



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Β ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΠΑΠΙΡΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΜΗΤΡΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΊΝΩΣΗΣ**

ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Κλινικός Χημικός

Αθήνα 2023

«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF MEDICINE

DOCTORAL DISSERTATION

**THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN THE PATHOGENESIS
OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS.**

KANELLOPOULOU PARASKEVI
Clinical Chemist

ATHENS 2023

«The implementation of the doctoral thesis was co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the Act “Enhancing Human Resources Research Potential by undertaking a Doctoral Research” Sub-action 2: IKY Scholarship Programme for PhD candidates in the Greek Universities».



Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning
Co-financed by Greece and the European Union



Στοιχεία Διδακτορικής διατριβής

Θέμα: «Ο ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ύψωσης».

Ημερομηνία υποβολής αίτησης στην Ιατρική Σχολή για ορισμό Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 12/12/2018

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

Ημερομηνία καθορισμού θέματος της διδακτορικής διατριβής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 19/04/2019

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 28/09/2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μάναλη Ευφροσύνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, επιβλέπων μέλος

Παπίρης Σπυρίδων, Καθηγητής Πνευμονολογίας-Εντατικής θεραπείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Αϊδίνης Βασίλης, Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Μάναλη Ευφροσύνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
2. Παπίρης Σπυρίδων, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
3. Λουκίδης Στυλιανός, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
4. Μπακάκος Πέτρος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
5. Ροβίνα Νικολέττα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
6. Παπαϊωάννου Ανδριάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
7. Αϊδίνης Βασίλης, Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Βαθμός: ΑΡΙΣΤΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσος

Ιπποκράτειος Όρκος

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ. ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΠΙΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΙΑ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΖΟΜΑΙ ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ ΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ'ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗΠΟΤΕ ΕΓΚΑΛΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ιπποκράτειος Όρκος

(Μετάφραση)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και τον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας, να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέλφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Στον μπαμπά μου....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που με βοήθησαν στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής.

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

Αισθάνομαι αρχικά την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Βασίλη Αϊδίνη, Ερευνητή Α, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διδακτορική διατριβή στο εργαστήριο του, την συνεχή επιστημονική του καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της εργασίας, την άψογη συνεργασία μας, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που έδειξε στο πρόσωπο μου από τη αρχή έως την ολοκλήρωση της διατριβής.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα έτερα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ευφροσύνη Μάναλη, επιβλέπουσα της διατριβής μου, καθώς και τον Καθηγητή κ. Σπυρο Παπίρη, για την χρόνο που αφιέρωσαν κατά την παρακολούθηση της συγκεκριμένης μελέτης, την φιλική διάθεση, την βοήθεια και την υποστήριξη που προσέφεραν, όποτε χρειάστηκε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Λουκίδη Στυλιανό, Καθηγητή, κ. Μπακάκο Πέτρο, Καθηγητή, κα. Ροβίνα Νικολέττα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, και κα. Παπαϊωάννου Ανδριάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια για το χρόνο που διέθεσαν.

Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους μου που συνυπήρξαμε στο εργαστήριο για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα και ιδιαίτερα τον Δημήτρη Νάστο, τον Αποστόλη Γαλάρη, τον Διονύση Φανίδη και την Χριστιάννα Μαγκριώτη για την άψογη συνεργασία που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως το οφείλω στην Ηλιάννα Μπαρμπαγιάννη. Η Ηλιάννα ήταν το πρώτο άτομο που με βοήθησε στο ξεκίνημα μου και συνεργαζόμασταν μαζί αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια. Πίστεψε από την αρχή στις δυνάμεις και στις δυνατότητες μου δείχνοντας μου έμπρακτα ότι πιστεύει πως μπορώ να φτάσω στο τέρμα, κίνηση που για μένα σημαίνει πολλά σε προσωπικό επίπεδο.

Κλείνοντας ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΠΠ) είναι μια χρόνια, προοδευτική διάμεση πνευμονοπάθεια άγνωστης αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από σχηματισμό ουλών και πάχυνση του πνευμονικού ιστού. Η ακριβής αιτία της ΠΠ δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά πιστεύεται ότι περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την ασθένεια και οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Δύο φάρμακα, η πιρφενιδόνη και το nintedanib, έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία της ΠΠ. Τα φάρμακα αυτά επιβραδύνουν την εξέλιξη και συμβάλλουν στην διαχείριση των συμπτωμάτων, παρόλα αυτά δεν θεραπεύουν πλήρως την ΠΠ.

Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες στην ίνωση παρουσιάζουν έναν παθολογικό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Η συσσώρευση ινοβλαστών έχει προταθεί ότι βασίζεται στην ικανότητα τους να εισβάλλουν στην ECM και/ή να μεταναστεύουν κατά μήκος της. Κρίσιμη για αυτές τις διαδικασίες είναι η πρωτεόλυση της ECM μέσω των κυτταρικών προεξοχών που είναι γνωστά ως ποδοσώματα. Τα ποδοσώματα και τα invadosodia (γνωστά με τον όρο invadosomes) είναι δομές πλούσιες σε ακτίνη με πρωτεολυτική δραστηριότητα, που οδηγεί στην αποικοδόμηση της ECM. Η SH3PXD2A (γνωστή ως TKS5) είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται και απαιτείται για το σχηματισμό των invadosomes. Μέχρι στιγμής, η Tks5 έχει βρεθεί να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον καρκίνο, συμμετέχοντας στην κυτταρική εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Είναι γνωστό ότι οι πνευμονικοί ινοβλάστες (ΠΠ) παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τα καρκινικά κύτταρα, ένα από αυτά είναι η εισβολή στην ECM. Έτσι, το TKS5 και τα ποδοσώματα μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της ΠΠ και, ως εκ τούτου, εξετάσαμε περαιτέρω τον ρόλο τους.

Αυξημένη έκφραση του TKS5 ανιχνεύθηκε στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΠΠ και ποντικών με επαγόμενη από μπλεομυκίνη (BLM) πνευμονική ίνωση, που συσχετίζεται με την αυξημένη έκφραση της αλυσίδας κολλαγόνου τύπου I άλφα 1 (COL1A1). Διαπιστώθηκε ότι το προϊνώτικό περιβάλλον ο TGFβ, καθώς και η ινωτική ECM, επάγουν την έκφραση του TKS5 και τον σχηματισμό ροζετών ποδοσωμάτων στους ΠΠ, που οδηγεί στην αυξημένη εισβολή στην ECM. Τα ποδοσώματα

διατηρήθηκαν *ex vivo* απουσία οποιασδήποτε διέγερσης, υποδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός ποδοσωμάτων με τη βοήθεια του TKS5 αποτελεί εγγενή ιδιότητα των ΠΙ της ΙΠΙ. Τα Tks5^{+/-} ποντίκια παρουσιάζονται ανθεκτικά στην επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση. Η προστασία από τη νόσο οφειλόταν σε μεγάλο βαθμό στον μειωμένο σχηματισμό ποδοσωμάτων στους ΠΙ και στη μειωμένη εισβολή της ECM, υποδεικνύοντας έτσι την ενεργοποίηση του TKS5 και τη διαμεσολαβούμενη από τα ποδοσώματα εισβολή της ECM ως κύριο παθογενετικό μηχανισμό στην πνευμονική ίνωση. Η ανάλυση προφίλ έκφρασης αποκάλυψε μια διασταυρούμενη σύνδεση ECM-ποδοσωμάτων και η φαρμακολογική ανάλυση χάρτη συνδεσιμότητας πρότεινε διάφορους αναστολείς που θα μπορούσαν να αποτρέψουν τον σχηματισμό ποδοσωμάτων και, συνεπώς, την πνευμονική ίνωση. Μεταξύ αυτών, η αναστολή της κινάσης Src φάνηκε να μετριάζει ισχυρά τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε ΠΙ, την εισβολή στην ECM, καθώς και την πνευμονική ίνωση σε τομές πνευμόνων κομμένες με ακρίβεια, μετά την χορήγηση BLM, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φαρμακολογική στόχευση του σχηματισμού ποδοσωμάτων μέσω του TKS5 είναι μια πολύ υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή στην πνευμονική ίνωση.

Επιπρόσθετα στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος του *Versican* (*Vcan*) στην παθογένεια της ΙΠΙ. Η *Versican* είναι μια μεγάλη πρωτεογλυκάνη της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) που εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα. Η εξωκυττάρια μήτρα είναι μια δυναμική δομή, που αποτελείται από περισσότερες από 300 πρωτεΐνες, γλυκοζαμινογλυκάνες και ένζυμα, και χρησιμεύει ως δομικό ικρίωμα συμβάλλοντας στη μηχανική σταθερότητα που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία των πνευμόνων. Η απορρύθμιση της σύνθεσης, της δομής, της ακαμψίας και της αφθονίας της ECM συμβάλλει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της ΙΠΙ. Λόγω των πολυάριθμων ενδείξεων ότι η ECM εμπλέκεται στην παθογένεια της ΙΠΙ, η *Versican*, ως συστατικό της ECM, θα μπορούσε να εμπλέκεται και ως εκ τούτου επιδιώξαμε την περαιτέρω μελέτη του.

In silico μελέτες, σε σύνολα δεδομένων ανθρώπων και ποντικών, αποκαλύπτουν αυξημένη έκφραση του *VCAN* σε ασθενείς με ΙΠΙ και σε πνεύμονες ποντικών με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Στους πνεύμονες ασθενών το *VCAN* εκφράζεται κυρίως από ινοβλάστες, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, όπου οι ΠΙ που εκφράζουν *VCAN* βρέθηκε ότι ανήκουν στον υποπληθυσμό

που εκφράζει *COL1A1* *In vitro* βρέθηκε ότι ο TGFβ διεγείρει την έκφραση του VCAN σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε πνευμονικούς ινοβλάστες που προέρχονται από ανθρώπους και ποντικούς. Επιπλέον, η δύσκαμπτη ινωτική aECM επάγει την έκφραση του *Vcan* στους ινοβλάστες. Σε *in vivo* πειράματα, αυξημένη έκφραση του *Vcan* βρέθηκε σε ποντίκια αγρίου τύπου με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Η ανοσοϊστοχημεία αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης *Vcan* στο βρογχικό επιθήλιο, στις ινωτικές περιοχές και στα μακροφάγα. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της *Vcan* στην ΙΠ, το μοντέλο της επαγόμενης από BLM πνευμονικής ίνωσης πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια *Vcan*^{+/-}. Η ετερόζυγη γενετική διαγραφή του *Vcan* οδηγεί σε επιδεινούμενο φαινότυπο πνευμονικής ίνωσης σε ποντίκια. Επίσης, η απομόνωση *Vcan*^{+/-} πρωτογενών ΙΠ αποκάλυψε διαφορές σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, ενώ η διέγερση με TGFβ, επηρεάζει την mRNA έκφραση ινωτικών γονιδίων και επάγει το σχηματισμό ροζετών ποδοσωμάτων, οδηγώντας σε αυξημένη εισβολή. Συμπερασματικά, η επιδείνωση της νόσου στα ποντίκια *Vcan*^{+/-} συσχετίζεται με τη διαταραχή της ομοιόστασης της ECM, τη διαφοροποίηση των αποκρίσεων του TGFβ, την αυξημένη προσκόλληση των ινοβλαστών και το σχηματισμό ποδοσωμάτων που οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση και εισβολή στην ECM.

ABSTRACT

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a chronic, progressive interstitial lung disease of unknown etiology, characterized by the scarring and thickening of the lung tissue. The exact cause of IPF is not fully understood, but it is believed to involve a complex interplay of genetic, environmental, and immune factors. Currently, there is no cure for the disease, and treatment options are limited. Two drugs, pirfenidone and nintedanib, have been approved by the FDA for the treatment of IPF. These drugs have been shown to slow the progression of the disease, and manage symptoms, but they do not fully cure IPF.

Fibroblasts and myofibroblasts in IPF demonstrate a pathologic phenotype characterized by uncontrolled proliferation and survival. Fibroblast accumulation has been suggested to rely on their ability to invade the ECM and/or to migrate along it. Critical for these processes is the proteolysis of the ECM through cell's protrusions known as podosomes. Podosomes and invadopodia (known as invadosomes) are actin rich structures of pericellular proteolytic activity, resulting in ECM degradation. SH3PXD2A (known as TKS5) is a scaffold protein that localizes to, and is required for invadosomes formation. So far, Tks5 has been found highly related with cancer, since induces cell invasion of cancer cells. It is known that lung fibroblasts shared common characteristics with cancer cells, including ECM invasion. So TKS5 and podosomes may be implicated in the pathogenesis of IPF, and therefore we further examined their role.

Increased expression of *TKS5*, was detected in the lung tissue of IPF patients and bleomycin (BLM)-treated mice, correlating with increased collagen type I alpha 1 chain (*COL1A1*) expression. The profibrotic milieu, TGF β , as well as the acellular fibrotic ECM, were found to induce *TKS5* expression and the formation of prominent podosome rosettes in LFs, culminating in increased ECM invasion. Podosomes were retained *ex vivo* in the absence of any stimulation, indicating that the formation of TKS5-enabled podosomes is an inherent property of IPF LFs. Haploinsufficient *Tks5*^{+/-} mice were relatively resistant to BLM-induced pulmonary fibrosis. Disease protection was largely attributable to diminished podosome formation in LFs and decreased ECM invasion, thus indicating TKS5-enabled and podosome-mediated ECM invasion as a major pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. Expression profiling revealed an ECM-podosome cross talk, and pharmacologic connectivity map analysis suggested

several inhibitors that could prevent podosome formation and thus pulmonary fibrosis. Among them, inhibition of Src kinase was shown to potently attenuate podosome formation in LFs, ECM invasion, as well as pulmonary fibrosis in post BLM precision cut lung slices, suggesting that pharmacological targeting of TKS5-enabled podosome formation is a very promising therapeutic option in pulmonary fibrosis.

In addition, in this dissertation the role of Versican in the pathogenesis of IPF was studied. Versican is a large extracellular matrix (ECM) proteoglycan that is present in various tissues, including the lung. Extracellular matrix is a dynamic structure, consisting of more than 300 proteins, glycosaminoglycans and enzymes, which serves as structural scaffold, and provides the mechanical stability for proper lung function. Dysregulation of ECM composition, structure, stiffness, and abundance contributes to several pathological conditions, including IPF. Due to the numerous indications that ECM is involved in the pathogenesis of IPF, Versican, as an ECM component, could be implicated and therefore we pursued its further study.

In silico studies, in human and mouse datasets, unveil upregulated expression of *VCAN* in IPF patients and murine lungs upon bleomycin induced pulmonary fibrosis. In IPF lungs *VCAN* is expressed mainly by fibroblasts, macrophages and dendritic cells, where *VCAN*-expressing LFs were found to belong to a *COL1A1*-expressing subpopulation. *In vitro* TGF β was found to stimulate *VCAN* mRNA and protein levels in human and mouse lung fibroblasts. Moreover, the stiff fibrotic aECM induces *Vcan* expression in fibroblasts. In *in vivo* experiments, *Vcan* was found increased in lungs of WT mice with bleomycin induced PF. Immunohistochemistry revealed increased levels of *Vcan* protein in bronchial epithelium, fibrotic areas and macrophages. To further dissect the role of *Vcan* in IPF, the BLM induced PF model performed in *Vcan*^{+/-} mice. Heterozygous genetic deletion of *Vcan* leads to exacerbated pulmonary fibrosis phenotype in mice. Also, isolation of haplo-insufficient *Vcan*^{+/-} primary LFs revealed differences in basic cell functions, while TGF- β 1 stimulation, affects the mRNA expression of fibrogenic genes and induces the formation of podosome rosettes, leading in increased invasion. In conclusion, disease exacerbation in *Vcan*^{+/-} mice was correlated with disturbed ECM homeostasis, modulation of TGF β responses, increased fibroblasts adhesion and the formation of podosomes leading in increased ECM migration and invasion.

Περιεχόμενα

Γενικό Μέρος.....	16
1.Εισαγωγή.....	17
1.1 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.	17
1.1.1 Ορισμός	17
1.1.2 Συμπτώματα.....	18
1.1.3 Διάγνωση	19
1.1.4 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΙΠΠ	21
1.1.5 Συνυπάρχουσες νόσοι (Comorbidities)	25
1.1.6 Εγκεκριμένες θεραπείες.....	28
1.1.7 Θεραπείες σε κλινικές δοκιμές	31
1.1.8 Μηχανισμός παθογένειας	35
1.1.9 Ο ρόλος του TGF-β1 στην παθογένεια της ΙΠΠ.....	43
1.1.10 Πειραματικό μοντέλο της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης.....	45
1.2 Εξωκυττάρια Μήτρα (Extracellular Matrix)	48
1.2.1 Εισαγωγή	48
1.2.2 Κύριες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας	49
1.2.3 Ένζυμα αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας μήτρας.....	54
1.2.4 Υποδοχείς και κυτταρική σηματοδότηση με τη μεσολάβηση της ECM.....	55
1.2.5 Η εξωκυττάρια μήτρα του πνεύμονα.....	57
1.2.6 Ο ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας στην ΙΠΠ.....	58
1.3 Το γονίδιο SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A /TKS5)	65
1.3.1 Δομή.....	65
1.3.2 Ρόλος	66
1.3.3. Podosomes και Invadopodia.....	68
1.3.4 Εμπλοκή του γονιδίου Tks5 στην κυτταρική μετανάστευση και στην εμβρυική ανάπτυξη.....	77
1.3.5 Εμπλοκή του γονιδίου Tks5 στην παθογένεια του καρκίνου	79
1.4 Το γονίδιο VERSICAN	80
1.4.1 Εισαγωγή	80
1.4.2 Versican-Δομή	81

1.4.3 Έκφραση.....	83
1.4.4 Βιοσύνθεση- Αποικοδόμηση	83
1.4.5 Συμμετοχή της versican στην συγκρότηση της εξωκυττάριας μήτρας	86
1.4.6 Ρόλος	94
1.4.7 Εμπλοκή του versican στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	98
1.4.8 Ο ρόλος του versican στην φλεγμονή	99
Ειδικό μέρος	109
2.1 Μελέτη του ρόλου του TKS5 και των ποδοσωμάτων στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης.....	110
2.1.1 Αυξημένη έκφραση <i>TKS5</i> στην πνευμονική ίνωση.....	111
2.1.2 Οι ροζέτες ποδοσωμάτων που προκαλούνται από τον TGFβ είναι μια εγγενής ιδιότητα των ινωτικών ΠΙ	115
2.1.3 Δημιουργία σειράς υποχρεωτικών και κατά επιλογή knock out ποντικών για το <i>Tks5</i> , με σκοπό την εξέταση του ρόλου του στην παθογένεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης.....	125
2.1.4 Η ετερόζυγη διαγραφή του γονιδίου <i>Tks5</i> σε ποντίκια μετριάζει την επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση.....	128
2.1.4 Η ετερόζυγη ανεπάρκεια του <i>Tks5</i> σε ΠΙ ποντικών μειώνει τον ρυθμιζόμενο από την ECM- σχηματισμό ποδοσωμάτων και την εισβολή στην ECM.....	131
2.1.5 Η αναστολή της Src μειώνει αποτελεσματικά το σχηματισμό ποδοσωμάτων και μετριάζει την πνευμονική ίνωση	138
Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	141
Υλικά και Μέθοδοι	145
Πίνακες	159
2.2 Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου Versican στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης.....	162
2.2.1 <i>In silico</i> μελέτη των επιπέδων έκφρασης σε ασθενείς με ΠΠ	162
2.2.2 <i>In vitro</i> μελέτη των επιπέδων έκφρασης σε σειρές πνευμονικών ινοβλαστών	164
2.2.3 <i>In vivo</i> μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου <i>Vcan</i> σε ποντίκια άγριου τύπου μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.....	170
2.2.5 Τα μειωμένα επίπεδα του γονιδίου <i>Vcan</i> οδηγούν σε χειρότερη πνευμονική ίνωση σε κατά επιλογή knockout ποντίκια.	177
2.2.6 Η γενετική διαγραφή του <i>Vcan</i> είτε από στρωματικά είτε από αιμοποιητικά κύτταρα επιδεινώνει την πνευμονική ίνωση	180

2.2.7 Ανάλυση φασματομετρίας μάζας στους πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα <i>Vcan</i> , μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.....	182
2.2.8 <i>In vitro</i> διέγερση των <i>Vcan</i> ^{+/-} πνευμονικών ινοβλαστών με TGFβ.	183
2.2.9 Η διαγραφή του Vcan από το aECM επηρεάζει τις κυτταρικές λειτουργίες των πνευμονικών ινοβλαστών άγριου τύπου, μετά από διέγερση TGFβ, και επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην οργάνωση της ECM, την προσκόλληση και τη μετανάστευση.	186
2.2.10 Οι Vcan ^{+/-} πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν προεξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, που οδηγούν σε αυξημένη εισβολή στην ECM.....	194
Συμπεράσματα Συζήτηση	197
3 Βιβλιογραφία.....	201

Γενικό Μέρος

1.Εισαγωγή

Η ίνωση είναι μια παθολογική διαδικασία των περισσότερων χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών. Ορίζεται ως η αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση συστατικών εξωκυττάριας μήτρας, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της αρχιτεκτονικής του φυσιολογικού ιστού και στην δυσλειτουργία λόγω της αντικατάστασης του φυσιολογικού παρεγχύματος από συνδετικό ιστό, ο οποίος αποτελείται από μόρια της παραγόμενης εξωκυττάριας μήτρας. Αν και εξαιρετικά προοδευτική, έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία των οργάνων και τον θάνατο. Η ίνωση επηρεάζει σχεδόν κάθε ιστό του σώματος. Μια από τις μορφές ίνωσης που προσβάλλει τους πνεύμονες χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF, ΙΠΙ).

1.1 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.

1.1.1 Ορισμός

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) είναι μια χρόνια, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη και τελικά θανατηφόρος ινώδης διάμεση πνευμονία, που χαρακτηρίζεται από κλιμακούμενα αναπνευστικά συμπτώματα και φυσιολογικές διαταραχές[1]. Η ΙΠΙ είναι η πιο συχνή νόσος από τις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες και χαρακτηρίζεται από την προοδευτική ουλοποίηση του πνεύμονα και αντικατάσταση του φυσιολογικού πνευμονικού παρεγχύματος με ινώδη. Η νόσος ορίζεται με βάση την παρουσία μιας ακτινογραφικής και/ή ιστοπαθολογικού προτύπου της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (Usual interstitial pneumonia, UIP) ενώ η διάμεση επιβίωση κυμαίνεται στα 3-5 έτη από την διάγνωση[1, 2].

Επιπολασμός

Η μελέτη της επιδημιολογίας της πνευμονικής ίνωσης αποτελεί πρόκληση επειδή η επίπτωση της νόσου και η συχνότητα εμφάνισης διαφοροποιούνται μεταξύ μελετών, με τις πιο πρόσφατες να δείχνουν ότι η επίπτωση και η θνησιμότητα της ΙΠΙ αυξάνονται με την πάροδο των χρόνων[3, 4]. Ωστόσο, η πραγματική επίπτωση και ο επιπολασμός της ΙΠΙ δεν είναι εύκολο να υπολογιστούν. Πολλές από τις υπάρχουσες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πριν τη θέσπιση του ενιαίου ορισμού και των διαγνωστικών κριτηρίων για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση από τους ATS/ERS[5]. Επιπλέον, σε κάθε μια από τις μελέτες διαφέρει ο σχεδιασμός, η μεθοδολογία και ο

πληθυσμός που επιλέγεται, γεγονός που δυσκολεύει την σύγκριση μεταξύ των μελετών για την διεξαγωγή ενός συνολικού συμπεράσματος για την επιδημιολογία.

Η επίπτωση της ΙΠΠ κυμαίνονται μεταξύ 0,09 και 1,30 ανά 10.000 άτομα παγκοσμίως. Συνολικά, οι χώρες με τον υψηλότερο φαινομενικό επιπολασμό της ΙΠΠ περιλαμβάνουν τη Νότια Κορέα, τον Καναδά, την Πολωνία, τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ιταλία[6]. Στις ΗΠΑ, ο επιπολασμός της ΙΠΠ ποικίλλει από 14 έως 63 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού, ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται και τον κριτήριο κατηγοριοποίησης των ασθενών με ΙΠΠ. Στις ευρωπαϊκές χώρες, οι υπάρχουσες μελέτες διαφέρουν στην μεθοδολογία επιλογής του πληθυσμού και στην κατηγοριοποίηση που ακολουθείται με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλο εύρος μεταξύ των διαφορετικών κρατών. Παρόλα αυτά ο επιπολασμός στις ευρωπαϊκές χώρες είναι σε γενικές γραμμές χαμηλότερος από τις ΗΠΑ[6].

Στην Ελλάδα, η επίπτωση της ΙΠΠ υπολογίζεται σε 0.93 ανά 100.000 άτομα, ενώ ο επιπολασμός υπολογίστηκε σε 3,38 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού. Από τότε, ωστόσο, τα διαγνωστικά κριτήρια, οι διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές, η τυπική ιατρική περίθαλψη και η σύνθεση του πληθυσμού έχουν αλλάξει, και πιθανώς αυτά τα δεδομένα δεν αντικατοπτρίζουν τον τρέχοντα πληθυσμό ασθενών με ΙΠΠ[7, 8].

Οι άντρες προσβάλλονται από ΙΠΠ συχνότερα από τις γυναίκες. Οι ασθενείς με τη νόσο είναι συνήθως μέσης ηλικίας (άνω των 50 ετών). Οι θάνατοι από ΙΠΠ αυξάνονται σημαντικά με την ηλικία. Μία συνολική εκτίμηση δείχνει ότι τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης των ασθενών με ΙΠΠ αναφέρονται κοντά στο 30%, ποσοστά επιβίωσης παρόμοια με αυτά του καρκίνου του πνεύμονα[9, 10].

1.1.2 Συμπτώματα

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι δύσκολο να διαγνωστεί επειδή τα συμπτώματά της είναι παρόμοια με άλλες πνευμονικές παθήσεις. Για τον λόγο αυτό παρατηρούνται σημαντικές καθυστερήσεις μεταξύ της εμφάνισης των συμπτωμάτων και της διάγνωσης της ΙΠΠ, με μέσο χρόνο διάγνωσης 1-2 έτη μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών εμφανίζει αναπνευστικά συμπτώματα αρκετά χρόνια πριν από τη διάγνωση. Δεδομένου ότι αυτά τα συμπτώματα είναι μη ειδικά, οι ασθενείς μπορεί επίσης να διαγνωστούν εσφαλμένα με άλλες καρδιακές και πνευμονικές παθήσεις, όπως άσθμα, ΧΑΠ ή με καρδιακή ανεπάρκεια[1]. Συνήθως, οι ασθενείς με ΙΠΠ παρουσιάζουν δύσπνοια κατά την άσκηση (δυσκολία αναπνοή κατά τη

δραστηριότητα), με ή χωρίς ξηρό βήχα. Ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν πληκτροδοκτυλία. Όσο η νόσος εξελίσσεται οι ασθενείς παρουσιάζουν οξεία αναπνευστική επιδείνωση, συχνά συνοδευόμενη από βήχα και πυρετό[10]. Η επιδείνωση των συμπτωμάτων δυσκολεύει τους ασθενείς στην εκτέλεση εργασιών που απαιτούν ακόμη και ήπια προσπάθεια, γεγονός που οδηγεί σε επιπτώσεις σε πολλές πτυχές της ζωής των ασθενών συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας, της κοινωνικής συμμετοχής και της απασχόλησης. Η διαχείριση των συμπτωμάτων και η υποστηρικτική φροντίδα είναι σημαντικά στοιχεία της διαχείρισης της ΙΠΠ[11].

1.1.3 Διάγνωση

Η μη ύπαρξη ειδικών συμπτωμάτων καθιστά την διάγνωση της ΙΠΠ ένα δύσκολο εγχείρημα για τους κλινικούς ιατρούς. Επίσης, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν συννοσηρότητες, και εκτός από ΙΠΠ, πάσχουν και από άλλες αναπνευστικές και μη αναπνευστικές παθήσεις που περιπλέκουν την ασθένειά τους, όπως πνευμονική υπέρταση, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, εμφύσημα, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, καρδιαγγειακή νόσο, αποφρακτική άπνοια ύπνου και κατάθλιψη[11].

Για την διάγνωση της νόσου απαιτείται μια σειρά εξετάσεων και λήψη λεπτομερούς ιστορικού του ασθενούς, ώστε να μπορέσει ο ιατρός να αποκλείσει άλλες πιθανές αιτίες εμφάνισης των συμπτωμάτων (άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες) και να επιβεβαιώσει την ύπαρξη της ΙΠΠ. Οι συνήθεις εξετάσεις που πραγματοποιούνται, πέρα από αιματολογικές, είναι η φυσική εξέταση του ασθενούς, δοκιμές απεικόνισης του πνεύμονα (ακτινογραφία θώρακα -chest X-ray, αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας-HRCT), δοκιμασίες αναπνευστικής λειτουργίας, βιοψία του πνεύμονα[12].

Μετά το 2011, θεσπίστηκαν οι ATS/ERS/JRS/ALAT κατευθυντήριες οδηγίες που σε συνδυασμό με τις βιοχημικές εξετάσεις, αποτελούν ένα χρήσιμο όπλο για την διάγνωση αναπνευστικών παθήσεων και ειδικότερα της ΙΠΠ[13]. Οι κατευθυντήριες οδηγίες ATS/ERS/JRS/ALAT αναφέρονται στις κατευθυντήριες γραμμές κλινικής πρακτικής που έχουν αναπτυχθεί από τέσσερις μεγάλες αναπνευστικές εταιρείες: την Αμερικανική Θωρακική Εταιρεία (ATS), την Ευρωπαϊκή Αναπνευστική Εταιρεία (ERS), την Ιαπωνική Αναπνευστική Εταιρεία (JRS) και τη Λατινοαμερικανική Θωρακική Εταιρεία (ALAT). Οι εν λόγω κατευθυντήριες γραμμές αποσκοπούν στην παροχή τεκμηριωμένων συστάσεων για τη διάγνωση, τη θεραπεία και τη διαχείριση διαφόρων αναπνευστικών παθήσεων και καταστάσεων.

Οι κατευθυντήριες γραμμές αναπτύχθηκαν μέσω μιας αυστηρής διαδικασίας που περιλαμβάνει συστηματική ανασκόπηση της διαθέσιμης βιβλιογραφίας, αξιολόγηση της ποιότητας των δεδομένων και διατύπωση συστάσεων με βάση τα καλύτερα διαθέσιμα στοιχεία. Οι κατευθυντήριες γραμμές επικαιροποιούνται τακτικά[14] ώστε να αντικατοπτρίζουν τις εξελίξεις στον τομέα και τις αλλαγές στην κλινική πρακτική. Οι κατευθυντήριες γραμμές κλινικής πρακτικής ATS/ERS/JRS/ALAT καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αναπνευστικών παθήσεων, όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η πνευμονική εμβολή, η άπνοια ύπνου και ο καρκίνος του πνεύμονα, μεταξύ άλλων.

Οι ATS/ERS/JRS/ALAT κατευθυντήριες οδηγίες παρέχουν τεκμηριωμένες συστάσεις σχετικά με τη διάγνωση, την αξιολόγηση και τη διαχείριση της ΙΠΙ. Οι οδηγίες περιέχουν ενότητες για τον ορισμό και την επιδημιολογία, τη σταδιοποίηση, τη διάγνωση, τους παράγοντες κινδύνου, το ιστορικό, την πρόγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Για τις ενότητες διάγνωσης και θεραπείας, εφαρμόστηκε μια μεθοδολογία βασισμένη σε στοιχεία GRADE σε μορφή ερωτήσεων. Για κάθε ερώτηση διάγνωσης και θεραπείας, η επιτροπή βαθμολόγησε την ποιότητα των διαθέσιμων στοιχείων (υψηλή, μέτρια, χαμηλή ή πολύ χαμηλή)[13]. Ο επίσημος ορισμός της ΙΠΙ με βάση την οδηγία είναι: «μια ειδική μορφή χρόνιας, προοδευτικής ινωτικής διάμεσης πνευμονίας άγνωστης αιτίας, που εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένους ενήλικες, περιορίζεται στους πνεύμονες και σχετίζεται με το ιστοπαθολογικό ή/και ακτινολογικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP).» Οι οδηγίες επικεντρώνονται επίσης στην σημασία της αξονικής τομογραφίας υψηλής ευκρίνειας (HRCT) στη διάγνωση της ΙΠΙ, ως ένα ουσιαστικό στοιχείο του διαγνωστικού αλγορίθμου[15]. Με βάση τα ευρήματα της HRCT, το απεικονιστικό μοτίβο μπορεί περαιτέρω να χαρακτηριστεί ως μοτίβο συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP) "μοτίβο UIP", "πιθανό μοτίβο UIP" ή "δεν συνάδει με το πρότυπο UIP". Αν και η θετική προγνωστική αξία μιας διάγνωσης HRCT της UIP είναι 90% έως 100%, οι ασθενείς με μελέτες HRCT που δεν παρουσιάζουν το πρότυπο UIP μπορεί να έχουν ακόμη ιστολογική διάγνωση UIP στη βιοψία πνεύμονα[14]. Με βάση τις επικαιροποιημένες οδηγίες συνιστάται διαφορετική προσέγγιση εξέτασης και θεραπείας με βάση το αν ο ασθενής έχει HRCT με μοτίβο UIP ή με διαφορετικό μοτίβο UIP[15].

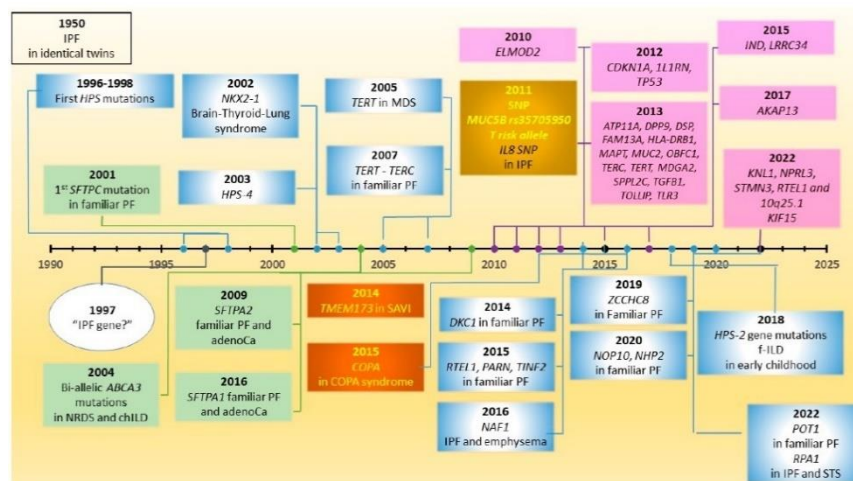
1.1.4 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΙΠΠ

1.1.4.1 Γενετικοί Παράγοντες

Παρόλο που η ΙΠΠ θεωρείται νόσος άγνωστης αιτιολογίας, πολλαπλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση της. Η παραδοσιακή άποψη ότι η ΙΠΠ είναι μια σποραδική νόσος άγνωστης αιτιολογίας που περιορίζεται στους πνεύμονες και προσβάλλει ανθρώπους μεγαλύτερης ηλικίας, αμφισβητήθηκε την τελευταία δεκαετία από την κλινική παρατήρηση ότι αναπτύσσεται 10 φορές συχνότερα σε μέλη οικογενειών ως μέρος μιας πολυσυστηματικής, κληρονομικής νόσου των τελομερών (σύνδρομο βραχέων τελομερών, short telomeres syndrome STS). Επιπλέον, το γεγονός ότι ορισμένες μορφές διάμεσης πνευμονοπάθειας αναπτύσσονται σε πολύ νεαρή ηλικία (παιδική διάμεση πνευμονοπάθεια, children's interstitial lung disease-chILD), παρείχαν ενδείξεις για την ύπαρξη κληρονομικής συνιστώσας στην ΙΠΠ[16].

Ο όρος οικογενής πνευμονική ίνωση χρησιμοποιείται για να περιγράψει το φάσμα της ινωτικής πνευμονικής νόσου που προκύπτει από κληρονομικούς παράγοντες[1]. Η οικογενής ΙΠΠ έχει βρεθεί στο επίκεντρο έντονων ερευνών από το 1950, όταν πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες διαγνώσεις ΙΠΠ σε πανομοιότυπους διδύμους, εγείροντας ερωτήματα σχετικά με την παρουσία ενός "γονιδίου ίνωσης"[16]. Η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού πνευμονικής ίνωσης αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου και για κακή έκβαση. Ένας ή περισσότεροι γενετικοί παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της οικογενούς ΙΠΠ[17].

Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 20 μεταλλάξεις (Εικόνα 1) σε γονίδια που εμπλέκονται στην άμυνα του ξενιστή, την προσκόλληση κυττάρων και την επιδιόρθωση του DNA, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην γενετική μετάδοση της νόσου, αποδεικνύοντας ότι η ΙΠΠ θα μπορούσε να θεωρηθεί μια πολυγονιδιακή νόσος με πολλές γενετικές παραλλαγές που εμπλέκονται στην ευαισθησία της νόσου, η οποία αφορά την εμφάνιση οικογενών αλλά και σποραδικών περιστατικών.



Εικόνα 1 Ανακαλύψεις γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΙΠΠ[16].

MUC5B

Το MUC5B είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που ονομάζεται Mucin 5B, η οποία αποτελεί συστατικό της βλέννας στην αναπνευστική οδό. Το 2011 σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε οικογένειες με ΙΠΠ, εντοπίστηκε μια περιοχή του χρωμοσώματος 11p15, που σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου. Η χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε, οδήγησε στην ανακάλυψη ενός πολυμορφισμού στο επίπεδο του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism- SNP) στην περιοχή υποκινητή του MUC5B, που έχει επίδραση στον κίνδυνο εμφάνισης είτε οικογενών είτε σποραδικών μορφών ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας[16]. Αυτό το εύρημα έχει επικυρωθεί και σε άλλες μελέτες και αυτός ο πολυμορφισμός παραμένει ισχυρός παράγοντας κινδύνου για πνευμονική ίνωση[18]. Ο πολυμορφισμός αυτός, οδηγεί σε υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης, η οποία μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη ΙΠΠ[1].

Ο πολυμορφισμός του υποκινητή MUC5B είναι ειδικός για την πνευμονική ίνωση, καθώς δεν έχει εντοπιστεί σημαντική συσχέτιση με άλλες πνευμονικές παθήσεις. Μάλιστα, φαίνεται να είναι προβλεπτικός και προγνωστικός παράγοντας της εξέλιξης της ΙΠΠ, καθώς μπορεί χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό ατόμων με προ κλινικές μορφές ΙΠΠ. Οι ασθενείς με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό παρουσιάζουν αυξημένη επιβίωση που πιθανόν οφείλονται στην ενισχυμένη άμυνα του ξενιστή. Επιπλέον, η παραλλαγή του υποκινητή MUC5B φαίνεται να προσδιορίζει έναν υπό-τύπο της ΙΠΠ που μπορεί να διαγνωστεί νωρίτερα και έχει πιο καλοήγη πορεία [18].

TOLLIP

Η TOLLIP (Toll-interacting protein) είναι μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη με ποικίλες δράσεις σε όλο το σώμα. Μπορεί να λειτουργήσει ως αναστολέας της φλεγμονής, ως ενεργοποιητής της αυτοφαγίας ή ως κρίσιμος ρυθμιστής της ενδοκυτταρικής διακίνησης. Οι διακριτές λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης έχουν συνδεθεί με τις έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα.

Οι γενετικές παραλλαγές της πρωτεΐνης TOLLIP έχουν συσχετιστεί με πολλές χρόνιες πνευμονικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της ΙΠΠ[19], μέσω συμμετοχής της στην αυτοφαγία και την απόπτωση. Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) έχουν εντοπίσει τρεις SNPs, (rs111521887, rs5743894 και rs5743890), οι οποίοι σχετίζονται με μειωμένη έκφραση της TOLLIP και αυξημένη ευαισθησία στην ΙΠΠ[1, 16, 20].

AKAP 13

Οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide exchange factors -GEF) είναι πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικές περιοχές που ενεργοποιούν μονομερείς GTPάσες διεγείροντας την απελευθέρωση διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) με σκοπό την δέσμευση τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP)[1]. Η AKAP13, είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Rho (RhoGEF) που ρυθμίζει την ενεργοποίηση της Rho A, μορίου με γνωστό ρόλο σε προινωτικά μονοπάτια σηματοδότησης.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΙΠΠ, εντοπίστηκε ένας SNP (rs62025270), ο οποίος εμπλέκει την AKAP13 ως πιθανό παράγοντα παθογένειας της ΙΠΠ, οδηγώντας σε αυξημένη ευαισθησία στην νόσο και σε αυξημένη έκφραση της AKAP13 στον πνευμονικό ιστό ασθενών [1, 16, 21].

Τελομεράση και διατήρηση του μήκους των τελομερών

Η τελομεράση είναι μια εξειδικευμένη πολυμεράση που προσθέτει επαναλήψεις τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Το μήκος των τελομερών περιορίζει την αναπαραγωγική ικανότητα των ιστών και έχει ενοχοποιηθεί για ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία[22]. Το 2007, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες ανέφεραν τη συσχέτιση μεταλλάξεων της τελομεράσης και της ανάπτυξης

οικογενούς ΙΙΙ σε ενήλικες. Οι μελέτες θεωρούσαν αρχικά υπεύθυνες για την ανάπτυξη της ΙΙΙ μόνο τις μεταλλάξεις στην αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT) και στο συστατικό RNA του συμπλόκου της τελομεράσης (TERC), που είναι και τα δύο υπεύθυνα για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών.

Στη συνέχεια, η ανακάλυψη μεταλλάξεων σε πολυάριθμα γονίδια διατήρησης των τελομερών (*PARN*, *RTEL1*, *DKC*, *TINF21*), καθιέρωσε το ρόλο αυτής της οδού στον κίνδυνο εμφάνισης ΙΙΙ και οδήγησε στην αναγνώριση των παθογενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια που σχετίζονται με το μήκος των τελομερών ως αιτία εμφάνισης του 30% των περιπτώσεων οικογενειακής ΙΙΙ. Τα μικρότερα τελομερή στα σωματικά κύτταρα οδηγούν σε απόπτωση και γήρανση κυττάρων, όπως τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου 2 του πνεύμονα (AECs), και σε απώλεια της ανθεκτικότητας και της ικανότητας επιδιόρθωσης. Μειωμένο μήκος τελομερών παρατηρείται επίσης σε ένα ποσοστό των σποραδικών περιπτώσεων ΙΙΙ, αλλά σε λιγότερο από το 2% των ενήλικων ασθενών[16]

Γονίδια σχετιζόμενα με επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες

Οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες (surfactant proteins) παράγονται κυρίως στον πνεύμονα από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου ΙΙ και είναι ζωτικής σημασίας για την κυψελιδική ομοιοστάση. Απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μετά από τραυματισμό και σε ασθένειες. Υπάρχουν 4 τύποι επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών γνωστές ως SFTPA, SFTPB, SFTPC, SFTPD

Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί στην SFTPC οδηγούν σε οικογενή πνευμονοπάθεια με πολύ υψηλή διεισδυτικότητα σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, και συσσώρευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη μέσω μη φυσιολογικής ανακύκλωσης από τα ενδοσώματα. Οι μεταλλάξεις των SFTPA2 και SFTPA1 οδηγούν σε μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών, οδηγώντας στην δέσμευση τους από τα AEC2, και συσχετίζονται με φαινότυπο ILD σε μεγάλες οικογένειες με πολλαπλά μέλη. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την SFTPD δεν έχουν εντοπιστεί στην ΙΙΙ, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την (SFTPB) συνδέονται συνήθως με νεογνικό RDS (Respiratory distress syndrome)[16].

1.1.4.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Αρκετές περιβαλλοντικές εκθέσεις οι οποίες στοχεύουν το πνευμονικό επιθήλιο αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΙΙΙ. Τα περισσότερα δεδομένα συσχετίζουν το

κάπνισμα τόσο με την σποραδική όσο και με την οικογενή ΙΠΠ. Παρόλο που το κάπνισμα δεν αποτελεί αιτία, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ως ο κύριος παράγοντας κινδύνου. Επιπλέον οδηγεί σε εμφάνιση εντονότερων συμπτωμάτων και μειώνει την λειτουργία των πνευμόνων[23].

Ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης της ΙΠΠ, συνδέεται επίσης με ορισμένα επαγγέλματα όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία, καθώς και σε επαγγέλματα στα οποία υπάρχει έκθεση σε σκόνη ξύλου, σκόνη μετάλλων, σκόνη πέτρας και πυρίτιο. Επίσης, η έκθεση σε αυξημένα επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης έχει συνδεθεί με την αυξημένη επίπτωση και την αυξημένη θνησιμότητα της ΙΠΠ[1].

Αρκετές μελέτες έχουν επίσης προτείνει την εμπλοκή των ιών στην παθογένεια της ΙΠΠ. Για παράδειγμα, ο ιός Epstein-Barr (EBV), έχει ανιχνευθεί στο κυψελιδικό επιθήλιο ασθενών με ΙΠΠ. Επιπλέον, στα AEC2, λανθάνοντες ανθρώπινοι ερπητοϊοί συν εντοπίζονται με δείκτες του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, η οποία είναι μια διαδικασία που έχει συσχετιστεί με την παθογένεια της ΙΠΠ.

Μελέτες που αξιολογούν το ρόλο των βακτηρίων στην παθογένεια της ΙΠΠ είναι ακόμα σε πρωιμο στάδιο. Οι πνεύμονες των ασθενών με ΙΠΠ έχουν υψηλότερα βακτηριακά φορτία και σημαντικές διαφορές στη σύνθεση και την ποικιλομορφία των μικροβίων σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου. Στους ασθενείς με ΙΠΠ, έχουν παρατηρηθεί αυξήσεις σε διάφορα δυνητικά παθογόνα βακτήρια όπως ο στρεπτόκοκκος και ο σταφυλόκοκκος. Είναι σημαντικό ότι αυτές οι μεταβολές στα μικρόβια των πνευμόνων, έχουν συσχετιστεί με κλινικούς δείκτες της εξέλιξης της νόσου και με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Την προηγούμενη δεκαετία, οι μικροαπορροφήσεις του γαστρικού περιεχομένου έχουν προταθεί ως άλλη πιθανή αιτία πρόκλησης βλάβης στο πνευμονικό επιθήλιο των ασθενών. Προς υποστήριξη αυτής της αντίληψης, ο επιπολασμός της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης είναι αυξημένος σε ασθενείς με ΙΠΠ. Αν και όλοι αυτοί οι παράγοντες κινδύνου θα μπορούσαν να συμβάλουν στην επιθηλιακή βλάβη, απαιτούνται περαιτέρω στοιχεία για να υποστηριχθεί μια αιτιώδης σχέση μεταξύ οποιουδήποτε παράγοντα κινδύνου και της παθογένειας ή της εξέλιξης της νόσου[10].

1.1.5 Συνυπάρχουσες νόσοι (Comorbidities)

Οι συνυπάρχουσες νόσοι που αφορούν τους πνεύμονες ή άλλο όργανο, αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως σημαντικός παράγοντας πρόγνωσης σε

ασθενείς με ΙΠΠ[10]. Στην αναζήτηση των νέων θεραπευτικών επιλογών στην ΙΠΠ, καθίσταται ακόμη πιο σημαντική η κατανόηση των κρίσιμων συννοσηροτήτων, καθώς επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής και την επιβίωση[1]. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΙΠΠ κατέδειξε ότι το 12% των ασθενών δεν είχαν καμία συνυπάρχουσα ασθένεια, ενώ η πλειοψηφία (58%) των ασθενών είχαν 1-3 συννοσηρότητες ενώ το 30% είχαν 4-7 συνυπάρχουσες παθήσεις[24]. Οι σημαντικότερες από τις συννοσηρότητες που έχουν συσχετιστεί με την ΙΠΠ είναι:

Συνυπάρχουσες νόσοι του πνεύμονα

Από τις πνευμονικές συννοσηρότητες, η πνευμονική η υπέρταση είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη- ο επιπολασμός της ποικίλλει με τα ποσοστά να κυμαίνονται στο 30-50% των ασθενών[10]. Η Πνευμονική υπέρταση έχει επαληθευτεί στο 14% των ασθενών με ΙΠΠ και ήπια έως μέτρια μείωση της πνευμονικής λειτουργίας, και στο 30-50% των ασθενών με πιο προχωρημένη ΙΠΠ[1]. Η παρουσία πνευμονικής υπέρτασης σε ασθενείς με ΙΠΠ, σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση, με τις διαθέσιμες θεραπευτικές δοκιμές να μην είναι επιτυχείς[10].

Εμφύσημα και/ή Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) έχουν αναφερθεί στο 6-67% των ασθενών με ΙΠΠ, ανάλογα με τα βασικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης [24]. Η συνύπαρξη εμφυσήματος και/ή ΧΑΠ με ΙΠΠ μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότερα αναπνευστικά συμπτώματα, ταχύτερη πτώση της πνευμονικής λειτουργίας και χειρότερη έκβαση σε σύγκριση με οποιαδήποτε από τις δύο νόσους μόνη της. Επιπλέον, η παρουσία εμφυσήματος σε ασθενείς με ΙΠΠ μπορεί να περιπλέξει τη διάγνωση και τη διαχείριση της ΙΠΠ, καθώς οι δύο νόσοι μπορεί να έχουν επικαλυπτόμενα κλινικά και ακτινολογικά χαρακτηριστικά[1].

Αρκετές μελέτες αναφέρουν αυξημένη επίπτωση καρκίνου του πνεύμονα σε ασθενείς με ΙΠΠ, με τον επιπολασμό να κυμαίνεται από 2,7% έως 48%. Η ηλικία και το κάπνισμα έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες συσχέτισης μεταξύ καρκίνου του πνεύμονα και ΙΠΠ. Η έγκαιρη αναγνώριση του καρκίνου σε ασθενείς με ΙΠΠ φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για έγκαιρες θεραπευτικές παρεμβάσεις[25]. Παρόλο που το αδενοκαρκίνωμα είναι ο συχνότερος τύπος του καρκίνου του πνεύμονα στο γενικό πληθυσμό, ο πιο συχνός τύπος καρκίνου που συναντάται σε ασθενείς με ΙΠΠ είναι το πλακώδες καρκίνωμα[25, 26]. Η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε ασθενείς με

ΙΠΙ έχει σημαντικά αρνητικό αντίκτυπο στην επιβίωση, με έως και 5 φορές υψηλότερη θνησιμότητα[1, 27].

Συνυπάρχουσες νόσοι άλλων οργάνων

Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αντιπροσωπεύει την πιο συχνά συναντούμενη ενδοκρινική συννοσηρότητα σε ασθενείς με ΙΠΙ, με τον επιπολασμό να κυμαίνεται από 10 έως 39%[28]. Τα διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ του διαβήτη και της πνευμονικής λειτουργίας, αλλά ο ακριβής μηχανισμός της συσχέτισης είναι ασαφής. Πιστεύεται ότι η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία στο σώμα προάγει την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης, είτε μέσω άμεσης βλάβης των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων (AECs) είτε συμμετέχοντας στη δημιουργία άλλων προ-φλεγμονωδών και προ-ινωτικών παραγόντων. Αναλύσεις έχουν δείξει ότι οι ενήλικες με διαβήτη παρουσιάζουν μειωμένες πνευμονικές λειτουργίες (FVC) σε σύγκριση με τους ενήλικες χωρίς διαβήτη, ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και το κάπνισμα[29]. Αν και ο πνεύμονας δεν είναι το κύριο όργανο των διαβητικών επιπλοκών, οι ασθενείς που πάσχουν και από τις δύο ασθένειες αναφέρουν επιδείνωση της πρόγνωσης[30].

Γαστροοισοφαγική Παλινδρόμηση

Η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι δύο παθολογικές καταστάσεις που συχνά σχετίζονται στενά, αν και δεν έχει αποδειχθεί ο τρόπος. Μελέτες δείχνουν ότι η νόσος είναι πιο συχνή σε ασθενείς με ΙΠΙ απ' ό,τι στο γενικό πληθυσμό. Ομοίως, σε μια μελέτη πάνω από 100.000 ατόμων με οισοφαγίτιδα, ο επιπολασμός της πνευμονικής ίνωσης ήταν σημαντικά υψηλότερος από ό,τι στους υγιείς μάρτυρες. Τέλος, η επίπτωση της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης αυξάνεται συνεχώς στους ασθενείς με ΙΠΙ[31].

Αποφρακτική άπνοια

Η αποφρακτική άπνοια ύπνου (Obstructive sleep apnea, OSA) εκτιμάται ότι εμφανίζεται σε περίπου 20% των ηλικιωμένων ενηλίκων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ΙΠΙ αποδείχθηκε ότι η συντριπτική πλειονότητα των ασθενών (88%) εμφάνισε άπνοια. Η άπνοια φαίνεται ως μια ιδιαίτερα διαδεδομένη συννοσηρότητα στην ΙΠΙ και προτείνεται όλοι οι ασθενείς με ΙΠΙ να εξετάζονται για άπνοια[32].

Καρδιαγγειακές παθήσεις

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Cardiovascular Diseases,CVD) είναι μια ομάδα παθήσεων που επηρεάζουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Η ΙΠΠ και οι καρδιαγγειακές παθήσεις μοιράζονται αρκετούς κοινούς παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η ηλικία και το ανδρικό φύλο. Επιπλέον, μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι οι ασθενείς με ΙΠΠ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών και το αντίστροφο. Οι μηχανισμοί που διέπουν τη σχέση μεταξύ ΙΠΠ και CVD δεν είναι απολύτως σαφείς, αλλά πιστεύεται ότι η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες που σχετίζονται με την ΙΠΠ μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των CVD. Ομοίως, η CVD μπορεί να προκαλέσει υποξία στους πνεύμονες, η οποία μπορεί να επιδεινώσει τα συμπτώματα της ΙΠΠ. Η διαχείριση της συνυπάρχουσας CVD σε ασθενείς με ΙΠΠ είναι απαραίτητη, καθώς μπορεί να βελτιώσει τόσο την ποιότητα ζωής όσο και τη συνολική πρόγνωση[24, 33].

Λοίμωξη από ερπητοϊό

Οι ιοί είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της ΙΠΠ και μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως συννοσηρότητες. Η χρόνια ιογενής λοίμωξη, ιδίως από μέλη της οικογένειας του ερπητοϊού, έχει προταθεί ως μηχανισμός με τον οποίο τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να υποστούν επαναλαμβανόμενο τραυματισμό που οδηγεί σε απορυθμισμένη απόκριση επιδιόρθωσης στην ΙΠΠ. Στον πνευμονικό ιστό και στον ορό ασθενών με ΙΠΠ διαπιστώθηκε ότι το 97% αυτών βρέθηκαν θετικοί σε τουλάχιστον έναν ερπητοϊό (ιός Epstein-Barr (EBV), κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ανθρώπινος ερπητοϊός-7 (HHV-7) και ο ανθρώπινος ερπητοϊός-8 (HHV-8)), σε σύγκριση με το 35% των ατόμων ελέγχου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι ερπητοϊοί, μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΙΠΠ[34].

1.1.6 Εγκεκριμένες θεραπείες

Η πορεία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι συνήθως ανεξέλεγκτη και προοδευτικά επιδεινούμενη, χωρίς να αναφέρονται αυτόματες υφέσεις. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών κυμαίνεται μεταξύ 4 και 6 ετών από τη στιγμή της διάγνωσης. Η μεταμόσχευση πνευμόνων είναι η μοναδική επιλογή θεραπείας που έχει αποδειχθεί ότι ωφελεί τους ασθενείς. Παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει προς την κατεύθυνση της φαρμακευτικής θεραπείας, δεν έχει ανακαλυφθεί θεραπεία που αποδεδειγμένα να βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών με ΙΠΠ. Το γεγονός ότι η

παθογένεια της νόσου δεν είναι απόλυτα κατανοητή πιθανότατα να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην εύρεση αποτελεσματικών θεραπειών[35]. Στις πιθανές θεραπείες της ΙΠΠ περιλαμβάνονται τα κορτικοειδή, αντι-ινωτικοί και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω.

Κορτικοειδή

Το σκεπτικό για τη χορήγηση των κορτικοειδών είναι η καταστολή της κυψελίτιδας. Ο ακριβής μηχανισμός με το οποίο τα κορτικοειδή επιδρούν στα κύτταρα της φλεγμονής δεν είναι γνωστός. Πιστεύεται ότι καταστέλλουν τη μετανάστευση ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα, διαφοροποιούν τη λειτουργία των μακροφάγων και επηρεάζουν την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο επιθήλιο. Σε παλαιότερες μελέτες, φαίνεται ότι περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με διάμεσες πνευμονοπάθειες που λαμβάνουν κορτικοειδή βελτιώνονται[36]. Νεότερες μελέτες, έχουν δείξει ότι τα κορτικοειδή δεν βελτιώνουν την έκβαση των ασθενών με ΙΠΠ και μπορεί στην πραγματικότητα να είναι επιβλαβή[37-41].

Πιρφενιδόνη

Η πιρφενιδόνη είναι το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) (2011) για τη διαχείριση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης[42]. Είναι μια συνθετική ένωση που χορηγείται από το στόμα που ασκεί αντί-ινωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες[43]. Δρα σαν αναστολέας κινάσης, αναστέλλοντας την έκφραση προ-ινωτικών αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του TGF- β 1, που αποτελεί τον κύριο προ-ινωτικό παράγοντα που εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου. Οδηγεί επίσης στην αναστολή της παραγωγής και απελευθέρωσης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF- α), που εμπλέκεται ενεργά στην φλεγμονή. Συμβάλλει επίσης στην μείωση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και του οξειδωτικού στρες. Μελέτες αποτελεσματικότητας του φαρμάκου έδειξαν ότι η πιρφενιδόνη επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου και μειώνει τα συμπτώματα του αναπνευστικού σε ασθενείς με ΙΠΠ[11]. Επιπλέον, η θεραπεία με πιρφενιδόνη σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο θνησιμότητας[44]. Παρόλο που το φάρμακο φαίνεται να παρουσιάζει ένα όφελος στην μείωση της εξέλιξης της νόσου, η χρήση της πιρφενιδόνης θα παρουσίαζε πραγματικό όφελος για τους ασθενείς με ΙΠΠ, αν είχε επίδραση και στην επιβίωση ή στην μείωση της επιδείνωσης της νόσου[43].

Nintedanib

Το Nintedanib είναι ένας τριπλός ενδοκυτταρικός αναστολέας τυροσινικών κινασών, που αναστέλλει την δράση του του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 1-3 (VEGFR1–3), του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 1-3 (FGFR1–3) και των υποδοχέων α και β του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGFR α, β). Αναστέλλοντας την δράση αυτών των υποδοχέων, το nintedanib παρεμβαίνει σε διάφορες διεργασίες που έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της ΙΠΠ, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ινοβλαστών του πνεύμονα καθώς και της διαφοροποίησης των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Τόσο το nintedanib όσο και η πιρφενιδόνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε ασθενείς με ΙΠΠ και μεταλλάξεις που σχετίζονται με το μήκος των τελομερών, παρουσιάζοντας ευεργετικά αποτελέσματα στον δείκτη FVC[45]. Το nintedanib φαίνεται επίσης να έχει όφελος στη θνησιμότητα των ασθενών με ΙΠΠ[44, 45].

Οι ATS/ERS/JRS/ALAT κατευθυντήριες οδηγίες του 2015 συνέστησαν τη ταυτόχρονη δυνητική χρήση του nintedanib μαζί με την πιρφενιδόνη. Είναι σημαντικό, να γίνεται η προσαρμογή της δόσης με βάση την ανεκτικότητα και να σχετίζεται με βελτιωμένη συμμόρφωση[10].

Αντιμετώπιση πέρα από την φαρμακευτική θεραπεία

Η διαχείριση της ΙΠΠ απαιτεί μια τακτική προσέγγιση, με τακτικές αξιολογήσεις και συνδυασμό της φαρμακοθεραπείας με μη φαρμακοθεραπευτικές μεθόδους. Οι κυριότερες μέθοδοι, πέρα από την φαρμακευτική αγωγή, που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της ΙΠΠ είναι η πνευμονική αποκατάσταση η θεραπεία με οξυγόνο και η μεταμόσχευση πνεύμονα.

Η πνευμονική αποκατάσταση αποτελεί μέρος της διαχείρισης και της διατήρησης της υγείας των ατόμων με χρόνιες αναπνευστικές νόσους που παραμένουν συμπτωματικοί ή συνεχίζουν να έχουν μειωμένη πνευμονική λειτουργία παρά την καθιερωμένη ιατρική θεραπεία. Τα αποτελέσματα σε ασθενείς με ΙΠΠ, υποδηλώνουν ότι η πνευμονική αποκατάσταση παρέχει οφέλη για τον οργανισμό παρόμοια με εκείνα της που παρατηρούνται στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Ωστόσο, τα ευεργετικά αποτελέσματα της δοκιμής παρατηρήθηκαν αμέσως μετά την ολοκλήρωση

του προγράμματος αποκατάστασης και το κατά πόσον τα οφέλη αυτά μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερο διάστημα είναι ασαφές[10].

Δεν υπάρχουν δεδομένα που να συσχετίζουν άμεσα τη χρήση μακροχρόνιας συμπληρωματικής θεραπείας οξυγόνου σε ασθενείς με ΙΠΠ. Πολλά άτομα με ΙΠΠ έχουν φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου σε ηρεμία αλλά τα επίπεδα αυτά γρήγορα μειώνονται κατά την άσκηση. Η χρήση οξυγόνου κατά την κινητοποίηση των ασθενών ή κατά τη διάρκεια άλλων δραστηριοτήτων μπορεί να βελτιώσει την ικανότητα άσκησης και να ανακουφίσει τη δύσπνοια σε αυτούς τους ασθενείς[10].

Δεδομένης της ανίατης φύσης της ΙΠΠ, η μεταμόσχευση πνεύμονα ενδείκνυται συνήθως για ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή μορφή ΙΠΠ. Η ηλικία των ασθενών και η ύπαρξη συννοσηροτήτων, καθιστούν την μεταμόσχευση ρεαλιστική θεραπευτική επιλογή μόνο για μια μειοψηφία αυτών. Ο χρόνος για την παραπομπή και την εισαγωγή για μεταμόσχευση πνευμόνων παραμένει πρόκληση λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας στην κλινική πορεία, του προσδόκιμου επιβίωσης αλλά και της ταχείας κλινικής επιδείνωσης. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η έγκαιρη παραπομπή και η στενή παρακολούθηση των υποψηφίων ασθενών για μεταμόσχευση πνεύμονα[10].

1.1.7 Θεραπείες σε κλινικές δοκιμές

Η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας σε συνδυασμό με την σφοδρότητα της της ΙΠΠ υποδηλώνουν τη συνεχιζόμενη κρίσιμη σημασία των προσπαθειών για την ανακάλυψη φαρμάκων. Ο εντοπισμός νέων στόχων για τη θεραπεία της ΙΠΠ απαιτεί σαφή κατανόηση της παθογένειας της νόσου, των γενετικών παραγόντων κινδύνου και των δεικτών εξέλιξης της νόσου. Η αύξηση της γνώσης στους παραπάνω τομείς οδήγησε στην αύξηση των μορίων που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία της ΙΠΠ.

Βλαστοκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) είναι πολυδύναμα κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται σε διάφορες κυτταρικές σειρές και να ασκούν ανοσοτροποποιητικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης που διαθέτουν καθώς και η ανοσοπροστασία που παρέχουν, έχουν οδηγήσει σε ερευνητικές προσπάθειες για θεραπευτικές εφαρμογές σε διάφορες ασθένειες. Οι έρευνες υποστηρίζουν τις ανοσοτροποποιητικές,

αντιφλεγμονώδεις και δυνητικά αντι-ινωτικές ιδιότητες των MSCs και για τις ιδιότητες αυτές που διαθέτουν, θεωρούνται υποσχόμενες για την θεραπεία της ΙΠΠ.

Τα MSCs φαίνεται να ασκούν αντιφλεγμονώδεις, ανοσοτροποποιητικές και αντιϊνωτικές επιδράσεις στην περιοχή της πνευμονικής βλάβης σε πειραματικά μοντέλα. Προ κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία και την πρόληψη της ίνωσης των πνευμόνων. Παρ' όλα αυτά, παραμένουν αμφιβολίες σχετικά με τη δραστηριότητα των MSCs εντός του προϊνωτικού μικροπεριβάλλοντος. Οι πρώτες κλινικές μελέτες των MSCs σε ασθενείς με ΙΠΠ έχουν δείξει ελπιδοφόρα προφίλ ασφάλειας. Επιπλέον, μελέτες ενδοφλέβιας χορήγησης MSCs, διαπίστωσαν ότι η χορήγηση ήταν ασφαλής σε άτομα με μέτριας σοβαρότητας ΙΠΠ. Παρόλο που τα αποτελέσματα της χορήγησης MSCs φαίνονται πολλά υποσχόμενα, αρκετές προκλήσεις στο κλινικό περιβάλλον όπως η βέλτιστη πηγή MSCs, η οδός, ο αριθμός και ο χρόνος χορήγησης, και το κατάλληλο δοσολογικό διάστημα, πρέπει να αξιολογηθούν[46].

FG3019/Pamrevlumab.

Ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (Connective tissue growth factor, CTGF) είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των μυοϊνοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο CTGF αλληλοεπιδρά με διάφορα ρυθμιστικά μόρια, όπως ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ), και υποδοχείς όπως οι ιντεγκρίνες, λειτουργώντας ως βασικός ρυθμιστής διαφόρων κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησης και μετανάστευσης, της ενεργοποίησης των μυοϊνοβλαστών, της εναπόθεσης εξωκυττάριας μήτρας και της αναδιαμόρφωσης των ιστών. Παρόλο που ο ρόλος του CTGF είναι εν μέρει κατανοητός- ωστόσο, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι εμπλέκεται στην παθογένεια των ινωτικών ασθενειών[47].

Το pamrevlumab (FG-3019) είναι ένα πλήρως ανθρώπινο ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CTGF. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, η χορήγηση του FG-3019 ανέστρεψε την πνευμονική ίνωση μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης και αποκατέστησε την πνευμονική λειτουργία. Επιπλέον, η χορήγηση του pamrevlumab μείωσε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας καθώς και την επαγόμενη από τον TGF-β επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάβαση. Μελέτες φάσης II, έδειξαν ότι η χορήγηση

του FG-3019 ήταν ασφαλής και καλά ανεκτή σε ασθενείς με ΙΠΠ[48]. Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια και η ανεκτικότητα του ramrevlumab σε μελέτη φάσης ΙΙ (PRAISE). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, η χορήγηση ramrevlumab συσχετίστηκε με σημαντική μείωση της ίνωσης των πνευμόνων, του ρυθμού FVC όσο και του ποσοστού των ασθενών που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου. Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του ramrevlumab αξιολογείται περαιτέρω στη δοκιμή φάσης ΙΙΙ με την ονομασία ZEPHYRUS (NCT03955146), πριν εγκριθεί για ευρεία χρήση[47].

GLPG1690/Autotaxin.

Το λυσοφωσφατιδικό οξύ (Lysophosphatidic acid, LPA) είναι ένα βιοδραστικό φωσφολιπίδιο που μεσολαβεί σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της μετανάστευσης διαμέσου σηματοδότησης μέσω συγγενών υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες[47]. Η αυτοταξίνη (Autotaxin, Atx) είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των εξωνουκλεοτιδικών πυροφωσφατασών φωσφοδιεστερασών (ectonucleotide pyrophosphatase-phosphodiesterase, ENPP) και καταλύει την υδρόλυση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lysophosphatidylcholine) σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA). Ο άξονας αυτοταξίνης - LPA συνδέει την πνευμονική ίνωση με την πνευμονική βλάβη μέσω της διαμεσολάβησης στην στρατολόγηση των ινοβλαστών και στην αγγειακή διαρροή[49]. Το LPA μέσω του υποδοχέα του LPA1 εμπλέκεται στην σηματοδότηση πολλαπλών κυτταρικών διεργασιών και παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένης της επούλωσης πληγών και της ίνωσης, μέσω των χημειοτακτικών ιδιοτήτων του που ασκεί στους ινοβλάστες, της δέσμευσης της ιντεγκρίνης $\alpha\text{v}\beta 6$ και της ενεργοποίησης του TGF β , και της ενδοθηλιακής διαπερατότητας[50]. Τόσο τα επίπεδα της αυτοταξίνης όσο και του LPA είναι αυξημένα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΙΠΠ και σε μοντέλα πνευμονικής ίνωσης[49, 51, 52].

Ο GLPG1690 είναι ένας εξαιρετικά ειδικός αναστολέας της αυτοταξίνης που μειώνει τα επίπεδα του LPA και έχει επιδείξει αντινωτικές ιδιότητες σε προκλινικές μελέτες φάσης 2, με την ονομασία FLORA, (NCT02738801) που ερευνούν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα. Επί του παρόντος, πραγματοποιούνται δύο

ελεγχόμενες δοκιμές φάσης 3 με εικονικό φάρμακο (ISABELA1 και ISABELA2), οι οποίες βρίσκονται σε διαδικασία πρόσληψης ασθενών[53].

Κινάσες της οικογένειας SRC

Οι κινάσες τυροσίνης είναι ένα είδος ενζύμου που επιδρά μέσω της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης-στόχου στα κατάλοιπα τυροσίνης. Είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταγωγή σήματος και τη ρύθμιση διαφόρων βιολογικών διεργασιών των κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Οι κινάσες της οικογένειας Src (Src family kinases, SFKs), είναι μια υποκατηγορία κινασών τυροσίνης με έντεκα μέλη, οι οποίες ενεργοποιούνται από έναν αυξημένο αριθμό κυτταροκινών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Ενεργοποιούνται από ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και έπειτα φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν πολλαπλούς μεταγενέστερους σηματοδοτικούς παράγοντες, όπως τους NF-κΒ, MAPK, STAT και PI3K, οι οποίοι ρυθμίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Επί του παρόντος, αρκετοί αναστολείς των SFKs βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία του καρκίνου. Λόγω του κεντρικού ρόλου των κινασών τυροσίνης στη σηματοδότηση των κυττάρων, η απορυθμισμένη δραστηριότητα τους εμπλέκεται και στην εξέλιξη των ινωτικών νόσων. Οι SFKs εμπλέκονται στην παθογένεια της ΙΠΠ μέσω της ρύθμισης της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), της διαφοροποίησης των μυοϊνοβλαστών και της απόκρισης στη φλεγμονή. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της κινάσης Src είναι αυξημένα στους πνευμονικούς ιστούς ασθενών με ΙΠΠ σε σύγκριση με υγιή άτομα. Επομένως, η στόχευση των SFKs θα μπορούσε να είναι ένας ελκυστικός τρόπος για τη θεραπεία της ΙΠΠ[54].

Η χορήγηση αναστολέων της κινάσης Src έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα σε προκλινικές μελέτες, συμβάλλοντας στη μείωση των ινωτικών αλλοιώσεων στους πνευμονικούς ιστούς και στη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας σε ζωικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Το Saracatinib, είναι ένας μικρομοριακός αναστολέας της κινάσης Src που έχει διερευνηθεί σε προκλινικές μελέτες ως πιθανή θεραπεία για την ΙΠΠ. Φαίνεται ότι το φάρμακο μπορεί να αντιστρέψει την έκφραση διαφόρων ινωτικών γονιδίων και μονοπατιών σε ζωικά μοντέλα με επαγόμενη πνευμονική ίνωση[55]. Πλέον μελετάται η πιθανότητα χορήγησης του saracatinib σε ασθενείς με ΙΠΠ (NCT04598919). Οι στόχοι αυτής της

κλινικής μελέτης είναι η αξιολόγηση της ασφάλειας, της ανεκτικότητας, της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής και η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του saracatinib στην ΙΠΠ.

1.1.8 Μηχανισμός παθογένειας

Τα τελευταία χρόνια, ο αυξανόμενος αριθμός μελετών που αφορούν την παθογένεια της ΙΠΠ, έχουν ρίξει φως στους μηχανισμούς που αποτελούν την βάση της νόσου, βελτιώνοντας σημαντικά την κατανόηση της πνευμονικής ίνωσης και συμβάλλοντας στις προσπάθειες ανάπτυξης αποτελεσματικών θεραπειών. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ίνωση αποτελεί παθολογικό χαρακτηριστικό πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος του Crohn και ο ερυθρεματώδης λύκος και εμπλέκεται και στην ανάπτυξη και την μετάσταση των όγκων, η κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών αναμένεται βελτιώσει την εξέλιξη και άλλων νόσων[56].

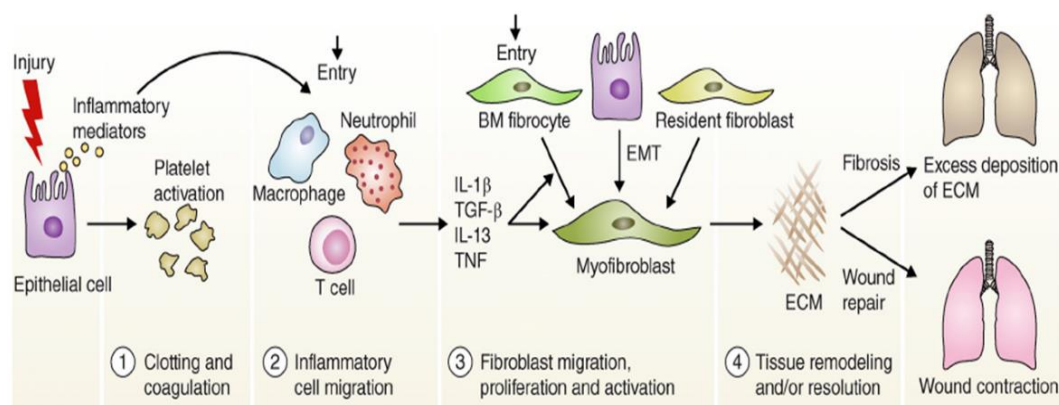
Οι πνεύμονες εκτίθενται συνεχώς σε πολλούς τραυματισμούς αλλά επιδεικνύουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα επιδιόρθωσης και ανάκαμψης μέσω ενός καταρράκτη από λεπτότατα συγχρονισμένες βιολογικές διεργασίες[10]. Η επιδιόρθωση των κατεστραμμένων ιστών είναι ένας θεμελιώδης βιολογικός μηχανισμός που επιτρέπει την αντικατάσταση νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων μετά από τραυματισμό, μια διαδικασία εξαιρετικά σημαντική για την επιβίωση. Ωστόσο, εάν η διαδικασία αυτή απορρυθμιστεί, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας μόνιμης ινωτικής "ουλής". Αυτός είναι και ο κύριος μηχανισμός στον οποίο θεωρείται ότι οφείλεται η εμφάνιση της πνευμονικής ίνωσης. Συγκεκριμένα, η επικρατούσα υπόθεση για την παθογένεια της ΙΠΠ υποστηρίζει ότι η νόσος είναι αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής επούλωσης τραύματος μετά από επαναλαμβανόμενους τραυματισμούς του κυψελιδικού επιθηλίου. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε υπερβολική εναπόθεση ουσιών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix, ECM), όπως είναι το υαλουρονικό οξύ, η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες, τα οποία αναδιαμορφώνουν τον πνευμονικό ιστό.

Ο φυσιολογικός μηχανισμός της επούλωσης του τραύματος αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις που περιλαμβάνουν, την φάση πήξης, την φλεγμονώδη φάση, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ινοβλαστών και την φάση αναδιαμόρφωσης της αρχιτεκτονικής του ιστού. (Εικόνα 2).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μετά τον τραυματισμό του κυψελιδικού επιθηλίου ξεκινά η φυσιολογική διαδικασία αποκατάστασης της βλάβης των επιθηλιακών κυττάρων (reepithelialization), όπου τα τραυματισμένα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, αντικαθίστανται από κυψελιδικά κύτταρα τύπου II τα οποία πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται σε τύπου I αποκαθιστώντας την βλάβη. Στα πρώτα στάδια μετά από την τραυματισμό του πνεύμονα, τα επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές οι οποίοι προκαλούν την θρόμβωση και την ανάπτυξη μιας προσωρινής ECM. Η συσσώρευση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προάγει την διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και την αυξημένη διαπερατότητα, επιτρέποντας την στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα) στην περιοχή του τραυματισμού. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πιο άφθονα φλεγμονώδη κύτταρα στα πρώτα στάδια της διαδικασίας επούλωσης του τραύματος, αλλά γρήγορα αντικαθίστανται από μακροφάγα μετά την αποκοκκίωση τους. Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα εξαλείφουν τυχόν εισβάλλοντες οργανισμούς και παράγουν μια ποικιλία κυτταροκινών και χημειοκινών, όπως IL-1β, TNF, IL-13 και TGF-β, που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και πυροδοτούν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών.

Οι μυοϊνοβλάστες προσλαμβάνονται από ποικιλία πηγών, συμπεριλαμβανομένων τοπικών μεσεγχυματικών κυττάρων, προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών και μέσω της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης των κυττάρων, όπου τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες. Μόλις ενεργοποιηθούν οι ινοβλάστες, μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες λύων μυών που εκφράζουν ακτίνη και εκκρίνουν συστατικά της ECM. Τέλος, στη φάση ωρίμανσης-αναδιαμόρφωσης του τραύματος, οι μυοϊνοβλάστες προωθούν τη συστολή του τραύματος με σκοπό την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού.

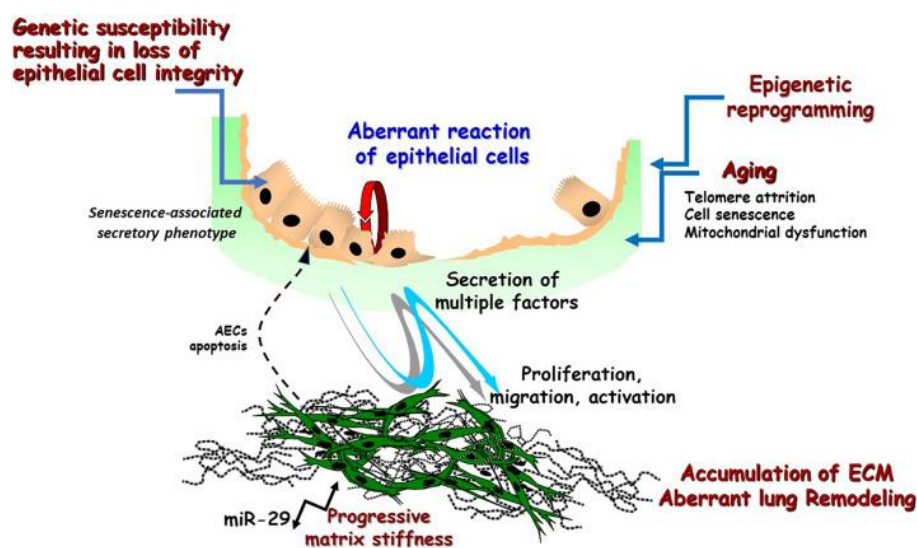
Η ίνωση αναπτύσσεται όταν το τραύμα, είναι σοβαρό, ο ερεθιστικός παράγοντας (γενετικός ή περιβαλλοντικός) που προκαλεί βλάβη στους ιστούς επιμένει ή όταν η διαδικασία επιδιόρθωσης απορρυθμίζεται. Έτσι, πολλά στάδια της διαδικασίας επιδιόρθωσης του τραύματος μπορεί να απορρυθμιστούν και συμβάλλουν στο σχηματισμό του τραύματος, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την πολύπλοκη φύση της πνευμονικής ίνωσης. Τα επιθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα αποτελούν βασικούς κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή.



Εικόνα 2: Φυσιολογικός μηχανισμός επούλωσης τραύματος και προτεινόμενες διαταραχές του μηχανισμού, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης[56].

Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων

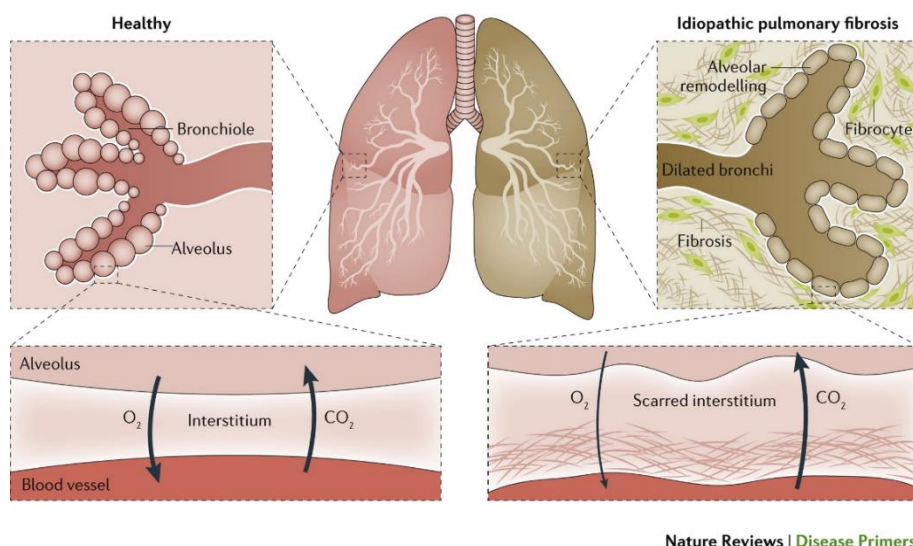
Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι κρίσιμα συστατικά στην έναρξη και πρόγνωση της ΠΠ, οδηγώντας σε δημιουργία ινωτικών ουλών με συνέπεια την δυσλειτουργία των οργάνων και αποτέλεσμα τον πρόωρο θάνατο. Οι μηχανισμοί που επηρεάζουν το πνευμονικό επιθήλιο δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά είναι γνωστό ότι είναι πολυπαραγοντικοί. Μελέτες δείχνουν ότι τουλάχιστον τρεις παράγοντες θα πρέπει να συγκλίνουν για να αλλάξουν την συμπεριφορά του επιθηλίου. (Εικόνα 3). Η παρουσία μεταλλάξεων ή συνδυασμού κοινών γονιδιακών παραλλαγών, χαρακτηριστικά που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΠΠ, οδηγούν στην απώλεια της επιθηλιακής ακεραιότητας. Κατά συνέπεια, τα επιθηλιακά κύτταρα είναι δεν μπορούν να ανταποκριθούν κατάλληλα στους επαναλαμβανόμενους μικροτραυματισμούς και στο στρες που σχετίζεται με την μηχανική αερισμού των πνευμόνων. Επιπλέον η ακεραιότητα του επιθηλίου επηρεάζεται από την επιταχυνόμενη γήρανση των πνευμόνων που χαρακτηρίζεται από την μη φυσιολογική μείωση των τελομερών, και άλλες μοριακές και κυτταρικές αλλοιώσεις. Ένας ακόμα μηχανισμός που εμπλέκεται στην ακεραιότητα του πνευμονικού επιθηλίου είναι ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός που σχετίζεται με τη γήρανση και με ορισμένες περιβαλλοντικές εκθέσεις, όπως το κάπνισμα. Η σύγκλιση αυτών των παραγόντων οδηγεί σε μια ανώμαλη ενεργοποίηση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών με αποτέλεσμα την λανθασμένη επικοινωνία μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και του γύρω μικροπεριβάλλοντος[57].



Εικόνα 3: Προτεινόμενο μοντέλο που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΠΠ και οδηγεί σε καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων[57].

Μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι μια ποικιλία μη φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων εντοπίζονται στους πνεύμονες με ΠΠ, τα οποία παράγουν σχεδόν όλους τους παράγοντες που ενεργοποιούν και διαφοροποιούν τους ινοβλάστες σε μυοϊνοβλάστες οδηγώντας σε υπερβολική εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας, η οποία γίνεται προοδευτικά δύσκαμπτη με αποτέλεσμα την καταστροφή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα (Εικόνα 4).

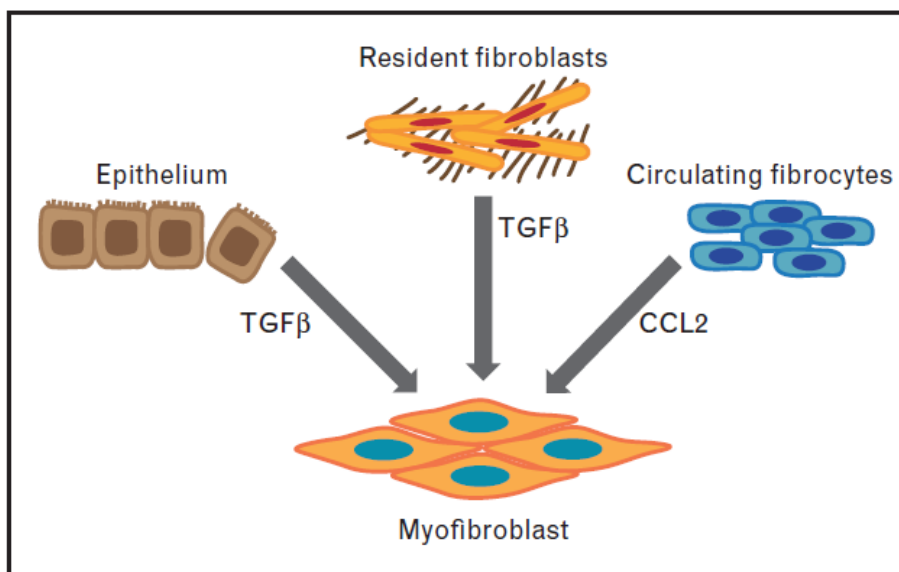
Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό τρόπων επιβράδυνσης, ελέγχου, ή ακόμη και της αντιστροφής της εξέλιξης της ΠΠ. Πιστεύεται ότι η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τον ανώμαλο επαναπρογραμματισμό των επιθηλιακών κυττάρων, μπορεί να αποκαλύψει στόχους για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Επιπλέον, μια συνδυασμένη θεραπεία που θα στοχεύει ταυτόχρονα επιθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιημένους ινοβλάστες/μυοϊνοβλάστες θα προσφέρει ένα καλύτερο σενάριο για αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις[57].



Εικόνα 4: Κυψελιδική βλάβη στην ΙΠΠ, που οδηγεί στην διαστολή των βρόγχων, τον ανασχηματισμό των κυψελίδων και την ίνωση του παρεγχύματος με αποτέλεσμα την μη ομαλή ανταλλαγή των αερίων[10].

Ο ρόλος των ινοβλαστών

Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες είναι τα κύρια κύτταρα-τελεστές της ίνωσης. Παραμένουν ενεργοί και σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου, όπου δρουν ανεξάρτητα από τις φλεγμονώδεις εισροές. Έτσι, η στόχευση της ενεργοποίησης των ινοβλαστών μπορεί να παρέχει μια πιο αποτελεσματική στρατηγική σε σύγκριση με τη στόχευση της φλεγμονής ή την στόχευση μορίων που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια του τραυματισμού. Οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες στην ΙΠΠ (Εικόνα 5) μπορεί προέρχονται από την ενεργοποίηση των τοπικών ινοβλαστών, που ευνοεί τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό και εναπόθεση της ECM., από την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση που υφίστανται τα τραυματισμένα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και από κυκλοφορούντα ινωδοκύτταρα (fibrocytes) τα οποία συσσωρεύονται σε περιοχές τραυματισμού των ιστών και διαφοροποιούνται σε κύτταρα που παράγουν κολλαγόνο.

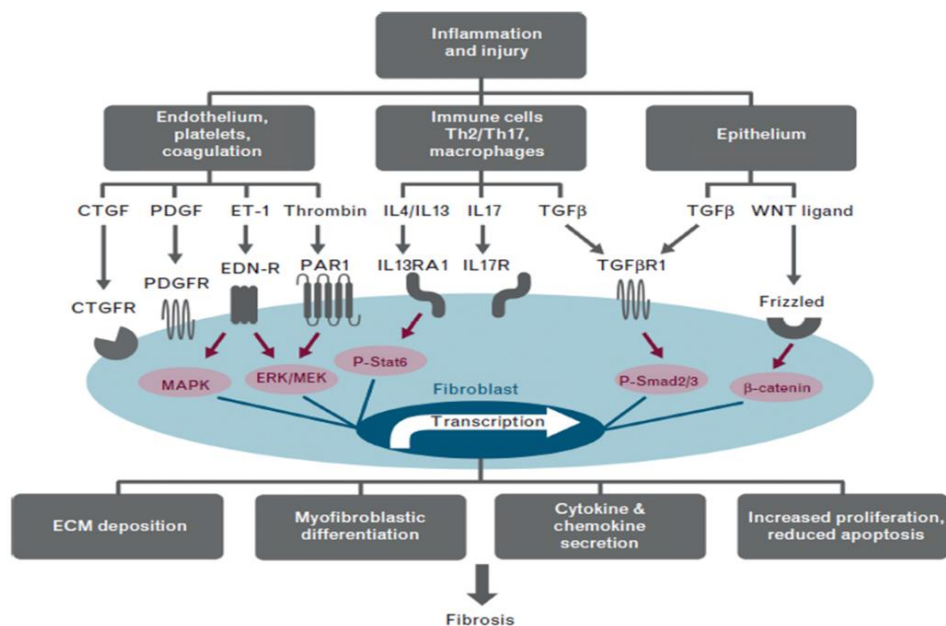


Εικόνα 5: Προέλευση ενεργοποιημένων ινοβλαστών στην ΙΠΠ[58].

Ανεξάρτητα από την πηγή, οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες χαρακτηρίζονται από αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης, ικανότητα υπερβολικής εναπόθεσης ECM και μειωμένη απόπτωση[58], χαρακτηριστικό που μεταφράζεται σε συσσώρευση συστατικών ECM, στο διάμεσο του πνεύμονα[10]. Η σημασία των ινοβλαστών στην ανθρώπινη νόσο αναδεικνύεται από μελέτες που παρέχουν δεδομένα για ανώμαλη συμπεριφορά των ινοβλαστών ασθενών με ΙΠΠ στην κυτταρική καλλιέργεια, που εκδηλώνονται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Επιπλέον, μελέτες γονιδιωματικής ινοβλαστών που προέρχονται από υγιείς και ασθενείς παρέχουν πληροφορίες για μονοπάτια που θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικούς στόχους. Έτσι, οι ινοβλάστες έχουν αναδειχθεί ως ένας ελκυστικός στόχος για να νέες θεραπευτικές προσπάθειες.

Στην ενεργοποίηση των ινοβλαστών εμπλέκονται πολλά διαφορετικά μόρια και μονοπάτια σηματοδότησης (Εικόνα 6). Η φλεγμονή και ο τραυματισμός του ιστού οδηγεί στην στρατολόγηση των ανοσοποιητικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων που πυροδοτούν την πήξη. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGFβ), που παράγεται από τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης επάγοντας την έκφραση κολλαγόνου τύπου I και της α- ακτίνης λύου μύος. Άλλοι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (CTGF) μπορούν επίσης να

προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνθεση κολλαγόνου, είτε ανεξάρτητα είτε σε συνδυασμό με τον TGFβ. Η αυξημένη πήξη συνοδεύεται από την προ-ινωτική σηματοδότηση μέσω αγγειακών παραγόντων, όπως η θρομβίνη. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες της οικογένειας Th2/Th17 επάγουν την έκφραση προ-ινωτικών και προφλεγμονωδών γονιδίων και πρωτεϊνών. Αυτοί οι πολλαπλοί καταρράκτες σηματοδότησης οδηγούν σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ινοβλαστών, αυξημένη παραγωγή ECM, αυξημένη έκκριση κυτταροκινών και χημειοκινών και μειωμένη ευαισθησία στην απόπτωση. Οι πρόσφατες πρόοδοι στην κατανόηση αυτών των καταρρακτών ενεργοποίησης έχουν ανοίξει ενδιαφέρουσες επιλογές για την θεραπευτική στόχευση αυτών των μορίων. Τρέχουσες κλινικές δοκιμές δοκιμάζουν μόρια που στοχεύουν πολλαπλές οδούς, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των ινοβλαστών[58].



Εικόνα 6: Κύρια μονοπάτια ενεργοποίησης ινοβλαστών στην πνευμονική ίνωση[58].

Ο ρόλος των μακροφάγων

Δεδομένου ότι η πνευμονική ίνωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος, ο ρόλος των ανοσοποιητικών κυττάρων στην παθογένεια της έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα μακροφάγα είναι το πιο κοινό ανοσοποιητικό κύτταρο που βρίσκεται στους πνεύμονες και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις και στην

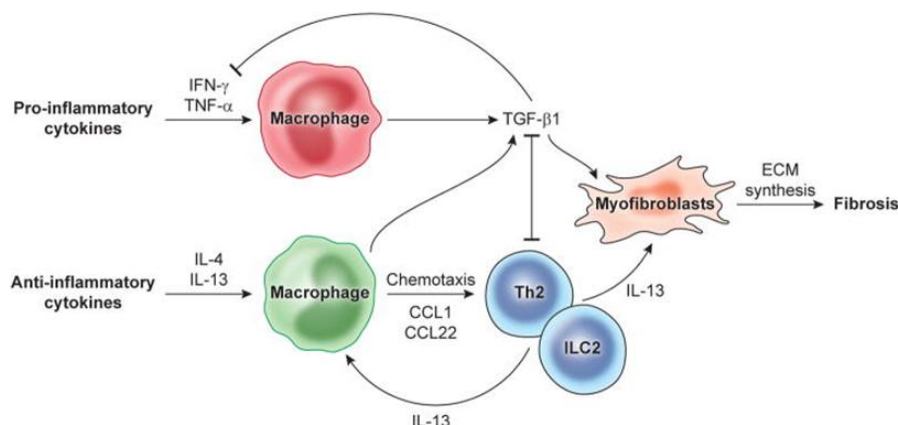
αναδιαμόρφωση των αεραγωγών κατά τη διάρκεια της ίνωσης. Οι περισσότερες χημειοκίνες και κυτταροκίνες που απαντώνται στην πνευμονική ίνωση σχετίζονται με τα μακροφάγα[59].

Στον πνεύμονα τα μακροφάγα χωρίζονται σε δύο κλασικές κατηγορίες ανάλογα με τη θέση που εντοπίζονται στους πνεύμονες. Τα κυψελιδικά μακροφάγα (alveolar macrophages, AMs), που βρίσκονται συνήθως στους αεραγωγούς και στον διάμεσο χώρο, και τα διάμεσα μακροφάγα (interstitial macrophages, IMs) που υπάρχουν κυρίως στο πνευμονικό παρέγχυμα. Τα AMs προέρχονται κυρίως από μονοκύτταρα του εμβρυϊκού ήπατος, ενώ τα IMs προέρχονται κυρίως από μακροφάγα του μυελού των οστών (BMDM) και εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα. Η ταξινόμηση των πνευμονικών μακροφάγων με βάση τη θέση τους είναι χρήσιμη, αλλά δεν αντικατοπτρίζει με ακρίβεια την ακριβή ετερογένεια των μακροφάγων στους υγιείς και στους ασθενείς[59].

Οι πληθυσμοί των μακροφάγων χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και ύπαρξη πολλαπλών φαινοτύπων υπό την επίδραση διαφορετικών παραγόντων σε διάφορα όργανα[60]. Τα μακροφάγα διακρίνονται με βάση το διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών και τις λειτουργίες τους σε κλασικά ενεργοποιημένα M1 εναλλακτικά ενεργοποιημένα M2 μακροφάγα. Προηγούμενες μελέτες έχουν υποδείξει τη συμμετοχή αυτών των μακροφάγων στην ίνωση[61], αν και η ταξινόμηση σε M1 και M2 φαίνεται να μην υποστηρίζεται ενεργά, διότι δεν περιγράφει σωστά την πλαστικότητα και τον ρόλο των μακροφάγων. Τα μακροφάγα πολώνονται σε φαινότυπο M1 ως απάντηση στην ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και στον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α), ενώ αποκτούν M2 φαινότυπο ως απάντηση στην επίδραση της ιντερλευκίνης (IL-4, IL-10) και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF-β)[62].

Στην ΙΙΙ, τα μακροφάγα στρατολογούνται στους πνεύμονες και συσσωρεύονται στις περιοχές ίνωσης. Φλεγμονώδεις αντιδράσεις που αναπτύσσονται μετά από τον τραυματισμό του ιστού και σχετίζονται με την παραγωγή μιας ποικιλίας φλεγμονωδών μεσολαβητών (όπως η IFN-γ και ο TNF-α) προάγουν την κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων. Ο TGF-β1 παράγεται στη συνέχεια από τα μακροφάγα ως ρυθμιστικός μηχανισμός ανατροφοδότησης της προφλεγμονώδους απόκρισης. Ο TGF-β1 πυροδοτεί επίσης την ενεργοποίηση των ινοβλαστών και την διαφοροποίηση σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν ECM και οδηγούν στην ίνωση. Η αντιφλεγμονώδης

κυτταροκίνη IL-13, που παράγεται από μια ποικιλία κυτταρικών τύπων χρησιμεύει ως σημαντικός παράγοντας επιδιόρθωσης των ιστών και ίνωσης, επάγοντας τον TGF- β 1, στοχεύοντας άμεσα τη λειτουργία των μυοϊνοβλαστών και προωθώντας την ανάπτυξη επανορθωτικών μακροφάγων τύπου M2 που διευκολύνουν τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στις θέσεις τραυματισμού των ιστών (Εικόνα 7)[60].



Εικόνα 7: Η εμπλοκή των μακροφάγων στον μηχανισμό της ίνωσης.

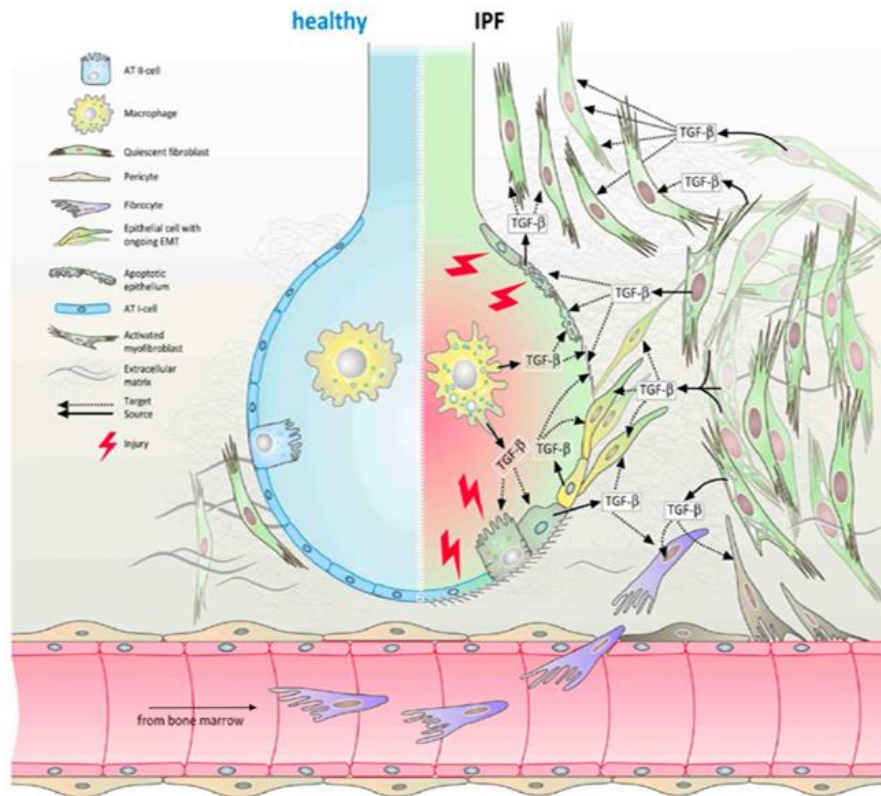
Τα μακροφάγα διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην αντιστροφή της ίνωσης. Η ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών μακροφάγων και άλλων κυττάρων που προέρχονται από μονοκύτταρα καθορίζει εάν το αποτέλεσμα μιας απόκρισης τραυματισμού είναι η επαναεπιθηλιοποίηση και επούλωση των ιστών ή η ανώμαλη επιδιόρθωση που οδηγεί στην εμφάνιση ίνωσης[63].

Συνολικά, τα μακροφάγα διαδραματίζουν πολύπλοκο ρόλο στην παθογένεια της ΙΠ, συμβάλλοντας τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην αντιστροφή της ίνωσης. Η στόχευση των μακροφάγων μπορεί να αποτελέσει θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία της ΙΠ.

1.1.9 Ο ρόλος του TGF- β 1 στην παθογένεια της ΙΠ

Ο TGF- β 1 είναι μία από τις πιο μελετημένες προ ινωτικές κυτταροκίνες. Στους πνεύμονες, παράγεται από μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των κυψελιδικών μακροφάγων, των ουδετερόφιλων, των ενεργοποιημένων κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών (Εικόνα 8). Μετά την ενεργοποίηση του επάγει τη στρατολόγηση μακροφάγων και ινοβλαστών καθώς και τον πολλαπλασιασμό

των ινοβλαστών, μέσω της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF). Στα κύτταρα αυτά, ο TGF διεγείρει επίσης την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών και ινωδογόνων κυτταροκινών, όπως ο TNF- α , ο PDGF, οι IL-1b και IL-13, τροφοδοτώντας έτσι περαιτέρω την ινωτική απόκριση[64].



Εικόνα 8 :Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου του TGF- β 1 στην παθογένεια της ΙΠΠ και πιθανές πηγές προέλευσης των ενεργοποιημένων μυοϊνοβλαστών[64].

Ο TGF- β εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης προωθώντας την παραγωγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) και αναστέλλοντας τη διάσπασή τους. Στον φυσιολογικό πνευμονικό ιστό, ο TGF- β συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της επιδιόρθωσης των ιστών. Ωστόσο, στην ΙΠΠ, ο TGF- β οδηγεί σε υπερπαραγωγή πρωτεϊνών ECM, όπως το κολλαγόνο, η φμπρονεκτίνη και η ελαστίνη, από τους ινοβλάστες του πνεύμονα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινωτικού ιστού και οδηγεί στη χαρακτηριστική ουλοποίηση και πάχυνση του πνευμονικού ιστού που εμφανίζεται στην ΙΠΠ. Ο TGF- β καταστέλλει επίσης τη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της μήτρας (MMPs), τα οποία είναι ένζυμα που διασπούν τις πρωτεΐνες της ECM, συμβάλλοντας περαιτέρω στη συσσώρευση ινωτικού ιστού.

Επιπλέον, ο TGF- β εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΙΠΙ μέσω της επαγωγής της EMT στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα[64].

Η στόχευση της σηματοδότησης του TGF- β έχει αναδειχθεί ως πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την ΙΠΙ. Ήδη αρκετά φάρμακα που αναστέλλουν τη σηματοδότηση του TGF- β αναπτύσσονται επί του παρόντος και δοκιμάζονται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της ΙΠΙ.

1.1.10 Πειραματικό μοντέλο της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης

Οι προσπάθειες για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου, τον εντοπισμό προγνωστικών παραγόντων και την αποκάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων έχουν βασιστεί σε ζωικά μοντέλα. Δυστυχώς, κανένα ζωικό μοντέλο δεν μπορεί να αναπαραστήσει πλήρως την ιστολογική εικόνα της UIP, που εμφανίζεται σε ασθενείς με ΙΠΙ, ή δεν παρουσιάζει χαρακτηριστικά της προοδευτικής νόσου. Αυτό δεν πρέπει να υποτιμά το γεγονός ότι τα πειραματικά ζωικά μοντέλα αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για τη μετέπειτα εφαρμογή προγνωστικών δοκιμών και θεραπευτικών παρεμβάσεων. Πολυάριθμες κλινικές δοκιμές έχουν ολοκληρωθεί με βάση τα αποτελέσματα μελετών σε ζώα και έχουν οδηγήσει στην έγκριση από τον FDA των δύο φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της νόσου. Τα πιο συνηθισμένα μοντέλα για μελέτες ασθενειών και προκλινική θεραπευτική αξιολόγηση περιλαμβάνουν τρωκτικά. Η επαγωγή της πνευμονικής ίνωσης σε τρωκτικά επιτυγχάνεται μέσω της χορήγησης διοξειδίου του πυριτίου, της έκθεσης σε αμίαντο και της υπερέκφρασης κυτταροκινών. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο επαγωγής της πνευμονικής ίνωσης για την αναπαράσταση της ανθρώπινης νόσου, αποτελεί το μοντέλο της μπλεομυκίνης [65].

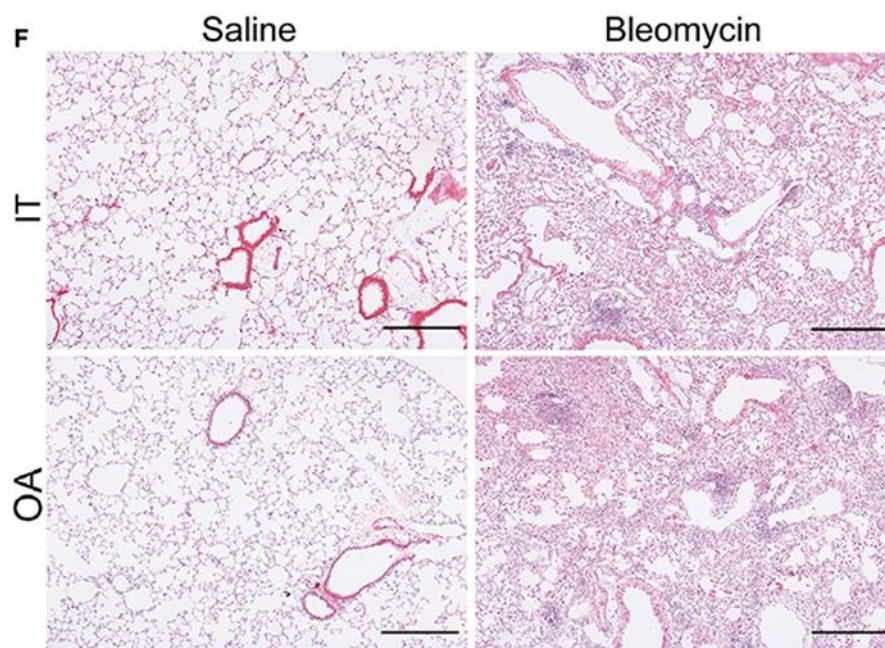
Η μπλεομυκίνη (Bleomycin, BLM) είναι ένα υδατοδιαλυτό γλυκοπεπτίδιο. Αναστέλλει το μεταβολισμό του DNA και χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματικό, ιδίως για συμπαγείς όγκους[66]. Η BLM είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντιβιοτικό που αναγνωρίστηκε ως προϊνωτικός παράγοντας όταν ασθενείς εμφάνισαν πνευμονική ίνωση μετά από ενδοφλέβια χορήγηση BLM[65]. Το 10-23% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με BLM εμφάνισαν πνευμονική τοξικότητα[66]. Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη ζώων, όπως ποντίκια, αρουραίοι, ινδικά χοιρίδια, χάμστερ, και σε πρωτεύοντα θηλαστικά- ωστόσο, τα ποντίκια είναι τα πιο

συνηθισμένα. Το μοντέλο της BLM είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο ζωικό μοντέλο που διατίθεται για προκλινικές δοκιμές φαρμάκων.

Πολλοί τύποι κυττάρων εμπλέκονται στη διαδικασία της επαγόμενης από BLM πνευμονικής ίνωσης, μηχανισμός που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την οδό χορήγησης του φαρμάκου. Πρωτεομική ανάλυση του που πραγματοποιήθηκε σε πνευμονικό ιστό και σε βρογχοκυψελιδικό υγρό έκπλυσης (BALF) ποντίκων C57Bl6, μετά από ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπλεομυκίνης υπέδειξε ότι υπάρχουν πολλοί τύποι κυττάρων που εμπλέκονται στην εξέλιξη της πνευμονικής βλάβης[66].

Πιστεύεται ότι η BLM δρα προκαλώντας μονόκλωνά και δίκλωνά θραύσματα στο DNA καρκινικών κυττάρων, διακόπτοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων αυτών. Η υδρολάση της μπλεομυκίνης είναι το ένζυμο που απενεργοποιεί την BLM και επηρεάζει την επίδραση του φαρμάκου με ιστό- ειδικό τρόπο. Οι πνεύμονες διατηρούν χαμηλά επίπεδα του ενζύμου, σε σύγκριση με το ήπαρ, και ως εκ τούτου είναι πιο ευαίσθητοι σε βλάβες που προκαλούνται λόγω χορήγησης BLM. Η υπερπαραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, οδηγεί σε θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων, υπερβολική διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ινοβλαστών, την εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας και την ανάπτυξη ίνωσης (ημέρες 10-21 με κορύφωση γύρω στην 14η ημέρα), σε μοριακό και ιστολογικό επίπεδο. Σε σχέση με την ΙΠΙ, έχει αποδειχθεί ότι η νόσος στα ποντίκια μοιάζει περισσότερο με την επιταχυνόμενη οξεία φάση της ΙΠΙ στον άνθρωπο. Οι μετρήσεις της πάχυνσης του κυψελιδικού διαφράγματος, της ενδοκυψελιδικής ίνωσης, της αύξησης των κυψελιδικών μακροφάγων και της διαστολής των βρόγχων και των κυψελιδικών πόρων κατέδειξαν μια ομοιόμορφη ινωτική κατανομή σε ένα μεγάλο μέγεθος δείγματος. Στα αρνητικά του μοντέλου συγκαταλέγεται η ταχύτητα ανάπτυξής της, η ύπαρξη φλεγμονής που προηγείται της ίνωσης και ότι οι πνεύμονες των πειραματικών ζώων επανέρχονται σε φυσιολογική κατάσταση συνήθως 21-28 ημέρες μετά την χορήγηση BLM (resolution phase). Τα ποντίκια C57BL/6J αποτελούν το πιο ευαίσθητο στέλεχος στην πνευμονική βλάβη μετά την χορήγηση BLM[67]. Η χορήγηση BLM μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλαπλές μεθόδους, όπως ενδοτραχειακά, ενδοπεριτοναϊκά, υποδόρια, ενδοφλέβια και εισπνεόμενα. Η ενδοτραχειακή ενστάλαξη, είναι η πιο συνηθισμένη οδός χορήγησης, η οποία θεωρείται ότι αναπαριστά καλύτερα τον ανθρώπινο φαινότυπο που περιορίζεται στους πνεύμονες. Ωστόσο, θεωρείται παρεμβατική μέθοδος που συνδέεται με αυξημένη

θνησιμότητα[65]. Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί η οροτραχειακή οδός χορήγησης που παρουσιάζει παρόμοια κινητική βλάβης με την ενδοτραχειακή χορήγηση με σημαντικά λιγότερες παρενέργειες (Εικόνα 9)[65, 68].



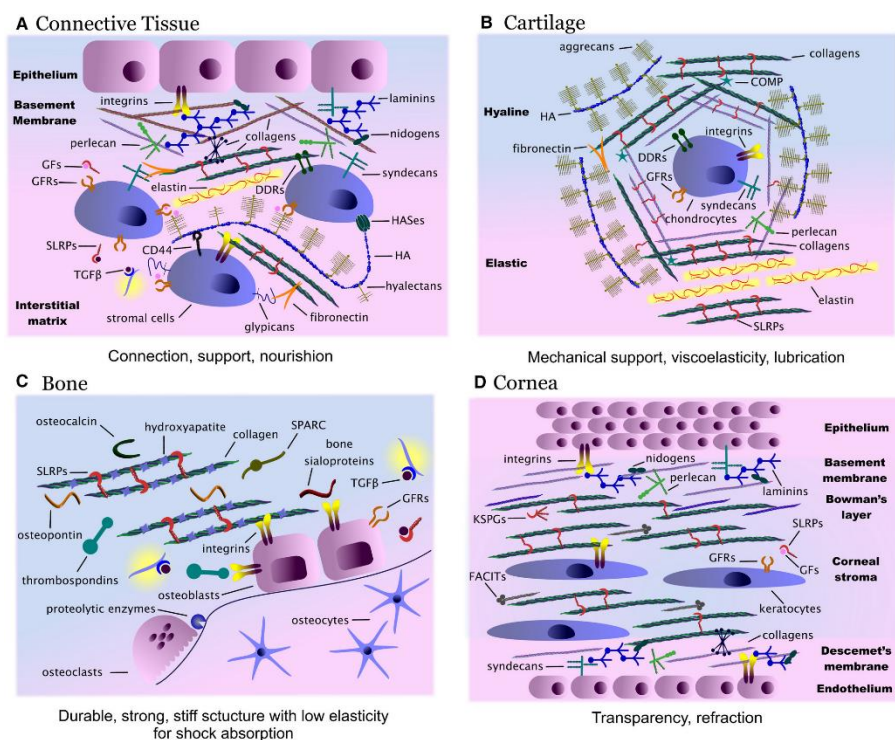
Εικόνα 9: Ενδεικτική εικόνα μετά από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης σε πνεύμονες ποντικών C57/Bl6, μετά την χορήγηση φυσιολογικού όρου και μπλεομυκίνης με ενδοτραχειακή (intratracheal, IT) και οροτραχειακή (oropharyngeal, OA) ενστάλαξη. Τροποποιημένη από [68].

Ένα άλλο ζήτημα που αναδεικνύεται σε μελέτες που χρησιμοποίησαν το μοντέλο της BLM είναι το ευρύ φάσμα των δοσολογικών σχημάτων που χρησιμοποιούνται. Συνήθως η χορήγηση πραγματοποιείται με δοσολογία ανάλογα με το βάρος του ζώου, ξεκινώντας από τα 1,25 U/kg με μέγιστο τα 4 U/kg. Όσον αφορά τη συχνότητα της δοσολογίας, προτιμάται η εφ άπαξ χορήγηση συγκριτικά με τις επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις. Η εφάπαξ χορήγηση χρησιμοποιείται συνήθως και σε μελέτες που αξιολογούν θεραπευτικούς στόχους. Οι δυνητικές θεραπείες χορηγούνται συνήθως 1-7 ημέρες μετά την έκθεση σε BLM, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα φάρμακα με θεραπευτικό ρόλο μπορεί να παρέχουν όφελος κυρίως μέσω της πρόληψης της φλεγμονής και όχι της αναστροφής της ίνωσης. Βέβαια όλο και περισσότερες μελέτες έχουν αρχίσει να διερευνούν τη χορήγηση φαρμάκων 7 ημέρες μετά την επαγωγή της νόσου [65].

1.2 Εξωκυττάρια Μήτρα (Extracellular Matrix)

1.2.1 Εισαγωγή

Ο όρος εξωκυττάρια μήτρα (ECM) αναφέρεται στο μείγμα κυττάρων και μη κυτταρικών συστατικών, τα οποία σχηματίζουν καλά οργανωμένα δίκτυα στους ιστούς και τα όργανα του οργανισμού[69]. Η ECM δεν λειτουργεί μόνο ως φυσικό ικρίωμα (scaffold) στο οποίο ενσωματώνονται τα κύτταρα, αλλά και ως σύνδεσμος επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, των οργάνων και των ιστών συντονίζοντας πολλαπλές σηματοδοτήσεις, ρυθμίζοντας έτσι πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η ομοιόσταση και η μορφογένεση. Η ECM αποτελείται από μια μεγάλη ποικιλία μακρομορίων των οποίων η ακριβής σύνθεση και δομή διαφέρει από ιστό σε ιστό (επιθηλιακό, νευρικό, μυϊκό και συνδετικό), ώστε να ανταποκρίνονται με τον βέλτιστο τρόπο στις απαιτήσεις για τις λειτουργίες των ιστών (Εικόνα 10). Τα σημαντικότερα συστατικά της ECM είναι πρωτεΐνες όπως τα κολλαγόνα, η ελαστίνη, η φιβρονεκτίνη, οι λαμινίνες, οι πρωτεογλυκάνες (PGs) και οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs)[70, 71].



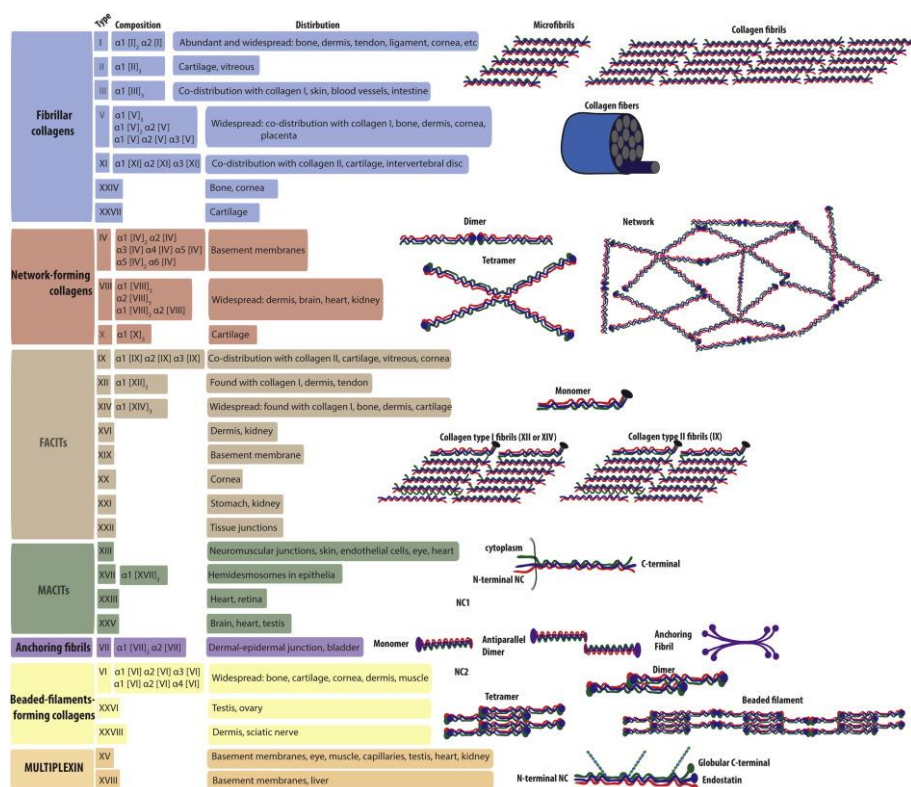
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της δομής και του ρόλου της ECM σε διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού [70].

1.2.2 Κύριες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας

Το **κολλαγόνο** είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη της ECM. Αποτελεί έως και το 30% των συνολικών πρωτεϊνών του ανθρώπου και συντίθεται και εκκρίνεται στην ECM κυρίως από τους ινοβλάστες. Η οικογένεια του κολλαγόνου αποτελείται από είκοσι οκτώ διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου που σχηματίζονται από τουλάχιστον σαράντα έξι διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α αλυσίδες) στα σπονδυλωτά. Το κολλαγόνο τύπου I είναι το κολλαγόνο που παρουσιάζει την πιο άφθονη έκφραση μεταξύ των ιστών. Και αποτελεί σημαντικό δομικό στοιχείο σε ιστούς όπως το δέρμα, τα οστά, και οι τένοντες. Τα κολλαγόνα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή και τις ιδιότητές τους. Τα κολλαγόνα μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με την ομολογία των τομέων τους και τις λειτουργίες τους σε επτά κατηγορίες (Εικόνα 11) .

Τα κολλαγόνα που σχηματίζουν ίνες (fibrillar collagens) αποτελούνται από τους τύπους κολλαγόνου I, II, III, V, XI, XXIV και XXVII. Συναντώνται σε αφθονία στους ιστούς παρέχοντας τους ανθεκτικότητα στην τάση. Η κατηγορία των κολλαγόνων που σχηματίζουν δίκτυα (network-forming collagens) περιλαμβάνει τους τύπους κολλαγόνου IV, VIII και X. Έχουν πολλές διακοπές στις τριπλές ελικοειδείς δομές τους που τα καθιστούν εύκαμπτα και ικανά να αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας εκτεταμένα δίκτυα. Επιπλέον, μπορούν να αλληλοεπιδρούν με διάφορα συστατικά της ECM δημιουργώντας πολυμοριακά σύμπλοκα. Τα κολλαγόνα που συνδέονται με ινίδια και έχουν διακεκομμένες τριπλές έλικες (fibril-associated collagens with interrupted triple helices, FACITs) περιλαμβάνουν τους τύπους κολλαγόνου IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII. Είναι σχετικά μικρά κολλαγόνα με περιοχές που διακόπτουν την τριπλή έλικα παρέχοντας στα μόρια αυτά ευελιξία. Τα κολλαγόνα που συνδέονται με τη μεμβράνη με διακοπόμενες τριπλές έλικες (membrane-associated collagens with interrupted triple helices, MACITs), είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II και περιλαμβάνουν τους τύπους κολλαγόνου XIII, XVII, XXIII, XXV. Τα κολλαγόνα αυτά εκφράζονται από διάφορα κύτταρα, στα οποία δρουν ως υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που επηρεάζουν την κυτταρική προσκόλληση και κατά την πρωτεολυτική διάσπαση αποβάλλονται από την κυτταρική επιφάνεια προς την ECM δημιουργώντας διαλυτά κολλαγόνα. Άλλες κατηγορίες κολλαγόνων περιλαμβάνουν τα κολλαγόνα που σχηματίζουν ινίδια αγκύρωσης (anchoring fibrils), τα κολλαγόνα που σχηματίζουν σφαιρικά ινίδια (beaded filament forming collagens), τα κολλαγόνα με πολλαπλές περιοχές τριπλής έλικας και διακοπές

(multiple triple-helix domains and interruptions, MULTIPLEXIN) και τα κολλαγόνα που παράγουν ενδοστατίνη. Στους περισσότερους ιστούς, το κολλαγόνο τύπου I που σχηματίζει ινίδια κυρίως στους χόνδρους και το κολλαγόνο τύπου II, είναι τα κύρια συστατικά των ECMs. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με άλλα κολλαγόνα, καθώς και με πρωτεΐνες της ECM για την κατασκευή μεγάλων δομών. Αυτές οι δομές διασυνδέονται με μόρια της ECM, τα οποία επίσης συνδέονται μεταξύ τους, δημιουργώντας το πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο της μήτρας[69].



Εικόνα 11: Ταξινόμηση, σύνθεση των αλυσίδων, κατανομή και δομικά χαρακτηριστικά των ειδών κολλαγόνου[69].

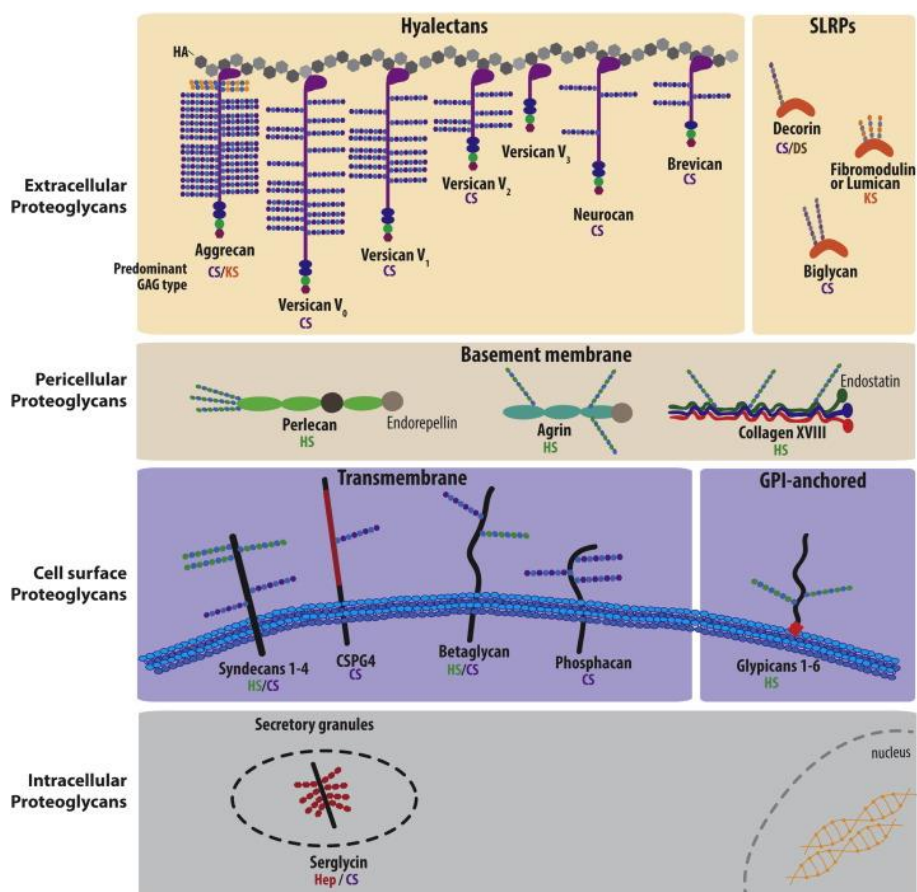
Η **ελαστίνη** είναι ένα άλλο σημαντικό συστατικό της ECM που υπάρχει σε συγκεκριμένους ιστούς που υφίστανται συνεχή διάταση, όπως οι πνεύμονες, τα ελαστικά αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα, οι ελαστικοί χόνδροι και οι σύνδεσμοι. Αποτελείται από μονομερή τροποελαστίνης που συνδέονται μέσω των καταλοίπων λυσίνης τους, σχηματίζοντας ελαστικές ίνες με επαρκή ελαστικότητα[72].

Ένα άλλο μόριο που σχηματίζει μακρομοριακές δομές είναι η **φιμπρονεκτίνη**. Ρόλος της είναι η ρύθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων, όπως η τάση που δημιουργείται λόγω αλλαγών στην διαμόρφωση. Η φιμπρονεκτίνη αλληλοεπιδρά επίσης με τις

ιντεγκρίνες που ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση, καθώς και με κυτταροκίνες και μόρια της ECM[70].

Οι **λαμινίνες** είναι σημαντικά συστατικά των βασικών μεμβρανών που αποτελούνται από μεγάλα ετεροτριμερή των αλυσίδων α, β και γ. Παρόλο που θα μπορούσαν να υπάρχουν πολυάριθμα πιθανά ετεροτριμερή των αλυσίδων α, β και γ, μόνο 16 συνδυασμοί τους έχουν βρεθεί σε ζωντανούς οργανισμούς. Έχουν την ικανότητα να αυτοσυνδέονται δημιουργώντας ένα μεγάλο δίκτυο στις βασικές μεμβράνες που αλληλοεπιδρούν με το δίκτυο του κολλαγόνου IV μέσω μορίων, όπως η περλεκάνη. Αλληλοεπιδρούν επίσης με τα επιθηλιακά κύτταρα μέσω πολλαπλών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένων των ιντεγκρινών και των PGs της κυτταρικής επιφάνειας, για να ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση και τη μετανάστευσή τους[72].

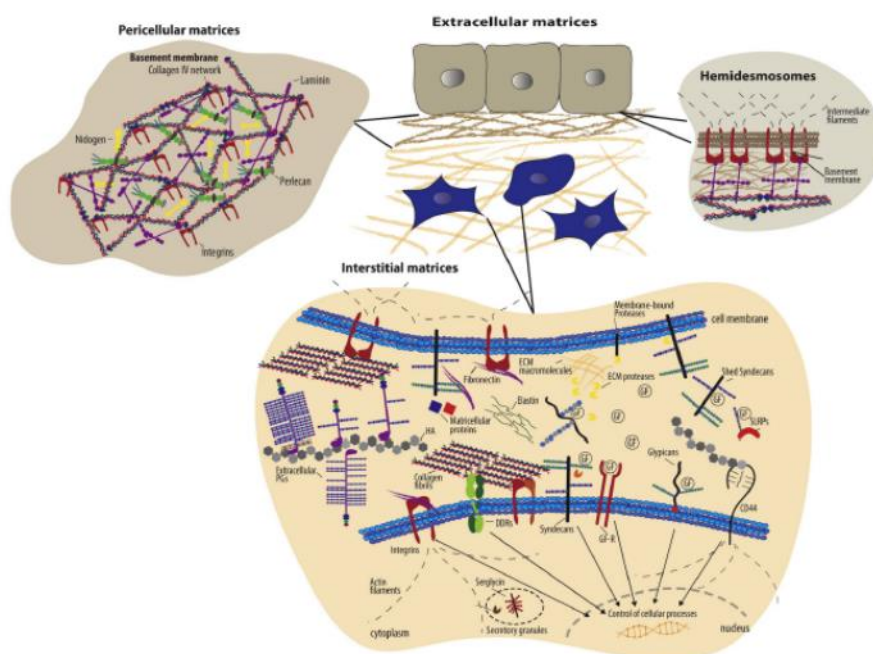
Οι **πρωτεογλυκάνες (PGs)** είναι από τα πιο σημαντικά δομικά και λειτουργικά βιομακρομόρια στους ιστούς. Αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό κορμό πάνω στον οποίο συνδέονται ομοιοπολικά μία περισσότερες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) ίδιου ή διαφορετικού τύπου. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι μακριές μη διακλαδισμένες αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες πολυσακχαριτών που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαριτών. Οι PG ταξινομούνται ως εξωκυτταριές, περικυτταρικές, κυτταρικής επιφάνειας και ενδοκυτταρικές ανάλογα με τον εντοπισμό τους, την ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο και παρουσία μοναδικών πρωτεϊνικών μονάδων (Εικόνα 12). Οι PGs βρίσκονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και στην επιφάνεια των κυττάρων, αλλά εντοπίζονται επίσης σε αφθονία στην ECM. Αλληλοεπιδρούν με πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και μόρια της ECM είτε μέσω των πρωτεϊνικού κορμού τους είτε μέσω των πλευρικών αλυσίδων GAG που συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργικές ιδιότητες των κυττάρων, όπως όπως η κυτταρική σηματοδότηση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η προσκόλληση. Λόγω της ικανότητάς τους να αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια ECM και κύτταρα, οι PGs είναι σημαντικά μόρια για την οργάνωση της ECM, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό του ικριώματος της ECM και την ενσωμάτωση των κυττάρων εντός αυτού[69].



Εικόνα 12: Ταξινόμηση και σχηματική αναπαράσταση των πρωτεογλυκανών[69].

Η ECM μπορούν να ταξινομηθεί σε δύο κύριους τύπους που διαφέρουν ως προς τη σύνθεση και τη δομή: την μεσοκυττάρια (interstitial) ECM και περικυτταρική (pericellular) ECM (Εικόνα 13). Οι μεσοκυττάρια περιβάλλει τα κύτταρα, ενώ η περικυτταρική μήτρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τα κύτταρα. Τα κύτταρα που είναι ενσωματωμένα στην ECM αλληλοεπιδρούν με αυτό το μακρομοριακό δίκτυο μέσω επιφανειακών υποδοχών, όπως οι ιντεγκρίνες, οι υποδοχείς της περιοχής των δισκοειδών (discoidin domain receptors, DDRs), οι PGs της κυτταρικής επιφάνειας και ο υποδοχέας του υαλουρονονικού οξέος (hyaluronic acid, HA) CD44. Έτσι τα κύτταρα ενσωματώνουν σήματα από την ECM, που υπαγορεύουν τις λειτουργίες και τη συμπεριφορά τους. Όλοι οι τύποι κυττάρων (επιθηλιακά, ινοβλάστες, ανοσοποιητικά, ενδοθηλιακά κύτταρα) συνθέτουν και εκκρίνουν μόρια της μήτρας υπό τον έλεγχο των πολλαπλών σημάτων συμμετέχοντας έτσι στο σχηματισμό της ECM. Παραλλαγές στη σύνθεση και της δομής των συστατικών της ECM επηρεάζουν τόσο τη συνολική δομή όσο και τις βιοχημικές ιδιότητες του σχηματιζόμενου δικτύου, αλλά

και τα σήματα που μεταδίδονται στα κύτταρα διαμορφώνοντας έτσι τις αποκρίσεις τους. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες εναποτίθενται εντός της ECMs μέσω της πρόσδεσης σε συγκεκριμένα μόρια και είναι σε θέση να απελευθερωθούν και να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους.



Εικόνα 13: Σχηματική επισκόπηση της εξωκυττάριας μήτρας, των κύριων πρωτεϊνών της και των κυτταρικών υποδοχέων επιφάνειας[69].

Η ECM είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ομοιόσταση και υφίσταται σε συνεχόμενη αναδιαμόρφωση σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως η επούλωση τραυμάτων. Η διατήρηση της ισορροπίας σύνθεσης και δομής της, είναι θεμελιώδους σημασίας για την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα των ιστών. Η αποικοδόμηση της μήτρας συνυπάρχει ταυτόχρονα με την παραγωγή και συσσώρευση νέων συστατικών της μήτρας. Αυτή η λεπτομερώς ρυθμιζόμενη διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη φυσιολογική αντικατάσταση της ECM. Η ανώμαλη αναδιαμόρφωση της μήτρας οδηγεί στην εμφάνιση διαφόρων παθολογιών, και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την έναρξη ή την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών, όπου η δομή και οι ιδιότητες της ECM αναδιαμορφώνονται με πολλαπλούς τρόπους[72]. Η ECM υποβάλλεται σε εκτεταμένη αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, δρώντας ως βασικός παράγοντας της εξέλιξης διαφόρων νόσων[70]. Στην αναδιαμόρφωσή της μήτρας

συμμετέχουν πολλά ένζυμα αποικοδόμησης της μήτρας [72], που τα σημαντικότερα από αυτά αναλύονται παρακάτω.

1.2.3 Ένζυμα αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας μήτρας

Πολλοί διαφορετικοί τύποι ενζύμων εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της ECM. Οι **μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (matrix metalloproteinases, MMPs)** είναι μια οικογένεια εξαρτώμενων από το ασβέστιο ενδοπεπτιδάσων, οι οποίες στοχεύουν μια πληθώρα μορίων, συμπεριλαμβανομένων συστατικών της μήτρας, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, καθώς επίσης μόρια προσκόλλησης και σηματοδότησης. Ταξινομούνται σε έξι ομάδες που περιλαμβάνουν τις κολλαγονάσες (collagenases), τις στρωμολυσίνες (stromelysins), τις ζελατινάσες (gelatinases), τις ματριλυσίνες (matrilysins), τις μεταλλοπρωτεϊνάσες των μεμβρανών (membrane-bound MMPs, MT-MMPs), και άλλες MMPs σύμφωνα με την ομολογία των τομέων τους και την ειδικότητα υποστρώματος. Οι MMPs εκκρίνονται μετά τη διάσπαση του προπεπτιδίου τους. Οι εκκρινόμενες MMPs ενεργοποιούνται εξωκυττάρια από διάφορες πρωτεάσες. Οι MT-MMPs εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη είτε μέσω ενός διαμεμβρανικού τομέα ή μέσω μιας άγκυρας GPI και ενεργοποιούνται από πρωτεάσες. Η δραστηριότητα των MMPs ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση με τους αναστολείς ιστών των MMPs (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs), από την ενεργοποίησή τους από άλλες πρωτεάσες καθώς και από τη σύνδεση τους με συστατικά της μήτρας. Εμπλέκονται στη φυσιολογική αναδιαμόρφωση των ιστών που συμβαίνει στην οργανογένεση και την επούλωση τραυμάτων, καθώς και στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και η ίνωση.

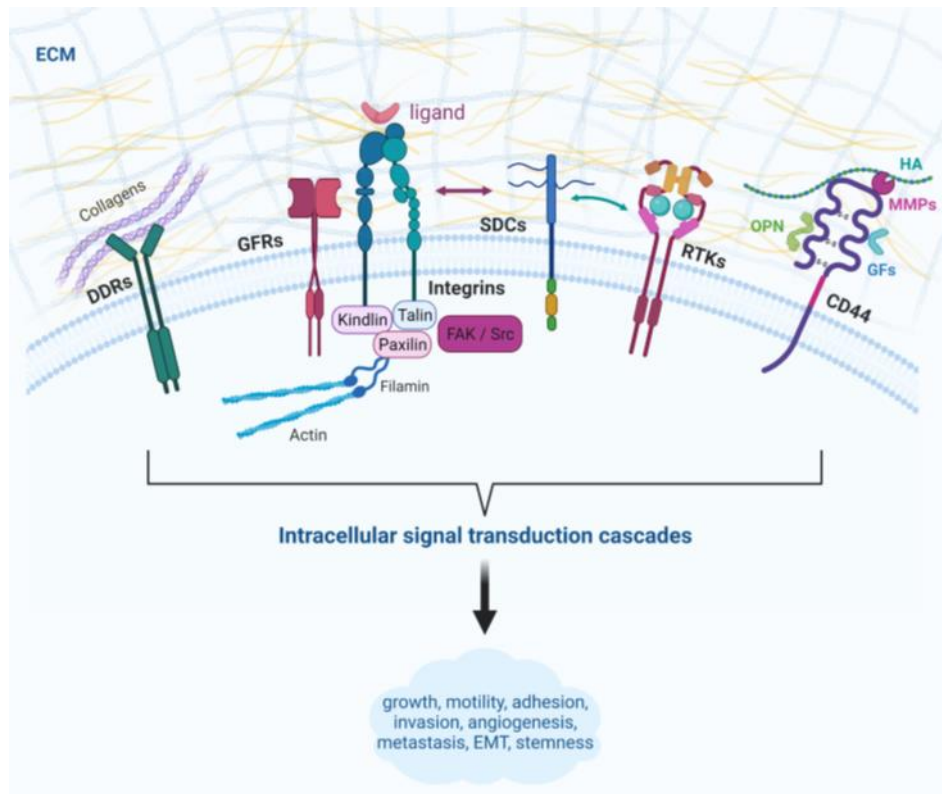
Άλλες συναφείς οικογένειες εξαρτώμενων από τον ψευδάργυρο πρωτεάσες είναι οι **ADAMs** και οι **ADAMTSs** [40,41]. Οι πρωτεάσες ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) είναι διαμεμβρανικές πρωτεάσες που περιέχουν περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και θέσεις για τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF). Οι ADAMTSs εκκρίνονται στην ECM, στοχεύουν πολυάριθμα μόρια και εμπλέκονται στην φυσιολογική και παθολογική αναδιαμόρφωση. Άλλες σημαντικές πρωτεάσες που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της μήτρας είναι οι πρωτεάσες σερίνης και ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστικού τύπου (tissue-type plasminogen activator, tPA), οι οποίες εμπλέκονται στη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Ο καταρράκτης της πλασμίνης εμφανίζει ευρεία εξειδίκευση στοχεύοντας πληθώρα συστατικών της μήτρας και μορίων σηματοδότησης, ενώ ενεργοποιεί αρκετές MMPs.

Άλλες **πρωτεάσες σερίνης**, εκκρίνονται από τα ανοσοποιητικά και μη ανοσοποιητικά κύτταρα στην ECM και μπορούν να αποικοδομήσουν μια ποικιλία πρωτεϊνών της μήτρας, καθώς και κυτταρικών υποδοχέων επιφάνειας που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-μήτρας.

Οι **καθεψίνες κυστεΐνης**, αν και εντοπίζονται στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα ασκούν επίσης τις λειτουργίες τους στην ECM αποικοδομώντας μόρια της ECM. Ορισμένες καθεψίνες εκκρίνονται στην ECM, και σε ελαφρώς όξινες συνθήκες, επικρατούν σε ασθένειες όπως ο καρκίνος και η οστεοαρθρίτιδα. Εκτός από τις πρωτεάσες, τα ένζυμα αποικοδόμησης των GAG, εμπλέκονται επίσης στην αναδιαμόρφωση της ECM τροποποιώντας τη δομή και το μέγεθος των PGs. Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί 6 ένζυμα αποικοδόμησης του HA, που αποτελεί την πιο γνωστή GAG. Ορισμένα από αυτά είναι δραστικά σε όξινο ή/και σε ουδέτερο pH και αποικοδομούν το υψηλού μοριακού βάρους HA σε μικρότερα βιοδραστικά θραύσματα στην ECM. Τα ένζυμα αυτά επάγουν βιολογικά γεγονότα όπως η αγγειογένεση, η φλεγμονή, και η εξέλιξη του καρκίνου. Ένα άλλο ένζυμο αποικοδόμησης GAG που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της ECM είναι η ηπαράνση (heparinase). Η ηπαράνση είναι μια ενδογλυκουρονιδάση που διασπά τις αλυσίδες θεικής ηπαράνης (heparan sulfate, HS), μειώνοντας το μέγεθός των PGs και απελευθερώνοντας βιοδραστικά θραύσματα HS 4-7 kDa. Υπερεκφράζεται σε ασθένειες όπως ο καρκίνος και προάγει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση και την αγγειογένεση[72].

1.2.4 Υποδοχείς και κυτταρική σηματοδότηση με τη μεσολάβηση της ECM

Τα κύτταρα ελέγχουν συνεχώς τη βιοχημική σύνθεση της της περιβάλλουσας μήτρας χρησιμοποιώντας διάφορους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας συμπεριλαμβανομένων των ιντεγκρινών, των υποδοχέων τομέα της δισκοειδών (discoidin domain receptors, DDRs), των υποδοχέων SDCs και του CD44, για να ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μεταγωγή σήματος μέσω υποδοχέων με τη μεσολάβηση της ECM[73].

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικά ετεροδιμερή που μπορούν να συνδεθούν με διάφορες πρωτεΐνες, όπως τα κολλαγόνα, και δρουν όχι μόνο ως πρωτεΐνες συγκράτησης, αλλά και ως μεταγωγείς σημάτων σε ενδοκυτταρικά μόρια για τον έλεγχο της συμπεριφοράς των κυττάρων. Ειδικότερα, οι ιντεγκρίνες δημιουργούν σύμπλοκα που ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις εστιακής προσκόλλησης και ξεκινούν τη συναρμολόγηση του δικτύου συνάφειας (adhesome).

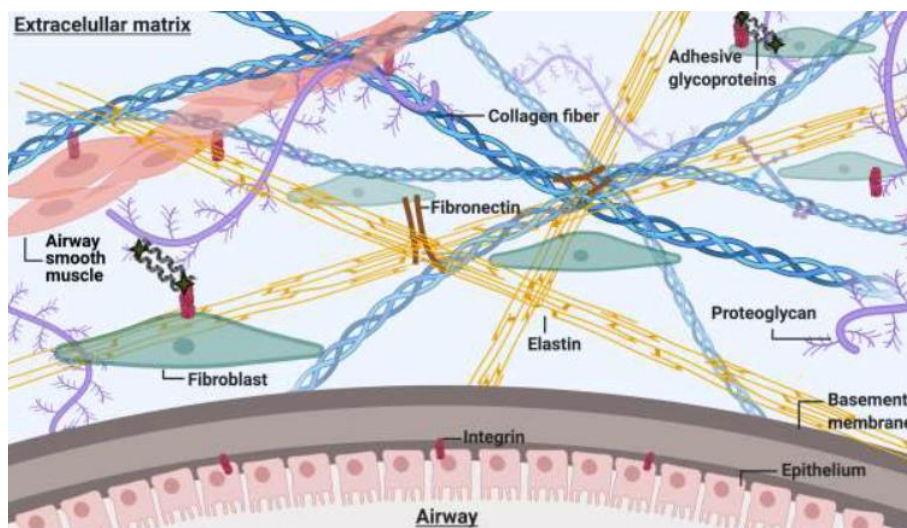
Μετά την διέγερση από αυξητικούς παράγοντες, συν-εντοπίζονται στις εστιακές συγκολλήσεις μαζί με τον αυξητικό παράγοντα των υποδοχέων (growth factor receptors, GFRs), με σηματοδοτικά μόρια, (FAK, Src) και μόρια που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, όπως η βινκουλίνη, η ταλίνη και η παξιλίνη. Με αυτόν τον τρόπο, οι ιντεγκρίνες διαμορφώνουν τελικά την δραστηριότητα των μεταγενέστερων παραγόντων, όπως οι PI3K/Akt, JNK, ERK και των Rho GTPασών. Οι DDRs συνδέονται με υποδοχείς κινάσεων τυροσίνης (RTKs), και παρουσιάζουν ειδικά χαρακτηριστικά, με πιο χαρακτηριστικό την ικανότητα δέσμευσης των κολλαγόνων. Οι SDCs, είναι διαμεμβρανικές πρωτεογλυκάνες με κυτταροειδικά και ιστοειδικά πρότυπα έκφρασης, και αποτελούν υποδοχείς που σχετίζονται κυρίως με την προσκόλληση. Επιπλέον, οι SDCs δρουν συνεργιστικά με τις ιντεγκρίνες και χρησιμεύουν ως

συνυποδοχείς των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Ο υποδοχέας CD44 είναι ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που συνδέεται με συστατικά της ECM, όπως το HA, η οστεοποντίνη (OPN) και οι MMPs, για να διεγείρει μεταγενέστερα μονοπάτια σηματοδότησης, όπως το PI3K/Akt. Παρ' όλα αυτά, το CD44 αλληλοεπιδρά επίσης με άλλα πολυάριθμα μόρια ECM, αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες και προάγει την ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση, τη μετάσταση και τον καρκίνο[73].

1.2.5 Η εξωκυττάρια μήτρα του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε, η σύνθεση της ECM ποικίλλει μεταξύ των συνδετικών ιστών, προκειμένου να προσαρμόζεται στις λειτουργίες του[72]. Η ECM του πνεύμονα (Εικόνα 15) συμβάλλει στην διατήρηση της βασικής αρχιτεκτονικής των ιστών του πνεύμονα. Ο όρος *matrisome*, αναφέρεται στο πλήρες σύνολο των πρωτεϊνών που συνθέτουν την εξωκυττάρια μήτρα ενός ιστού ή οργανισμού. Το *matrisome* του πνεύμονα ασκεί 3 θεμελιώδεις λειτουργίες στο πνεύμονα. Παρέχει δομική υποστήριξη, εμποδίζοντας την κατάρρευση των ανώτερων αεραγωγών, σχηματίζει μία μεμβράνη στους κατώτερους αεραγωγούς, διευκολύνοντας την ανταλλαγή αερίων και χρησιμεύει ως δεξαμενή για τους αυξητικούς παράγοντες ενεργοποιώντας σηματοδοτικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων και επηρεάζοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την λειτουργία τους μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας[71].

Στον φυσιολογικό πνεύμονα, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν διακλαδισμένες δομές, ενώ εκφράζουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με επιφανειοδραστικές ουσίες. Επιπλέον, η ακαμψία της μήτρας επηρεάζει τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες και ενισχύει τη χημειοτακτική δραστηριότητα, τη φαγοκυττάρωση και την προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων. Η δυσκαμψία του πνεύμονα αυξάνεται όταν η ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και αποικοδόμησης των συστατικών της ECM διαταράσσεται, ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζει διάφορες πνευμονικές παθήσεις[71].



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων πρωτεϊνών της πνευμονικής ECM [74].

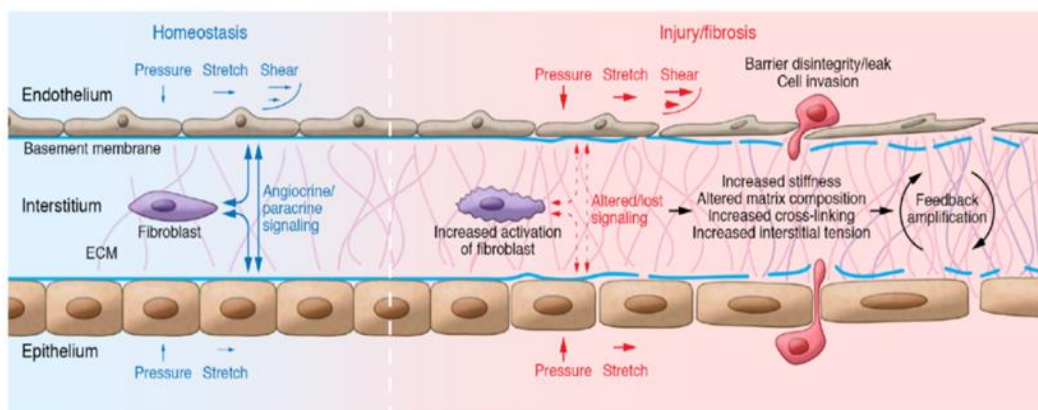
1.2.6 Ο ρόλος της εξωκυττάριας μήτρας στην ΙΠΠ

Ο ρόλος της ECM είναι έχει μελετηθεί εκτενώς στην παθογένεια της ΙΠΠ. Εκεί η ECM αντιπροσωπεύει έναν πολυδύναμο προϊνωτικό μεσολαβητή που λειτουργεί ως ρυθμιστής της κυτταρικής συμπεριφοράς μέσω των βιοχημικών ιδιοτήτων της, που ελέγχονται από τη συγκεκριμένη σύνθεση και αποικοδόμηση της μήτρας καθώς και από την απελευθέρωση των χημικών μεσολαβητών. Η ανώμαλη αναδιαμόρφωση της ECM, η οποία αναφέρεται σε αλλαγές στην σύνθεση και οργάνωση της, μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης μέσω διαφορετικών μηχανισμών [71], οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι:

Τροποποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων του πνεύμονα

Ο τραυματισμός του πνεύμονα αναπόφευκτα διαταράσσει τη μηχανική ομοιόσταση που διέπει τη φυσιολογική αρχιτεκτονική και λειτουργία του ιστού. Ο τραυματισμός του ιστού, οδηγεί σε καταστροφή της ακεραιότητας των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα αυξημένη διαπερατότητα, αυξημένη κυτταρική εισβολή, απελευθέρωση φλεγμονωδών σημάτων και κυτταροκινών, διαταραγμένη κυτταρική συστολή και πίεση, καθώς και αυξημένη εναπόθεση συστατικών ECM. Η μη αποκατάσταση των φυσιολογικών ομοιοστατικών μηχανικών και κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, οδηγεί σε συσσώρευση πρωτεϊνών ECM που προάγει την δυσκαμψία της μήτρας και την επίμονη κυτταρική δυσλειτουργία (Εικόνα 16).

Το μηχανικό περιβάλλον στον ινωτικό ιστό εξελίσσεται προς μια συνθήκη που χαρακτηρίζεται από αυξημένη δυσκαμψία[75]. Η αυξημένη δυσκαμψία του πνευμονικού παρεγχύματος, εξαιτίας της υπερβολικής εναπόθεσης ECM προκαλεί δύσπνοια, το πρώτο κλινικό σύμπτωμα της ΙΠΠ. Η αύξηση της δυσκαμψίας των πνευμόνων μετράται έμμεσα με τη μείωση της βίαιης ζωτικής χωρητικότητας (FVC), η οποία συσχετίζεται με τη θνησιμότητα και είναι η καλύτερη παράμετρος για τον προσδιορισμό της εξέλιξης της νόσου[76].



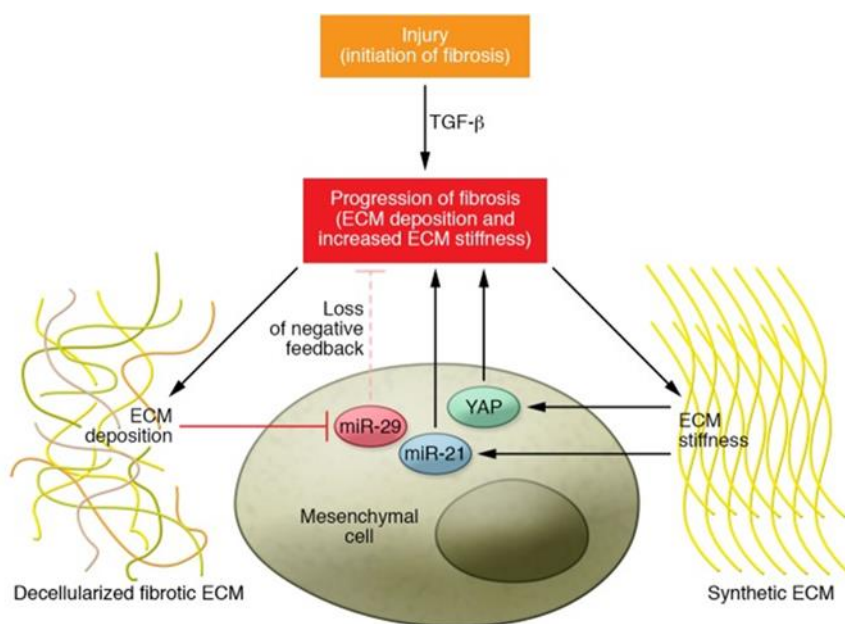
Εικόνα 16: Μεταβολές της ECM κατά τον τραυματισμό του ιστού[75].

Μηχανικό στρες

Η εναπόθεση ECM και οι μεταβολές στις μηχανικές ιδιότητες του πνευμονικού ιστού στην ΙΠΠ μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένο μηχανικό στρες, που μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια σηματοδότησης και να επηρεάσει την κυτταρική συμπεριφορά, συμβάλλοντας τελικά στην εξέλιξη της νόσου.

Η μηχανική ακαμψίας της ECM είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την εξέλιξη της ίνωσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει νέες ιδέες για βρόχους θετικής ανατροφοδότησης με τη μεσολάβηση της ECM σε ασθενείς με ΙΠΠ. Απουσία εξωγενών κυτταροκινών, η ECM της ΙΠΠ προκαλεί τη φυσιολογική μετατροπή των ινοβλαστών του πνεύμονα σε ενεργοποιημένους μυοϊνοβλάστες που μειώνουν την έκφραση του microRNA-29 (miR-29), κύριου αρνητικού ρυθμιστή στρωματικών γονιδίων. Μόλις σχηματιστεί, η ECM στην ΙΠΠ δημιουργεί ένα βρόχο προ-ινωτικής ανάδρασης που μπορεί να διατηρήσει την ίνωση. Η αυξημένη ακαμψία του υποστρώματος ενεργοποιεί τη μηχανοευαίσθητη πρωτεΐνη 1 (YAP) που σχετίζεται με το μονοπάτι Hippo, το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Η ενεργή YAP με τη σειρά της, ρυθμίζει ανοδικά την εναπόθεση και

τη δυσκαμψία της ECM, αποτελώντας έναν άλλο βρόχο θετικής ανάδρασης. Στα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, (mesenchymal progenitor cells, MPC), η αυξημένη ακαμψία μεσολαβεί στην απόκτηση μηχανικής μνήμης προκαλώντας σταθερή αύξηση του miR-21, θετικού ρυθμιστή της εναπόθεσης ECM, επιτρέποντας σε αυτά τα κύτταρα να διατηρούν σταθερά τον ινωτικό φαινότυπό τους και να αυξάνουν περαιτέρω την ακαμψία της ECM (Εικόνα 17)[77].



Εικόνα 17: Βρόχοι ανατροφοδότησης με τη μεσολάβηση της ECM κατά την έναρξη και την εξέλιξη της ίνωσης[77].

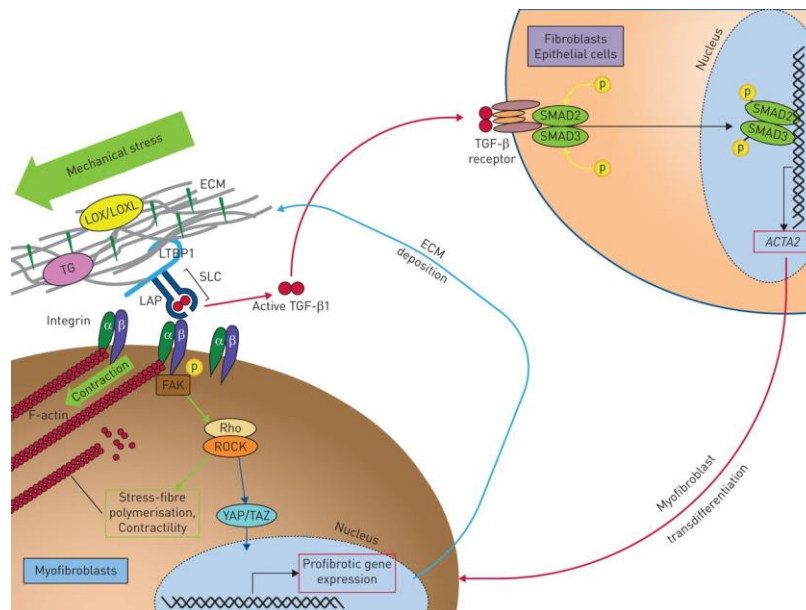
Ενεργοποίηση του TGF-β

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός που εξηγεί την επίδραση της αυξημένης μηχανικής ακαμψίας στον ινωτικό φαινότυπο είναι η επαγόμενη ενεργοποίηση του TGF-β1. Μελέτες αποδεικνύουν ότι η αυξημένη μηχανική τάση ενεργοποιεί και απελευθερώνει λανθάνοντα TGF-β1 σε ινωτικούς πνεύμονες.

Ο παράγοντας TGF-β συντίθεται ως προπεπτίδιο. Αρχικά, το προπεπτίδιο ελευθερώνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου διμερίζεται και αναδιπλώνεται. Εντός του κυττάρου, το ώριμο τμήμα του πεπτιδίου συγκρατείται σε λανθάνουσα μορφή μέσω μη ομοιοπολικής σύνδεσης με το προπεπτίδιο LAP, σχηματίζοντας το μικρό λανθάνον σύμπλοκο (SLC), το οποίο προσκολλάται στην ECM. Οι ιντεγκρίνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων συνδέουν το LAP με τον κυτταροσκελετό, για να καταστεί δυνατή η μεταγωγή του μηχανικού σήματος στο εσωτερικό του

κυττάρου. Παρουσία μηχανικού στρες, το SLC διασπάται και απελευθερώνει το βιοδραστικό ομοδιμερές TGF- β 1. Η ενεργός πρωτεΐνη TGF- β 1 στην συνέχεια δεσμεύεται στον υποδοχέα της που βρίσκεται στα γειτονικά κύτταρα (επιθηλιακά, ινοβλάστες). Η ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του συμπλόκου SMAD2/3, με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε μυοϊνοβλάστες. Το μηχανικό στρες προκαλεί επίσης συστολή της ακτίνης μέσω των ιντεγκρινών, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK) για την προώθηση του περαιτέρω πολυμερισμού της ακτίνης. Η φωσφορυλίωση της FAK ενεργοποιεί επίσης την Rho κινάση (ROCK), η οποία οδηγεί σε αυξημένη συσταλτικότητα της ακτομυοσίνης. Σε απόκριση σε αυτά τα μηχανικά σήματα, οι μηχανοευαίσθητες πρωτεΐνες YAP (yes-associated protein) και TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) μετατοπίζονται στο πυρήνα του κυττάρου για να προωθήσουν τη μεταγραφή προινωτικών γονιδίων, προωθώντας την εναπόθεση ECM. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το περιβάλλον των κυττάρων να γίνεται ακόμα πιο άκαμπτο και δύσκαμπτο, προσθέτοντας έτσι περαιτέρω τη μηχανική καταπόνηση που ασκείται στα κύτταρα (Εικόνα 18).

Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η δυσκαμψία των ιστών συσχετίζεται θετικά με την ποσότητα του ενεργού TGF- β 1 που απελευθερώνεται από τον ιστό μετά από μηχανική διάταση. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δυσκαμψία του περιβάλλοντος είναι ικανή να ενεργοποιεί τον TGF- β 1, ο οποίος μπορεί να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ικανότητα του ECM να υπαγορεύει έναν προϊνωτικό κυτταρικό φαινότυπο και να προάγει την προοδευτική πνευμονική ίνωση[88].



Εικόνα 18: Δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ ECM, κυττάρων και TGF-β[76].

Συμμετοχή των ενζύμων διασταυρούμενης (cross-linking) σύνδεσης στην ΠΠ.

Τα ένζυμα διασταυρούμενης σύνδεσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοποίηση της ECM. Οι βιομηχανικές ιδιότητες της ECM επηρεάζονται έντονα από τη βιοχημική σύνθεση της μήτρας και των επιμέρους συστατικών της, καθώς και από μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση, και η διασταυρούμενη σύνδεση[76]. Αυτά τα ένζυμα διασταυρούμενης σύνδεσης, όπως οι τρανσγλουταμινάσες (TGs), και οι οξειδάσες της λυσίνης (lysyl oxidase, LOX), ρυθμίζουν τη σταθερότητα, την ωρίμανση και τον κύκλο εργασιών του κολλαγόνου και εξασφαλίζουν την σωστή σύνδεση των συστατικών της ECM για τη βέλτιστη λειτουργία της[71].

Τα αντισώματα έναντι της LOXL2 ανέστειλαν μια σειρά από ινωτικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης αυτής της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης. Επιπλέον, τα υψηλότερα επίπεδα LOXL2 στον ορό ασθενών με ΠΠ, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου. Μια πρόσφατη μελέτη που διερεύνησε το ρόλο τόσο των ενζύμων TG όσο και των LOXL κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η παθολογική διασταυρούμενη σύνδεση της ECM στην ΠΠ αυξάνει την ανάπτυξη των ινοβλαστών και την αντίσταση στη φυσιολογική αναδιαμόρφωση της ECM. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα ένζυμα διασταυρούμενης σύνδεσης ρυθμίζουν την ανάπτυξη της ίνωσης. Εκτός από την αυξημένη εναπόθεση ECM, η ανώμαλη διασταύρωση των πρωτεϊνών της ECM, ιδιαίτερα του κολλαγόνου,

οδηγεί στην συσσώρευση ινοβλαστών, στο σχηματισμό περισσότερο άκαμπτων δομών εντός της ECM, συμβάλλοντας περαιτέρω στην αύξηση της ακαμψίας[88].

Ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς

Η ECM μπορεί επίσης να διαμορφώνει τη συμπεριφορά διαφόρων κυτταρικών τύπων που εμπλέκονται στην πνευμονική ίνωση, όπως οι ινοβλάστες και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

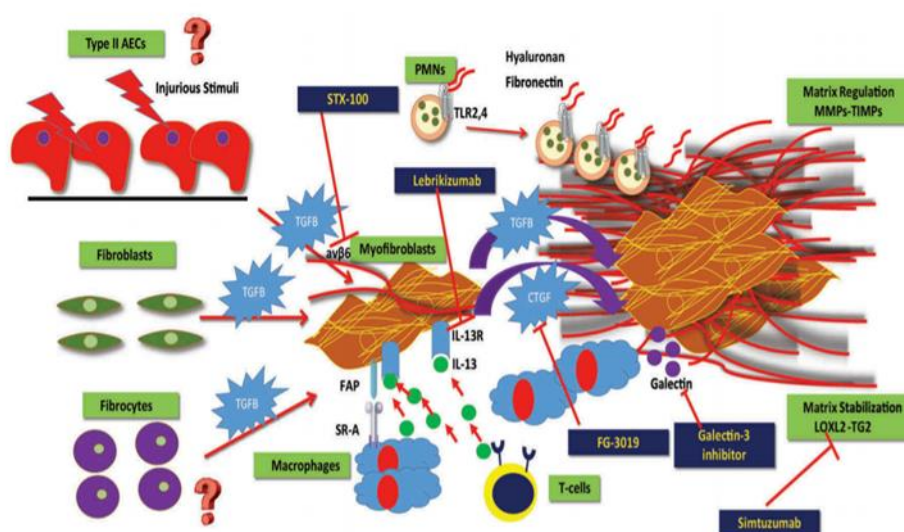
Οι ινοβλάστες είναι ο κύριος κυτταρικός τύπος που παράγει και αποικοδομεί την ECM. Οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες δεν εντοπίζονται στον υγιή πνευμονικό ιστό και συσσωρεύονται ως απόκριση σε μια βλάβη. Στο πλαίσιο της ΙΠΙ, οι μυοϊνοβλάστες διαφεύγουν του φυσιολογικού ελέγχου, αντιστέκονται στην απόπτωση, και παρουσιάζουν έναν εκκριτικό φαινότυπο που οδηγεί στο χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθολογίας της νόσου, τις εστίες μυοϊνοβλαστών. Με βάση τις υπάρχουσες μελέτες, μέχρι στιγμής, η προέλευση των ινοβλαστικών εστιών της ΙΠΙ οφείλεται είτε στην διέγερση των φυσιολογικών πνευμονικών ινοβλαστών από τοπικούς προϊνωτικούς αυξητικούς παράγοντες (TGF- β , CTGF TNF- α), είτε στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II που κάτω από τα επαναλαμβανόμενα τραυματικά ερεθίσματα υφίστανται επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες, είτε στα προγονικά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών που συσσωρεύονται στον τραυματισμένο ιστό και συμβάλλουν στη συσσώρευση του ECM κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ίνωσης. Πειραματικές μελέτες στους πνεύμονες έχουν ποσοτικοποιήσει τη συμβολή του κάθε μηχανισμού, εκτιμώντας ότι η EMT αντιπροσωπεύει το 30% των ενεργοποιημένων μυοϊνοβλαστών, τα κύτταρα του μυελού το 20%, ενώ το υπόλοιπο 50% προέρχεται από τα στρωματικά κύτταρα. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν αυτούς τους αριθμούς[71].

Η συνεχής αλληλεπίδραση μεταξύ ινοβλαστών και ECM παρουσία προϊνωτικών αυξητικών παραγόντων είναι υπεύθυνη για την υπερβολική εναπόθεση ECM και την προοδευτική ουλοποίηση των πνευμόνων. Δεδομένα δείχνουν ότι η αυξημένη ακαμψία της μήτρας ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την αντίσταση στην απόπτωση. Επίσης, η προέλευση της ECM έχει αποδειχθεί πιο σημαντική από την κυτταρική προέλευση στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ινοβλαστών κατά την εξέλιξη της ίνωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η καλλιέργεια ινοβλαστών σε ινωτική ECM, επάγει έναν θετικό βρόχο ανατροφοδότησης μεταξύ των

ινοβλαστών, ανεξάρτητα από το αν οι ινοβλάστες αυτοί προέρχονται από υγιείς ή ασθενείς[71]. Η υψηλή δυσκαμψία της ECM σε έναν ιστό ΙΠΙ είναι ένα τυπικό παράδειγμα του πώς η ECM καθοδηγεί την διαφοροποίηση των κυττάρων[75].

Η ECM μπορεί επίσης να δράσει ως φλεγμονώδης μεσολαβητής. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά από τα συστατικά της ECM, συμπεριλαμβανομένων του HA και της ελαστίνης, συμβάλλουν άμεσα στη φλεγμονή μέσω της ρύθμισης της χημειοτακτικής δραστηριότητας, της φαγοκυττάρωσης, της προσκόλλησης και των ανοσολογικών αποκρίσεων των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων[71].

Συνολικά, η ECM δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα αθώο ικρίωμα, αλλά αντιπροσωπεύει ένα πολυδύναμο προϊόντικό μεσολαβητή που θα μπορούσε να εξηγήσει την εξέλιξη και ετερογένεια της νόσου και να παρέχει αποκαλυπτικά στοιχεία σχετικά με τον σύνθετο μηχανισμό της ΙΠΙ. Η ECM λειτουργεί ως ευέλικτος ρυθμιστής της κυτταρικής συμπεριφοράς μέσω των βιομηχανικών και βιοχημικών ιδιοτήτων της, που ελέγχονται από τη συγκεκριμένη σύνθεση και αναδιαμόρφωση της ακαμψίας της μήτρας καθώς και από την απελευθέρωση των χημικών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών. Υπό το πρίσμα αυτών των δεδομένων, οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στην μεταβολή της δομής της ECM αναπτύσσοντας θεραπευτικούς παράγοντες (Εικόνα 19) που στοχεύουν στην θεραπεία της ΙΠΙ μέσω αλλαγής του μικροπεριβάλλοντος της ECM[71].



Εικόνα 19: Αναπαράσταση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, που στοχεύουν στην θεραπεία της ΙΠΙ μέσω αλλαγής του μικροπεριβάλλοντος της ECM[71].

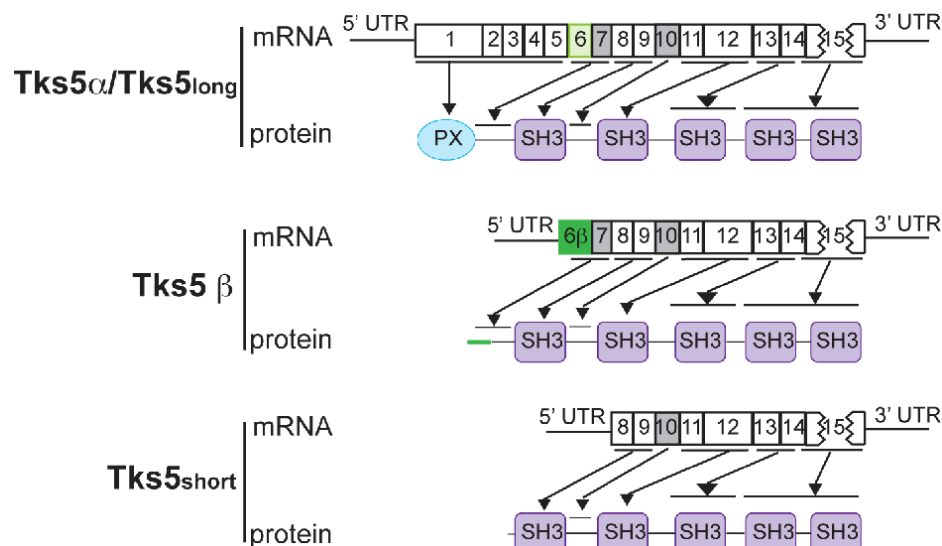
1.3 Το γονίδιο SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A /TKS5)

1.3.1 Δομή

Το γονίδιο SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A), γνωστό και με την ονομασία Tyrosine kinase substrate 5 (Tks5), χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 10 στον άνθρωπο και έχει μέγεθος 267 kb[78]. Το SH3PXD2A γονίδιο παράγει δυο κύρια μετάγραφα διαφορετικού μήκους (long-short transcripts), τα οποία προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, μεταξύ των εξονίων 7 και 10. Το πλήρες (long) μετάγραφο έχει μήκος 11468 ζεύγη βάσεων και αποτελείται από 15 εξώνια. Το μικρότερο μετάγραφο (short isoform), συναντάται σε τρεις διαφορετικές μορφές, η κυριότερη από τις οποίες, αποτελείται από 11.245 ζεύγη βάσεων και 14 εξώνια[79].

Και τα 2 μετάγραφα (long-short), μεταγράφονται από τον ίδιο υποκινητή ο οποίος βρίσκεται ανοδικά του εξονίου 1. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου SH3PXD2A που αντιστοιχεί στο πλήρες μετάγραφο, αποτελείται από 1133 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 150 kDa. Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης Tks5 περιλαμβάνει μια Phox-ομόλογη περιοχή (PX) στο αμινοτελικό άκρο και πέντε Src ομόλογες (SH3) περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο.

Στα ποντίκια, το γονίδιο sh3pxd2a βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19. Το πλήρες μετάγραφο (sh3pxd2a/tks5 long), έχει μήκος 10.464 ζεύγη βάσεων και αποτελείται από 15 εξώνια. Το 2013, σε εργασία για την έκφραση του γονιδίου SH3PXD2A σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, διαπιστώθηκε, ότι υπάρχει ακόμα ένα βραχύ μετάγραφο (tks5 short), το οποίο περιέχει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία από το ιντρόνιο 7 του ακολουθούμενη από τα εξώνια 8-15[80]. Το 2014, έρευνα βασιζόμενη στην παραπάνω εργασία, ανέδειξε ακόμα μία ισομορφή του γονιδίου (tks5 β) στο ποντίκι, της οποίας η κωδική αλληλουχία ξεκινά στο εξώνιο 6β και αποτελείται από τα εξώνια 8-15 (Εικόνα 20)[78].



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση των τριών μεταγράφων του γονιδίου *sh3pxd2a* και των πρωτεϊνών που προκύπτουν[78].

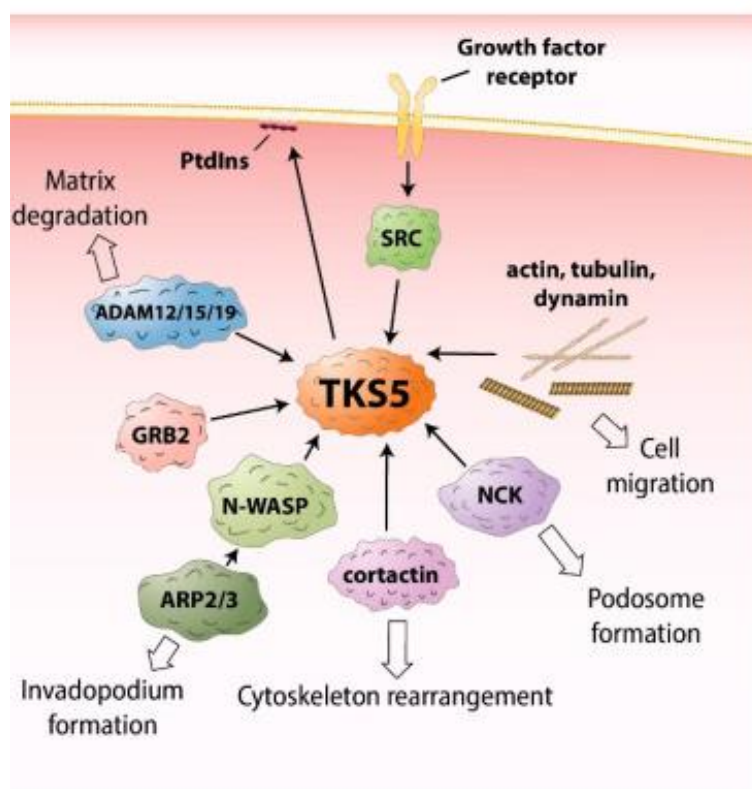
Η περιοχή PX, είναι μια περιοχή δέσμευσης φωσφολιπιδίων, σχηματίζεται από 120 αμινοξέα και εμφανίζεται σε μια ποικιλία ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Η κύρια λειτουργία της περιοχής PX είναι να συνδέει τις πρωτεΐνες ικριώματος TKS με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της δέσμευσης φωσφοϊνοσιτιδίων[81]. Η περιοχή PX αποτελείται στο αμινοτελικό άκρο από μία τριπλή αλυσίδα που σχηματίζει δομή β-πτυχωτού φύλλου η οποία ακολουθείται από μια ελικοειδή δομή που αποτελείται από τέσσερις α-έλικες. Οι περιοχές ομολογίας SH3, είναι μικρές πρωτεϊνικές περιοχές 50 περίπου αμινοξέων, που αρχικά εντοπίστηκαν στο μη καταλυτικό τμήμα αρκετών κινασών τυροσίνης. Έκτοτε, έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία άλλων ενδοκυτταρικών ή μεμβρανικών πρωτεϊνών[82, 83]. Οι SH3 περιοχές χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για τα σηματοδοτικά μόρια και μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης[81].

1.3.2 Ρόλος

Η Tks5, είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογέας (adaptor), που λειτουργεί ως σκαλωσιά (scaffold), συνδεόμενη με άλλες πρωτεΐνες, διευκολύνοντας το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών συμπλοκών. Οι πρωτεΐνες προσαρμογείς, διαμορφώνουν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση φέρνοντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες, ένζυμα ή κυτταροσκελετικές δομές σε κοντινή απόσταση[81].

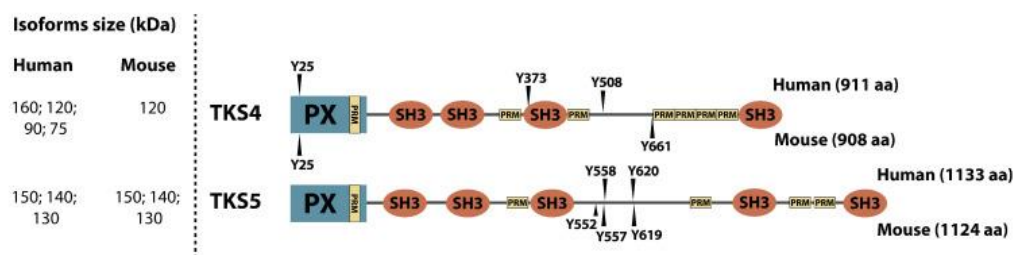
Οι πρωτεΐνες που προσελκύονται από την Tks5 μπορούν να αλληλοεπιδράσουν τόσο μεταξύ τους, όσο και με την Tks5. Επομένως, η Tks5 είναι ένα μόριο το οποίο

επιτρέπει σε πρωτεΐνες και άλλους παράγοντες, που υπό άλλες συνθήκες δεν θα αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους ή τόσο αποτελεσματικά, να έρθουν κοντά και να αλληλεπιδράσουν. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης συνήθως σχετίζεται με την προώθηση της κυτταρικής σηματοδότησης (Εικόνα 21) [83]. Επίσης, λειτουργεί και ως υπόστρωμα της Src κινάσης, η οποία μπορεί να την φωσφορυλιώνει. Έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση της Tks5 απελευθερώνει τον τομέα PX από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, και της επιτρέπει να δεσμεύεται σε φωσφορικά λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης[84]. Φυσιολογικά, η θέση της Tks5 είναι στο κυτταρόπλασμα σε αδρανή κατάσταση, αλλά με τα κατάλληλα ερεθίσματα, μπορεί να εντοπιστεί, μεμβρανικά, σε ενεργή κατάσταση στα κύτταρα[81], και στα podosomes, δομές που θα περιγράψουν λεπτομερέστερα στη συνέχεια.



Εικόνα 21: Ο ρόλος της Tks5 στην δέσμευση σηματοδοτικών μορίων. Τροποποιημένη από [81].

Η πρωτεΐνη Tks5, παρουσιάζει υψηλή ομολογία με μια άλλη πρωτεΐνη προσαρμογέα την Tyrosine kinase substrate 4 (Tks4), η οποία αποτελεί επίσης υπόστρωμα της Src κινάσης και απαρτίζεται από μια PX περιοχή σύνδεσης λιπιδίων και τέσσερις SH3 περιοχές (Εικόνα 22)[85].



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση των TKS πρωτεϊνών προσαρμογών. Τροποποιημένη από [81].

Η πρωτεΐνη Tks5 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς στον άνθρωπο. Αυξημένη έκφρασή της παρατηρείται στον πλακούντα, στην μήτρα, στις σάλπιγγες, στην χοληδόχο και ουροδόχο κύστη, στο συκώτι, το πάγκρεας και τους νεφρούς. Στους υπόλοιπους ιστούς έχει μέτρια έως χαμηλή έκφραση, ενώ δεν ανιχνεύεται στην σπλήνα, στους λεμφαδένες και στον λιπώδη ιστό[86]. Ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους που εκφράζουν την Tks5 συγκαταλέγονται, τα μακροφάγα, οι μυοϊνοβλάστες, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, οι νευρώνες και οι οστεοκλάστες.

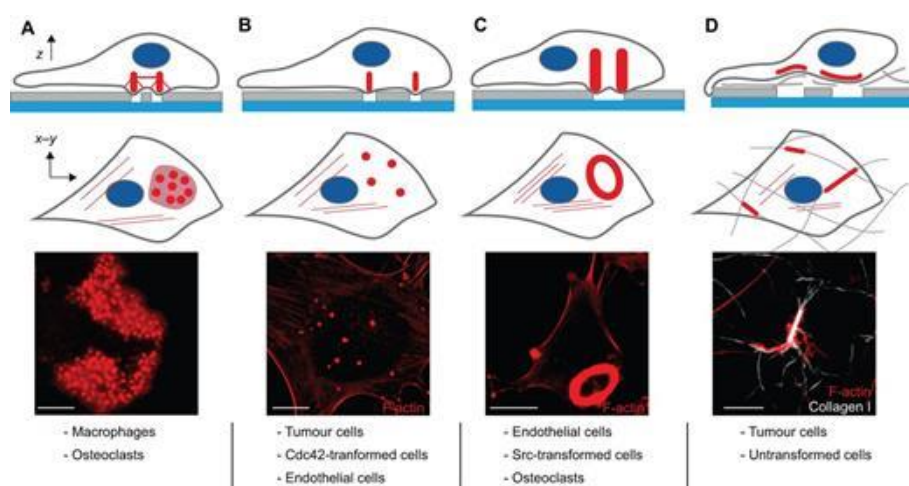
Η πρωτεΐνη Tks5, επιτελεί σημαντικό ρόλο στον οργανισμό, τόσο σε συνθήκες υγείας όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Έτσι, έχει αποδειχθεί η εμπλοκή του γονιδίου στην εμβρυική ανάπτυξη *in vivo* και *in vitro*. Οι περισσότερες όμως δημοσιεύσεις, συνδέουν την έκφραση του Tks5 με την παθογένεια διαφόρων μορφών καρκίνου. Μάλιστα θεωρείται πιθανή η εμπλοκή του στους μηχανισμούς της μετάστασης και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, ενώ πολλοί θεωρούν την έκφρασή του γονιδίου ως προγνωστικό παράγοντα της πορείας της ασθένειας. Η αιτία της στενής συσχέτισης της νόσου με το γονίδιο, είναι ο σημαντικός ρόλος της πρωτεΐνης στο σχηματισμό των invadosomes.

1.3.3. Podosomes και Invadopodia

Γενικά Χαρακτηριστικά των Podosomes και Invadopodia

Οι όροι podosomes και invadopodia (αμφότεροι δύνανται να περιγράφουν με τον όρο «invadosomes»), αναφέρονται σε δυναμικές πλούσιες σε ακτίνη προεξοχές της μεμβράνης ορισμένων τύπων κυττάρων, οι οποίες προκύπτουν από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης[85]. Οι δομές αυτές, συμβάλλουν στη στενή επαφή του κυττάρου με την ECM, ενώ σε αντίθεση με παρόμοιες δομές (π.χ. εστιακές συμφύσεις), είναι σε θέση να αποικοδομούν τα συστατικά της ECM. Για αυτό τον λόγο τα

invadosomes θεωρούνται απαραίτητες δομές για την κυτταρική εισβολή. Τα invadosomes μπορούν να παρατηρηθούν σε διαφορετικές διαμορφώσεις (Εικόνα 23), όπως συσσωματώματα, μεμονωμένες κουκίδες, ροζέτες ή γραμμικές δομές. Οι μελέτες επικεντρώνεται στην διακρίβωση του ρόλου τους τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές επεμβατικές διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, η αθηροσκλήρωση και η μετάσταση[87].



Εικόνα 23: Διαφορετικές διαμορφώσεις των invadosomes[88].

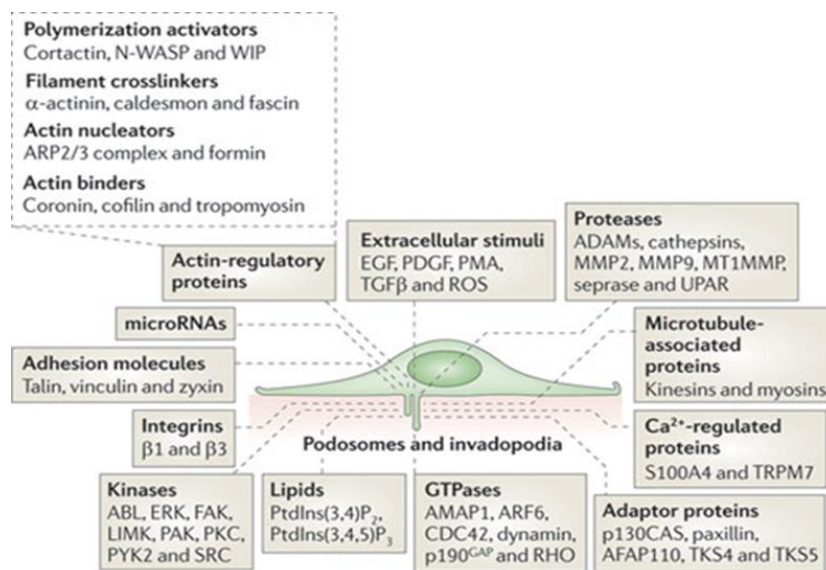
Χαρακτηριστικά

Τα Podosomes και τα invadopodia μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι ικανά να τα διακρίνουν από άλλες επαφές κυττάρου-μήτρας ή από επιφανειακά παρόμοιες δομές[87].

Οι πιο χαρακτηριστικές πρωτεΐνες που συνθέτουν τα invadosomes είναι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ακτίνης (π.χ. cortactin), οι νευρικές πρωτεΐνες του συνδρόμου Wiskott-Aldrich (N-WASP), οι πρωτεΐνες προσαρμογείς που δρουν ως υπόστρωμα κινασών, με τέσσερις περιοχές SH3 (TKS4) και με πέντε περιοχές SH3 (TKS5), και οι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMP) (Εικόνα 24)[89].

Τόσο τα podosomes όσο και τα invadopodia είναι χαρακτηριστικές δομές που αποτελούνται από ένα πυρήνα πλούσιο σε ακτίνη, ο οποίος περιβάλλεται από πρωτεΐνες προσκόλλησης (adhesion) και πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης (scaffolding). Ένα σύνολο μορίων, ρυθμίζουν την ακτίνη μέσα σε αυτές τις δυναμικές δομές. Επιπλέον, πολλά από τα συστατικά των invadosomes

ρυθμίζονται από κινάσες τυροσίνης, γεγονός που οδηγεί σε υψηλό τοπικό εμπλουτισμό σε υπολείμματα φωσφοτυροσίνης[89]



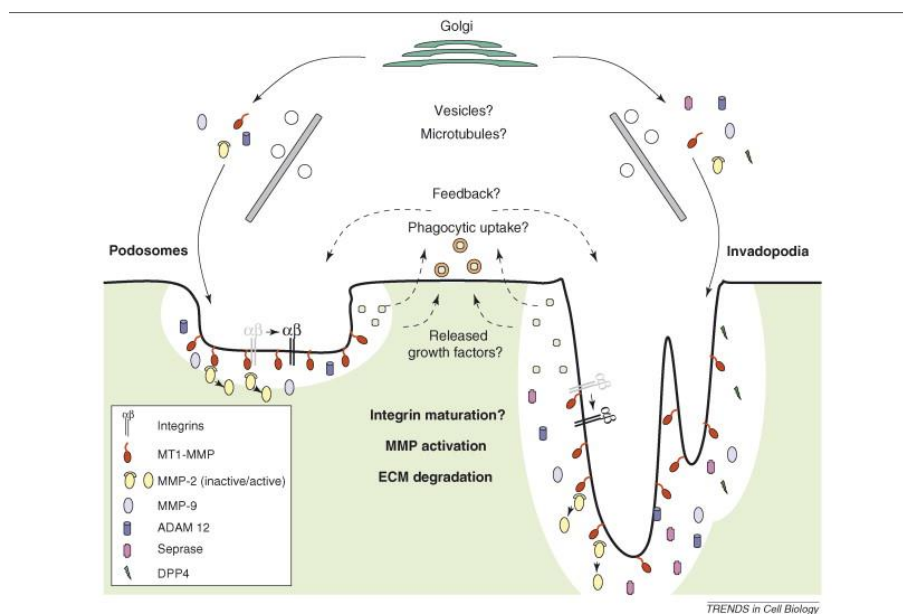
Εικόνα 24: Πρωτεΐνες και μόρια που απαιτούνται για τον σχηματισμό και την λειτουργία των invadosomes[89].

Παρά τις ομοιότητες τους, οι δομές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους σε αρκετά σημεία. Τα podosomes διαθέτουν μια εμφανή δομή δακτυλίου που αποτελείται από πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως η ταλίνη (talin), η παξιλλίνη (paxillin) και η βινκουλίνη (vinculin), ο οποίος περιβάλλει τον πλούσιο σε ακτίνη πυρήνα. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες, όπως η παξιλλίνη, εντοπίζονται και στα invadopodia, χωρίς όμως να σχηματίζουν δομή δακτυλίου, αλλά συνεντοπίζονται με τον πυρήνα. Τα podosomes και τα invadopodia διαφέρουν και σε άλλα σημεία. Τα podosomes συνήθως σχηματίζονται σε μονοκυτταρικά κύτταρα (π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και οστεοκλάστες), σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ τα invadopodia εντοπίζονται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα[85]. Η διάκριση των podosomes και των invadopodia είναι επίσης δυνατή μέσω του μεγέθους και της αφθονίας τους. Αν και οι δομές αυτές έχουν παρόμοιο πλάτος τα podosomes έχουν μέγεθος έως 2μm, ενώ τα invadopodia έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (πάνω από 2μm). Τα κύτταρα σχηματίζουν πολυάριθμα podosomes, αλλά, σε πολλές περιπτώσεις, μόνο λίγα invadopodia (μεταξύ 1 και 10). Οι δομές αυτές διαφέρουν σημαντικά και στη διάρκεια ζωής τους. Τα podosomes εμφανίζουν μεγάλο δυναμικό, με διάρκεια ζωής αρκετών λεπτών, ενώ τα invadopodia είναι πιο σταθερά και μπορεί να διαρκέσουν για πάνω από 1 ώρα[87, 89].

Είναι επίσης σημαντικό να γίνει διάκριση των podosomes και των invadopodia από άλλες κυτταρικές προεξοχές, όπως τα νηματοπόδια (filopodia) και τα ελασματοπόδια (lamellipodia), και από δομές προσκόλλησης, όπως είναι οι εστιακές συμφύσεις (FK-focal adhesions). Καθεμιά από αυτές τις δομές έχει ξεχωριστά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ωστόσο υπάρχουν αρκετές κοινές πρωτεΐνες, ιδιαίτερα αυτές που συμμετέχουν στον πολυμερισμό της ακτίνης[90]. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίο να εξεταστούν οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μορφολογία και ο εντοπισμός της κάθε δομής προκειμένου να διακριθούν μεταξύ τους. Ειδικότερα, ο συνεντοπισμός περιοχών ακτίνης σε συνδυασμό με την υποβάθμιση της ECM είναι ένα πολύτιμο μέσο για τη διάκριση των podosomes και των invadopodia από τις άλλες μεμβρανικές δομές[89].

Αν και τα invadosomes είναι δομές κυτταρικής προσκόλλησης, η πιο χαρακτηριστική λειτουργία τους είναι η αποικοδόμηση της ECM. Θεωρείται ότι τα podosomes και τα invadopodia επιτρέπουν σε ένα κύτταρο να συντονίσει την αποικοδόμηση της ECM μέσω κυτταρικής κινητικότητας, προκειμένου να διευκολυνθεί η μετανάστευση των κυττάρων μέσω του μικροπεριβάλλοντος του ιστού. Η μετανάστευση των κυττάρων απαιτείται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και, σε ενήλικες, σε απάντηση μετά από έναν τραυματισμό ή μια μόλυνση. Η ανώμαλη κυτταρική μετανάστευση μπορεί να αποτελέσει την βάση της ανάπτυξης, αγγειακών ασθενειών, όπως επίσης και την αιτία μετάστασης σε περιπτώσεις νεοπλασιών. Τα podosomes εντοπίζονται κυρίως σε τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ιστών και στην ανοσολογική επιτήρηση, ενώ η παρουσία των invadopodia συσχετίζεται με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εισβάλουν και να δημιουργούν μεταστάσεις[89]. Αν και οι δύο δομές αποικοδομούν τα συστατικά της ECM η αποικοδόμηση μήτρας με τα podosomes τείνει να είναι ρηχή και διαδεδομένη, ενώ τα invadopodia προκαλούν βαθύτερη και πιο επικεντρωμένη υποβάθμιση (Εικόνα 25), πιθανώς ως αποτέλεσμα της μικρής διάρκειας ζωής και της υψηλής αφθονίας των podosomes, η οποία έρχεται σε αντίθεση με την διάρκεια ζωής και την αφθονία των invadopodia ανά κύτταρο. Η ικανότητα αποικοδόμησης της ECM επιτυγχάνεται με πρόσληψη ενζύμων, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες, από τα invadosomes. Τα γνωστότερα μέλη αυτών των ομάδων είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs), με κυριότερες τις MT1-MMP, MMP-2 και MMP-9, οι οποίες φαίνεται

να είναι κεντρικά μόρια της αποικοδόμησης μήτρας που οφείλεται στην παρουσία των invadosomes[87].



Εικόνα 25: Διαφορετική αποικοδόμηση μήτρας με την παρουσία podosomes και invadopodia[91].

Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό των invadosomes

Ο σχηματισμός των invadosomes είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία όπου απαιτείται η εμπλοκή και η αλληλεπίδραση ενός μεγάλου αριθμού δομικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες είναι οι παρακάτω.

Η **cortical actin binding protein** (cortactin), η οποία είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που μπορεί να ενεργοποιηθεί από εξωτερικά ερεθίσματα για την προώθηση του πολυμερισμού και την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Εντοπίζεται σε όλους τους τύπους των κυττάρων και όταν φωσφορυλιωθεί, από κινάσες τυροσίνης ή κινάσες σερίνης θρεονίνης, ενεργοποιεί το σύμπλοκο Arp2/3, και προωθεί τον σχηματισμό των invadopodia[92].

Η πρωτεΐνη **WASP** (Wiskott Aldrich Syndrome Protein). Η πρωτεΐνη WASP εντοπίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Η N-WASP (neural- WASP) είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας, που είναι άφθονη στο νευρικό ιστό, αλλά εντοπίζεται και σε πολλούς άλλους ιστούς του σώματος. Οι WASP πρωτεΐνες αποτελούνται από περίπου 500 αμινοξέα, έχουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή και ομόλογα τους εντοπίζονται σε ποικιλία ευκαρυωτών. Εντοπίζονται τόσο στο

κυτταρόπλασμα κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου αλληλοεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τα φωσφολιπίδια της[93], όσο και στον πυρήνα. Το έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη τους έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ Rho-GTPασών και κυτταροσκελετού ακτίνης.

Η πρωτεϊνική δομή της N-WASP εμπεριέχει τις παρακάτω περιοχές[94].

Μια VCA περιοχή, που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο και συνδέεται με ένα μονομερές ακτίνης και με το Atp2/3 σύμπλεγμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πυρήνα πολυμερισμού και τη δημιουργία νηματίων ακτίνης[95].

Μια WH1/EVH-1 περιοχή (WASP-homology-1 ή Ena VASP Homology-1 domain), η οποία εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο και αποτελεί θέση πρόσδεσης για την οικογένεια των WIP πρωτεϊνών, οι οποίες σταθεροποιούν την WASP.

Μια βασική περιοχή, που αλληλοεπιδρά με τα φωσφοϊνοσιτίδια της μεμβράνης.

Μια πλούσια σε προλίνη περιοχή (Proline-rich domain) που αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες που περιέχουν SH3 περιοχές και την προφιλίνη.

Μια GBD/CRIB περιοχή (GTPase Binding domain ή Cdc42/Rac interactive binding domain) που αλληλοεπιδρά με τις μικρές Rho-GTPάσες και συγκεκριμένα με το Cdc42.

Σε συνθήκες ηρεμίας η πρωτεΐνη N-WASP είναι αναδιπλωμένη μέσω αλληλεπίδρασης της VCA με την CRIB περιοχή και συνεπώς είναι ανενεργή, εφόσον η VCA είναι καλυμμένη και δεν μπορεί να αλληλοεπιδράσει με το σύμπλεγμα Atp-2/3. Η σύνδεση του Cdc42 με την CRIB περιοχή ή/και η σύνδεση φωσφοϊνοσιτιδίων PtdIns(3,4,5)P3 με την βασική περιοχή, οδηγούν σε αποκάλυψη της VCA περιοχής και ενεργοποίηση της N-WASP. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης N-WASP επιτυγχάνεται επίσης τόσο με την σύνδεση πρωτεϊνών με SH3 περιοχές (Src homology-3) με την πλούσια σε προλίνη περιοχή της[94], όσο και με την φωσφορυλίωση της από την οικογένεια των Src τυροσινικών κινασών. Η φωσφορυλίωση φαίνεται πως ενισχύεται από την ενεργοποίηση του Cdc42, γεγονότα που δρουν συνεργιστικά στην ενεργοποίηση του Atp-2/3 συμπλέγματος. Μετά την ενεργοποίηση της η πρωτεΐνη N-WASP συμμετέχει σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών όπως στην ενδοκυττάρωση και την μεταφορά κυστιδίων, σε κυτταρικές συνδέσεις, σε συνδέσεις

με πρωτεϊνικούς υποδοχείς, αλλά και στον σχηματισμό προεκβολών κυτταρικής κίνησης (invadosomes).

Οι πρωτεΐνες προσαρμογείς **Tks**, οι οποίες είναι σημαντικές πρωτεΐνες, που ρυθμίζονται από διάφορους αλλοστερικούς μηχανισμούς, και εμπλέκονται τόσο στην φωσφορυλίωση τυροσινών όσο και σε άλλες μη καταλυτικές δραστηριότητες. Από την ομάδα πρωτεϊνών προσαρμογέων στον σχηματισμό των invadosomes εμπλέκονται οι πρωτεΐνες Tks4 και Tks5. Οι πρωτεΐνες αυτές, πιστεύεται ότι λειτουργούν ως πρωτεΐνες, που προσλαμβάνουν άλλες πρωτεΐνες και λιπίδια, απαραίτητα για τη συναρμολόγηση των invadopodia. Η Tks5 απαιτείται τόσο για τον σχηματισμό των invadosomes, όσο και για την ικανότητα εισβολής των invadopodia σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι η Tks5 δεσμεύει την μεταλλοπρωτεϊνάση Adam-12, η οποία συνδέεται με τα invadopodia. Επιπλέον, η Tks5 συνδέεται με την ρυθμιστική πρωτεΐνη της ακτίνης N-WASP, και εμπλέκεται στην πρόσληψη της cortactin. Τέλος, συνδέεται με την p22phox, ένα μέρος του συμπλόκου της οξειδάσης του NADPH, το οποίο δημιουργεί δραστικά είδη οξυγόνου, που διευκολύνουν τον σχηματισμό και την λειτουργία των invadopodia. Η Tks4, η οποία είναι μέλος της οικογένειας των κινάσων τυροσίνης, εντοπίζεται επίσης στα invadopodia σε Src μετασχηματισμένα κύτταρα. Η Tks4 είναι απαραίτητη για την δημιουργία και την λειτουργία των invadosomes, γιατί δεσμεύει την MT1-μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας (MMP), η οποία είναι απαραίτητο συστατικό των δομών αυτών [92].

Οι **μεταλλοπρωτεάσες (MMP)**, με σημαντικότερη την MT1-MMP. Η MT1-MMP (επίσης γνωστή ως MMP14), είναι μια μεμβρανική μεταλλοπρωτεϊνάση, η οποία θεωρείται κεντρικός παράγοντας στην διαμεσολαβούμενη από τα invadopodia υποβάθμιση της ECM. Η MT1-MMP διασπά αρκετά υποστρώματα *in vitro*, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών της ECM όπως η φιβρονεκτίνη, το κολλαγόνο κ.α. Επιπλέον, η MT1-MMP είναι ικανή να ενεργοποιεί άλλα ανενεργά ένζυμα της οικογένειας των MMP, όπως την MMP2. Η MT1-MMP φτάνει στα invadopodia με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι μέσω της N-WASP πρωτεΐνης, η οποία προωθεί την μεταφορά της MT1-MMP στα invadosomes. Ένας σημαντικός επαγωγέας των invadopodia, η Src κινάση, έχει επίσης δείχθει ότι ρυθμίζει άμεσα την μεταφορά των MT1-MMP στα invadopodia. Η διαμεσολαβούμενη από την

Src φωσφορυλίωση της MT1-MMP, επιβραδύνει την ενδοκύτωση της MT1-MMP και αυξάνει την δραστηριότητα της αποικοδόμησης μήτρας [92].

Οι πρωτεάσες **Adams**, είναι μια οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται σε μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, μετανάστευσης, πρωτεόλυσης, κ.α. Από την οικογένεια αυτών των πρωτεασών, καίριο ρόλο στον σχηματισμό των invadosomes έχει η Adam-12. Η Adam-12 συμβάλλει στη λειτουργία των invadosomes σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της αποικοδόμησης της ECM, της ρύθμισης της λειτουργίας της ιντεγκρίνης, και της ενεργοποίησης παραγόντων ανάπτυξης.

Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης των invadosomes

Για να ξεκινήσει η δημιουργία των invadosomes, έχει αποδειχθεί ότι συχνά απαιτείται η διέγερση με παράγοντες ανάπτυξης, όπως π.χ. ο παράγοντας ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν τη φωσφορυλίωση ή/και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα podosomes και τα invadopodia.

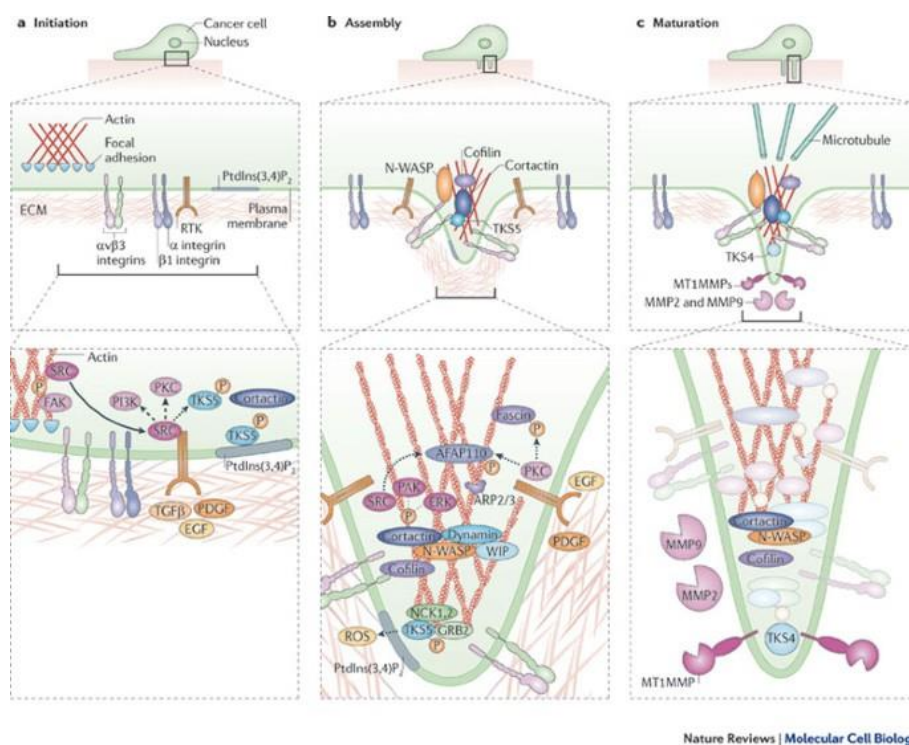
Ο σχηματισμός των invadosomes περιλαμβάνει τρία στάδια, το στάδιο έναρξης, το στάδιο σχηματισμού και το στάδιο ωρίμανσης (Εικόνα 26).

Κατά την έναρξη του σχηματισμού των invadopodia (Εικόνα 26α), τα κύτταρα δημιουργούν εστιακές συμφύσεις και έρχονται σε επαφή με την ECM μέσω της αλληλεπίδρασης των ιντεγκρινών, της SRC και της φωσφορυλιωμένης κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK). Σε κύτταρα εισβολής, απελευθερώνεται η SRC κινάση, η οποία δεσμεύεται και φωσφορυλιώνει την κινάση τυροσίνης TKS5, την κινάση της τριφωσφορικής φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K) και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Η απελευθέρωση της Src κινάσης διαμεσολαβείται από παράγοντες ανάπτυξης όπως, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGFβ). Η φωσφορυλιωμένη TKS5 στη συνέχεια εντοπίζεται σε περιοχές πλούσιες σε διφωσφορικό φωσφατιδυλ-ινοσιτολικό φωσφολιπίδιο (PtdIns(3,4)P2). Αυτό το λιπίδιο στρατολογεί την TKS5 μέσω σύνδεσης με την PX περιοχή της. Ο συνεντοπισμός της TKS5 με την cortactin στις πρόδρομες ουσίες των invadopodia, προτείνει ότι η TKS5

δρα σαν μόριο ικρίωμα το και προσλαμβάνει την cortactin η οποία είναι απαραίτητη για τον μετέπειτα σχηματισμό των invadopodia.

Ο σχηματισμός των invadopodia (Εικόνα 26β) επιτυγχάνεται τόσο με την πρόσληψη και την ενεργοποίηση του συμπλέγματος ARP2/3 και της πρωτεΐνης που αλληλοεπιδρά με την WASP (WIP), όσο και με την φωσφορυλίωση των βασικών συστατικών των invadopodia, όπως π.χ. της cortactin, και της TKS5. Σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό παίζει επίσης η παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS). Η TKS5 δεσμεύει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς NCK1 και NCK2, την πρωτεΐνη δέσμευσης που δρα σαν υποδοχέας του παράγοντα ανάπτυξης (GRB2) και την πρωτεΐνη N-WASP. Η cortactin συνδέεται με την N-WASP και με το σύμπλεγμα ARP2/3 και δημιουργεί επίσης ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τις πρωτεΐνες WIP και dynamin, κατά τη διάρκεια του σχηματισμού invadopodia. Η φωσφορυλίωση τόσο της cortactin όσο και της TKS5 (από την SRC) ρυθμίζει τον σχηματισμό των invadopodia. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της cortactin από τον EGF προκαλεί διαχωρισμό της κοφιλίνης που απαιτείται για την έναρξη του πολυμερισμού της ακτίνης και το σχηματισμό των invadopodia.

Στο στάδιο της ωρίμανσης (Εικόνα 26γ), τα invadopodia προάγουν την αποικοδόμηση της ECM μέσω της έκκρισης των μεταλλοπρωτεασών μήτρας 2 (MMP2) και 9 (MMP9), και μέσω μεταφοράς της μεμβρανικής μεταλλοπρωτεάσης τύπου 1 (MT1-MMP) προς το άκρο της προεξέχουσας δομής, μέσω της αλληλεπίδρασης αυτών των πρωτεασών με βασικά συστατικά των invadopodia όπως την cortactin, την TKS4 και την β1 ιντεγκρίνη. Η αποφωσφορυλίωση της cortactin εμποδίζει την ικανότητα αποκοπής της κοφιλίνης και επιτρέπει τη σταθεροποίηση των invadopodia[89].



Εικόνα 26: Τα στάδια σχηματισμού των *invadopodia*.

1.3.4 Εμπλοκή του γονιδίου Tks5 στην κυτταρική μετανάστευση και στην εμβρυική ανάπτυξη

Η κυτταρική μετανάστευση είναι απαραίτητη για διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού, αλλά και για ορισμένα παθολογικά γεγονότα. Στον ενήλικα οργανισμό, η μετανάστευση των κυττάρων περιορίζεται σε κύτταρα που απαιτούνται για την διάσχιση της εξωκυττάριας μήτρας και συμβαίνει κατά τη διάρκεια διαδικασιών όπως η επούλωση τραυμάτων, η αγγειογένεση και η ανοσολογική επιτήρηση, και η καρκινική μετάσταση. Η μετανάστευση των φυσιολογικών κυττάρων συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, όπου τα μεταναστευτικά κύτταρα υφίστανται την διαδικασία της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), η οποία οδηγεί στην παραγωγή ενός μεσεγχυματικού φαινότυπου που απαιτείται για την προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης.

Η πρωτεΐνη Tks5 έχει εμπλακεί σε πολλούς τύπους καρκίνων, μέσω της συμμετοχής της στον σχηματισμό των *invadopodia*. Ωστόσο ο ρόλος της στην εμβρυική ανάπτυξη δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση του ρόλου της Tks5 στην εμβρυϊκή ανάπτυξη *in vivo*, αποκάλυψε φαινοτυπικές διαφορές στα πειραματόζωα ελέγχου και στα πειραματόζωα

στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο *Tks5*, αναδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο του *Tks5* κατά την ανάπτυξη. Αποδείχθηκε επίσης ότι, το μονοπάτι σηματοδότησης Src-Tks5 απαιτείται για την μετανάστευση των εμβρυικών κυττάρων, αφού η χορήγηση αναστολέων για την Src, επηρέασε την κατανομή των κυττάρων. Τέλος, αυτό το μονοπάτι φαίνεται να ρυθμίζει την μετανάστευση συγκεκριμένου τύπου κυττάρων μέσω του σχηματισμού προμεταναστευτικών πλούσιων σε ακτίνη, προεξοχών *in vivo*, και σε καλλιέργειες *in vitro*, όπου αυτές οι προεξοχές έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των podosomes [96].

Το 2014, ερευνητές, βασιζόμενοι στην παραπάνω δημοσίευση, διερεύνησαν τη λειτουργία της πρωτεΐνης *Tks5* στην ανάπτυξη των θηλαστικών, αναλύοντας ποντικούς που φέρουν μετάλλαξη στο αντίστοιχο γονίδιο. Η διακοπή και των δυο αντίγραφων του γονιδίου *Sh3pxd2a* (μητρικής και πατρικής προέλευσης), με την τεχνολογία της γονιδιακής παγίδευσης στα ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο των νεογνών και την εμφάνιση του παθολογικού φαινομένου της υπερωισχιστίας. Οι ερευνητές ασχολήθηκαν επίσης με την επίδραση των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το mRNA της πρωτεΐνης *Tks5b*, της μικρότερης ισομορφής της πρωτεΐνης *Tks5* η οποία εντοπίζεται στα ποντίκια και αποτελεί ανακάλυψη της συγκεκριμένης ομάδας ερευνητών, εκφράζεται σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών, αλλά και σε όλους τους ιστούς των ποντικών που αναλύθηκαν, ακόμα και σε αυτούς στους οποίους είχε αδρανοποιηθεί η *Tks5long* ισομορφή. Η έκφραση βέβαια της συγκεκριμένης ισομορφής βρέθηκε από 8 έως και 490 φορές χαμηλότερη σε σχέση με την έκφραση της *Tks5long*. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, για την ομαλή ανάπτυξη των θηλαστικών απαιτείται η ύπαρξη της πλήρους ισομορφής της πρωτεΐνης *Tks5*.

Τέλος αποκαλύφθηκε επίσης ένα πιθανός γενικότερος ρόλος για τις πρωτεΐνες προσαρμογείς *Tks*, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών, επειδή όταν έχουν αδρανοποιηθεί και τα δυο αλληλόμορφα που κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τα έμβρυα που προκύπτουν δεν γεννιούνται, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις μεντελιανές αναλογίες που προκύπτουν κατά τη γέννηση μεταλλαγμένων ποντικών είτε για την *Tks5* είτε για την *Tks4* πρωτεΐνη [78].

1.3.5 Εμπλοκή του γονιδίου Tks5 στην παθογένεια του καρκίνου

Το μόριο Tks5 έχει εμπλακεί στον καρκίνο λόγω της συμμετοχής του στην προώθηση της μετανάστευσης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες είναι κρίσιμες διαδικασίες στη μετάσταση των όγκων. Μελέτες έχουν δείξει ότι το Tks5, έχει εμπλακεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού[97, 98], του καρκίνου του πνεύμονα[80, 97], του μελανώματος[99, 100] και του καρκίνου του προστάτη[101].

Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι το TKS5 απαιτείται για την προώθηση της συναρμολόγησης και ωρίμανσης των invadopodia, που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα τον μεταστατικό τους φαινότυπο. Επιπλέον, η TKS5 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του πνεύμονα και του μελανώματος. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του TKS5 έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση και αυξημένη μετάσταση σε ορισμένες μελέτες, γεγονός που υποδηλώνει ότι το TKS5 μπορεί να διαδραματίζει ρόλο στην προώθηση της εξέλιξης του καρκίνου.

1.4 Το γονίδιο VERSICAN

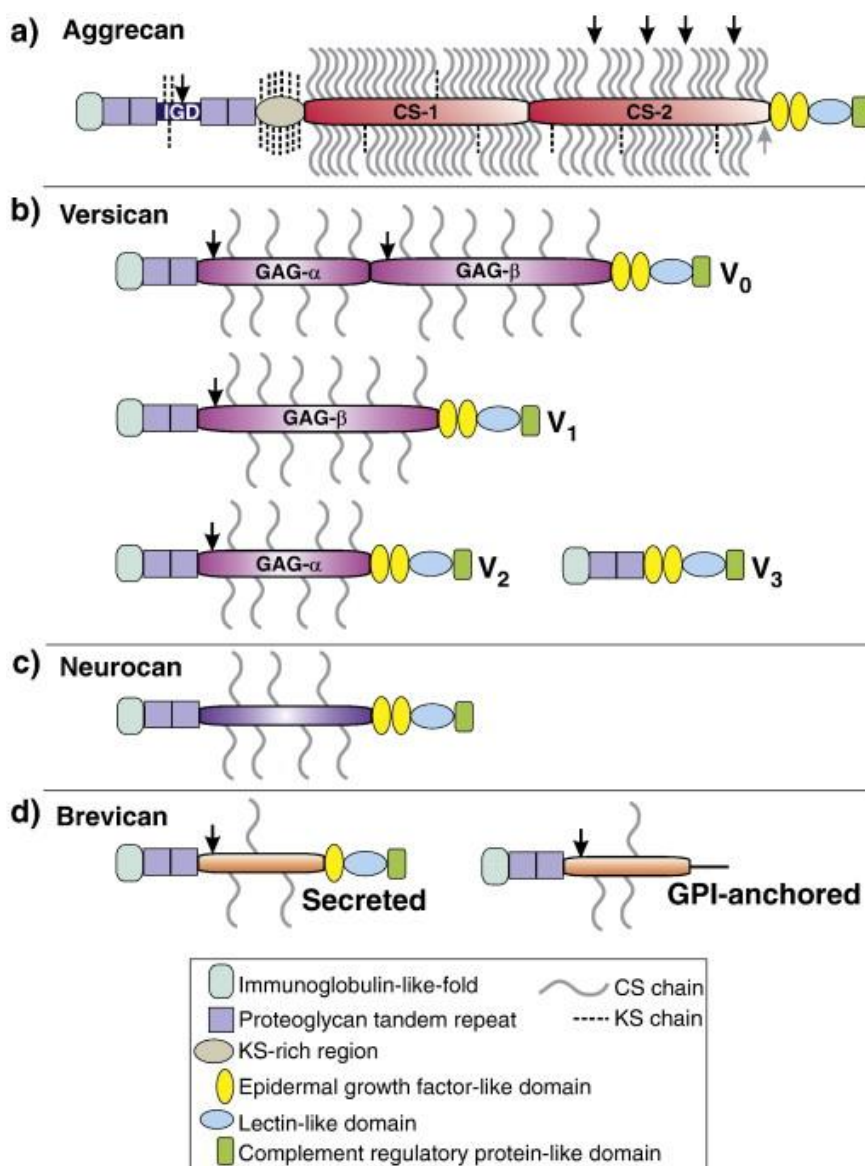
1.4.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεογλυκάνες (Proteoglycans, PGs), όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν κύρια κατηγορία πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας. Κατέχουν τόσο δομικό όσο και βιολογικό ρόλο, καθώς είναι υπεύθυνες για τη μηχανική αντίσταση στη συμπίεση και την ενυδάτωση των ιστών και συμβάλλουν επίσης στην δέσμευση αυξητικών παραγόντων στην ECM[70]. Λόγω της ικανότητάς τους να αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια της ECM και κύτταρα, οι PGs είναι επίσης σημαντικές για την οργάνωση της ECMs, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό του ικριώματος της ECM και στην ενσωμάτωση των κυττάρων σε αυτό[69]. Οι PGs ταξινομούνται σε διαφορετικές οικογένειες ανάλογα με τον εντοπισμό τους και τα κοινά γονιδιακά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Μια μεγάλη κατηγορία PG αποτελούν οι πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ύλης. Πρόκειται για τη μεγαλύτερη κατηγορία που περιλαμβάνει δύο υποομάδες- τις υαλεκτίνες (hyalectans) και τις μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη (small leucine rich proteoglycans, SLRPs)[72].

Οι SLRPs αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια PG που περιλαμβάνει δεκαοκτώ μέλη τα οποία ομαδοποιούνται σε πέντε κατηγορίες και εκφράζονται στην ECM. Οι SLRPs μοιράζονται πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως η αλληλεπίδραση με διάφορα κολλαγόνα και η δέσμευση υποδοχέων κινάσεων τυροσίνης καθώς και υποδοχέων του ανοσοποιητικού, ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική σηματοδότηση σε διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης[69], καθώς και ζωτικές διεργασίες όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η ομοιοστάση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση, η έμφυτη ανοσία, η απόπτωση και η αυτοφαγία[70].

Οι υαλεκτίνες (PGs που δεσμεύουν HA και λεκτίνη) αποτελούνται από 4 πρωτείνες, τις aggrecan, versican, neurocan και brevican, οι οποίες μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι μοιράζονται ένα κοινό δομικό πρότυπο το οποίο αποτελείται από 1 αμινοτελική (G1) και 1 καρβοξυτελική (G3) περιοχή οι οποίες διαχωρίζονται από μια γραμμική κεντρική περιοχή που αποτελεί την θέση πρόσδεσης των γλυκοζαμινογλυκανών. Η περιοχή G1 έχει σφαιρική δομή και είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογη μεταξύ των υαλεκτίνων. Αποτελείται από επαναλήψεις τύπου Ig και δύο περιοχές τις ονομαζόμενες PTR (Proteoglycan Tandem Repeats) που είναι υπεύθυνες για την υψηλή συγγένεια πρόσδεσης του υαλουρονικού οξέος (HA). Η

κεντρική τους περιοχή φιλοξενεί μεταβλητό αριθμό δυνητικών θέσεων πρόσδεσης GAG, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή G3 περιέχει δύο επαναλήψεις του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), μια περιοχή λεκτίνης τύπου C και μια CRP (Complementary regulatory protein) περιοχή (Εικόνα 27)[69].

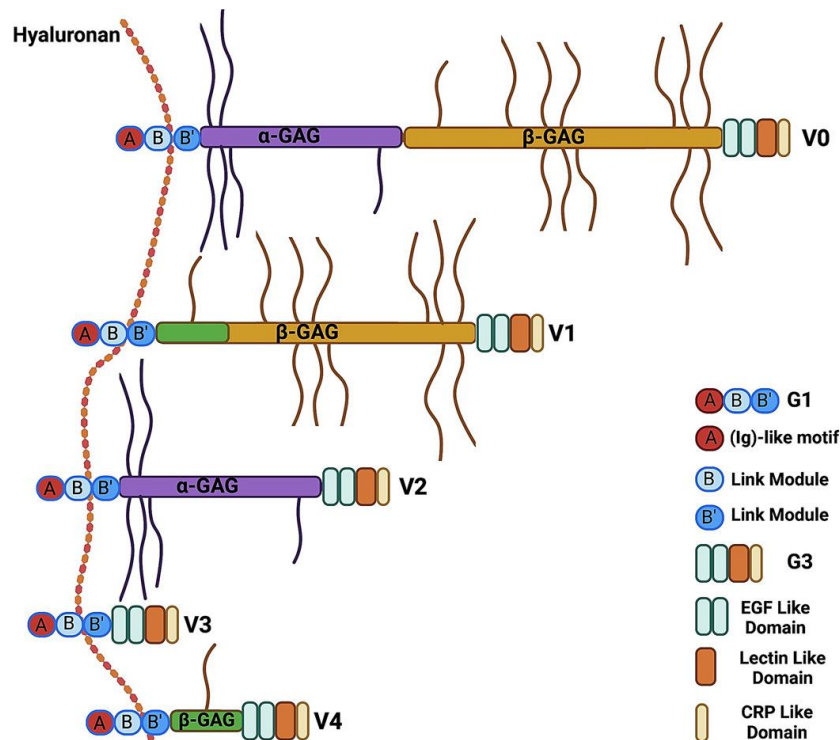


Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των υαλεκτινών[102].

1.4.2 Versican-Δομή

Η πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης 2 (chondroitin sulfate proteoglycan 2, CSPG2), γνωστή με την ονομασία versican, αποτελεί μέρος της οικογένειας των υαλεκτινών. Το γονίδιο εντοπίζεται στην περιοχή 5q14.3 και αποτελείται από 15

εξώνια[103]. Η αμινοτελική περιοχή G1 κωδικοποιείται από τα εξώνια 2-6 και η καρβοξυτελική περιοχή G3 από τα εξώνια 9-15. Η πρωτεΐνη έχει δύο περιοχές πρόσδεσης αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκανών, την α-GAG, που κωδικοποιείται από το εξώνιο 7 και την b-GAG, που κωδικοποιείται από το εξώνιο 8. Το mRNA του γονιδίου μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα στα εξώνια 7 και 8, με αποτέλεσμα την ύπαρξη 5 ισομορφών, με σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα αλυσίδων γλυκοζαμινογλυκανών και στο συνολικό μέγεθος της πρωτεΐνης. Η V0 ισομορφή περιέχει τόσο την aGAG όσο και την bGAG και η πρωτεΐνη έχει μέγεθος 370 kDa, η V1 περιέχει μόνο την bGAG και η πρωτεΐνη έχει μέγεθος 263 kDa, η V2 περιέχει μόνο την περιοχή aGAG και η πρωτεΐνη που δημιουργείται έχει μέγεθος 180 kDa και η V3 στερείται και των δύο περιοχών δέσμευσης GAGs και το μέγεθος της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι 74 kDa. Η πέμπτη ισομορφή της versican, η V4, περιέχει τις περιοχές G1 και G3 και ένα τμήμα της περιοχής bGAG στο αμινοτελικό άκρο. Οι τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα επηρεάζουν πέρα από το μέγεθος τον αριθμό των αλυσίδων GAG που μπορούν να συνδεθούν σε αυτήν. Έτσι, 17-23 αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών μπορούν να συνδεθούν στην V0 ισομορφή, 12-15 στην V1, 5-8 στην V2 και καμία στην V3, αφού απουσιάζει ολόκληρη η περιοχή πρόσδεσης από την πρωτεΐνη (Εικόνα 28)[104]. Δεδομένου ότι η V3 δεν περιέχει αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως πρωτεογλυκάνη, αλλά συχνά ομαδοποιείται με τις πρωτεογλυκάνες και χαρακτηρίζεται ως τέτοια[103].



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης Versican[104].

1.4.3 Έκφραση

Το Vcan εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο ανάλογα τον ιστό και την χρονική περίοδο. Σε υγιείς ανθρώπους η έκφραση του γονιδίου εντοπίζεται κυρίως σε χαλαρούς συνδετικούς ιστούς, στον μυελό, στον πνεύμονα στο έντερο την καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία και την σπλήνα[105]. Οι ισομορφές της versican εκφράζονται διαφορετικά στον κάθε ιστό. Οι V0 και V1 είναι οι πιο διαδεδομένες ισομορφές στην καρδιά, στα αγγεία και σε διάφορους μη νευρικούς ιστούς, ενώ η V2 είναι παρούσα στον εγκέφαλο[69]. Το versican συντίθεται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών, των ενδοθηλιακών των στρωματικών κυττάρων, των λευκοκυττάρων και των ινοβλαστών[106]. Μάλιστα, το μόριο πρώτο-ανακαλύφθηκε σαν μια μεγάλη πρωτεογλυκάνη που εκφραζόταν σε ινοβλάστες *in vitro*[107]. Στους υγιείς πνεύμονες, η έκφραση του Versican εντοπίζεται κυρίως στις ελαστικές ίνες των τοιχωμάτων του κεντρικού αεραγωγού, στο κυψελιδικό παρέγχυμα και τους ινοβλάστες[108].

1.4.4 Βιοσύνθεση- Αποικοδόμηση

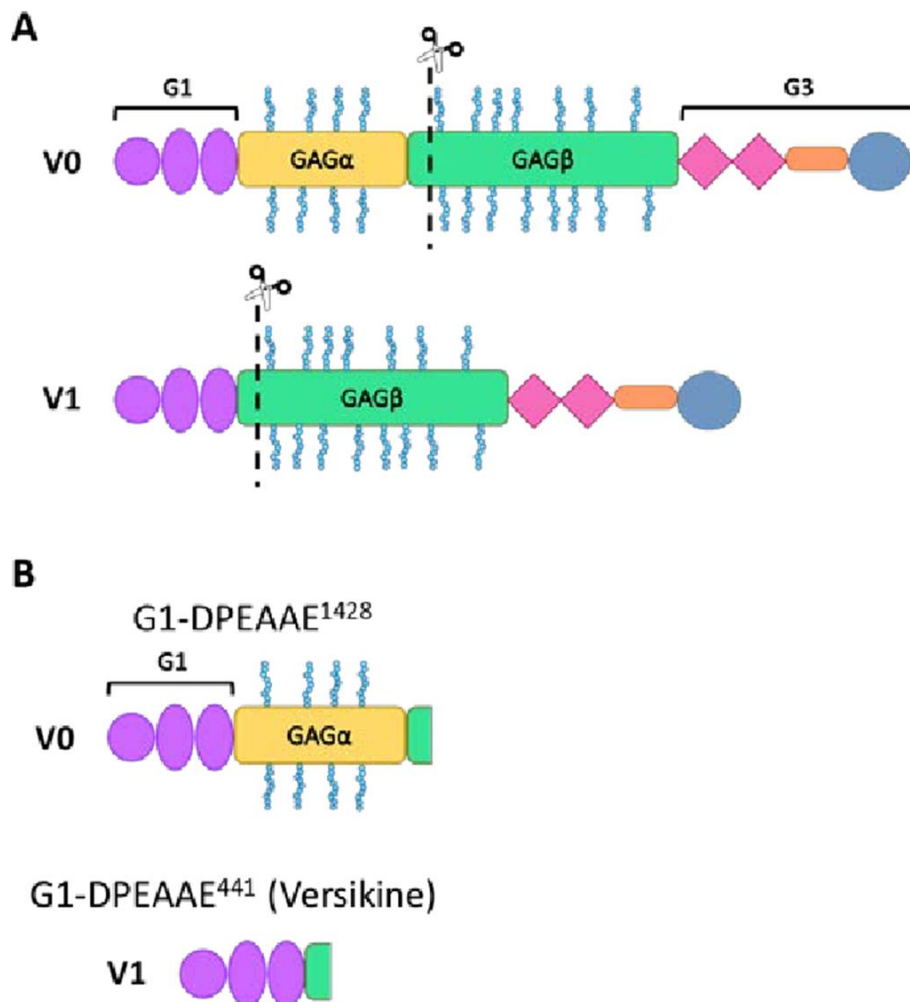
Διάφορες ενδοκυτταρικές οδοί μεταγωγής σήματος έχουν εμπλακεί στην βιοσύνθεση του versican σε διάφορα κύτταρα και ιστούς. Ένας αριθμός κυτταροκινών

και αυξητικών παραγόντων, όπως ο TGFβ, PDGF, TNF, IL11, IL1β, ελέγχουν την σύνθεση του versican[109]. Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας βήτα (TGF-β) έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει την έκφραση του versican σε διάφορους τύπους κυττάρων. Ο TGF-β ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Smad, το οποίο οδηγεί στην ανοδική ρύθμιση της έκφρασης του versican[110]. Ένα εξίσου σημαντικό μονοπάτι που επηρεάζει την σύνθεση του versican είναι το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης, το οποίο εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της αναγέννησης των ιστών και του καρκίνου. Η σηματοδότηση Wnt /β-κατενίνης ρυθμίζει την έκφραση του versican δρώντας ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου *versican*, οδηγώντας στην αυξημένη έκφραση του[111].Επιπλέον, ο παράγοντας ανάπτυξης των αιμοπεταλίων (PDGF) και η αγγειοτενσίνη II αποδείχθηκε ότι διεγείρουν την έκφραση του πρωτεϊνικού κορμού της versican και την επιμόκυνση των αλυσίδων GAG στα λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) με μηχανισμούς εξαρτώμενους από τον υποδοχείς κινάσων τυροσίνης. Ένα ακόμα μονοπάτι που έχει εμπλακεί στην βιοσύνθεση του γονιδίου είναι το PI3k/PKB/AKT μονοπάτι σηματοδότησης. Αποδείχθηκε ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής της versican στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η PKB είναι πρωτεΐνη που ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein), NF-kB (Nuclear Factor kB) και p53. Η PKB φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την κινάση GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3) και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο β-κατενίνης στον πυρήνα, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του versican. Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 προσδένεται στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου του versican και ενεργοποιεί την έκφραση του. Η ρύθμιση της μεταγραφής του versican σχετίζεται με τα επίπεδα του p53[112]. Τέλος η σύνθεση του versican ρυθμίζεται από πολλά διαφορετικά miRNAs[106].

Όπως για όλα τα μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, έτσι και για το versican η ισορροπία σύνθεσης και αποικοδόμησης του μορίου, είναι ζωτικής σημασίας για την δράση του. Η αποικοδόμηση του versican πραγματοποιείται από διαφορές πρωτεϊνάσες, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας και οι ADAMTS πρωτεϊνάσες. Από τα 23 μέλη της οικογένειας των MMPs, οι MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 και MMP14 έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν το versican[113].

Η οικογένεια ενζύμων ADAMTS αποτελείται από 19 ένζυμα στον άνθρωπο. Τα ένζυμα αυτά είναι μεταλλοπρωτεϊνάσες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην

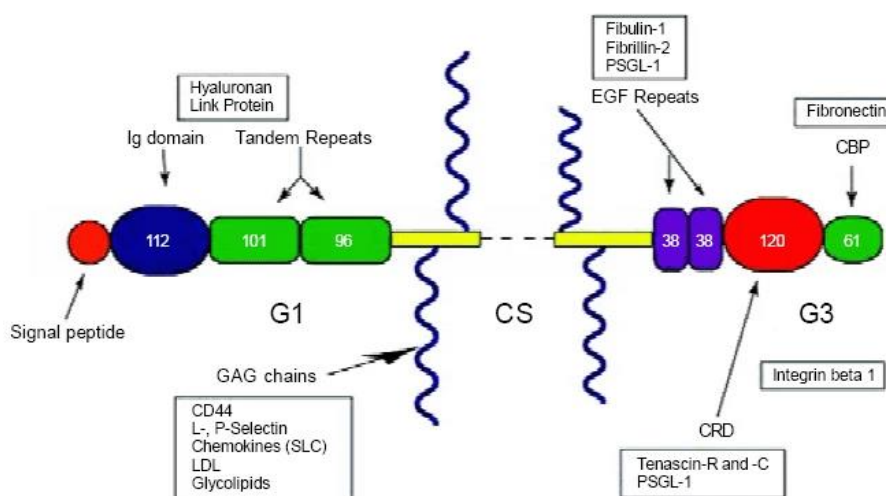
επεξεργασία και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας και άλλων εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Από αυτά οι ADAMTS- 1,-4,-5,-9, και-20 συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του versican. Η διάσπαση του μορίου από τις ADAMTS-1,-4,-5 και-9, οδηγεί στην παραγωγή 2 ενεργών αμινοτελικών θραυσμάτων (Εικόνα 29), του V0 G1-DPEAAE1428[114], και του V1 G1DPEAAE441, γνωστότερο με την ονομασία versikine, τα οποία ανιχνεύονται με τη χρήση ενός αντισώματος που αναγνωρίζει την αλληλουχία του παραγόμενου νεοεπιτόπου DPEAAE (DPE). Θραύσματα όπως το versikine, μπορούν να δρουν ως μόρια που σχετίζονται με βλάβες (Damage-associated molecular patterns,DAMPs), αλληλοεπιδρώντας με ανοσοποιητικά και μη ανοσοποιητικά κύτταρα, διεγείροντας την απελευθέρωση προ- και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγώντας σε τροποποιημένη ανοσολογική απόκριση τόσο σε ανθρώπινα μοντέλα όσο και σε μοντέλα ποντικών[106].



Εικόνα 29: Η διάσπαση του versican από τις ADAMTS(A) και τα παραγόμενα θραύσματα που προκύπτουν από την αποικοδόμηση(B)[114].

1.4.5 Συμμετοχή της versican στην συγκρότηση της εξωκυττάριας μήτρας

Η versican αλληλοεπιδρά με διάφορα διαφορετικά μόρια ECM και, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη συγκρότηση της ECM. Η δομή της πρωτεΐνης προσφέρεται για πολλαπλούς τύπους αλληλεπιδράσεων είτε με άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας είτε με χημειοκίνες είτε με πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας (Εικόνα 30) [107, 115]. Τα γνωστότερα μόρια που αλληλοεπιδρούν με το versican περιγράφονται παρακάτω.



Εικόνα 30: Σχηματική δομή της versican και οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα μόρια της εξωκυττάριας ύλης και με μόρια της κυτταρικής επιφάνειας[115].

Υαλουρονικό (Hyalouronan, HA)

Το HA, αποτελεί κρίσιμο συστατικό της ECM, το οποίο εκφράζεται ευρέως σε ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης. Το υαλουρονικό είναι μια αρνητικά φορτισμένη γραμμική γλυκοζαμινογλυκάνη και αποτελεί το γραμμικό πολυμερές ενός δισακχαρίτη, που αποτελείται από DN-ακετυλογλυκοζαμίνη και D-γλυκουρονικό οξύ. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το HA συμβάλλει στην ελαστικότητα των ιστών. Η βιοσύνθεση του HA ρυθμίζεται από την οικογένεια ενζύμων συνθάσης του υαλουρονικού (Hyaluronic acid synthase, HAS) και συγκεκριμένα από τα HAS1, HAS2 και HAS3, οι οποίες παραγουν το HA στο εξωκυττάριο περιβάλλον ως μη θειωμένο πολυμερές GAG. Οι ισομορφές HAS εμφανίζουν διαφορετική κινητική σύνθεσης HA και μπορούν να παράγουν διάφορα μήκη πολυμερών HA που συμβάλλουν στην ετερογένεια του

μοριακού βάρους HA στο μικροπεριβάλλον. Οι ισομορφές HAS εκφράζονται διαφορετικά κατά τη διάρκεια του τραυματισμού και της επιδιόρθωσης των ιστών και υπόκεινται επίσης σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μπορούν να ρυθμίσουν περαιτέρω τη δραστηριότητά τους. Η αποικοδόμηση του HA διευκολύνεται από την δραστηριότητα των υαλουρονιδασών, οι οποίες επίσης εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση και διαφοροποιημένη ρύθμιση κατά τη διάρκεια του τραυματισμού και της αποκατάστασης.

Το HA εκκρίνεται κυρίως ως HA υψηλού μοριακού βάρους (high molecular weight HA, HMW-HA, 1.000 kDa)- επομένως, η διαμόρφωση του μορίου HA μπορεί να είναι εξαιρετικά μεταβλητή ανάλογα με την αλληλεπίδρασή του με το νερό και την παρουσία άλλων μορίων που δεσμεύουν το HA στο περιβάλλον. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις του HA με μόρια που δεσμεύουν του είναι εξαιρετικά ποικίλες και εξαρτώνται από το μέγεθος του μορίου HA. Το HMW-HA μπορεί να αποικοδομηθεί σε θραύσματα χαμηλότερου μοριακού βάρους, από τις υαλουρονιδάσες και τα δραστικά είδη οξυγόνου, διευκολύνοντας τη δημιουργία HA χαμηλού μοριακού βάρους (low molecular weight HA, LMW-HA). Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι τα διαφορετικά μοριακά μεγέθη είναι εν μέρει υπεύθυνα για τις ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες του HA. Για παράδειγμα, το HMW-HA καταστέλλει την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, αναστέλλει το σχηματισμό ουλής και καταστέλλει τη φλεγμονή, ενώ το LMW-HA προάγει αυτές τις επιδράσεις.

Εκτός από τον ρόλο του HA ως εξωκυττάριο ικρίωμα, έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, μέσω της σύνδεσης του σε υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, όπως οι CD44, RHAMM, LYVE-1, και υποδοχείς όπως οι TLRs, TLR2 και TLR4. Η πρόσδεση του HA σε αυτούς τους υποδοχείς ρυθμίζει μια σειρά μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της φλεγμονώδους απόκρισης. Τα μόρια HA διαφορετικών μεγεθών μπορούν να επιτελέσουν διαφορετικό ρόλο στην σηματοδότηση μετά από τη δέσμευση του ίδιου υποδοχέα. Ένας υποθετικός μηχανισμός για αυτές τις διαφορές στη μεταγωγή σήματος είναι ότι το HMW-HA μπορεί να δεσμεύσει πολλαπλούς υποδοχείς ταυτόχρονα, συγκεντρώνοντας την ενεργοποίηση της σηματοδότησης στην κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, το LMW-HA δεν είναι σε θέση να ενεργοποιεί τους υποδοχείς με τον ίδιο τρόπο, ενεργοποιώντας έτσι διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης. Επιπλέον, το LMW-HA είναι σε θέση να

συνδέεται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας στους οποίους το HMW-HA δεν προσδένεται. Τέλος η δέσμευση του HA στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να ενισχυθεί μέσω της αλληλεπίδρασης του HA με τις υαλεκτίνες, η οποία μπορεί να ενισχύσει τη συγγένεια της αλληλεπίδρασης και να προωθήσει την κυτταρική σηματοδότηση του HA. Η πιο χαρακτηριστική αλληλεπίδραση του HA με υαλεκτίνες αποτελεί η αλληλεπίδραση με το versican.

Η διερεύνηση του ρόλου του HA και των τροποποιήσεών του στον φυσιολογικό πνεύμονα η μετά τον τραυματισμό του είναι ένας αναπτυσσόμενος τομέας, με σημαντική εξέλιξη τα τελευταία χρόνια. Το HA εντοπίζεται σε μικρές ποσότητες στον υγιή πνευμονικό ιστό, κυρίως γύρω από τα αγγεία και τους βρόγχους ενώ ελάχιστες ποσότητες εντοπίζονται και στις κυψελίδες. Κατά τη διάρκεια του τραυματισμού και της αποκατάστασης του πνεύμονα, το HA αυξάνεται σε αυτές τις περιοχές και σχετίζεται με την εισροή φλεγμονωδών κυττάρων ενώ οι αλληλεπιδράσεις με το HA μπορεί να επηρεάσουν περαιτέρω την φλεγμονώδη διαδικασία. Αυξημένα επίπεδα HA έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, διάμεση πνευμονική ίνωση και σε διάφορες επαγγελματικές πνευμονοπάθειες. Τα ευρήματα αυτά επαληθεύονται σε μελέτες σε ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης, του άσθματος που προκαλείται από αντιγόνα, και σε μοντέλα πνευμονικής λοίμωξης. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μελετών είναι ότι τα επίπεδα HA συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της πνευμονικής νόσου και του βαθμού φλεγμονής που παρατηρείται στους πνεύμονες, γεγονός που υποδηλώνει τον ουσιαστικό ρόλο του HA στην παθογένεια και την εξέλιξη των πνευμονικών νόσων. Το HA διαδραματίζει επίσης κρίσιμο ρόλο κατά την ανάπτυξη και την αναγέννηση των πνευμόνων. Πράγματι, η αναδιαμόρφωση της ECM μέσω της εναπόθεσης μιας προσωρινής μήτρας (provisional matrix) πλούσια σε HA, είναι ένα ουσιαστικό βήμα στην επιδιόρθωση των τραυμάτων.

Οι βιολογικές επιδράσεις του versican θα ήταν δύσκολο να εξεταστούν χωρίς να υπολογιστούν οι αλληλεπιδράσεις της με το HA. Οι παράγοντες που αυξάνουν την έκφραση της versican, αυξάνουν την έκφραση του HA οδηγώντας σε αυξημένη συσσώρευση τόσο του HA όσο και της versican στους ιστούς. Η versican δεσμεύει το HA μέσω μιας θέσης στην περιοχή G1 (Εικόνα 28). Και τα δύο μόρια συχνά συγκεντρώνεται σε περιοχές φλεγμονής του πνεύμονα ή επιδιόρθωσης των ιστών. Μελέτες αναφέρουν ότι το HA και η versican συνεντοπίζονται σε τρεις διαφορετικούς

τύπους ινωτικής νόσου στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένης της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Σε μεταγενέστερες μελέτες, αναφέρονται παρόμοια ευρήματα για τις εμπλουτισμένες με versican και HA περιοχές στον συνδετικό ιστό σε πνευμονοπάθειες οδηγώντας τους στο συμπέρασμα ότι μια προσωρινή πλούσια σε versican μήτρα είναι απαραίτητη για την αναδιαμόρφωση των πνευμόνων, ανεξάρτητα από το είδος της φλεγμονής

Συνοψίζοντας, η αυξημένη έκφραση και σύνθεση τόσο του versican όσο και του HA παρατηρείται σε πολλαπλούς τύπους πνευμονικής φλεγμονής και τραυματισμού σε ανθρώπους αλλά και σε μοντέλα ποντικών. Τα στοιχεία από αυτές τις μελέτες υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις versican-HA είναι ουσιώδεις, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτής της αλληλεπίδρασης[104].

Τενασκίνες-Tenascins

Οι οικογένεια των τενασκινών περιλαμβάνει πέντε διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τις TN-C, TN-R, TN-X, TN-Y και TN-W. Αυτές οι γλυκοπρωτεΐνες έχουν πολύπλοκες δομές που επιτρέπουν ποικίλες μοριακές αλληλεπιδράσεις με μόρια κυτταρικής επιφάνειας (π.χ. ιντεγκρίνες), άλλα μόρια της ECM (π.χ. φιμπρονεκτίνη, υαλεκτίνες), αυξητικούς παράγοντες (π.χ. PDGF, FGF και TGF- β), και υποδοχείς (π.χ. EGF-R)[115]. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, οι τενασκίνες συχνά συνδέονται με την αναστολή της εξάπλωσης των κυττάρων και του σχηματισμού εστιακών προσκολλήσεων, καθώς και με αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας, της εισβολής και του πολλαπλασιασμού.

Τόσο η TN-R όσο και η TN-C αλληλοεπιδρούν με την καρβοξυτελική περιοχή της versican, επιτρέποντας το σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων με το HA. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ TN-R, versican και HA είναι απαραίτητη για το σχηματισμό περινευρικών δικτύων. Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται επηρεάζει ποικίλες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησης και μετανάστευσης των νευρικών κυττάρων, της πλαστικότητας, της δράσης αυξητικών παραγόντων και

κυτταροκινών, της επιβίωσης των νευρώνων και της δομικής οργάνωσης της ECM[104].

Ινωδουλίνες-Fibulins

Οι πρωτεΐνες Fibulin-1 και 2 (Fbln-1, Fbln-2) είναι από τα μεγαλύτερα μέλη (90 kDa) της οικογένειας των γλυκοπρωτεϊνών fibulins και εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα. Μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με την fibrillin-1 και τον TGFβ, οι fibulins-1 και -2 έχουν διττό ρόλο ως δομικές πρωτεΐνες και ως κυτταρικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας. Ως δομικές πρωτεΐνες, συμβάλλουν στην σύνδεση της Fbn-1 με την ελαστίνη και διάφορα άλλα μόρια, όπως η λαμινίνη, η ινωδονεκτίνη, το ινωδογόνο, και με PG, δρώντας ως μόρια σταθεροποίησης της ECM. Ως μόρια της ECM, διαμορφώνουν τη σηματοδότηση του TGFβ. Η fibulin-1 αποτελεί βασικό μόριο σύνδεσης και ρύθμισης της πρωτεόλυσης με τη μεσολάβηση της ADAMTS-1, υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο στον κύκλο εργασιών της ECM. Έτσι οι πρωτεΐνες αυτές με αυτόν τον τρόπο επηρεάζουν τις κυτταρικές διεργασίες που είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη, την ομοιόσταση και διάφορες ασθένειες[104].

Οι αλληλεπιδράσεις της versican με τις παραπάνω πρωτεΐνες πραγματοποιείται στις EGF επαναλήψεις της C-τελικής περιοχής G3 του versican[115]. Μελέτες αναδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ fibulin-1 και -2 με τη versican και άλλα μόρια, συμπεριλαμβανομένων των ADAMTS-1 και HA, είναι σημαντικές στην αναδιαμόρφωση των ιστών[104].

Φιμπρονεκτίνη- Fibronectin (FN)

Η φιμπρονεκτίνη αποτελεί μία από τις κύριες γλυκοπρωτεΐνες της ECM, όπου μπορεί να αλληλοεπιδρά με πολυάριθμες πρωτεΐνες, να αυτοσυνδέεται για να σχηματίσει ινίδια και να συνδέεται επίσης με ιντεγκρίνες, υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, και ένζυμα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας. Μέσω αυτών των πολλαπλών αλληλεπιδράσεων, η φιμπρονεκτίνη επηρεάζει τη συναρμολόγηση της εξωκυττάριας μήτρας και κυτταρικές διεργασίες καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των ιστών και της επούλωσης τραυμάτων. Τόσο η σύνθεση της FN όσο και η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης είναι ουσιώδεις για τη διαδικασία επούλωσης και η διαταραχή οποιαδήποτε από τις δύο διαδικασίες συμβάλλει σε πολλές χρόνιες

παθήσεις. Η σύνθεση της φιμπρονεκτίνης ρυθμίζεται από τον TGFβ και η αποικοδόμηση της από τις ADAMTS9 και MMP14.

Στους πνεύμονες, η φιμπρονεκτίνη πιστεύεται ότι εμπλέκεται στον σχηματισμό των αεραγωγών, στη διαφοροποίηση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων και στην ανάπτυξη και ωρίμανση των πνευμόνων. Κύριο χαρακτηριστικό χρόνιων πνευμονικών παθήσεων αποτελεί η διαταραχή στην σύνθεση η αποικοδόμηση της φιμπρονεκτίνης. Η versican και η φιμπρονεκτίνη μπορούν να αλληλοεπιδράσουν μέσω τόσο της περιοχής G3 όσο και μέσω των αλυσίδων θειικής χονδροϊτίνης της versican. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της versican μεταβάλλεται ταυτόχρονα με την έκφραση της φιμπρονεκτίνης καθώς και άλλων μορίων της εξωκυττάριας μήτρας, ως μέρος της εκτεταμένης αναδιαμόρφωσης της ECM που συμβαίνει σε ινωτικές ασθένειες. Παρόλα αυτά, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με το πώς οι αλληλεπιδράσεις φιμπρονεκτίνης-versican συμβάλλουν στην ινωτική διαδικασία. Είναι γνωστό, ωστόσο, ότι η ίνωση εξαρτάται από το HA, το οποίο επίσης συνδέεται με την φιμπρονεκτίνη της οποίας οι αλληλεπιδράσεις με τις CD44 και TLR4 επηρεάζουν τον φαινότυπο των μυοϊνοβλαστών μέσω ρύθμισης του TGFβ. Συνεπώς, είναι πιθανό και οι αλληλεπιδράσεις versican-φιμπρονεκτίνης έχουν σημαντικές συνέπειες στην πνευμονική ίνωση[104].

Κολλαγόνο τύπου I- Collagen type I

Το κολλαγόνο αποτελεί ένα από τα βασικότερα μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, και ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη στην παθογένεια της ΠΠ. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ versican και του κολλαγόνου τύπου I έχουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της διάμεσης μήτρας που περιβάλλει τους ινοβλάστες. Η σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I λαμβάνει χώρα σε πλούσια σε versican περιοχές που περιέχουν μυοϊνοβλάστες σε διάφορες ινωτικές πνευμονοπάθειες. Μελέτες αναφέρουν ότι το κολλαγόνο τύπου I και η versican συνεντοπίζονται στους αεραγωγούς ασθενών με ARDS, ΧΑΠ και σε μυοϊνοβλαστικές εστίες σε ασθενείς με ΠΠ. Αν και οι αλλαγές στο κολλαγόνο και το versican θεωρούνται σημαντικές για την εξέλιξη αυτών των ασθενειών, η φύση των αλληλεπιδράσεων και ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν στην παθολογία των πνευμόνων δεν είναι επαρκώς κατανοητές. Είναι πιθανό ότι και άλλα

μόρια που συνδέονται με τη versican στην ECM, συμπεριλαμβανομένων του HA και της φιβρονεκτίνης, εμπλέκονται σε αυτή τη δυναμική αλληλεπίδραση[104].

Αλληλεπίδραση με μόρια κυτταρικής επιφάνειας

Σελεκτίνες και χημειοκίνες

Οι πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, L-, E και P-selectin, περιέχουν μια N-τελική επανάληψη λεκτίνης τύπου C, μια επανάληψη EGF, μια ενιαία διαμεμβρανική αλληλουχία και μια κυτταροπλασματική ουρά. Καθώς η περιοχή G3 της versican που περιέχει CRD και EGF περιοχές, έχει παρόμοια δομή με τις σελεκτίνες, είναι λογικό τα δύο μόρια να αλληλοεπιδρούν. Η σύνδεση της versican με την P-σελεκτίνη και την L-σελεκτίνη αναστέλλεται έντονα από την πέψη της versican με χονδροϊτινάση. Έτσι, η versican φαίνεται να αλληλοεπιδρά με τις σελεκτίνες μέσω των GAGs της, και μόνο όταν αυτές είναι σουλφοποιημένες.

Επιπλέον, η versican βρέθηκε επίσης να δεσμεύει ορισμένες χημειοκίνες και με αυτό τον τρόπο να ρυθμίζει τη λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, η χημειοκίνη SLC (secondary lymphoid tissue chemokine) συνδέεται με την versican με ισχυρή εξειδίκευση. Η SLC βοηθά στη σύνδεση της ιντεγκρίνης $\alpha 4 \beta 7$, στα λευκοκύτταρα. Η versican, μέσω των αλυσίδων GAG της, μπορεί έτσι να αποτρέψει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων μέσω της δέσμευσης της SLC. Συνολικά η ρύθμιση της αλληλοεπίδρασης της versican με τις σελεκτίνες και τις χημειοκίνες είναι ζωτικής σημασίας για την φλεγμονή[115].

CD44

Η CD44 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης τύπου I. Αποτελείται από μια μεγάλη περιοχή που περιέχει μια θέση δέσμευσης υαλουρονικού, 4 θέσεις προσκόλλησης αλυσίδων θειικής χονδροϊτίνης, μια διαμεμβρανική περιοχή 21 αμινοξέων και μια κυτταροπλασματική ουρά 72 αμινοξέων. Η CD44 μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα που οδηγεί σε διαφορετικές ισομορφές που διαφοροποιούνται ως προς την παρουσία ή την απουσία συγκεκριμένων περιοχών. Η πιο εκτενώς μελετημένη ισομορφή CD44 είναι η τυπική ισομορφή (CD44s), η οποία περιέχει όλες τις γνωστές περιοχές του μορίου CD44. Η CD44 έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-ECM, διεγείρει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και τη διήθηση των ιστών και

προάγει την ανάπτυξη και τη μετάσταση ορισμένων όγκων. Αν και οι αλυσίδες GAG που συνδέονται με ορισμένες ισομορφές της CD44 μπορούν επίσης να δεσμεύουν ένα υποσύνολο αυξητικών παραγόντων, κυτταροκίνες και πρωτεΐνες της ECM όπως η φιβρονεκτίνη, οι περισσότερες από τις λειτουργίες που αποδίδονται στο CD44 μπορούν να αποδοθούν στην ικανότητά του να δεσμεύει το υαλουρονικό.

Οι αλυσίδες GAG της versican συνδέονται επίσης με το CD44 στην περιοχή πρόσδεσης του HA. Αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεγάλου μακρομοριακού συμπλόκου που εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση και τη σηματοδότηση. Συνολικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ versican και CD44 είναι μια πολύπλοκη και δυναμική διαδικασία που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες[115].

Ιντεγκρίνες-Intergrins

Οι ιντεγκρίνες είναι σημαντικοί υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Αν και αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως μια οικογένεια υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται στην μεταφορά των κυττάρων στην ECM και επηρεάζουν δυναμικές διαδικασίες σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, όπως η ενδοκυτταρική σηματοδότηση και η έκφραση γονιδίων που οδηγούν στη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Οι ιντεγκρίνες μπορούν να σηματοδοτούν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης προς οποιαδήποτε κατεύθυνση: η εξωκυτταρική δραστηριότητα πρόσδεσης των ιντεγκρινών ρυθμίζεται από το εσωτερικό του κυττάρου, ενώ η πρόσδεση της ECM προκαλεί σήματα που μεταδίδονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι ιντεγκρίνες ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την ανάπτυξη. Οι περισσότερες ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν διάφορες πρωτεΐνες της ECM. Η versican αλληλοεπιδρά με την ιντεγκρίνη β1 μέσω της C-τελικής περιοχής G3. Ως αποτέλεσμα, το προϊόν versican G3 ανιχνεύθηκε εκτός από την ECM, και στην κυτταρική επιφάνεια που περιβάλλει τα κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι η versican δεν περιέχει μοτίβο RGD, γεγονός που υποδηλώνει έναν εντελώς νέο μηχανισμό πρόσδεσης των ιντεγκρινών[115].

EGFR

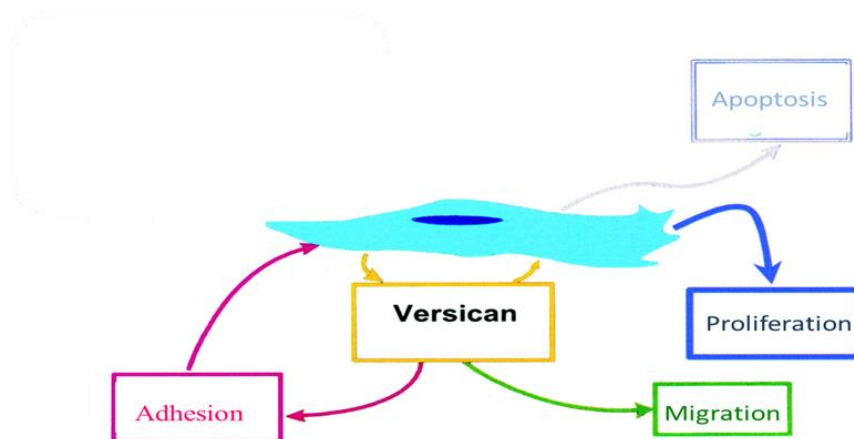
Ο EGFR, ένας άλλος σημαντικός υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας, μεσολαβεί σε πολλές κυτταρικές αποκρίσεις τόσο σε φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Τα μόρια σύνδεσης με τον EGFR, όπως ο EGF,

προσδένονται στους υποδοχείς τους και προκαλούν αλλαγές διαμόρφωσης στα μονομερή του υποδοχέα που προάγουν την ενεργοποίησή τους. Οι ιντεγκρίνες είναι σε θέση να σχηματίζουν κλάστερ με τους υποδοχείς EGF και αυτή η φυσική αλληλεπίδραση επηρεάζει συχνά την ένταση του επαγόμενου από τον EGFR σήματος προς την ERK κινάση. Τα συνεργατικά μονοπάτια που προέρχονται από αυτά τα δύο σήματα είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση μιας σειράς κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η προσκόλληση και η μετανάστευση.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ versican και EGFR διαμεσολαβείται από τις EGF περιοχές του versican και την εξωκυττάρια περιοχή του EGFR. Η σύνδεση των 2 μορίων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών του EGFR. Η αλληλεπίδραση versican-EGFR έχει εμπλακεί σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της εξέλιξης και της μετάστασης του όγκου, της φλεγμονής και της επούλωσης των πληγών[104, 115].

1.4.6 Ρόλος

Πέρα από τον σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης στην συγκρότηση της εξωκυττάριας μήτρας, το versican εμπλέκεται και σε άλλες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες (Εικόνα 31), όπως:



Εικόνα 31: Σύνοψη των επιδράσεων του versican στον κυτταρικό φαινότυπο. Τροποποιημένη από [116]

Προσκόλληση

Το versican δρα ως μόριο που μειώνει την προσκόλληση(anti-adhesive) και αυτή η δραστηριότητα οφείλεται στην περιοχή G1 της πρωτεΐνης. Ωστόσο έχει

αναφερθεί ότι, η καρβοξυτελική περιοχή του versican μπορεί να αλληλοεπιδρά με τη $\beta 1$ ιντεγκρίνη των κυττάρων γλοιώματος, ενεργοποιώντας την κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK), προάγοντας έτσι την κυτταρική προσκόλληση και αποτρέποντας την απόπτωση σε αυτόν τον κυτταρικό τύπο.

Η ιδιότητα προσκόλλησης της περιοχής G3 της versican εγείρει την πιθανότητα ότι διαφορετικά προϊόντα διάσπασης της versican μπορούν να επηρεάζουν την κυτταρική προσκόλληση με διαφορετικούς τρόπους. η υπερέκφραση της ισομορφής V3 οδηγεί σε αυξημένη προσκόλληση σε λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών (Airway Smooth Muscle Cells- ASMCs)[117].

Η versican συνδέεται επίσης με μόρια προσκόλλησης (L-,P-selectins) στην επιφάνεια των φλεγμονωδών λευκοκυττάρων. Επιπλέον, η δέσμευση του CD44 από την versican, σταθεροποιεί την σύνδεση υαλουρονικού-versican στην κυτταρική επιφάνεια, με αποτέλεσμα την δημιουργία ECM στην οποία υπάρχουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης για τα φλεγμονώδη κύτταρα. Η versican δεσμεύει επίσης αρκετές διαφορετικές χημειοκίνες που εμπλέκονται στη στρατολόγηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να διατηρούν την φλεγμονώδη απόκριση, και συνεπώς θα μπορούσαν να θέσουν τη versican ως ένα υποσχόμενο μόριο στόχο για τον έλεγχο της φλεγμονής[107].

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Το versican εμπλέκεται επίσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση της versican σχετίζεται με έναν πολλαπλασιαστικό κυτταρικό φαινότυπο και βρίσκεται συχνά σε ιστούς που παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό, όπως κατά την ανάπτυξη και σε μια ποικιλία όγκων, συμπεριλαμβανομένων των όγκων του μαστού, του εγκεφάλου, του προστάτη και του μελανώματος.

Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η versican προάγει τον πολλαπλασιασμό, είναι η επίδραση αυξητικών παραγόντων. Η αύξηση της versican και των συναφών πρωτεϊνών σε απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες όπως ο PDGF και ο TGF- $\beta 1$ προκαλεί αύξηση της περικυττάριας μήτρας των κυττάρων και επέκταση της ECM. Η επέκταση της περικυττάριας μήτρας προϋποθέτει την αλληλεπίδραση της versican με διάφορες συνδετικές πρωτεΐνες, όπως το υαλουρονικό και την CD44. Αυτά τα σύμπλοκα αυξάνουν την ελαστικότητα και το ιξώδες της μήτρας, δημιουργώντας ένα

εξαιρετικά εύπλαστο περιβάλλον που ευνοεί την αλλαγή του κυτταρικού σχήματος που είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον, τα παραγόμενα μακρομοριακά σύμπλοκα versican-υαλουρονικού μπορεί να έχουν μια δραματική επίδραση στην τάση που ασκείται στα ίδια τα κύτταρα και στις δυνάμεις έλξης που παράγονται από το κύτταρο. Τέτοιες μηχανικές αλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάσουν την σηματοδότηση. Έτσι, το σύμπλοκο versican-υαλουρονικού που περιβάλλει τα κύτταρα χρησιμεύει ως ένας σημαντικός, μηχανισμός για τον έλεγχο του κυτταρικού σχήματος και της κυτταρικής διαίρεσης.

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο η versican θα μπορούσε να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό είναι δρώντας η ίδια ως μιτογόνο, μέσω των EGF αλληλουχιών της στην περιοχή G3 του μορίου. Τέλος, συγκέντρωση της versican που συνδέεται με την κυτταρική επιφάνεια φαίνεται να είναι κρίσιμος παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό και η απώλεια της versican από την κυτταρική επιφάνεια σχετίζεται με μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το σημαντικότερο μονοπάτι που προάγει τον πολλαπλασιασμό μέσω της άμεσης σύνδεσης της versican με τον υποδοχέα ενός αυξητικού παράγοντα επεμβαίνοντας στην κυτταρική προσκόλληση[107]. Τέλος έχει αναφερθεί ότι οι 2 ισομορφές του γονιδίου V1,V2 επιτελούν αντίθετους ρόλους στον πολλαπλασιασμό. Πιο συγκεκριμένα η ισομορφή V1 φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η V2 να τον αναστέλλει[118].

Κυτταρική μετανάστευση

Η versican επηρεάζει επίσης τη μετανάστευση πολλών κυττάρων. Η versican εκφράζεται κατά μήκος νευρικών μονοπατιών και επηρεάζει τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η versican εμποδίζει τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων επειδή τα κύτταρα δεν εισέρχονται σε ιστούς που υπερεκφράζουν versican. Πιστεύεται ότι το πρόβλημα στην μετανάστευση των κυττάρων του νευρικού, οφείλεται στο περιβάλλον της ECM μέσω της οποίας μεταναστεύουν, και όχι στα ίδια τα κύτταρα.

Η versican μπορεί επίσης να επηρεάσει τη μετανάστευση των λεμφοειδών κυττάρων. Μελέτες δείχνουν ότι τα T κύτταρα δεν μεταναστεύουν όταν προστίθενται σε μια ECM εμπλουτισμένη σε versican και HA, αλλά αυτή η αναστολή της μετανάστευσης μπορεί να αντιστραφεί εάν αυτή η ECM υποστεί προ κατεργασία με αντισώματα έναντι της versican.

Η versican επηρεάζει τη μετανάστευση μιας ποικιλίας άλλων κυτταρικών τύπων και η δραστηριότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με τις ιδιότητες προσκόλλησης που αφορούν την περιοχή G1 του μορίου. Στο νευρικό σύστημα, η κύρια εκφραζόμενη ισομορφή V2 αναστέλλει τη μετανάστευση. Αυτή η ιδιότητα της versican μπορεί να μειωθεί, αλλά όχι να εξαλειφθεί, με την αφαίρεση των αλυσίδων CS, υποδεικνύοντας ότι πολλαπλές περιοχές του versican εμπλέκονται στον έλεγχο της αναγέννησης των νευρικών αξόνων. Το γεγονός ότι η versican διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, υπογραμμίζεται από μελέτες που δείχνουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης μαζί με άλλες υαλεκτίνες μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο χειρισμός της σύνθεσης της versican στον τραυματισμού του νωτιαίου μυελού μπορεί να είναι μια χρήσιμη παρέμβαση για τη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτής της πάθησης. Για να γίνει αυτό είναι σημαντικό να εντοπιστούν άλλοι βασικοί παράγοντες με τους οποίους η versican αλληλοεπιδρά[117]. Η εμπλοκή του versican στην κυτταρική μετανάστευση έχει περιγράψει σε πολλούς τύπους καρκίνων και θα αναλυθεί λεπτομερέστερα στην συνέχεια.

Απόπτωση

Ο τρόπος με τον οποίο η versican εμπλέκεται στην απόπτωση είναι περίπλοκος. Ενώ υπάρχουν ορισμένα δεδομένα που επαληθεύουν ότι η versican μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν είναι καλά κατανοητοί.

Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου μπορεί να εμπλακεί στην απόπτωση είναι μέσω των αλληλεπιδράσεων με μόρια όπως το HA και το CD44. Το CD44 έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που είτε προάγουν είτε αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο[119]. Μελέτες δείχνουν ότι η versican είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση της μήτρας μέσω σύνδεσης με το υαλουρονικό και ότι η μειωμένη εναπόθεση versican αυξάνει τα ελεύθερα θραύσματα υαλουρονικού τα οποία αλληλοεπιδρούν με το CD44 και αυξάνουν τη φωσφορυλίωση της ERK1/2, οδηγώντας σε κυτταρική γήρανση[120].

Όπως συμβαίνει και στον πολλαπλασιασμό, έτσι και στην διαδικασία της απόπτωσης έχει βρεθεί ότι οι 2 ισομορφές V1,V2 επιτελούν αντίθετους ρόλους. Πιο

συγκεκριμένα έχει βρεθεί σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε NH3T3 κύτταρά ότι η ισομορφή V1 αυξάνει την αντοχή των κυττάρων στην αποπτωτική διαδικασία ενώ η ισομορφή V2 δεν επηρεάζει την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην απόπτωση[118].

Συνολικά, τα υπάρχοντα δεδομένα αναδεικνύουν ότι η versican εμπλέκεται στην απόπτωση. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων εμπλέκεται σ' αυτήν την διαδικασία.

1.4.7 Εμπλοκή του versican στην εμβρυϊκή ανάπτυξη

Πολλές μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή του Vcan στην μορφογένεση των ιστών και την οργανογένεση κατά την ανάπτυξη. Η ανάλυση της έκφρασης του Vcan στον πνεύμονα, το ήπαρ, την καρδιά και τον εγκέφαλο ανά εμβρυϊκή ημέρα καταδεικνύει την υψηλότερη τιμή της έκφρασης την μέρα E13.

Ο ρόλος της Vcan στην ανάπτυξη της καρδιάς έχει μελετηθεί εκτενώς. Η Versican εκφράζεται στους αναπτυσσόμενους καρδιακούς ιστούς και έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για τη σωστή καρδιακή μορφογένεση. Πειράματα σε ποντίκια με πλήρη διαγραφή ή μερική ανεπάρκεια του γονιδίου έδειξαν ότι στα ζώα αυτά η καρδιά δεν αναπτύσσονται σωστά, υποδεικνύοντας τον ουσιαστικό ρόλο του γονιδίου στο σχηματισμό του καρδιακού τοιχώματος. Η Vcan δημιουργεί ένα προσωρινό καρδιακό τοίχωμα, μαζί με το HA, όπου βοηθά τα ενδοκαρδιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν και να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του μυοκαρδίου. Ο εντοπισμός του Vcan στην αναπτυσσόμενη καρδιά μεταβάλλεται γρήγορα, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζει διαφορετικούς ρόλους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές[113].

Το versican εκφράζεται επίσης και στους αναπτυσσόμενους ιστούς των άκρων. Κυτταρικές σειρές χονδροκυττάρων (ATDC5, N1511) παρουσιάζουν διαδοχικά πρότυπα έκφρασης των ναλεκτίνων versican και aggrecan. Στο πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, το versican εκφράζεται παροδικά και ενσωματώνεται στην ECM, και στην συνέχεια αντικαθίσταται από το aggrecan. Καλλιέργεια κυττάρων που προέρχονται από έμβρυα στα οποία λείπει το γονίδιο versican, έδειξε ότι τα κύτταρα αυτά αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει τον ουσιαστικό ρόλο του versican στη χονδρογένεση. Το versican διευκολύνει τη χονδρογένεση και τη μορφογένεση των αρθρώσεων, μέσω μεταφοράς του TGF- β στην εξωκυττάρια μήτρα και ρύθμισης της σηματοδότησής του[113, 121].

Η Versican εκφράζεται στους αναπτυσσόμενους νευρικούς ιστούς και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των νευρικών προγονικών κυττάρων. Οι πρωτεογλυκάνες, συμπεριλαμβανομένης της versican, έχουν εμπλακεί στη σταθεροποίηση των συναπτικών συνδέσεων στον εγκέφαλο και στην παρεμπόδιση της αναγέννησης μετά από τραυματισμό στον ενήλικο εγκέφαλο. Το versican εμπλέκεται σε μια προγενέστερη πτυχή της νευρικής ανάπτυξης, την ωρίμανση των προσυναπτικών δομών. Επιπλέον, αλληλοεπιδρώντας με άλλα μόρια εξωκυττάριας μήτρας, συμβάλλει και στην μετέπειτα σταθεροποίηση των προσυναπτικών δομών. Συνολικά φαίνεται να συμβάλλει στην νευρική ανάπτυξη μέσω των προσυναπτικών δομών[122].

Συμπερασματικά, οι παραπάνω μελέτες υποδηλώνουν ότι το Vcan σχηματίζει ένα χώρο που διευκολύνει την μετανάστευσης και διαφοροποίηση των κυττάρων και ρυθμίζει τις τοπικές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών[113].

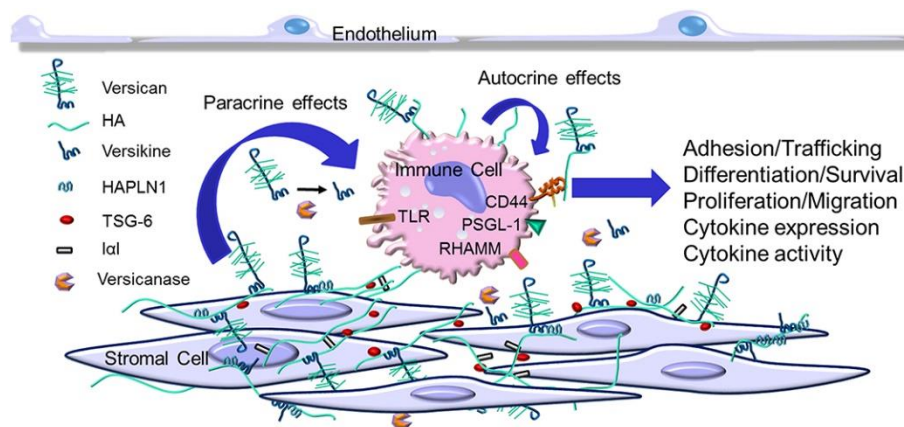
1.4.8 Ο ρόλος του versican στην φλεγμονή

Όπως αναφέρθηκε, το versican είναι απαραίτητο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και αποτελεί σημαντικό συστατικό της φλεγμονής των ιστών που προκαλείται από λοίμωξη ή τραυματισμό. Το versican συσσωρεύεται ως μέρος της πρώιμης φλεγμονώδους απόκρισης σε μια σειρά από ανθρώπινες ασθένειες που συχνά σχετίζονται με την εισβολή των λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων ασθενειών του αγγειακού συστήματος, των πνευμόνων, του εγκεφάλου, του εντέρου και άλλων οργάνων, καθώς και σε πολλές διαφορετικές μορφές καρκίνου[106].

Η έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης απαιτεί την μετανάστευση λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία σε κατεστραμμένες περιοχές των ιστών, ως μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Τα κύτταρα αυτά έρχονται σε επαφή με την ECM η οποία λειτουργεί ως κρίωμα, επηρεάζοντας την προσκόλληση, τη μετανάστευση, την ενεργοποίηση και τη συγκράτησή τους.

Το versican σε αυτήν την αρχική φάση της φλεγμονής, αλληλοεπιδρά με υποδοχείς στην επιφάνεια των ανοσοκυττάρων, όπως ο CD44, ο υποδοχέας Toll-like 2 (TLR2) και οι P- ή L-σελεκτίνες, και παρέχει εγγενή σήματα που επηρεάζουν τον φαινότυπο των ανοσοποιητικών και φλεγμονωδών κυττάρων (Εικόνα 32). Το versican αλληλοεπιδρά επίσης με ένα αριθμό άλλων συστατικών της ECM που είναι σημαντικά στη φλεγμονή, όπως η υαλουρονικό, η ινωδονεκτίνη και η τεναςκίνη-R και -C.

Μάλιστα η αλληλεπίδραση του versican με ορισμένα από τα παραπάνω μόρια, δημιουργεί διακριτά νημάτια στην ECM που εκφύονται από την επιφάνεια μιας ποικιλίας κυττάρων και σχηματίζουν μια μήτρα που δεσμεύει τα λευκοκύτταρα. Τέτοιες εμπλουτισμένες με versican δομές, έχουν βρεθεί επίσης σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων, όπως σε περιπτώσεις φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών συστατικών της ECM δημιουργούν δομές που επηρεάζουν επιλεκτικά τις αλληλεπιδράσεις λευκοκυττάρων/ECM. Το versican, πέρα από το HA, μπορεί επίσης να συνδεθεί με το CD44, γεγονός που υποδηλώνει και τα 2 μόρια μπορούν να σταθεροποιούν τις εξαρτώμενες από το CD44 αλληλοεπιδράσεις και την επακόλουθη εξαρτώμενη από το CD44 σηματοδότηση στα φλεγμονώδη κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η σύνδεση της versican με το HA μπορεί να παρεμβαίνει στη σύνδεση του HA με το CD44 στα ανοσοποιητικά κύτταρα και να αμβλύνει την ανοσολογική απόκριση. Οι αλυσίδες CS στη versican μπορούν επίσης να αλληλοεπιδράσουν με χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και πρωτεάσες, επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα των χημειοκινών, τη δραστηριότητα και τον φαινότυπο των ανοσοκυττάρων. Έτσι, τα επιμέρους συστατικά της ECM, συμπεριλαμβανομένου του versican, μπορεί να αλληλοεπιδρούν ειδικά με βασικά μόρια που εμπλέκονται είτε στην προώθηση είτε στην αναστολή της φλεγμονής[123].



Εικόνα 32: Η αυξημένη έκφραση του versican στην ECM ως μέρος της πρώιμης φλεγμονώδους απόκρισης οδηγεί στην αλληλεπίδραση με άλλα μόρια της ECM και στην ενεργοποίηση μονοπατιών που επηρεάζουν την φλεγμονή[106].

Μόλις τα λευκοκύτταρα συνδεθούν με την ECM που περιέχει versican, έχουν την ικανότητα να την αποικοδομούν, και να δημιουργούν προ φλεγμονώδη θραύσματα

που προωθούν περαιτέρω τη φλεγμονώδη απόκριση. Για παράδειγμα το versikine, θραύσμα που προκύπτει από την αποικοδόμηση του versican από τις ADAMTS πρωτεάσες, έχει βρεθεί σε περιοχές των αιμοφόρων αγγείων που υφίστανται ατροφία και κυτταρικό θάνατο, και έχει συσχετιστεί με την ρύθμιση της απόπτωσης. Η αποικοδόμηση του versican συμβαίνει επίσης κατά την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων ως μέρος των φλεγμονωδών γεγονότων που σχετίζονται με την αποκατάσταση των ιστών. Έτσι, είτε η ολόκληρη μορφή της πρωτεΐνης είτε τα παραγόμενα θραύσματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα "πρώτο βήμα" στην ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης σε πολλές διαφορετικές ασθένειες.

Μετά από την πρόσληψη των λευκοκυττάρων, η ECM εμπλέκεται στην προσκόλληση και την ενεργοποίηση τους. Τα αποτελέσματα μελετών υποδεικνύουν ότι η versican είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διαμόρφωση της ECM που δεσμεύει τα μονοκύτταρα, σε πειράματα *in vitro*. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η εμπλουτισμένη με HA και versican ECM επάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων. Ένας άλλος τομέας όπου η versican μπορεί να επηρεάσει τη φλεγμονή είναι προωθώντας την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών από μυελοειδή και λεμφοειδή κύτταρα. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι ιδιαίτερο γνώρισμα των περισσότερων τύπων καρκίνου στους οποίους εμπλέκεται το versican.

Πέρα από τον ρόλο του γονιδίου σε στρωματικά κύτταρα, πολλές αναφορές εντοπίζουν το versican ως ένα γονίδιο που ρυθμίζεται σε μονοκύτταρα, σε μια σειρά από προ φλεγμονώδεις ασθένειες. Δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι το γονίδιο παρουσιάζει διαφορετική έκφραση στα μακροφάγα M1, σε αντίθεση με τα μακροφάγα M2, καθώς αυτά διαφοροποιούνται από τα μονοκύτταρα. Επιπλέον, η versican που παράγεται από τα μακροφάγα μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με τις MMPs, όπως η MMP-9, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο της versican στον έλεγχο της δραστηριότητας των ενζύμων αποικοδόμησης της μήτρας. Τέτοιες αλλαγές εγείρουν την πιθανότητα τα ίδια τα μυελοειδή κύτταρα να δημιουργούν το δικό τους μικροπεριβάλλον για να υποστηρίξουν τον φαινότυπο τους ως μέρος της φλεγμονώδους απόκρισης. Επιπλέον, η έκφραση της versican έχει βρεθεί σε σχετιζόμενα με όγκους μακροφάγα (Tumor associated macrophages, TAMs) και θεωρείται ότι είναι κρίσιμη για την προώθηση της μετάστασης. Το versican που προέρχεται από μυελοειδή κύτταρα έχει εμπλακεί με την ανάπτυξη του όγκου ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, πιθανώς μέσω του αποκλεισμού της οδού TGF- β -smad2/3. Παρόλο που υπάρχουν

ορισμένα διαθέσιμα δεδομένα, χρειάζεται περισσότερη εργασία για να διευκρινιστεί ο ρόλος που διαδραματίζει η versican στο μονοκύτταρο και ο τρόπος με τον οποίο τα μακροφάγα συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση.

Ενώ είναι σαφές ότι τα μυελοειδή κύτταρα προσδένονται τόσο στο HA όσο και στο versican και χρησιμοποιούν αυτά τα συστατικά της ECM για να αλληλοεπιδράσουν, λιγότερα είναι γνωστά για τη σημασία της ECM στις αλληλεπιδράσεις των λεμφοειδών κυττάρων. Η ικανότητα των T κυττάρων να προσκολλώνται και να μεταναστεύουν μέσω της ECM του συνδετικού ιστού είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση. Η εισβολή των T-κυττάρων είναι κρίσιμη για την πρώιμη ανοσολογική απόκριση και είναι ιδιαίτερα εμφανής στις αυτοάνοσες νόσους. Δεδομένα δείχνουν ότι η ECM που είναι πλούσια σε versican έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα T κύτταρα. Επιπλέον, η παρεμπόδιση της δέσμησης του HA στην επιφάνεια των T κυττάρων από τη versican επηρέασε αρνητικά την έκκριση IL-10 από τα T κύτταρα, μειώνοντας έτσι την ανοσοκατασταλτική ικανότητα του HA. Επιπλέον σε *in vitro* πειράματα με πήκτες κολλαγόνου στα οποία προστέθηκε εξωγενώς versican αποδείχθηκε ότι η προσθήκη versican εμπόδισε την T-κυτταρική διείσδυση και μετανάστευση, υποδεικνύοντας περαιτέρω ότι οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των συστατικών της ECM μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο κατά πόσον η ECM προωθεί ή αναστέλλει δραστηριότητες που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Έτσι, ο αντίκτυπος οποιουδήποτε συστατικού της ECM στις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις μπορεί σαφώς να επηρεαστεί από τα εν λόγω άλλα ECM συστατικά με τα οποία αλληλοεπιδρά.

Συνολικά η versican, ως συστατικό της ECM, εμπλέκεται στην φλεγμονή, αλλά το αν δρα μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα συστατικά κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό. Πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι η versican έχει τόσο προ- όσο και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες. Οι δραστηριότητες αυτές φαίνεται να εξαρτώνται από το πλαίσιο στο οποίο βρίσκεται η versican στα κύτταρα και τη χρονική και χωρική διαθεσιμότητα της versican κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης του ιστού και της φλεγμονής. Η σημασία της στην φλεγμονή έγκειται στην ευελιξία της και στην ικανότητά της να συνδέεται με μια μεγάλη ποικιλία υποδοχέων και άλλων φλεγμονωδών συστατικών επηρεάζοντας την διαθεσιμότητάς και την δραστηριότητάς τους[123].

Ο ρόλος του versican στις πνευμονικές παθήσεις

Το Versican υπερεκφράζεται σε ασθενείς με ΧΑΠ, άσθμα και μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για μελλοντικές θεραπευτικές παρεμβάσεις. Η ΧΑΠ σε προχωρημένο στάδιο είναι μη θεραπεύσιμη και η μεταμόσχευση πνεύμονα αποτελεί τη μόνη επιλογή για αυτούς τους ασθενείς και για άλλες ασθενείς με άλλες παθήσεις όπως η κυστική ίνωση και η ΠΠ. Ωστόσο, η μεταμόσχευση πνεύμονα ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης του συνδρόμου της χρόνιας απόρριψης (BOS), μια διαδικασία που περιλαμβάνει ανώμαλη επούλωση τραυμάτων και ανάπτυξη ινωτικών δομών στους αεραγωγούς με αποτέλεσμα την ανεπαρκή παροχή αέρα. Σε μια μελέτη σε ασθενείς με μεταμόσχευση πνεύμονα, οι ινοβλάστες του πνεύμονα παρήγαγαν 16 φορές περισσότερο versican μισό χρόνο μετά τη μεταμόσχευση σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές. Η ιστολογία έδειξε ότι η versican εντοπιζόταν κυρίως στα κυψελιδικά τοιχώματα και συνεπώς μπορεί να προάγει τον σχηματισμό των ινωτικών δομών σε αυτούς τους ασθενείς[124].

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) χαρακτηρίζεται από την απώλεια ελαστικών ινών από τους μικρούς αεραγωγούς και τα κυψελιδικά τοιχώματα και από μείωση της ελαστικής των πνευμόνων, η οποία σχετίζεται με αυξημένη σοβαρότητα της νόσου. Αυξημένα επίπεδα versican ανιχνεύονται σε ινοβλάστες στους αεραγωγούς ασθενών με ΧΑΠ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή της versican είναι μεγαλύτερη από την αποικοδόμηση της. Η έκφραση της versican στο κυψελιδικό τοίχωμα συσχετίζεται αρνητικά με την έκφραση της ελαστικής και της πρωτεΐνης που δεσμεύει την ελαστίνη (Elastin binding protein, EBP), μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται ενεργά στην διαδικασία σχηματισμού ινιδίων της ελαστικής και συσχετίζεται επίσης με την πνευμονική λειτουργία. Η αναστολή της δράσης της EBP από τη versican εμποδίζει την αποτελεσματική επιδιόρθωση με επανασύνθεση των ελαστικών ινών στις κυψελίδες των ασθενών με ΧΑΠ. Η EBP συμβάλλει επίσης στην μεταφορά της τροποελαστικής από το Golgi και τα ενδοσωμικά διαμερίσματα στην κυτταρική επιφάνεια. Κατά την ΧΑΠ, όπου τα επίπεδα της versican είναι αυξημένα, η πρωτεΐνη EBP αλληλοεπιδρά με τις CS αλυσίδες της versican και προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης της EBP απελευθερώνοντας πρόωρα την τροποελαστίνη. Σε φυσιολογικές συνθήκες, μετά την απελευθέρωση της EBP, η τροποελαστίνη συνδέεται με τα νεοσχηματιζόμενα μικροϊνίδια ελαστικής. Ωστόσο, όταν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα versican στον ιστό παρεμποδίζεται ο σχηματισμός των ελαστικών ινών. Η σχέση μεταξύ της απώλειας των

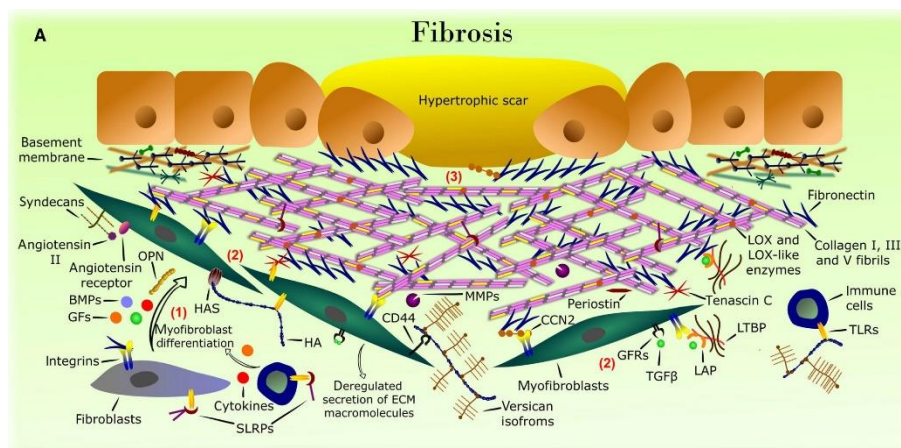
ελαστικών ινών και της συσσώρευσης της versican έχει επιβεβαιωθεί σε μελέτες που δείχνουν ότι η διαμόρφωση της versican επηρεάζει την εναπόθεση ελαστικών ινών. Σε τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, αποδείχθηκε ότι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή αύξησαν τη έκφραση της versican μαζί με το κολλαγόνο III σε ασθενείς με ΧΑΠ, και η αυξημένη έκφραση συσχετίστηκε με βελτιωμένη πνευμονική λειτουργία[124]. Τέλος σε άλλη μελέτη απομονώθηκαν ινοβλάστες από ασθενείς με ΧΑΠ και υγιείς μάρτυρες και υποβλήθηκαν σε κατεργασία με versican siRNA. Η θεραπεία με versican siRNA μείωσε την έκφραση και την έκκριση versican από τους πνευμονικούς ινοβλάστες τόσο στους ασθενείς με ΧΑΠ όσο και στους υγιείς και αύξησε σημαντικά την εναπόθεση αδιάλυτης ελαστίνης στις καλλιέργειες ινοβλαστών ασθενών. Η θεραπεία, ωστόσο, δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή τροποελαστίνης σε καμία από τις 2 καλλιέργειες κυττάρων, υποστηρίζοντας ότι η versican εμπλέκεται στην αναστολή της συναρμολόγησης αλλά όχι της σύνθεσης της τροποελαστίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αφαίρεση ή η μείωση της versican μπορεί να είναι μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για την αύξηση της εναπόθεσης αδιάλυτης ελαστίνης και την τόνωση της επιδιόρθωσης των ελαστικών ινών στον πνεύμονα με ΧΑΠ[125].

Το άσθμα είναι μία ακόμα πνευμονική ασθένεια στην όποια τα επίπεδα του versican αυξάνονται. Αυξημένη συσσώρευση versican παρατηρείται στον διάμεσο χώρο των μικρών και μεγάλων αεραγωγών ασθενών με άσθμα και σε ζωικά μοντέλα άσθματος. Τα κύτταρα που απομονώνονται από πνεύμονες ασθενών παρουσιάζουν επίσης αυξημένη παραγωγή versican. Επιπλέον, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα versican και HA, τα οποία συσχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με αναπνευστικές λειτουργίες (FEV). Επιπροσθέτως, η versican συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στο άσθμα προωθώντας την εναπόθεση πρωτεϊνών ECM, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε πάχυνση του τοιχώματος των αεραγωγών και μειωμένη πνευμονική λειτουργία[126]. Το πλούσιο σε versican μικροπεριβάλλον του πνεύμονα συμβάλλει στην δέσμευση και την ικανότητα διήθησης των μονοκυττάρων καθώς και στην αυξημένη ανοσολογική απόκριση. Οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος θα μπορούσαν να αποτελούν το έναυσμα της εμφάνισης της οξείας παρόξυνσης τόσο στο άσθμα όσο και στη ΧΑΠ και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ο καταλύτης που ξεκινά την αυξημένη εναπόθεση versican και υαλουρονικού[124]. Αυτές οι παρατηρήσεις, υποδηλώνουν ότι

η versican μπορεί να αποτελεί ενεργό οδηγό της φλεγμονώδους διαδικασίας κατά την εξέλιξη του άσθματος[126].

Ο ρόλος του versican στην ίνωση

Οι PGs όπως η versican καθώς και μόρια που συνδέονται με την versican, όπως το HA και ο υποδοχέας CD44 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης (Εικόνα 33). Η πρωτεΐνη αλληλοεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες ECM, όπως το HA, και δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον που προάγει την ενεργοποίηση των ινοβλαστών και την εναπόθεση της ECM. Αυξημένα επίπεδα versican εντοπίζονται στις υπερτροφικές ουλές. Η σύνθεση του μορίου ρυθμίζεται από τους ινοβλάστες οι οποίοι εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ουλών. Στην ηπατική ίνωση, αυξημένη έκφραση versican ανιχνεύεται κατά την ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και η πρωτεολυτική του διάσπαση σχετίζεται με την επαναφορά του ήπατος στην φυσιολογική κατάσταση (resolution). Η versican προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση των ινωτικών δεικτών κολλαγόνου I, TGFβ και α-SMA. Η υπερέκφραση της V1 ισομορφής από τους ινοβλάστες επάγει τη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες και οδηγεί στην υπερέκφραση του κολλαγόνου III και αυξημένη ικανότητα σύσπασης ενός κολλαγόνου πλέγμα κολλαγόνου[72]. Σε ασθενείς με ΙΙΙ η έκφραση του versican εντοπίζεται κυρίως στις εστίες των ινοβλαστών του πνεύμονα. Μάλιστα στις ινοβλαστικές εστίες το versican συνεντοπίζεται με το κολλαγόνο. Πέρα από τους ινοβλάστες, το κολλαγόνο IV και η versican ανιχνεύονται επίσης στα πεπαχυσμένα κυψελιδικά διαφράγματα και στις παρακείμενες μορφολογικά φυσιολογικές κυψελιδικές δομές[108].



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση των συστατικών της ECM καθώς και των αλληλεπιδράσεων μήτρας-κυττάρου κατά την εξέλιξη της ίνωσης. Τροποποιημένη από[72].

Ο ρόλος του versican στον καρκίνο

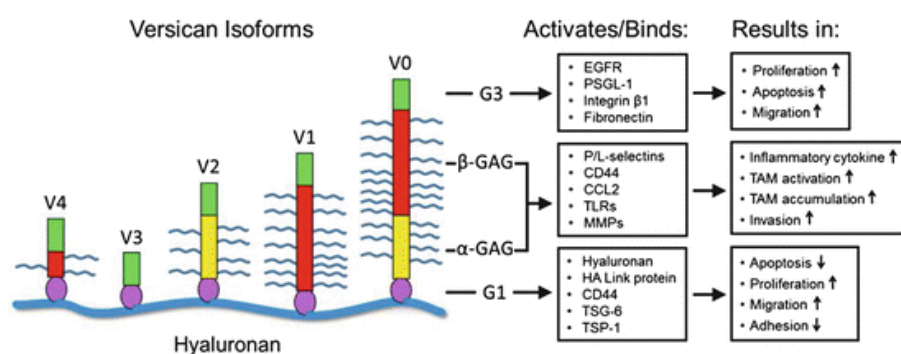
Ο καρκίνος είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά και από απώλεια της φυσιολογικής οργάνωσης των ιστών. Ο κυτταρικός μετασχηματισμός προκύπτει από γενετικές μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλοιώσεις και ευνοείται από την τροποποιημένη δομή και σύνθεση της ECM. Η αναδιαμόρφωση της ECM στον όγκο χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μιας άκαμπτης μήτρας στην οποία συσσωρεύονται φλεγμονώδης μεσολαβητές, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και ένζυμα αποικοδόμησης της ECM[72].

Πολλές μελέτες έχουν επαληθεύσει ότι το versican εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου. Οι κύριες πηγές που παράγουν versican κατά την καρκινογένεση είναι τα καρκινικά κύτταρα, το σχετιζόμενο με τον όγκο στρώμα τα σχετιζόμενα με τον όγκο μυελοειδή κύτταρα και τα διεισδυτικά στον όγκο λεμφοειδή κύτταρα. Όλες οι ισομορφές του γονιδίου έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της νόσου. Μάλιστα η ισομορφή V4 πρωτοανακαλύφθηκε στον καρκίνο του μαστού[127].

Η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης versican στην εξωκυττάρια μήτρα, ενισχύει την εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας την προσκόλληση του κυττάρου στην εξωκυττάρια μήτρα. Η συμμετοχή του versican στον καρκίνο επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με διάφορα συστατικά

της ECM , μέσω των G1, G3 περιοχών της, οδηγώντας σε απορρύθμιση μονοπατιών τα οποία εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου[127].

Πέρα από τους τομείς G1 και G3 του versican, και οι περιοχές πρόσδεσης των GAG, οι οποίες αλληλοεπιδρούν με φλεγμονώδεις μεσολαβητές, αποτελούν κομβικές περιοχές για το ρόλο της versican στην εξέλιξη του καρκινικού φαινοτύπου (Εικόνα 34). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση versican-HA παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων καθώς και στην αλληλεπίδραση με την ECM και το ανοσοποιητικό σύστημα. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα versican και υαλουρονικού συσχετίζονται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και κακή πρόγνωση της νόσου. Η versican διεγείρει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών, διευκολύνοντας έτσι την μετάσταση. Επιπλέον, μέσω η σύνδεση της versican με τον TLR2, οδηγεί στην ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων και στην έκφραση φλεγμονωδών ρυθμιστικών κυτταροκινών, όπως ο TNFα, η IL-1β και η IL-6. Αυτές οι κυτταροκίνες συμβάλλουν στην δημιουργία ενός φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή στους ιστούς και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ο σημαντικός ρόλος των 2 μορίων στην παθογένεια της νόσου αναδεικνύεται από το γεγονός ότι η αναστολή στην σύνθεση versican-HA συσχετίζεται με μειωμένη εξέλιξη του καρκίνου[127].



Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της versican με υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και άλλα μόρια ECM, η οποίες επηρεάζουν την εξέλιξη του καρκίνου[127].

Συνολικά η versican διαδραματίζει ενεργό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου. Ο ρόλος της versican στην εξέλιξη του καρκίνου περιλαμβάνει τόσο την επίδρασή της στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων (πολλαπλασιασμός, μετανάστευση,

μετάσταση) όσο και στον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει το μικροπεριβάλλον και την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να εντοπίζει και να απομακρύνει τα καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση versican συσχετίζεται διαγνωστικά με κακή πρόγνωση, ταχεία εξέλιξη της νόσου και αυξημένη πιθανότητα μετάστασης. Υπό το πρίσμα αυτό, η versican μπορεί όχι μόνο να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός ή προγνωστικός δείκτης σε μια ευρεία ποικιλία καρκίνων, μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως δυνητικός θεραπευτικός στόχος για τις θεραπείες του καρκίνου[127].

Ειδικό μέρος

2.1 Μελέτη του ρόλου του TKS5 και των ποδοσωμάτων στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΠΠ) είναι μια χρόνια, προοδευτική, διάμεση πνευμονοπάθεια αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους ενήλικες. Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από ουλές στο πνευμονικό παρέγχυμα, και ένα προφύλ συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP), που διακρίνεται από την παρουσία εστιών ινοβλαστών[15]. Παρόλο που η παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή, η επικρατούσα υπόθεση υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ΠΠ περιλαμβάνουν την απορρύθμιση των αναπτυξιακών προγραμμάτων οι οποίες αντανακλούν την ανώμαλη, απορυθμισμένη επούλωση των πληγών ως απάντηση στην επίμονη βλάβη του κυψελιδικού επιθηλίου, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των πνευμονικών ινοβλαστών[10].

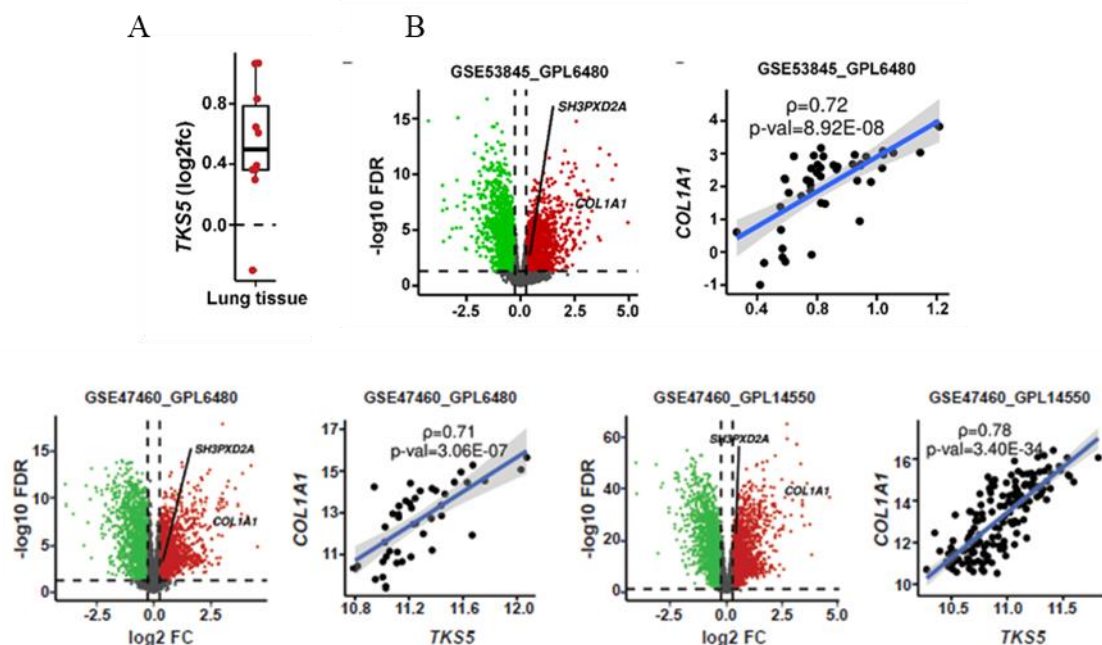
Οι πνευμονικοί ινοβλάστες (ΠΙ) είναι τα κύρια κύτταρα τελεστές στην πνευμονική ίνωση που εκκρίνουν υπερβολικές ποσότητες συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) επηρεάζοντας τη συνολική οργάνωση της ECM και κατά συνέπεια τις μηχανικές ιδιότητες του πνεύμονα[128]. Η συσσώρευση ινοβλαστών στην πνευμονική ίνωση έχει προταθεί ότι διαμεσολαβείται από την ικανότητά τους να εισβάλλουν στην υποκείμενη ECM [129-132]. Η ενεργοποίηση της εισβολής συγκαταλέγεται στα καθιερωμένα χαρακτηριστικά του καρκίνου[133], και είναι ένα από τα πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ενεργοποιημένων ΠΙ[26]. Η εισβολή βασίζεται στην πρωτεόλυση της υποκείμενης ECM μέσω των invadopodia στα καρκινικά κύτταρα και μέσω των ποδοσωμάτων σε άλλους κυτταρικούς τύπους[89, 134]. Τα ποδοσώματα είναι κυτταρικές δομές που αποτελούνται από έναν πυρήνα πλούσιο σε ακτίνη, εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ακτίνη, όπως την cortactin (CTTN), και περιβάλλονται από έναν δακτύλιο πρωτεϊνών ικριωμάτων, κυρίως της SH3 και PX περιοχών 2A (SH3PXD2A-κοινώς γνωστό ως υπόστρωμα κινάσης τυροσίνης με 5 SH3 περιοχές, TKS5)[89, 134, 135].

Αυξημένη έκφραση του TKS5 έχει αναφερθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου[89, 134, 135], όπου προτάθηκε ότι μεσολαβεί στη μεταστατική εισβολή[80]. Η πνευμονική ίνωση αποτελεί έναν από τους υψηλότερους κινδύνους ανάπτυξης

καρκίνου του πνεύμονα, ενώ έχουν προταθεί πολλές ομοιότητες μεταξύ των ενεργοποιημένων ΠΠ και των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας εισβολής στην ECM[26]. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε η μελέτη του ρόλου του *TKS5* και των ποδοσωμάτων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.

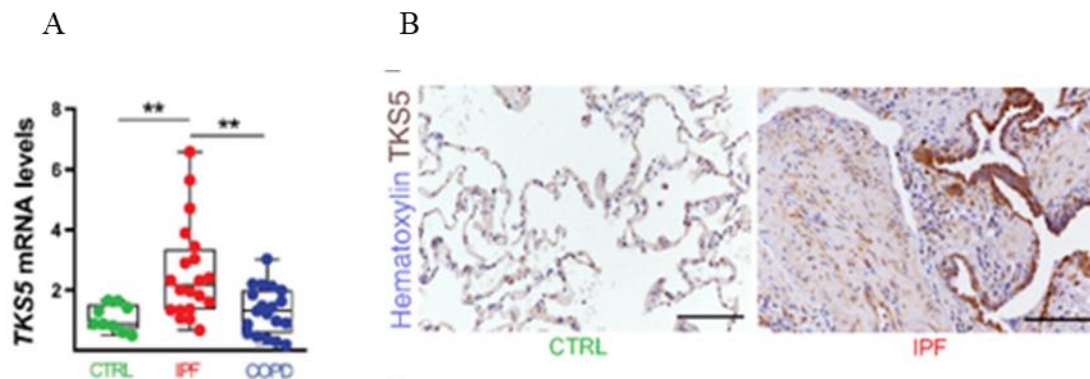
2.1.1 Αυξημένη έκφραση *TKS5* στην πνευμονική ίνωση

Για να διερευνήσουμε την έκφραση του *TKS5* στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΠΠ, χρησιμοποιήσαμε το εργαλείο Fibromine[136], το οποίο φιλοξενεί τα περισσότερα δημόσια διαθέσιμα σύνολα δεδομένων μεταγραφομικής που αφορούν την πνευμονική ίνωση. Η ανάλυση αποκάλυψε ότι *in silico* τα επίπεδα mRNA του *TKS5* είναι αυξημένα στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΠΠ σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου (Εικόνα 35Α), στα περισσότερα δημόσια διαθέσιμα σύνολα δεδομένων πνευμονικού ιστού ΠΠ (Πίνακας 1) συμπεριλαμβανομένων των τριών μεγαλύτερων (Εικόνα 35Β) Επίσης, η έκφραση σε επίπεδο mRNA του *TKS5* στους ινωτικούς πνεύμονες συσχετίζεται *in silico* με την έκφραση του *COL1A1*(Εικόνα 35Β), ενός καθιερωμένου δείκτη της ινωτικής έκφρασης.



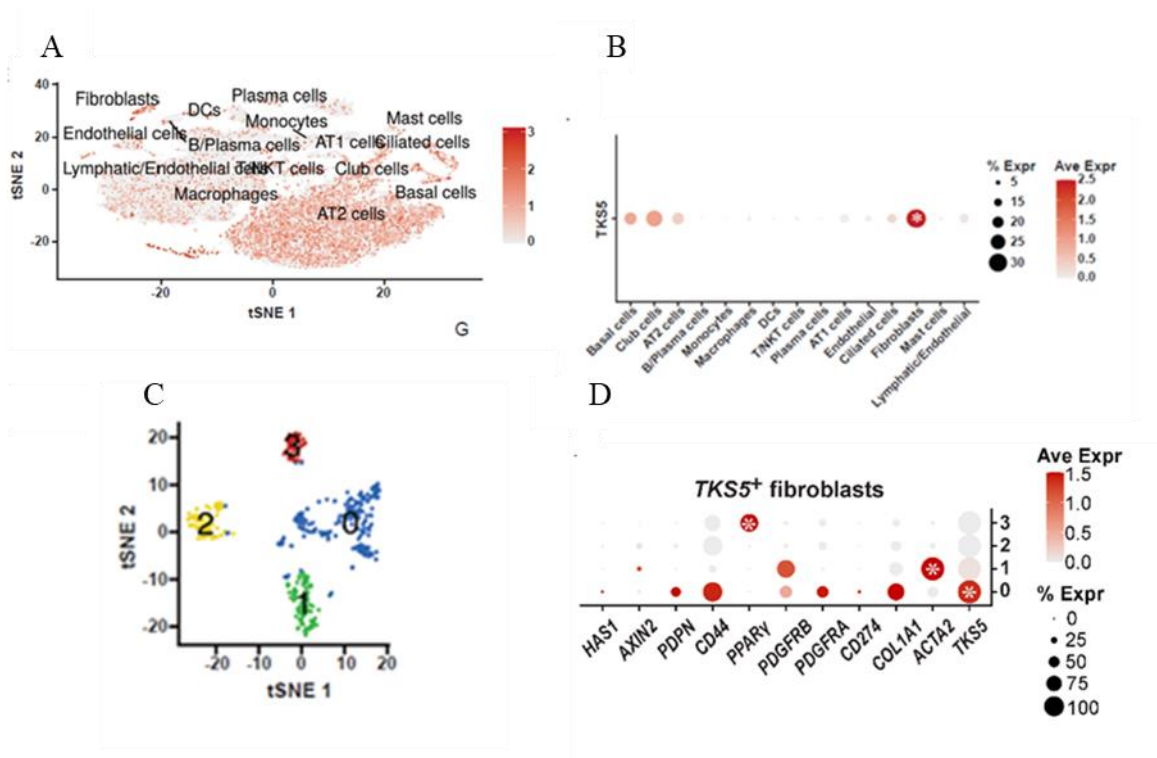
Εικόνα 35: Αυξημένη έκφραση του *TKS5* σε *in silico* δεδομένα. Α) Αυξημένα επίπεδα mRNA του *TKS5* σε πνευμονικό ιστό από ασθενείς με ΙΠΠ σε σύγκριση ($\log_2FC$) με υγιείς (CTRL) σε διάφορα δημόσια διαθέσιμα σύνολα δεδομένων (Πίνακας 1) στο Fibromine. Β) Διάγραμμα *Volcano* από τρία αντιπροσωπευτικά μεγάλα σύνολα δεδομένων συνοδευόμενα από διαγράμματα συσχέτισης *Spearman* της έκφρασης *TKS5* και *COL1A1* στο κάθε σύνολο δεδομένων

Για να επιβεβαιώσουμε την αυξημένη έκφραση του *TKS5*, στην συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ανθρώπινα δείγματα ασθενών. Αρχικά μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA του *TKS5* με Q-RT-PCR σε πνευμονικό ιστό που απομονώθηκε από ασθενείς με ΙΠΠ (n=20), σε σύγκριση με ασθενείς με ΧΑΠ (n=19) και υγιή πνευμονικό ιστό (n=9) (Πίνακας 2, Εικόνα. 36Α) τα οποία βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε θετική χρώση του *TKS5* στους πνεύμονες των ασθενών με ΙΠΠ/UIP (n=3) μετά από χρώση ανοσοϊστοχημείας, σε αντίθεση με τα δείγματα ελέγχου (n=3), η οποία εντοπίστηκε κυρίως στο κυψελιδικό επιθήλιο και στις ινωτικές περιοχές (Εικόνα 36Β).



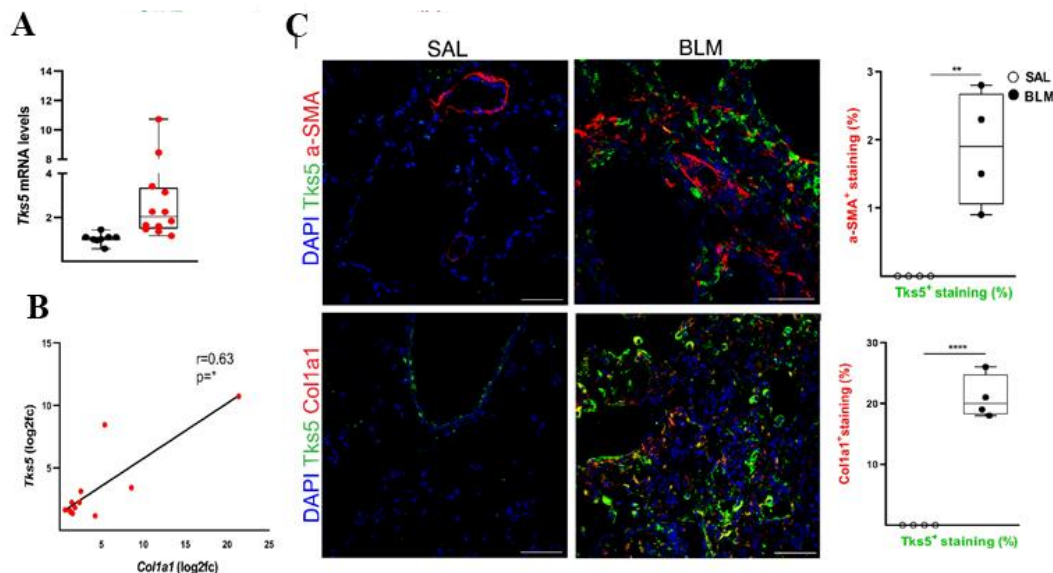
Εικόνα 36: Αυξημένα επίπεδα *TKS5* στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΙΠΠ Α) Αυξημένη έκφραση του *TKS5* σε επίπεδο mRNA στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΙΠΠ σε σχέση με τα επίπεδα που ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΧΑΠ και σε υγιή πνευμονικό ιστό(CTRL) που απομονώθηκε από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Πίνακας 2). Β). Αυξημένη χρώση του *TKS5* στους ινωτικούς πνεύμονες. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανοσοϊστοχημεία για το *TKS5* σε πνευμονικό ιστό ΙΠΠ και CTRL (n=3, Εικ. S2)-κλίμακας=50 μm .

Για την εύρεση του κυτταρικού τύπου που εκφράζει το TKS5 σε πνεύμονες ασθενών με ΙΠΠ πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός δημοσίως διαθέσιμου συνόλου δεδομένων αλληλούχισης RNA μεμονωμένων κυττάρων (scRNAseq) που προέρχονται από πνευμονικό ιστό μεταμοσχευμένων ασθενών με πνευμονική ίνωση (n=4) και υγιή πνευμονικό ιστό μεταμοσχευμένων δοτών (n=8)[137]. Η mRNA έκφραση του TKS5 ανιχνεύθηκε κυρίως σε υποσύνολα επιθηλιακών κυττάρων, βασικών (basal) κυττάρων και κυρίως ινοβλαστών (Εικόνα 37A,B). Επιπλέον, η περαιτέρω ανάλυση των τεσσάρων υποπληθυσμών ινοβλαστών στο ίδιο σύνολο δεδομένων scRNAseq, υπέδειξε ότι οι ΙΠ που εκφράζουν TKS5 ανήκουν στον υποπληθυσμό ΙΠ που εκφράζει επίσης COL1A1 (Εικόνα 37C-D).



Εικόνα 37: Αυξημένη έκφραση του TKS5 στους ινοβλάστες σε *in silico* δεδομένα που προέρχονται από αλληλούχιση RNA μεμονωμένων κυττάρων (scRNAseq) από πνευμονικό ιστό ασθενών με ΙΠΠ Α) Σχηματική αναπαράσταση της αφθονίας του TKS5 στις ανιχνευόμενες κυτταρικές ομάδες πνευμονικού ιστού από την εκ νέου ανάλυση συνόλου δεδομένων scRNA-seq (Reyffman, Walter et al. 2019). Β) Στο ίδιο σύνολο δεδομένων, το TKS5 εκφράζεται κυρίως από ινοβλάστες σε σύγκριση με άλλα κύτταρα Γ). Υπό-ομάδες ινοβλαστών που ορίζονται από τα ίδια δεδομένα Δ) Το TKS5 εκφράζεται στους ΙΠ κυρίως από τον υποπληθυσμό που εκφράζει COL1A1 στο ίδιο σύνολο δεδομένων

Για να εξετάσουμε αν μπορούν να εξαχθούν παρόμοια συμπεράσματα από τη αναπαράσταση της νόσου σε ποντίκια, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής του *Tks5* στην παθογένεια της ΙΠΠ, διερευνήσαμε την έκφραση του mRNA του *Tks5* στους πνεύμονες ποντικών μετά τη χορήγηση μπλεομυκίνης (BLM), του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου ζωικού μοντέλου πνευμονικής ίνωσης[65, 68, 138]. Αυξημένα επίπεδα mRNA του *Tks5*, που συσχετίζονται με τα επίπεδα mRNA του *Col1a1*, ανιχνεύθηκαν επίσης στον πνευμονικό ιστό ποντικών μετά τη χορήγηση BLM (Εικόνα 38A,B) με Q-RT-PCR. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού η οποία έδειξε ότι το *Tks5* εντοπίζεται στο κυψελιδικό επιθήλιο και στις ινωτικές περιοχές (Εικόνα 38C), όπως παρατηρήθηκε και στους ασθενείς με ΙΠΠ. Επιπλέον, η διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για αSMA ή *Col1a1*, εξέχοντες δείκτες ενεργοποίησης των ινοβλαστών τόσο στα ποντίκια όσο και στους ανθρώπους, έδειξε ότι η *Tks5* εντοπίζεται κυρίως σε ένα υποσύνολο ινοβλαστών που εκφράζουν *Col1a1* (Εικόνα 38C), αποτέλεσμα που επαληθεύει τα ευρήματα που παρατηρήθηκαν στην *in silico* scRNAseq ανάλυση.



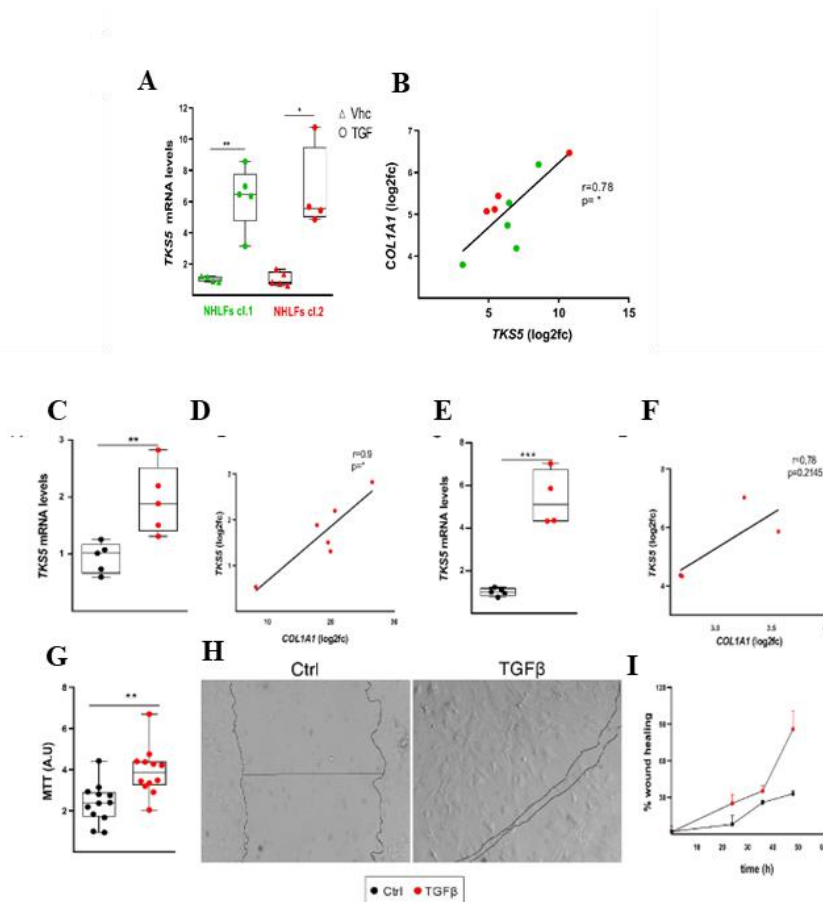
Εικόνα 38: Αυξημένη έκφραση του *Tks5* σε ποντίκια άγριου τύπου με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Α) Αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA του *Tks5* σε πνεύμονες ποντικών με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση, αθροιστικό αποτέλεσμα από 3 διαφορετικά πειράματα. Β) Αυξημένη συσχέτιση των mRNA επιπέδων

έκφρασης του *Tks5* και *Col1a1* στα ίδια δείγματα C) Διπλή χρώση ανοσοϊστοχημείας έναντι του *Tks5* και του *αSMA (Acta2)* ή του *Col1a1* επαληθεύει τον εντοπισμό του *Tks5* στον υποπληθυσμό των ινοβλαστών που εκφράζουν *Col1a1*; παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, ακολουθούμενες από την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση με το Image J- κλίμακα=50 μm - αντιπροσωπευτικό πείραμα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Επομένως, η πνευμονική ίνωση τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του *TKS5*, η οποία συσχετίζεται σταθερά με την έκφραση του *COL1A1*, ιδίως στους ΠΙ.

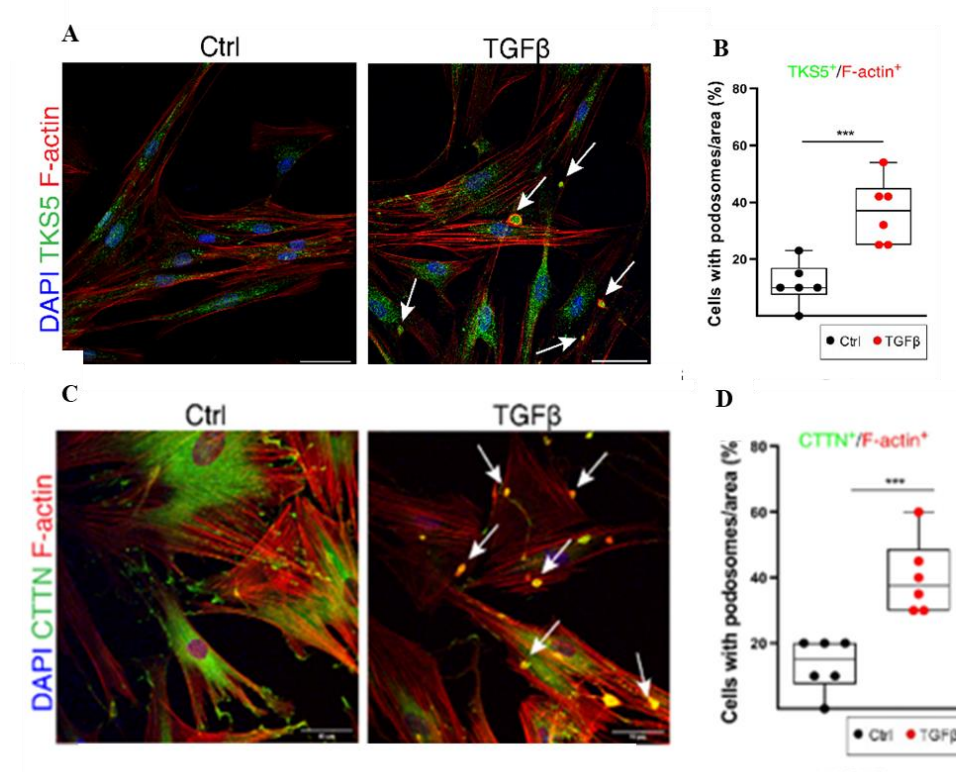
2.1.2 Οι ροζέτες ποδοσωμάτων που προκαλούνται από τον TGFβ είναι μια εγγενής ιδιότητα των ινωτικών ΠΙ

Καθώς ο TGFβ είναι ένας από τους κύριους προϊνωτικούς παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη της νόσου *in vivo*, εξετάσαμε στη συνέχεια αν η έκφραση του *TKS5* από τους ινοβλάστες του πνεύμονα επάγεται από τον TGFβ. Χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί ανθρώπινοι πνευμονικοί ινοβλάστες (ΑΠΙ) που απομονώθηκαν από υγιή πνευμονικό ιστό κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης για καρκίνο του πνεύμονα και καλλιιεργήθηκαν σε πυκνότητα 60-80%. Μετά από καλλιέργεια απουσία ορού για 17 ώρες, οι NHLFs εκτέθηκαν σε 10 ng/ml ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TGFβ για 24 ώρες. Διαπιστώθηκε ότι ο TGFβ διεγείρει την έκφραση του mRNA του *TKS5* σε διαφορετικούς κλώνους ΑΠΙ, όπως ποσοτικοποιήθηκε με Q-RT-PCR (Εικόνα 39Α), η οποία συσχετίζεται με την mRNA έκφραση του *COL1A1* (Εικόνα 39Β) στα ίδια δείγματα, μια πρωτότυπη απόκριση του TGFβ σε αυτές τις συνθήκες. Πανομοιότυπα αποτελέσματα προέκυψαν από μια ανεξάρτητη κυτταρική σειρά NHLF από διαφορετικό εργαστήριο/συνδυασμό (Εικόνα 39C,D), καθώς και από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοβλαστών MRC5 (Εικόνα 39E,F). Στους ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες βρέθηκε επίσης ότι ο TGFβ επάγει τον πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 39G), όπως ποσοτικοποιήθηκε με την δοκιμασία MTT αλλά και την μετανάστευση τους (Εικόνα 39 H-I).

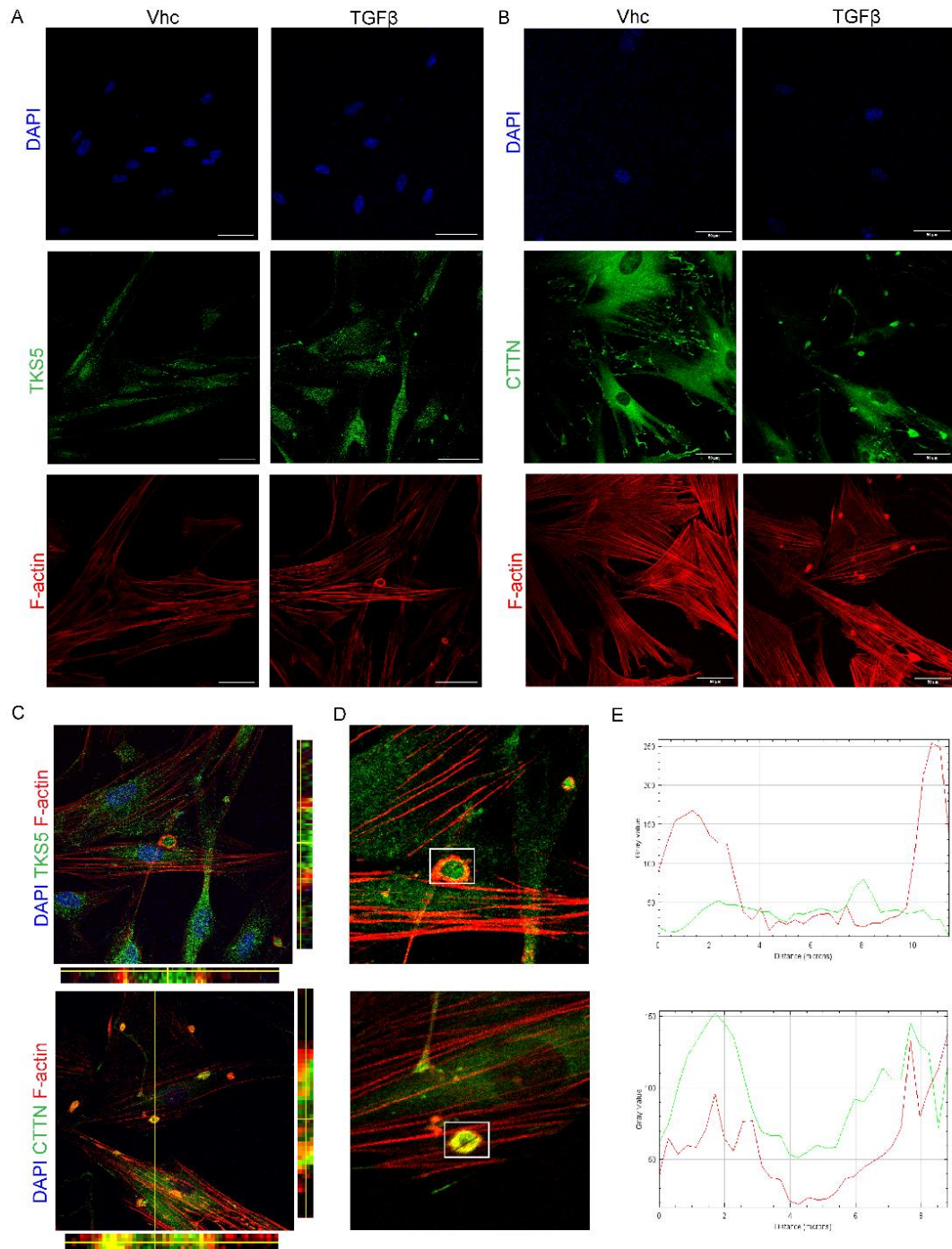


Εικόνα 39: Ο TGF διεγείρει την mRNA έκφραση του TKS5 στους ινοβλάστες των πνευμόνων (ΑΠΠ) η οποία συσχετίζεται με την έκφραση του COL1A1. Πρωτογενείς φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες πνευμόνων (NHLFs; A-D) και η κυτταρική σειρά MRC5 (ανθρώπινοι ινοβλάστες πνευμόνων; E-F) διεγέρθηκαν με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο TGFβ, αντιπροσωπευτικό πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα. A,C,E) Αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA του TKS5 παρουσία TGFβ σε διαφορετικές σειρές ανθρώπινων ινοβλαστών. B,D,F) Διάγραμμα συσχέτισης Pearson της έκφρασης COL1A1 στα ίδια δείγματα, στο οποίο αναπαρίσταται η συσχέτιση της έκφρασης του με το TKS5 παρουσία TGFβ. G). Αυξημένος πολλαπλασιασμός των NHLF μετά την διέγερση με TGFβ αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία MTT. H-I). Αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης των NHLFs παρουσία TGFβ, όπως αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία scratch. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες 48 ώρες μετά τη διέγερση με TGFβ-I) Ποσοτικοποίηση του "κλεισίματος της πληγής" με την πάροδο του χρόνου, όπως πραγματοποιήθηκε με το Image J.

Δεδομένου ότι το TKS5 είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό ποδοσωμάτων[139], εξετάσαμε στη συνέχεια αν ο TGFβ, στις ίδιες συνθήκες που επάγει την έκφραση του TKS5, διεγείρει τον σχηματισμό ποδοσωμάτων στους ΑΠΙ. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και για TKS5 ή CTTN, τα οποία είναι και τα δύο απαραίτητα συστατικά των ποδοσωμάτων, σε ΑΠΙ μετά την διέγερση με TGFβ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι TGFβ διεγείρει ισχυρά το σχηματισμό ποδοσωμάτων σε ΑΠΙ *in vitro*. Οι ορθογώνιες προβολές (Orthogonal projections) και η ανάλυση των καμπυλών K (K-curve) επιβεβαίωσαν τον συνεντοπισμό της F-ακτίνης με τα CTTN/TKS5 και αποκάλυψαν ότι τα ποδοσώματα που προκαλούνται από τον TGFβ στα NHLF οργανώνονται σε διακριτές ροζέτες (Εικόνα. 40 A,B και 41).

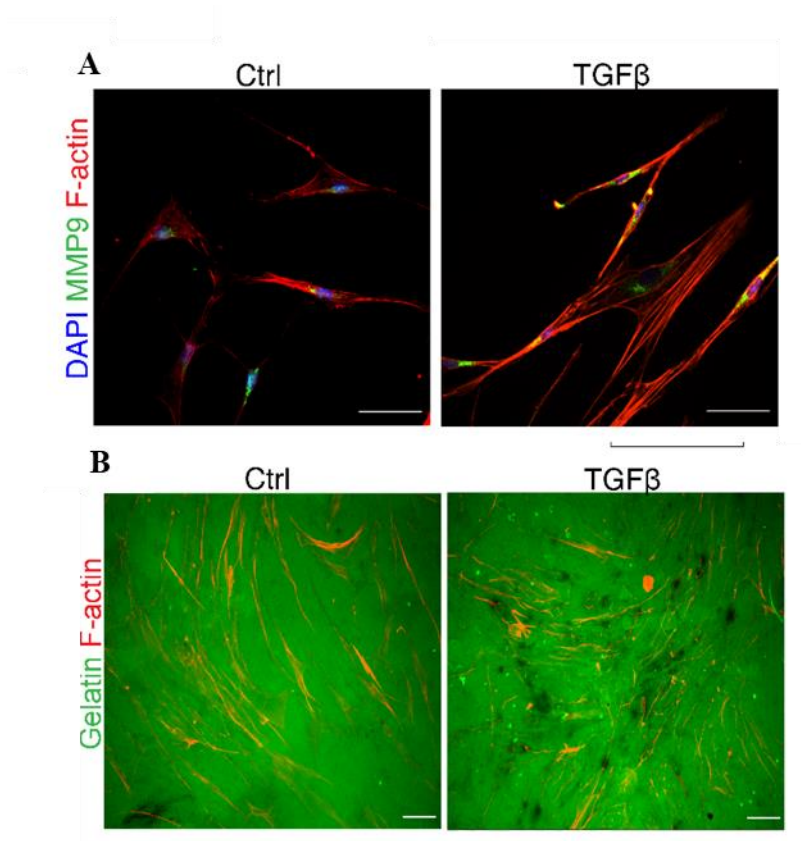


Εικόνα 40: Ο TGFβ επάγει την έκφραση ποδοσωμάτων σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες *in vitro*. A, C) Αυξημένος αριθμός ποδοσωμάτων στους ΑΠΙ μετά την διέγερση με TGFβ- Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και TKS5 (A) ή Cortactin (CTTN; C) μαζί με DAPI- τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα. B, D) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό πεδίο (x6).



Εικόνα 41: Ο TGFβ επάγει την έκφραση ποδοσωμάτων σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες *in vitro*. A, B) Παρουσιάζονται οι επιμέρους εικόνες των αντίστοιχων συγχωνευμένων εικόνων της Εικόνας 40 C.) Ορθογώνιες προβολές (Orthogonal projections) των υποδεικνυόμενων ποδοσωμάτων μέσω z-stacking. D-E.) Καμπύλες K, που δείχνουν τη χωρική ένταση των σημάτων φθορισμού.

Επιπλέον, τα ποδοσώματα που προκλήθηκαν από τον TGFβ στους ΠΙ ήταν εμπλουτισμένα σε MMP9 (Εικόνα 42Α), συμβάλλοντας πιθανώς στην αυξημένη αποικοδόμηση ενός υποστρώματος ζελατίνης συνδεδεμένης με φλουορεσκεΐνη (Εικόνα 42Β), μια διακριτή ιδιότητα των ποδοσωμάτων. Επομένως, αποδείχθηκε ότι ο TGFβ επάγει την έκφραση του TKS5 και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων στους NHLF, διεγείροντας με τη σειρά του την πρωτεολυτική αποδόμηση της υποκείμενης ECM.

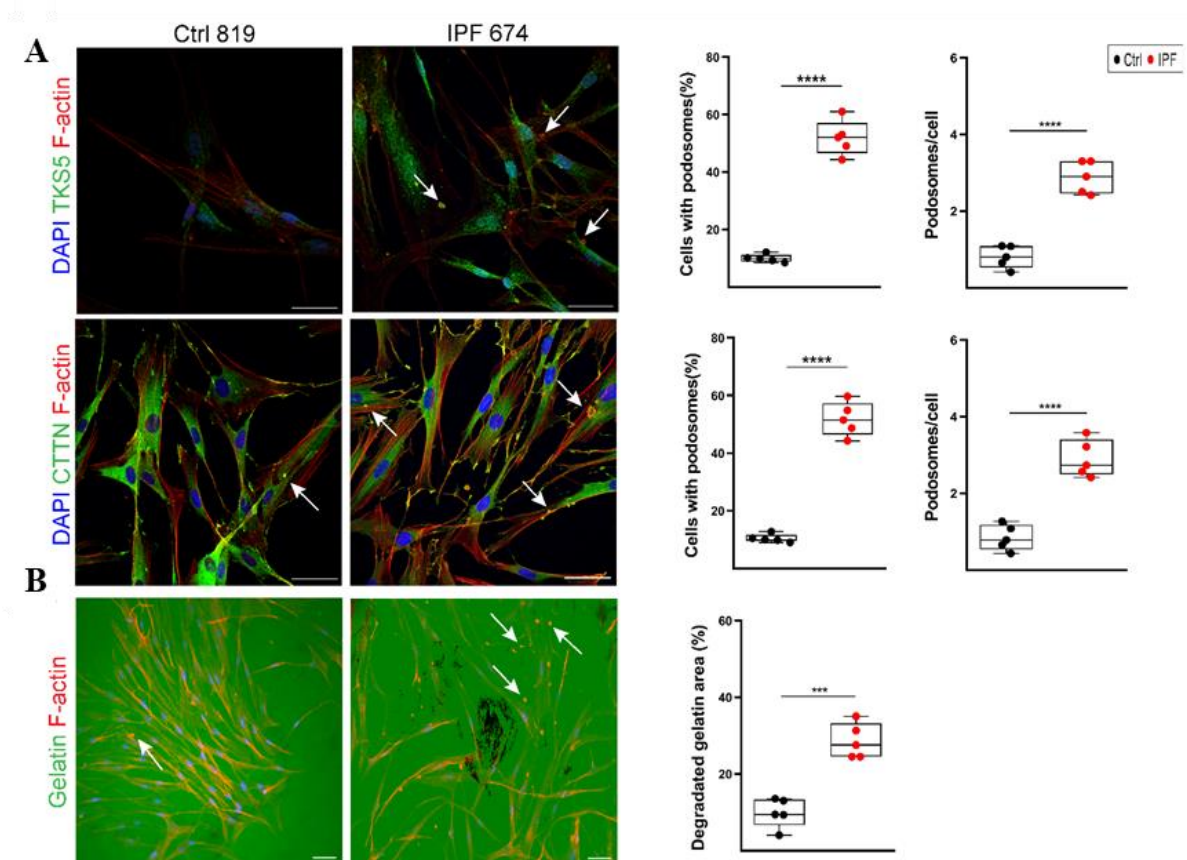


Εικόνα 42: Τα ποδοσώματα που δημιουργούνται στους πνευμονικούς ινοβλάστες, παρουσία TGFβ, είναι πλούσια σε MMP9 και συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του υποστρώματος ζελατίνης. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή χρώση ανοσοϊστοχημείας για F-ακτίνη και MMP-9, και με DAPI. Β.) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της επαγόμενης από τον TGFβ αποδόμησης (μαύρες τρύπες) ενός υποστρώματος ζελατίνης συνδεδεμένου με φλουορεσκεΐνη από ΠΙ

Καθώς ο TGFβ αποδείχθηκε ότι διεγείρει την έκφραση του TKS5 και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε ΑΠΙ *in vitro*, εξετάσαμε στη συνέχεια αν το προϊνωτικό περιβάλλον στους πνεύμονες των ασθενών με ΠΠ, το οποίο περιλαμβάνει τον TGFβ, διεγείρει επίσης τον σχηματισμό ποδοσωμάτων *in vivo*. Προς αυτή την κατεύθυνση, απομονώσαμε ΠΙ από ασθενείς με ΠΠ (Πίνακας 3), οι οποίοι καλλιεργήθηκαν απουσία

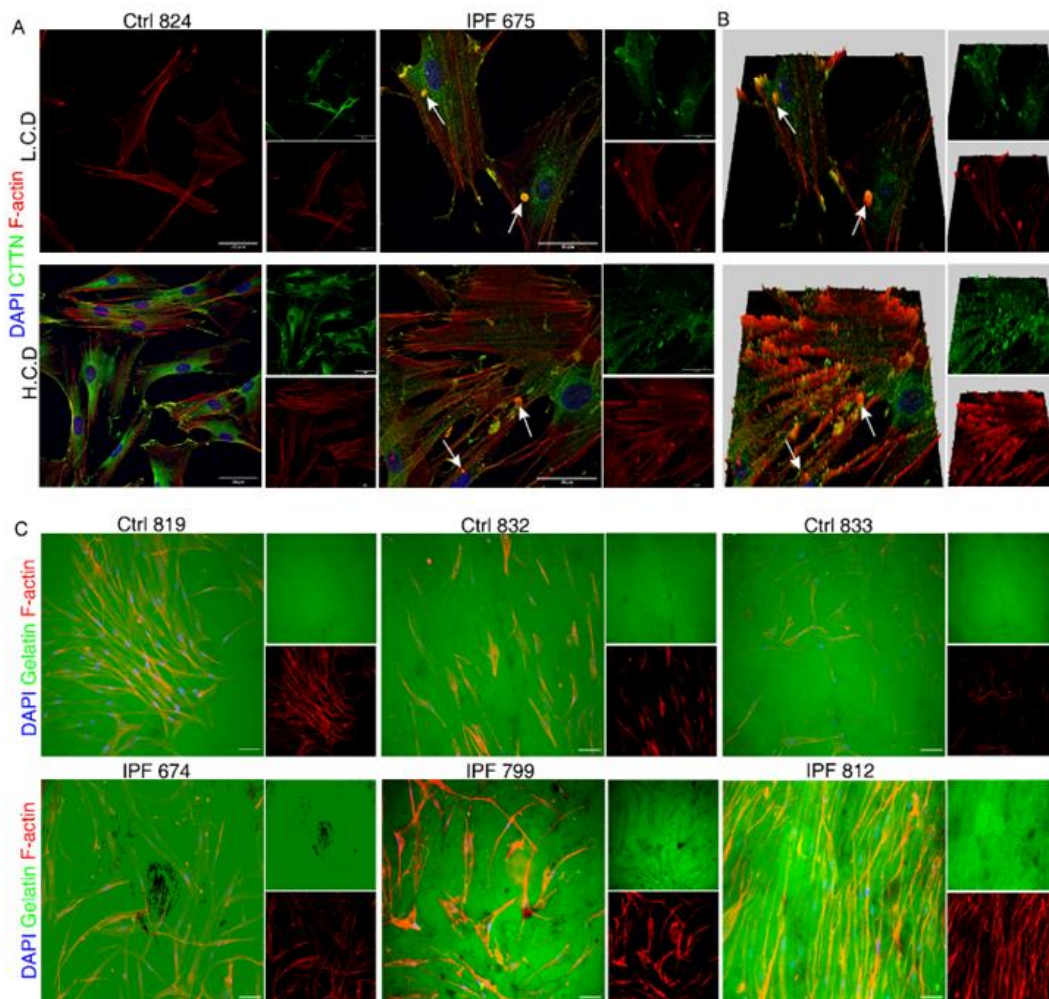
διέγερσης και πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού για ποδοσώματα υπό τις ίδιες συνθήκες (και 7-8 ανακαλλιέργειες) σε σύγκριση με διαφορετικούς κλώνους ΑΠΙ που απομονώθηκαν από υγιή ιστό. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ΑΠΙ της ΙΠΙ παρουσίαζαν εξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων (Εικόνα. 43Α, Εικόνα 44Α-Β), πανομοιότυπες ως προς τη δομή με εκείνες που προέκυψαν μετά την *in vitro* διέγερση από τον TGFβ, οι οποίες διατηρούνται κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια *ex vivo* (7-8 ανακαλλιέργειες) και έχουν την δυνατότητα να αποικοδομούν πιο ισχυρά από τους NHLFs ένα υπόστρωμα ζελατίνης συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη (Εικόνα 43Β, Εικόνα 44C).

Επομένως, το προϋνωτικό περιβάλλον στους πνεύμονες των ασθενών με ΙΠΙ διεγείρει τις ροζέτες ποδοσωμάτων στους πνευμονικούς ινοβλάστες και την τοπική αποικοδόμηση της ECM, μια πιθανή παθολογική απόκριση που αποτυπώνεται στους ινοβλάστες της ΙΠΙ.



Εικόνα 43: Οι ΑΠΙ που προέρχονται από ασθενείς με ΙΠΙ, παρουσιάζουν εξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, απουσίας οποιασδήποτε διέγερσης. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από αντιπροσωπευτικούς κλώνους πρωτογενών ΙΠΙ-ΑΠΙ και ΑΠΙ, (n=5 η

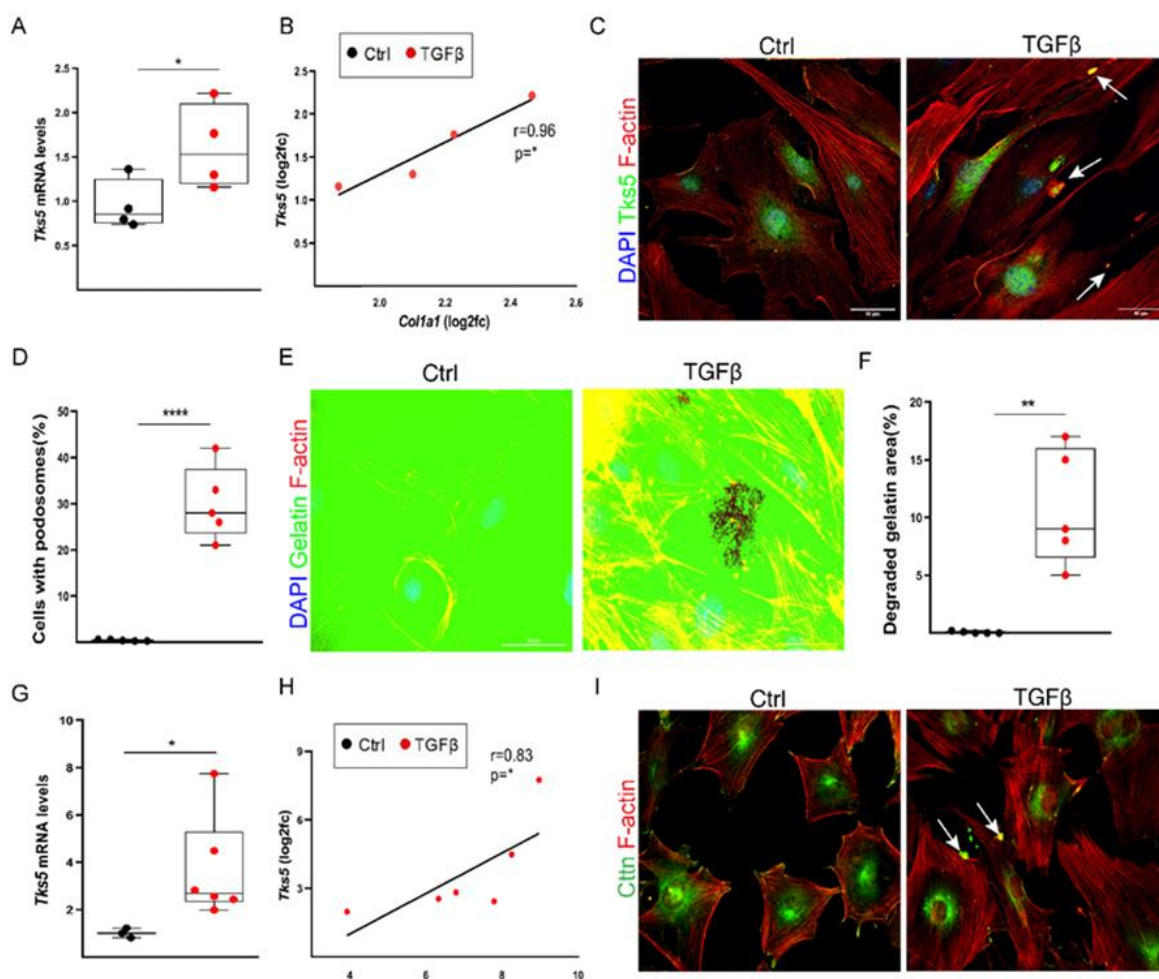
καθεμία) μετά από χρώση για F-ακτίνη και TKS5 ή Cortactin (CTTN), ακολουθούμενες από την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα και του αριθμού των ποδοσωμάτων ανά κύτταρο ανά οπτικό πεδίο (x6)-ράβδοι κλίμακας=50 μ m. B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες αποικοδόμησης υποστρώματος ζελατίνης συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη, ακολουθούμενες από την ποσοτικοποίηση του ποσοστού της αποικοδομημένης ζελατίνης για όλους τους κλώνους ΙΙΙ και τους κλώνους ελέγχου αθροιστικά, μετά την ποσοτικοποίηση με το ImageJ.



Εικόνα 44: Ο σχηματισμός ροζετών ποδοσωμάτων που αποικοδομούν την ECM είναι μια εγγενής ιδιότητα των ΙΙΙ της ΙΙΙΙ. A) Οι πρωτογενείς ΙΙΙΙ-ΑΙΙΙ και οι NHLFs καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή (LCD) ή υψηλή κυτταρική πυκνότητα (HCD) απουσία ορού, και πραγματοποιήθηκε διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και cortactin (CTTN) μαζί με DAPI. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες. B) Τρισδιάστατα

διαγράμματα (3D surface plots) των ΙΙΙ-ΑΙΙ όπως αποτυπώθηκαν με το Image J, παρουσιάζοντας την τρισδιάστατη δομή των ποδοσωμάτων. C) Οι ενδεικνύμενοι κλώνοι καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα ζελατίνης συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη και χρωματίστηκαν για F-ακτίνη και DAPI- απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες- κλίμακα=50 μ m.

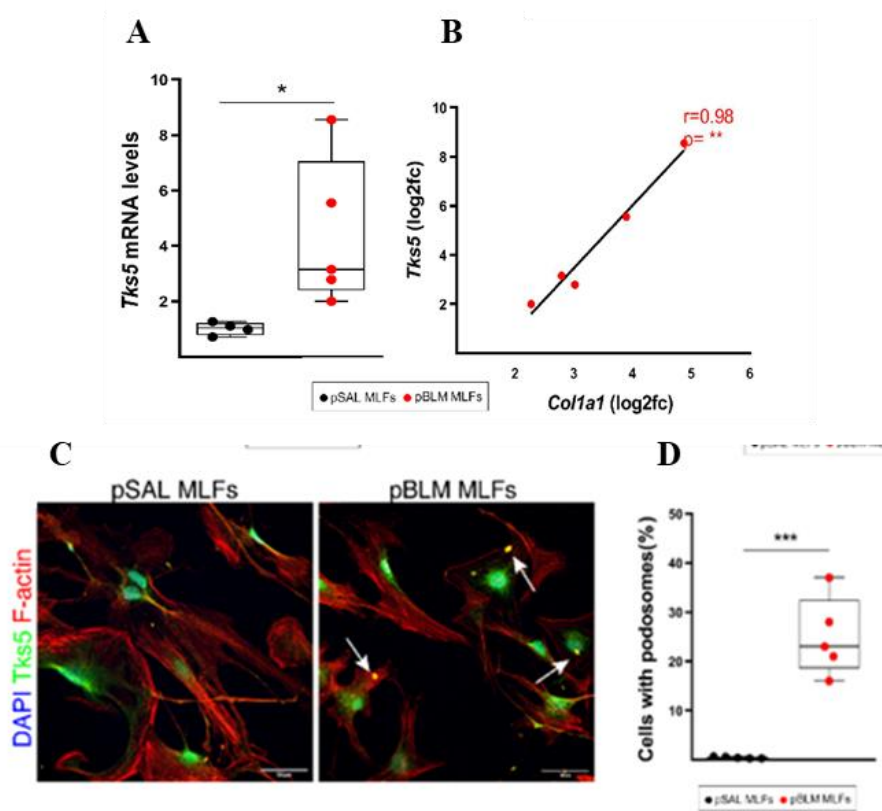
Για να επαληθευτούν τα αποτελέσματα που πραγματοποιήθηκαν στους ανθρώπινους ινοβλάστες, απομονώθηκαν πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες ποντικών (NMLFs) οι οποίοι επώαστηκαν με TGF β και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *Tks5* σε επίπεδο mRNA και η ικανότητα σχηματισμού ποδοσωμάτων. Όπως και στους ΑΙΙ, οι NMLFs μετά την έκθεση σε TGF β παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του *Tks5* σε επίπεδο mRNA (Εικόνα. 45A), η οποία συσχετίζεται με την έκφραση του *Colla1* (Εικόνα 45B), το σχηματισμό ποδοσωμάτων (Εικόνα 45C,D) και την αποικοδόμηση ενός υποστρώματος ζελατίνης συζευγμένης με φλουορεσκεΐνη (Εικόνα 45E-F)- παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν με εμβρυϊκούς πνευμονικούς ινοβλάστες 3T3 (Εικόνα 45G-I).



Εικόνα 45: Η επαγόμενες από τον TGFβ, ροζέτες ποδοσωμάτων είναι μια εγγενής ιδιότητα των ΠΙ που προέρχονται από πρωτογενείς πνεύμονες ποντικών. A-B, G-H) Αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA των *Tks5* και *Col1a1* μετά την επώαση των NMLFs και 3T3 κυττάρων με TGFβ. B,H) Διάγραμμα συσχέτισης Pearson της έκφρασης του *Col1a1* στα ίδια δείγματα. C,I) Αντιπροσωπευτικές συγχωνευμένες εικόνες από διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και *Tks5* (C) και Ctnn (I) με DAPI σε NMLFs- τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα. D) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό πεδίο (x6). E) Αντιπροσωπευτικές συγχωνευμένες εικόνες της επαγόμενης από TGFβ αποδόμησης ενός υποστρώματος ζελατίνης συνδεδεμένου με φλουορεσκεΐνη από NMLFs. F) Ποσοτικοποίηση της αποικοδόμησης της ζελατίνης, όπως μετρήθηκε με το ImageJ.

Επιπλέον, και όπως και στην περίπτωση των ΑΠΙ της ΠΠ, οι πρωτογενείς ΠΙ ποντικών που απομονώθηκαν μετά τη χορήγηση BLM παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα

Tks5 σε επίπεδο mRNA και εξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων απουσία οποιασδήποτε διέγερσης (Εικόνα 46Α-Δ).



Εικόνα 46 Η επαγόμενες ροζέτες ποδοσωμάτων μετά την χορήγηση BLM είναι μια εγγενής ιδιότητα των ΙΙΙ Α) Αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA των Tks5 και Col1a1 σε NMLFs που απομονώθηκαν μετά τη χορήγηση BLM Β) Διάγραμμα συσχέτισης Pearson της έκφρασης του Col1a1 στα ίδια δείγματα. C) Αντιπροσωπευτικές συγχωνευμένες εικόνες από διπλή χρώση για F-ακτίνη και Tks5 με DAPI. D) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό πεδίο (x5). κλίμακα 50μm- αντιπροσωπευτικό πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Συμπερασματικά, το προϊνωτικό περιβάλλον στους πνεύμονες των ασθενών με ΙΙΙ και των ποντικών μετά την χορήγηση BLM, καθώς και ο TGFβ, επάγουν την έκφραση του TKS5 και τον σχηματισμό ροζετών ποδοσωμάτων, μια εγγενή ινωτική ιδιότητα των ΙΙΙ.

2.1.3 Δημιουργία σειράς υποχρεωτικών και κατά επιλογή knock out ποντικών για το *Tks5*, με σκοπό την εξέταση του ρόλου του στην παθογένεια της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης

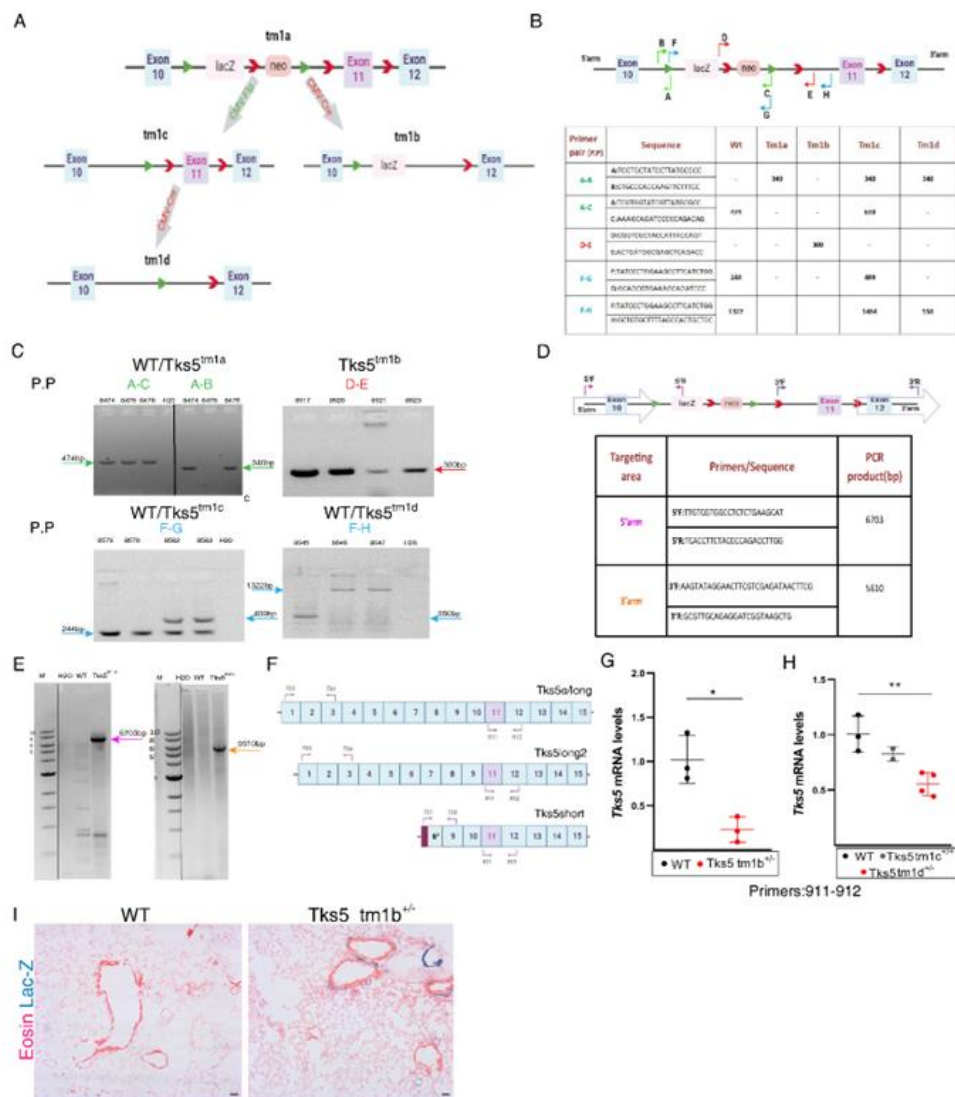
Για να αναλυθεί ο πιθανός ρόλος του *Tks5* στην παθοφυσιολογία των ποντικών και την πνευμονική ίνωση, δημιουργήσαμε στη συνέχεια μια σειρά υποχρεωτικών και κατά επιλογή knock out ποντικών για τον *Tks5* (*Sh3pxd2a*). Ο γενετικός τύπος *Sh3pxd2a* έχει ήδη στοχευθεί από το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα κατά επιλογή Μετάλλαξης Ποντικών (EUCOMM), με στόχο την εξουδετέρωση όλων των γονιδίων ποντικών σε μια προσέγγιση υψηλής απόδοσης[140]. Στο πλαίσιο αυτό, το εξώνιο 11 του γονιδίου *Sh3pxd2a* πλαισιώθηκε από 2 περιοχές loxP, ενώ μια κασέτα αναφοράς/επιλογής LacZ/νεομυκίνης τοποθετήθηκε ανοδικά, συμπεριλαμβανομένων δύο θέσεων FRT- αυτό το αλληλόμορφο αναφέρεται ως "στοχευμένη μετάλλαξη 1α" (*tm1a*, Εικόνα. 47A). Στη συνέχεια, τα στοχευόμενα εμβρυικά βλαστικά (ES) κύτταρα μικροεγχύθηκαν σε βλαστοκύστες C57Bl/6N από το Ινστιτούτο Wellcome Trust Sanger (WTSI), οι οποίες μεταφέρθηκαν σε ψευδο-έγκυες για να προκύψουν τα ετερόζυγα ποντίκια *Sh3pxd2a^{tm1a}(EUCOMM)Wtsi/+* (Εικόνα 47A). Το κατεψυγμένο σπέρμα αυτών των ποντικών ελήφθη από το WTSI, μέσω της κοινοπραξίας [INFAFRONTIER](#)[141, 142] και του Ευρωπαϊκού Αρχείου Μεταλλαγμένων Ποντικών ([EMMA](#)), το οποίο εγχύθηκε απευθείας σε ποντίκια στις εγκαταστάσεις ([transgenic facility](#)) του "BSRC Φλεμινγκ" μέσω τεχνολογίας IVF για να προκύψουν τα ετερόζυγα ποντίκια *Sh3pxd2a^{tm1a}(EUCOMM)WtsiFlmg/+*. Τα ποντίκια γονοτυπήθηκαν σύμφωνα με την αντίστοιχη στρατηγική της EUCOMM, με τη διενέργεια τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων PCR (Εικόνα 47B, C). Επιπλέον, η επιτυχής στόχευση επαληθεύτηκε επίσης με PCR μεγάλου εύρους τόσο για το 5' όσο και για το 3' σκέλος που πλαισιώνει την floxed περιοχή (Εικόνα 47D, E).

Για την απόκτηση του αλληλομόρφου αναφοράς *tm1b* (Εικόνα 47A), τα ποντίκια *Sh3pxd2a^{tm1a}Fleming/+* διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα των ποντικών (*Tg-CMV-Cre*)[143]. Ο γενετικός ανασυνδυασμός των λαμβανόμενων *Sh3pxd2a^{tm1b}(EUCOMM)WtsiFlmg/+* ποντικών επαληθεύτηκε με γονιδιωματική PCR (Εικόνα. 47B, C). Ανιχνεύθηκε 50% μείωση των επιπέδων mRNA του *Sh3pxd2a* στους πνεύμονες, γεγονός που υποδεικνύει τη σωστή

γονιδιακή στόχευση (Εικόνα 47G). Η χρώση X-gal, που ανιχνεύει την έκφραση LacZ από τον υποκινητή του Tks5, εντόπισε τη μεταγραφική ενεργοποίηση του Tks5 (καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, της νεογνικής και της ενήλικης ζωής) κυρίως στο αρτηριακό ενδοθήλιο του πνεύμονα (Εικόνα 47I). Δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς μακροσκοπικές ανωμαλίες στα ετερόζυγα. Η διασταύρωση ετερόζυγων ποντικών Tks5^{+/-} δεν έδωσε ομόζυγους απογόνους, υποδεικνύοντας ότι το Tks5 έχει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ποντικών, όπως έχει ήδη αναφερθεί για τα ομόζυγα στελέχη[78].

Για τη δημιουργία του κατά επιλογή αλληλομόρφου tm1c (Εικόνα 47A), τα ποντίκια Sh3pxd2a^{tm1a(EUCOMM)WtsiFlmg/+} διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Flp υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα του ποντικού του ποντικού (*Tg-CMV-Flp*)[144].

Για τη δημιουργία του κατά επιλογή αλληλομόρφου tm1d (Εικόνα 47A), τα ποντίκια Sh3pxd2a^{tm1c(EUCOMM)WtsiFlmg/+} διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα του ποντικού (*Tg-CMV-Cre*). Ανιχνεύθηκε 50% μείωση των επιπέδων mRNA του *Sh3pxd2a* στους πνεύμονες, γεγονός που υποδεικνύει τη σωστή γονιδιακή στόχευση (Εικόνα 47H).



Εικόνα 47 Δημιουργία κατά επιλογή αλληλόμορφων ή αλληλόμορφων knockout ποντικών για το *Tks5*. Α) Σχηματική παρουσίαση των αλληλόμορφων knockout και της γενετικής στρατηγικής. Β, D) Αναπαράσταση της στρατηγικής γονοτύπησης, των αλληλουχιών των εκκινητών και του μήκους του αναμενόμενου προϊόντος. C) Επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού για όλα τα διαφορετικά αλληλόμορφα με γονιδιωματική PCR. E) Επιβεβαίωση της επιτυχούς στόχευσης με γονιδιωματική PCR μεγάλου εύρους. F) Σχηματική παρουσίαση των ισομορφών του ποντικού *Tks5* και της θέσης των εκκινητών PCR πραγματικού χρόνου, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση της διαγραφής και των διαφόρων ισομορφών. G-H) Μειωμένα επίπεδα mRNA *Tks5* στους πνεύμονες των στελεχών *tm1b* και *tm1d*, που επαληθεύουν την επιτυχή

γονιδιακή στόχευση.Ι) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες πνευμόνων μετά από χρώση *Lac-Z* σε ποντίκια *Tks5^{tm1b}* και συνομήλικα *WT*.

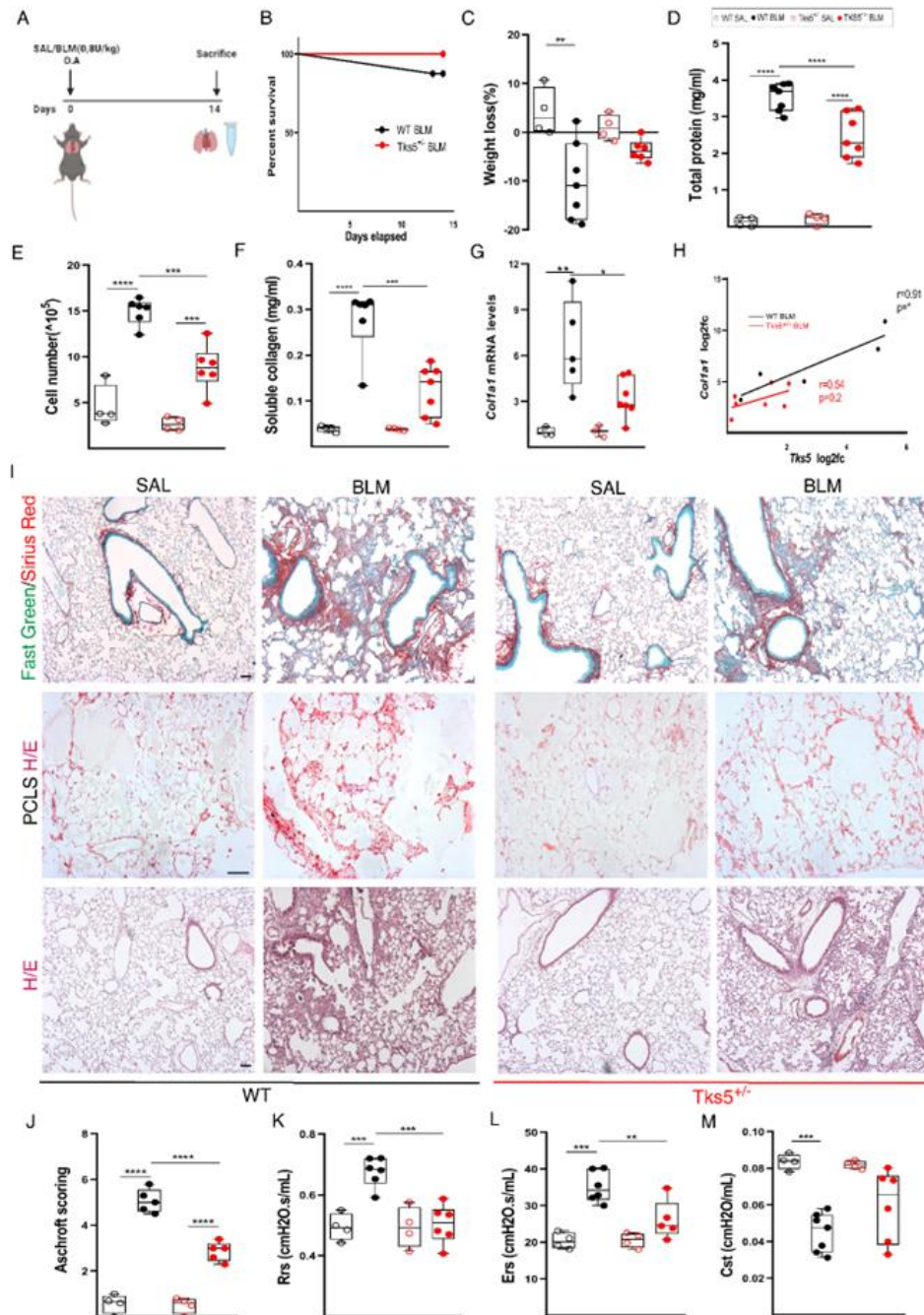
2.1.4 Η ετερόζυγη διαγραφή του γονιδίου *Tks5* σε ποντίκια μετριάζει την επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση

Μετά την δημιουργία των πρώτων knockout και κατά επιλογή knockout ποντικών για το *Tks5*, χορηγήθηκε μπλεομυκίνη (BLM) σε αυτά τα ποντίκια και σε αδέρφια άγριου τύπου (WT) (Εικόνα 48A,B), όπως έχει ήδη περιγραφεί[68]. Συνοπτικά, 0,8U/Kg μπλεομυκίνης χορηγήθηκε σε ποντίκια C57Bl6/J *Tks5^{+/-}* ηλικίας 8-10 εβδομάδων με στοματοφαρυγγική ενστάλαξη- η δόση και η οδός επιλέχθηκαν κατόπιν προηγούμενων εκτεταμένων δοκιμών για την πρόκληση ενός στερεού ινωτικού προφίλ, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τη θνησιμότητα. Η ανάπτυξη της νόσου αξιολογήθηκε σε σύγκριση με τα wt ζώα 14 ημέρες μετά την χορήγηση BLM, κατά την κορύφωση της νόσου στις τοπικές συνθήκες.

Στα ποντίκια *Tks5^{+/-}* δεν παρατηρήθηκε απώλεια βάρους, ένας γενικός δείκτης συστηματικής υγείας (Εικόνα 48C), σε αντίθεση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Η αγγειακή διαρροή και το πνευμονικό οίδημα μειώθηκαν σημαντικά στα ποντίκια *Tks5^{+/-}*, όπως υποδεικνύεται από τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυελιδικό έκπλυμα (BALF), που προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Bradford (Εικόνα 48D). Τα φλεγμονώδη κύτταρα στο BALF, όπως μετρήθηκαν με αιματοκυτταρόμετρο, βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στα ποντίκια *Tks5^{+/-}* (Εικόνα 48E)- το ίδιο και τα επίπεδα διαλυτού κολλαγόνου στο BALF, όπως προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία Sirius red (Εικόνα 48F), αποτέλεσμα που είναι σε συμφωνία με την μειωμένη έκφραση του *Colla1* σε επίπεδο mRNA στον πνευμονικό ιστό από τα ίδια ποντίκια (Εικόνα 48G-H). Η ιστολογική ανάλυση αποκάλυψε μειωμένη εναπόθεση κολλαγόνου στα ποντίκια *Tks5^{+/-}* μετά τη BLM, όπως ποσοτικοποιήθηκε με τη χρώση Sirius red/Fast green (Εικόνα 48I), και ανιχνεύθηκαν λιγότερες ινωτικές περιοχές γύρω από τους βρόγχους και στο παρέγχυμα (Εικόνα 48I), όπως αντικατοπτρίζεται με την βαθμολογία Ashcroft (Εικόνα 48J)- παρόμοια συμπεράσματα εξήχθησαν κατά την ιστολογική αξιολόγηση των PCLS που προέκυψαν από τα ίδια ποντίκια και καλλιεργήθηκαν *ex vivo* (Εικόνα 48I). Η σχετική προστασία από την προκαλούμενη από BLM παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής των ιστών κατά τη γενετική μείωση της

έκφρασης του *Tks5* αντικατοπτρίστηκε επίσης στις αναπνευστικές λειτουργίες των πνευμόνων, όπως μετρήθηκαν με το FlexiVent (Εικόνα 48K-M).

Ως εκ τούτου, η γενετική ανεπάρκεια του *Tks5* φάνηκε να μετριάξει σχετικά την επαγόμενη από BLM ίνωση, καθιερώνοντας έτσι έναν σημαντικό ρόλο του *Tks5*, και πιθανότατα των ποδοσωμάτων, στην παθογένεια της ΙΠΠ.

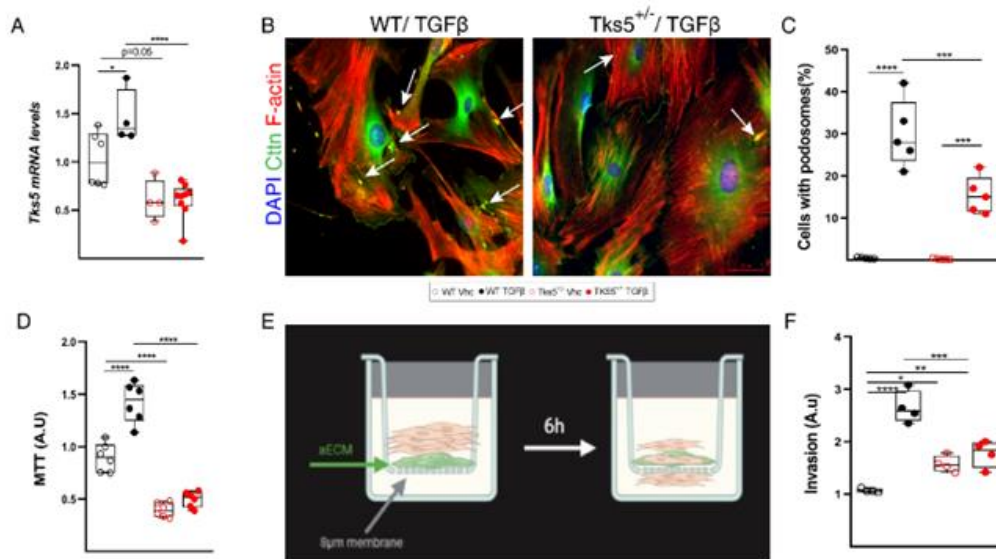


Εικόνα 48: Η μερική ανεπάρκεια του *Tks5* σε ποντίκια μετριάζει την επαγόμενη από *BLM* πνευμονική ίνωση. Α) Σχηματική παρουσίαση του μοντέλου της πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από *BLM*. Β) Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meyer μετά τη χορήγηση *BLM*. Γ) Μειωμένη μεταβολή βάρους στα ετερόζυγα ποντίκια, μετά τη χορήγηση *BLM*. Δ-Ε) Η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης, ο αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων και τα επίπεδα διαλυτού κολλαγόνου στα *BALFs* ανιχνεύθηκαν μειωμένα στα *Tks5*^{+/-} ποντίκια. ΣΤ) Μειωμένη έκφραση σε επίπεδο mRNA των *Tks5* και *Col1a1* μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης στα ετερόζυγα *knockout* ποντίκια. Ζ) Διάγραμμα συσχέτισης

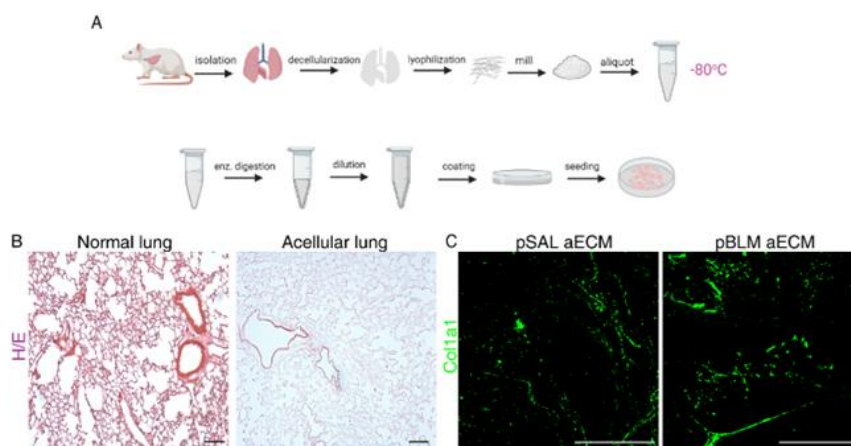
Pearson της έκφρασης του Colla1. I) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές πνευμόνων ποντικού των υποδεικνυόμενων γονότυπων, βαμμένες με Fast Green/Sirius Red (πρώτη σειρά), από PCLS πνευμόνων με χρώση H&E- (δεύτερη σειρά) και τομές πνευμόνων με χρώση H&E-(τρίτη σειρά). J) Ποσοτικοποίηση της δριμύτητας της ίνωσης μέσω της βαθμολόγησης Ashcroft. K-M) Οι αναπνευστικές λειτουργίες, όπως μετρήθηκαν με το FlexiVent.

2.1.4 Η ετερόζυγη ανεπάρκεια του Tks5 σε ΠΙ ποντικών μειώνει τον ρυθμιζόμενο από την ECM- σχηματισμό ποδοσωμάτων και την εισβολή στην ECM

Για να αναλυθεί η σχετική προστασία των ποντικών $Tks5^{+/-}$ από την επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση, στην συνέχεια απομονώθηκαν πρωτογενείς ΠΙ από wt και $Tks5^{+/-}$ ποντικούς οι οποίοι επώστηκαν με TGFβ. Οι $Tks5^{+/-}$, που εκφράζουν ~50% του $Tks5$ (Εικόνα 49A), παρουσίασαν μειωμένο αριθμό ποδοσωμάτων ως απόκριση στον TGFβ (Εικόνα 49B,C), επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό ρόλο του $Tks5$ στον σχηματισμό τους[139], καθώς και μειωμένο πολλαπλασιασμό (24h, Εικόνα 49D). Καθώς τα ποδοσώματα είναι γνωστό ότι προάγουν την εισβολή στην ECM, στη συνέχεια εξετάσαμε την ικανότητα των ΠΙ να εισβάλλουν στην ECM (acellular, aECM) που παρασκευάστηκε από τους πνεύμονες ποντικών (Εικόνα. 50 A,B), σε φρεάτια μετανάστευσης transwell (6h- Εικόνα 49E). Η μείωση των ποδοσωμάτων συσχετίστηκε με μείωση στην επαγόμενη από τον TGFβ εισβολή των $Tks5^{+/-}$ ΠΙ στην aECM (Εικόνα 49F).



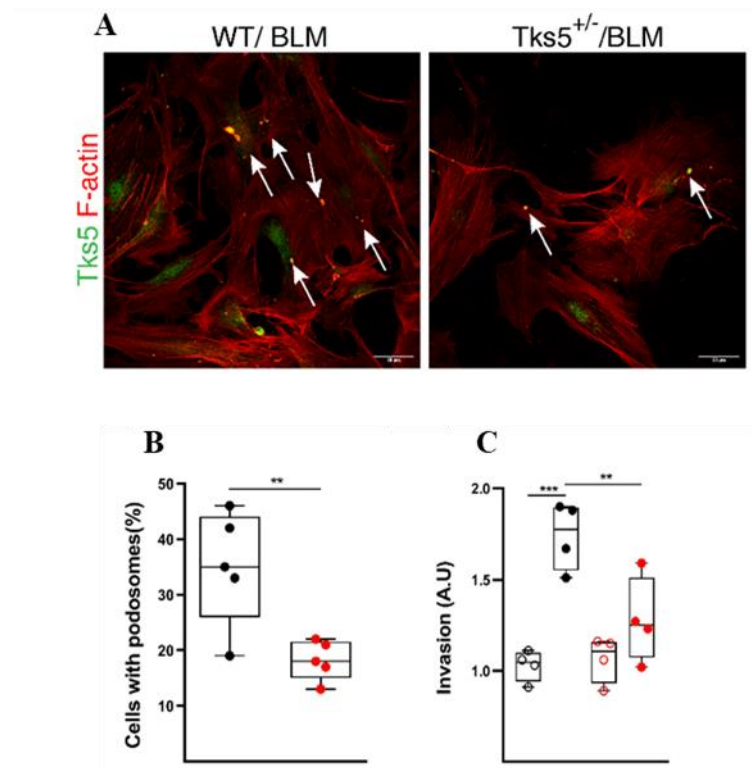
Εικόνα 49: Η μερική ανεπάρκεια του *Tks5* σε *ΠΙ* ποντικών μειώνει τον σχηματισμό ποδοσωμάτων και την ικανότητα εισβολής τους στην *ECM*. Α) Μειωμένη έκφραση του *Tks5* σε επίπεδο *mRNA* στους ετερόζυγους *ΠΙ*, μετά από διέγερση με *TGFβ*. Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για *F*-ακτίνη και *Ctnn* με *DAPI*- τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα. Γ) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό πεδίο (x5). Δ) Μειωμένος πολλαπλασιασμός των ετερόζυγων *ΠΙ* μετά από διέγερση με *TGFβ*. Ε) Σχηματική παρουσίαση της εισβολής των *ΠΙ* στην *aECM*, μετά από διέγερση με *TGFβ*. Σ) Μειωμένη ικανότητα εισβολής των *Tks5*^{+/-} *ΠΙ*, μετά από διέγερση με *TGFβ*.



Εικόνα 50: Η εξωκυττάρια μήτρα (*aECM*) από ιστό μετά την αφαίρεσή κυττάρων ως κυτταρικό υπόστρωμα για την αυτοτελή *in vitro* καλλιέργεια πνευμονικών ινοβλαστών. Α)

Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου παραγωγής aECM από πνεύμονες ποντικών. B) Επιβεβαίωση της απουσίας κυττάρων με χρώση H&E. C) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της χρώσης ανοσοφθορισμού των aECM, που δημιουργήθηκαν από πνεύμονες μετά από χορήγηση BLM, για το *Colla1*. Όπως αναμενόταν, η aECM που παράγεται από πνεύμονες ποντικών μετά τη χορήγηση BLM, είναι εμπλουτισμένη σε *Colla1* σε σύγκριση με την pSAL aECM. Αντιπροσωπευτικό πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα- κλίμακα 50μm.

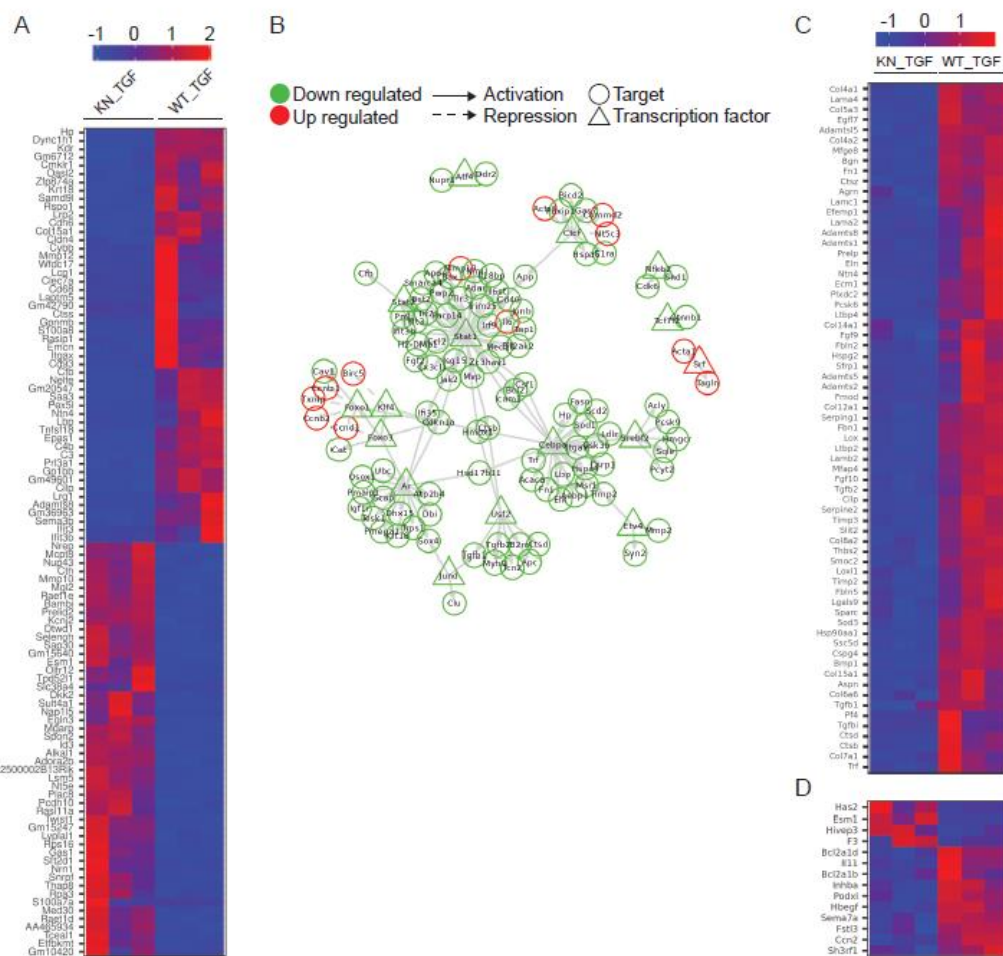
Δεδομένου του εγγενή χαρακτήρα των ποδοσωμάτων στους ΠΙ, απομονώσαμε στη συνέχεια πρωτογενείς wt και *Tks5*^{+/-} ΠΙ μετά τη χορήγηση BLM. Οι ΠΙ *Tks5*^{+/-} που απομονώθηκαν μετά από την χορήγηση BLM παρουσίασαν μειωμένο αριθμό ποδοσωμάτων σε σύγκριση με τους wt ΠΙ (Εικόνα 51Α-Β), με αποτέλεσμα μειωμένη εισβολή στην aECM (Εικόνα 51C). Επομένως, ο *in vivo* αποδεδειγμένος παθογενετικός ρόλος του *Tks5* στην πνευμονική ίνωση περιλαμβάνει το σχηματισμό ποδοσωμάτων στους ΠΙ και την προώθηση της εισβολής στην ECM τους.



Εικόνα 51: Η μερική ανεπάρκεια του *Tks5* σε ΠΙ ποντικών μειώνει τον σχηματισμό ποδοσωμάτων και την εισβολή τους στην ECM, μετά την χορήγηση BLM. A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και *Tks5* σε πνευμονικούς ινοβλάστες που απομονώθηκαν από WT και *Tks5*^{+/-} ποντίκια, μετά τη χορήγηση BLM, τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα B)

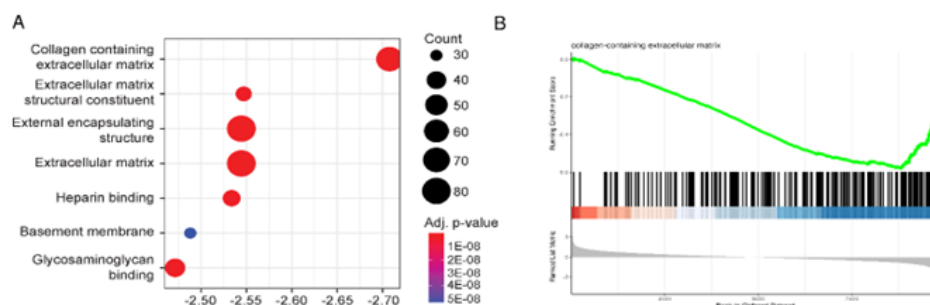
Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό πεδίο (x5). C) Μειωμένη ικανότητα εισβολής των $Tks5^{+/-}$ ΠΙ, μετά τη χορήγηση BLM, όπως ανιχνεύθηκε με τη δοκιμασία εισβολής.

Με σκοπό την απόκτηση πρόσθετων μηχανιστικών γνώσεων, πέραν του σχηματισμού ποδοσωμάτων, οι wt και $Tks5^{+/-}$ ΠΙ εκτέθηκαν σε TGFβ, όπως παραπάνω, και το συνολικό προφίλ έκφρασής τους εξετάστηκε με αλληλούχιση RNA 3' UTR (Quant-Seq LEXOGEN). Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης μεταξύ των $Tks5^{+/-}$ και wt ΠΙ που επώαστηκαν με TGFβ, αποκάλυψε 3648 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια (ΔΕΓ; FC>1,2, FDR corr. p<0,05) (Πίνακας 4, Εικόνα 52Α). μεταξύ αυτών 418 ΔΕΓ έχουν συσχετιστεί προηγουμένως με την πνευμονική ίνωση, όπως διαπιστώθηκε με υπολογιστική αναζήτηση (Πίνακας 4). Οι μεταγραφικοί παράγοντες (ΜΠ) Stat1, Cebpa και Ar, βρέθηκαν με μειωμένη έκφραση στους $Tks5^{+/-}$ ΠΙ μαζί με αρκετά από τα γονίδια-στόχους τους (Εικόνα 52Β).



Εικόνα 52: Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των *Tks5*^{+/-} ινοβλαστών πνευμόνων (ΠΙ) που διεγείρονται με *TGFβ*. A) Heatmap των 100 κορυφαίων στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων σε *Tks5*^{+/-} ΠΙ. B) Δίκτυο αλληλεπίδρασης των διαφορετικά εκφραζόμενων μεταγραφικών παραγόντων και των στόχων τους σε *Tks5*^{+/-} ΠΙ. C) Heatmap των χαρακτηριστικών στο βασικό σύνολο εμπλουτισμού του όρου γονιδιακής οντολογίας GO:0062023, όπως αποκαλύφθηκε κατά την ανάλυση μονοπατιών. D) Heatmap των απορρυθμισμένων ομόλογων γονιδίων ποντικών των 50 πιο αυξημένων χαρακτηριστικών σε διηθητικούς ινοβλάστες, όπως δίνονται στα συμπληρωματικά δεδομένα του PMID: 30763282.

Η ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (GSEA) που πραγματοποιήθηκε στα ΔΕΓ αποκάλυψε ότι τα πιο απορυθμισμένα κυτταρικά συστατικά (CC), οι απορυθμισμένες μοριακές λειτουργίες (MF) και βιολογικές διεργασίες (BP) σχετίζονται όλες με την ECM (Εικόνα 53A, Πίνακας 5). Η "ECM που περιέχει κολλαγόνο" (GO:0062023) ήταν πιο απορυθμισμένη λειτουργία (Εικόνα. 53B) λόγω της μείωσης της έκφρασης πολλών γονιδίων, όπως τα κολλαγόνα και οι MMPs/TIMPs/Adamts (Εικόνα 53B, 52C).

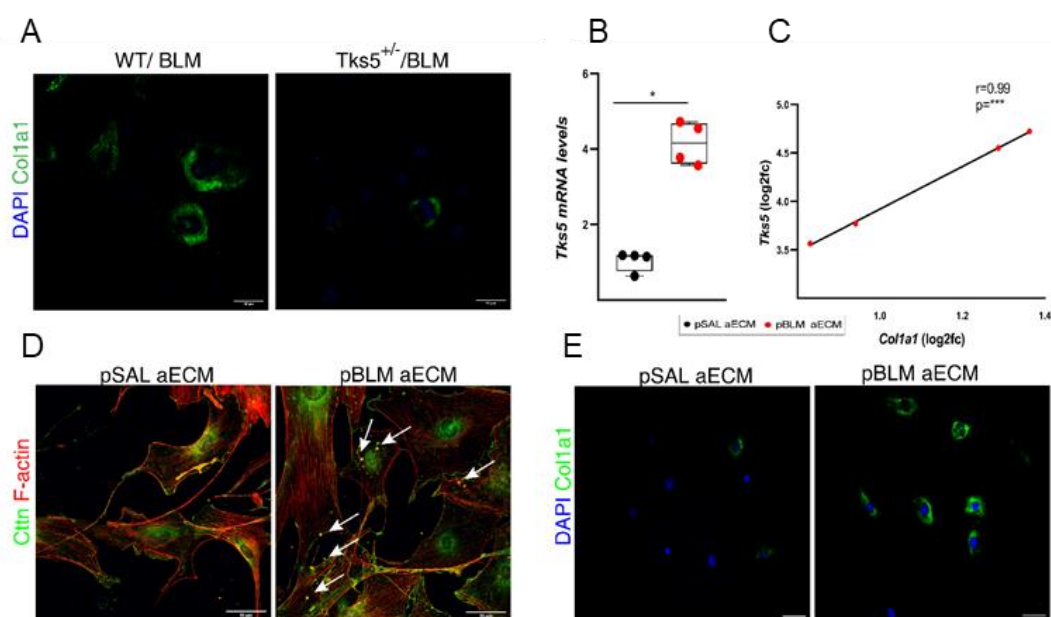


Εικόνα 53: Η μερική ανεπάρκεια του *Tks5* σε ΠΙ ποντικών διαταράσσει την ομοιόσταση της ECM. Α) Τα συστατικά γονιδιακής οντολογίας που σχετίζονται με γονίδια της ECM είναι εμπλουτισμένα σε γονίδια που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση σε διεγερμένους με *TGFβ* *Tks5*^{+/-} ΠΙ σε σύγκριση με τους αντίστοιχους WT. Β) Ο πιο εμπλουτισμένος όρος σε γονίδια με καθοδική ρύθμιση σύμφωνα με την ανάλυση εμπλουτισμού γονιδίων (GSEA). είναι ο όρος της εξωκυττάριας μήτρας που περιέχει κολλαγόνο.

Για να επαληθευτούν τα ευρήματα που προέκυψαν από την ανάλυση RNAseq, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού για κολλαγόνο στους ΠΙ που απομονώθηκαν μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Οι *Tks5*^{+/-} ΠΙ μετά την χορήγηση BLM, που περιέχουν λιγότερα ποδοσώματα και παρουσιάζουν μειωμένη εισβολή στην aECM, βρέθηκε ότι παράγουν σημαντικά λιγότερο Col1a1 (Εικόνα 54A).

Σε αυτό το πλαίσιο, και δεδομένης της σύνδεσης της ECM με τους ινοβλάστες, καθώς και με τα ποδοσώματα, εξετάσαμε στη συνέχεια την επίδραση της σύνθεσης της ECM στην έκφραση του *Tks5* και την ομοιόσταση των ποδοσωμάτων. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε aECM από πνεύμονες ποντικών μετά τη χορήγηση BLM ή SAL (Εικόνα 50) και η λυοφιλοποιημένη σκόνη χρησιμοποιήθηκε, ως πλούσιο σε Col1a1, αυτόλογο υπόστρωμα ECM για την καλλιέργεια πρωτογενών NMLFs. Η καλλιέργεια

πρωτογενών NMLFs σε πλούσιο σε Colla1 aECM που παρασκευάστηκε από τους πνεύμονες ποντικών μετά από χορήγηση BLM, διεγείρει την έκφραση του *Tks5* η οποία συσχετίζεται με την έκφραση του *Colla1* (Εικόνα. 54B-C), τον σχηματισμό ποδοσωμάτων (Εικόνα 54D) και οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της έκφρασης του Colla1 (Εικόνα 54E), υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του Colla1 αποτελεί κρίσιμο συστατικό της ινωτικής ECM που αυξάνει την έκφραση του *Tks5* και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων στα LF..

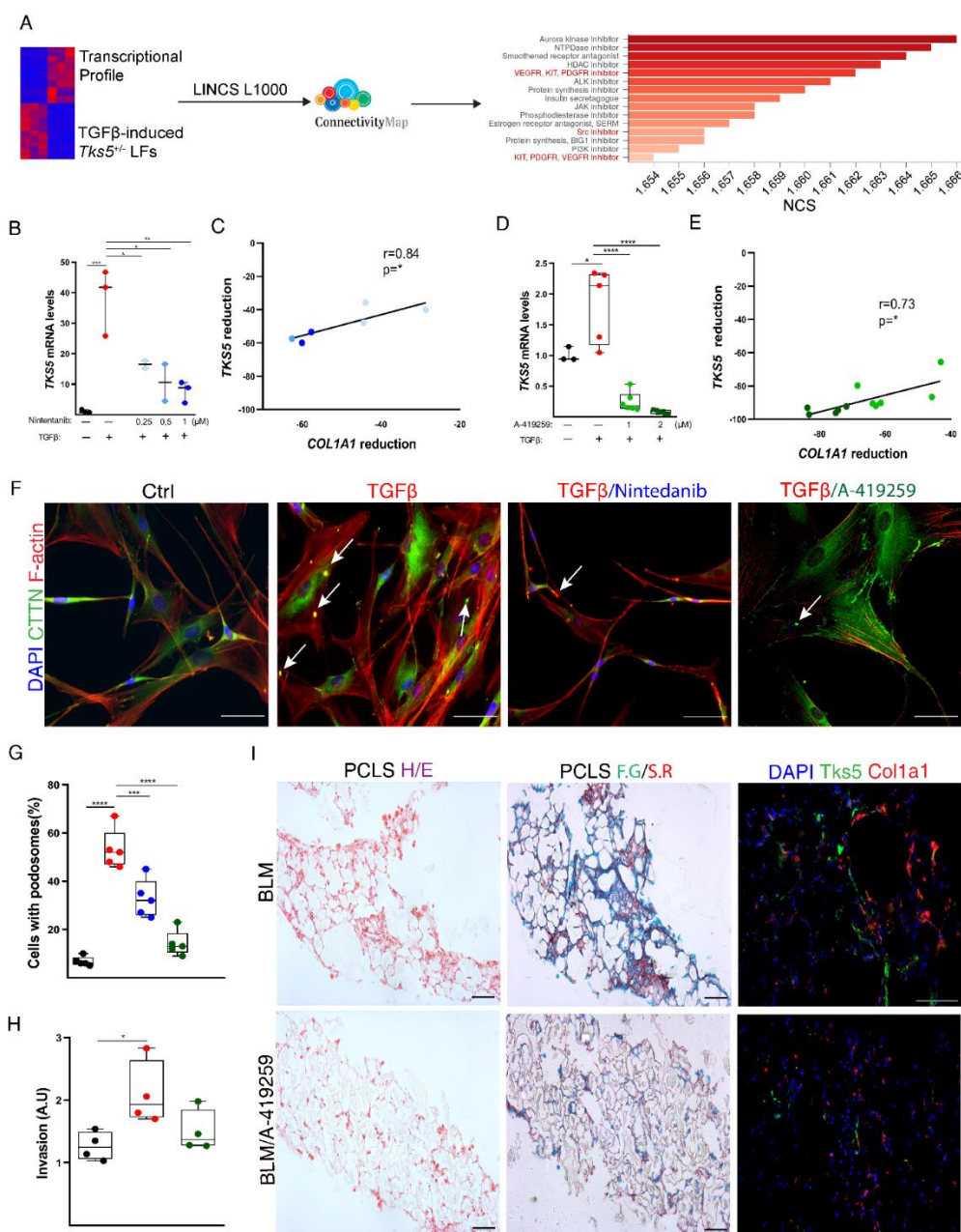


Εικόνα 54: Η μερική ανεπάρκεια του *Tks5* σε III ποντικών διαταράσσει την ομοιόσταση της ECM, η οποία ελέγχει κρίσιμα τον σχηματισμό ποδοσωμάτων και την εισβολή της ECM. A) Μειωμένη έκφραση *Colla1* από τους *Tks5*^{+/-} III. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες μετά από χρώση για *Colla1* και DAPI. B-C) Οι WT III παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του *Tks5* όταν καλλιεργηθούν σε υπόστρωμα που δημιουργείται από πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση BLM, η οποία συσχετίζεται με την mRNA έκφραση του *Colla1*. D-E) Το ινωτικό υπόστρωμά επάγει την δημιουργία ποδοσωμάτων και την έκφραση του κολλαγόνου στα κύτταρα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ανοσοφθορισμού για F-ακτίνη και Ctnn (D) ή *Colla1* (E) με DAPI- τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα- κλίμακα=50 μ m.

2.1.5 Η αναστολή της Src μειώνει αποτελεσματικά το σχηματισμό ποδοσωμάτων και μετριάξει την πνευμονική ίνωση

Για τον εντοπισμό φαρμακευτικών ενώσεων που μπορούν να επάγουν ένα παρόμοιο μεταγραφικό προφίλ με αυτό των *Tks5*^{+/-} ΠΙ που χαρακτηρίζεται από μειωμένη εισβολή στην ECM, το προφίλ των *Tks5*^{+/-} ΠΙ που επάγεται από TGFβ αναζητήθηκε στη βάση δεδομένων LINCSL1000 του χάρτη συνδεσιμότητας (CMap) (Εικόνα 55Α), έναν δημόσιο πόρο που περιέχει >10⁶ υπογραφές γονιδιακής έκφρασης διαφορετικών κυτταρικών τύπων που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με μια μεγάλη ποικιλία μικρών μοριακών ενώσεων[145]. Μεταξύ των ενώσεων που εντοπίστηκαν με παρόμοια προφίλ έκφρασης, αρκετές έχουν ήδη αποδειχθεί ότι έχουν θετική επίδραση στην παθογένεια της νόσου σε ζωικά μοντέλα (Εικόνα 55Α, Πίνακας 6). Στους εντοπισμένους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους περιλαμβάνονται οι υποδοχείς PDGF και VEGF, οι οποίοι αποτελούν φαρμακολογικό στόχο του nintedanib που χρησιμοποιείται για την θεραπεία (SOC) της ΙΠΙ[146]. Το πιο σημαντικό είναι ότι ο κατάλογος περιλαμβάνει επίσης έναν αναστολέα της Src, μιας επαγωγίμης από τον TGFβ/PDGF, κινάσης τυροσίνης που είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό ποδοσωμάτων[54]. Για να επαληθεύσουμε πειραματικά τα *in silico* ευρήματα, οι ενεργοποιημένοι από τον TGFβ ΑΠΙ επώαστηκαν με μη τοξικές, αυξανόμενες συγκεντρώσεις nintedanib και A-419259, ενός εμπορικά διαθέσιμου αναστολέα της Src. Τόσο το nintedanib αλλά κυρίως το A-419259 μείωσαν την έκφραση του *TKS5* και του *COL1A1* (Εικόνα 55Β-Ε), καθώς και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων (Εικόνα 55F-Γ). Επιπλέον, ο αναστολέας της Src μείωσε την εισβολή των ΠΙ στην aECM (Εικόνα 55Η) και ανέστρεψε την ίνωση σε ινωτικά PCLS ποντικών που απομονώθηκαν μετά την χορήγηση BLM (Εικόνα 55Ι).

Επομένως, ο σχηματισμός ποδοσωμάτων με τη μεσολάβηση του TKS5 είναι μια παθολογική διαδικασία που μπορεί να αντιμετωπιστεί φαρμακευτικά και μπορεί να στοχευθεί αποτελεσματικά με την αναστολή της Src.



Εικόνα 55: Η αναστολή της *Src* μειώνει αποτελεσματικά τον σχηματισμό ποδοσωμάτων, την εισβολή του ECM και εξασθενεί την πνευμονική ίνωση. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης συνδεσιμότητας (CMap) με χρήση του εργαλείου LINCS1000 του προφίλ έκφρασης του *TKS5*^{+/-} που προκαλείται από τον TGFβ. **B-E).** Μειωμένη έκφραση mRNA των *TKS5* και *COL1A1* μετά την διέγερση με nintedanib και A-419259. **C, E).** Διάγραμμα συσχέτισης Pearson της μείωσης του *COL1A1* στα ίδια δείγματα. **F)** Μειωμένη παρουσία ποδοσωμάτων στους AΠΙ μετά την διέγερση με nintedanib και A-419259. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από διπλή χρώση για F-ακτίνη και CTTN με DAPI- τα βέλη υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά ποδοσώματα. **G)** Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχουν ποδοσώματα ανά οπτικό

πεδίο (x5). Η) Μειωμένη ικανότητα εισβολής των ΑΠΠ, μετά από προ-επόαση με A-419259 και διέγερση με TGF- β , όπως ανιχνεύεται με τη δοκιμασία εισβολής. Ι) Η αναστολή της SRC μετριάξει την πνευμονική ίνωση σε μοντέλα PCLS ποντικών, μετά τη χορήγηση BLM. Δημιουργήθηκαν τομές PCLS τόσο από ποντίκια που έλαβαν φυσιολογικό ορό όσο και από ποντίκια που έλαβαν μπλεομυκίνη (ημέρα11). Η θεραπεία με το A-419259, χορηγήθηκε τις πρώτες 24 ώρες μετά την απομόνωση για 3 διαδοχικές ημέρες. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από PCLS χρωματισμένες με H&E, με Fast green/Sirius red και από διπλή χρώση ανοσοϊστοχημείας για Tks5 και Colla1. Κλίμακα=50 μ m- αντιπροσωπευτικό πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Αυξημένη έκφραση του *TKS5* ανιχνεύθηκε, για πρώτη φορά σε μη κακοήγη νόσο[134], στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΙΠΙ και ποντικών με επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση. Η αυξημένη έκφραση του *TKS5* έχει αναφερθεί προηγουμένως, πέρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα[80], επεκτείνοντας περαιτέρω τις ομοιότητες της ΙΠΙ και του καρκίνου του πνεύμονα[26]. Η έκφραση του *TKS5* σε επίπεδο mRNA στον πνευμονικό ιστό, τόσο των ανθρώπων όσο και των ποντικών, συσχετίστηκε με την έκφραση σε επίπεδο mRNA του *COL1A1*, χαρακτηριστικό γονίδιο με απορυθμισμένη έκφραση στην ΙΠΙ, ενώ η έκφραση του *TKS5* στους ινωτικούς πνεύμονες εντοπίστηκε κυρίως στο κυψελιδικό επιθήλιο και στους ΙΠΙ που εκφράζουν *COL1A1*.

Ο TGFβ, ο κύριος προϊνωτικός παράγοντας, βρέθηκε να αυξάνει την έκφραση του *TKS5* και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε διάφορες σειρές ινοβλαστών, όπως είχε αναφερθεί προηγουμένως μόνο για τα μακροφάγα THP-1[147, 148] και τα πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής[149, 150]. Άλλοι καθιερωμένοι προϊνωτικοί αυξητικοί παράγοντες στον πνεύμονα έχουν αναφερθεί ότι τροποποιούν τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους: Ο PDGF στους αρθρικούς ινοβλάστες[151] και στα λεία μυϊκά κύτταρα[152], ο VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα[153], γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να ασκήσουν παρόμοια διεγερτικά αποτελέσματα στους ΙΠΙ. Επιπλέον, η PGE₂, η οποία καταστέλλει την πνευμονική ίνωση[154], έχει αναφερθεί ότι προάγει τη καταστροφή των ποδοσωμάτων σε δενδριτικά κύτταρα[155], γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μειωμένα επίπεδα PGE₂ στην ΙΠΙ[154] επίσης ευνοούν τον σχηματισμό ποδοσωμάτων. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο σχηματισμός ποδοσωμάτων στους ΙΠΙ αποδείχθηκε ότι αποτελεί εγγενή ιδιότητα των ΙΠΙ της ΙΠΙ και των ΙΠΙ μετά την BLM που μπορεί να διατηρηθούν σε καλλιέργεια απουσία οποιασδήποτε διέγερσης. Επομένως, ο σχηματισμός ποδοσωμάτων είναι μια κεντρική απόκριση των ΙΠΙ σε προϊνωτικούς παράγοντες.

Μεταξύ των διαφόρων συστατικών της ECM, των οποίων η έκφραση και η εναπόθεση αυξάνονται στην πνευμονική ίνωση, τα επίπεδα mRNA του *Colla1* βρέθηκαν να συσχετίζονται σταθερά με τα επίπεδα mRNA του *Tks5* τόσο στον ανθρώπινο πνευμονικό ιστό όσο και στον πνευμονικό ιστό των ποντικών ή στους ΙΠΙ. Οι *Tks5*^{+/-} ΙΠΙ αποδείχθηκε ότι παράγουν λιγότερο *Colla1* μετά από την χορήγηση BLM

όπως αντικατοπτρίζεται επίσης στη μειωμένη συνολική εναπόθεση κολλαγόνου στους πνεύμονες των *Tks5*^{+/-} ποντικών. Η καλλιέργεια των ΠΙ σε πλούσια σε Colla1 aECM προώθησε την έκφραση του *Tks5* και το σχηματισμό ποδοσωμάτων, καθώς και την περαιτέρω έκφραση του *Colla1*, τονίζοντας την επαγόμενη από τον TGFβ αλληλεξάρτηση Colla1-ποδοσωμάτων στο πλαίσιο της προτεινόμενης σύνδεσης της ECM με τα ποδοσώματα. Κατά συνέπεια, το Coll1 έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει την εξαρτώμενη από το *Tks5* ανάπτυξη[156], ενώ ο βαθμός ινώδους κολλαγόνου έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει καθοριστική επίδραση στον σχηματισμό ποδοσωμάτων[157], πιθανώς μέσω των υποδοχέων της περιοχής της δισκοϊδίνης (DDR) που μεσολαβούν στη δέσμευση του κολλαγόνου[158]. Η έκφραση τόσο του DDR1 όσο και του DDR2 βρέθηκε μειωμένη σε *Tks5*^{+/-} ΠΙ που επωάστηκαν με TGFβ (Πίνακας 4), γεγονός που υποδηλώνει ότι η σηματοδότηση DDR και η επακόλουθη ενεργοποίηση κινάσεων τυροσίνης θα μπορούσε να μεσολαβήσει στον παρατηρούμενο σχηματισμό ποδοσωμάτων που προκαλείται από TGFβ-Coll1a1.

Ένας άλλος ισχυρός επαγωγέας των ποδοσωμάτων είναι η τροποελαστίνη[156], το διαλυτό πρόδρομο μόριο της πρωτεΐνης διασταυρούμενης σύνδεσης της ECM ελαστίνης (Eln), η έκφραση της οποίας βρέθηκε αντίστοιχα μειωμένη σε ποδοσώματα που σχηματίζονται σε ΠΙ με ανεπάρκεια *Tks5*^{+/-} (Πίνακας 4). Επιπλέον, η άκαμπτη ινωτική aECM που παράγεται μετά την-BLM, φάνηκε ότι διεγείρει την έκφραση του *Tks5* και τον σχηματισμό ποδοσωμάτων στους ΠΙ και διατηρεί την αυξημένη έκφραση του Coll1a1. Σε συμφωνία, η αυξημένη ακαμψία του υποστρώματος, έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι προάγει τη δραστηριότητα των invadopodia[159]. Επομένως, ο σχηματισμός ποδοσωμάτων στους ΠΙ μετά από μηχανικά ερεθίσματα της άκαμπτης ECM των ιωτικών πνευμόνων είναι ένα σημαντικό συστατικό της προτεινόμενης σύνδεσης της ECM με τους ινοβλάστες[160, 161], ιδίως λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της ακαμψίας της ECM στους πνεύμονες που σχετίζεται με την ηλικία[162], και τον προτεινόμενο ρόλο της μηχανοευαίσθητης σηματοδότησης στην ενεργοποίηση των ΠΙ και την πνευμονική ίνωση[163].

Η συνολική γενετική ετερόζυγη ανεπάρκεια του *Tks5* αποδείχθηκε ότι μειώνει την επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση με μια πληθώρα δοκιμασιών και οι *Tks5*^{+/-} ΠΙ αποδείχθηκε ότι σχηματίζουν λιγότερα ποδοσώματα, με αποτέλεσμα την μειωμένη εισβολή της aECM, καθιερώνοντας έτσι έναν σημαντικό παθογενετικό ρόλο για τα ποδοσώματα που ενεργοποιούνται από το *Tks5* και την εισβολή των ΠΙ στην ECM

στην πνευμονική ίνωση. Η εισβολή στην ECM, χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου[133], κερδίζει όλο και μεγαλύτερη προσοχή στην πνευμονική ίνωση. Οι ΑΠΙ της ΙΙΙ αποδείχθηκε ότι εισβάλλουν σε matrigel πιο αποτελεσματικά από τους ΑΠΙ από άλλες διάμεσες νόσους[129, 131, 132]. Η αυξημένη εισβολή συσχετίστηκε με αυξημένες ίνες ακτίνης[131], και προτάθηκε ότι διαμεσολαβείται, εν μέρει, από τη σηματοδότηση ινωδονεκτίνης και ιντεγκρίνης $\alpha 4 \beta 1$ [132], ή τη σηματοδότηση υαλουρονικού (HA) και CD44[129]. Το CD44 έχει εντοπιστεί στα invadopodia σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και έχει αποδειχθεί ότι απαιτείται για τη δραστηριότητα των invadopodia[164] ενώ οι TKS5^{+/-} ΙΙΙ βρέθηκε να εκφράζουν CD44, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μόρια HA/CD44 συμμετέχουν στη ρύθμιση του σχηματισμού ποδοσωμάτων στους ΙΙΙ. Οι TKS5^{-/-} ΙΙΙ βρέθηκε επίσης ότι εκφράζουν κατά προτίμηση το CD274, έναν προτεινόμενο δείκτη των διεισδυτικών ΙΙΙ της ΙΙΙ[165], υποδηλώνοντας ένα ακόμη πιθανό σηματοδοτικό μονοπάτι για το σχηματισμό ποδοσωμάτων. Επιπλέον, τα BALFs από ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με BLM ή ασθενείς με ΙΙΙ διεγείρουν εισβολή στην ECM των ΙΙΙ[166, 167], η οποία αποδείχθηκε ότι εξασθενεί μετά την αποσιώπηση των υποδοχέων LPAR1, EGFR και FGFR2[166], ή με την παρεμβολή των αλληλεπιδράσεων Sdc4-CXCL10[167], υποδηλώνοντας πρόσθετα σήματα που θα μπορούσαν να διαμορφώσουν την εισβολή των ΙΙΙ. Το HER2 έχει επίσης προταθεί ότι προωθεί την εισβολή στους ΙΙΙ[168], γεγονός που υποδηλώνει και πάλι ομοιότητες με τα μεταστατικά ADC- είναι ενδιαφέρον ότι αρκετά από τα αναγνωρισμένα γονίδια που σχετίζονται με την εισβολή (*Fstl3*, *Il11*, *Hbegf*, *Ccn2*, *Inhba*, *Podxl*, *Sema7a*, *Bcl2a1b*, *Bcl2a1d*, *Sh3rf1*) βρέθηκαν μειωμένα στους *Tks5*^{+/-} ΙΙΙ με μειωμένη εισβολή, υποστηρίζοντας περαιτέρω τα λειτουργικά αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο του TKS5 και των ποδοσωμάτων στην εισβολή των ΙΙΙ.

Η ανάλυση της συνδεσιμότητας MAP (CMap) έχει αναδειχθεί ως ένα ανεκτίμητο εργαλείο για τη σύνδεση της γονιδιακής έκφρασης, των φαρμάκων και των καταστάσεων των νόσων[145]. Η ανάλυση CMap των scRNAseq βρογχικών δειγμάτων της ΙΙΙ υπέδειξε ότι η αναστολή της Src μπορεί να αντιστρέψει τις παρατηρούμενες προϊνωτικές μεταγραφικές αλλαγές στα βασικά κύτταρα των βρογχικών αεραγωγών της ΙΙΙ[169]. Επιπλέον, η ανάλυση CMap μεταγραφικών προφίλ της ΙΙΙ και των αντίστοιχων μεταγραφικών υπογραφών των nintedanib και pirfenidone, υπέδειξε την αναστολή της Src ως την ισχυρότερη[170]. Όπως

αποδείξαμε, η ανάλυση CMap του προφίλ των *Tks5*^{+/-} ΠΙ που διεγείρονται από τον TGFβ προσδιόρισε, μεταξύ καθιερωμένων μορίων και άλλων υποσχόμενων, την αναστολή της src ως πιθανή θεραπεία για τον περιορισμό της διείσδυσης των ΠΙ και, συνεπώς, της πνευμονικής ίνωσης. Σε συμφωνία, η αναστολή της src φάνηκε να μειώνει τα επίπεδα *Tks5* και τον αριθμό των ποδοσωμάτων, να μειώνει την εισβολή στην aECM και να αντιστρέφει την ίνωση σε PCLS. Η αναστολή της Src έχει αποδειχθεί ότι μετριάξει την πνευμονική ίνωση που προκαλείται από BLM[170-172], ενώ ο αναστολέας της Src Saracatanib[170] έχει εισέλθει σε κλινικές δοκιμές ([NCT04598919](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04598919)). Επομένως, η στόχευση του σχηματισμού ποδοσωμάτων, μιας εγγενούς παθογόνου ιδιότητας των ΠΙ, καθώς και των αλληλεπιδράσεων των ΠΙ με την ECM, συμπεριλαμβανομένης της εισβολής, αποτελούν πολύ υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους στην πνευμονική ίνωση.

Υλικά και Μέθοδοι

Σύνολα δεδομένων. Όλα τα αναλυμένα, ξανά-κανονικοποιημένα σύνολα δεδομένων (Πίνακας 1) προέρχονται από το Fibromine; DEGs: FC>1.2, FDR corr. p<0.05.

Ασθενείς. Όλες οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε συμμόρφωση με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Τα δείγματα πνευμονικού ιστού (Πίνακας 2) ελήφθησαν μέσω της Τράπεζας Ιστών του Πανεπιστημίου του Πίτσμπουργκ και της υπηρεσίας ιστών παθολογίας του Πανεπιστημίου του Γέιλ, ένα υποσύνολο προηγουμένως καλά χαρακτηρισμένων και δημοσιευμένων δειγμάτων[173]. Οι πνευμονικοί ινοβλάστες απομονώθηκαν από τον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΙΠΠ και από τον παρακείμενο υγιή ιστό ασθενών που υποβλήθηκαν σε ανοικτή χειρουργική επέμβαση πνεύμονα για καρκίνο (Πίνακας 3) στο Τμήμα Πνευμονολογίας του Νοσοκομείου Bichat-Claude Bernard (#0811760-25032010), Παρίσι/Γαλλία.

Ποντίκια. Τα ποντίκια εκτράφηκαν στις εγκαταστάσεις ζώων του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών " Αλέξανδρος Φλέμινγκ ", σε συνθήκες SPF, στους 20-22°C, με υγρασία 55 ±5% και κύκλο φωτός-σκοταδιού 12 ωρών- η τροφή και το νερό παρέχονταν σε τακτά διαστήματα. Η πνευμονική ίνωση προκλήθηκε με εφάπαξ οροφαρυγγική χορήγηση (OA) 0,8U/kg μπλεομυκίνης (BLM) σε ποντίκια C57Bl6/J ηλικίας 8-10 εβδομάδων, έχει περιγραφεί[68, 154]. Όλα τα πειράματα εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Δεοντολογίας Ζώων (IAEZ) του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", καθώς και από την Κτηνιατρική Υπηρεσία του κυβερνητικού νομού Αττικής, Ελλάδα (# 8441/2017).

Επαγόμενη από μπλεομυκίνη (BLM)-πνευμονική ίνωση

Η πνευμονική ίνωση προκλήθηκε με εφάπαξ οροτραχειακή χορήγηση (OA) 0,8U/kg υδροχλωρικής μπλεομυκίνης (BLM) (Nippon Kayaku Co., Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία) την ημέρα 0 σε αναισθητοποιημένα (i.p., ξυλαζίνη, κεταμίνη και ατροπίνη, 10, 100 και 0,05 mg/kg, αντίστοιχα) ποντίκια ηλικίας 8-10 εβδομάδων- οι ομάδες ελέγχου έλαβαν χλωριούχο νάτριο (SAL). Η δόση και η οδός επιλέχθηκαν κατόπιν προηγούμενων εκτεταμένων τοπικών δοκιμών για την πρόκληση στερεού ινωτικού προφίλ, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τη θνησιμότητα. Όλες οι τυχαία κατανεμημένες πειραματικές ομάδες αποτελούνταν από συνομήλικους ποντικούς. Η κατάσταση της υγείας των ποντικών παρακολουθείτο τουλάχιστον μία φορά την ημέρα- δεν

παρατηρήθηκαν απροσδόκητοι θάνατοι- ελήφθησαν όλα τα μέτρα για την ελαχιστοποίηση της ταλαιπωρίας και της δυσφορίας των ζώων. Η ανάπτυξη της νόσου αξιολογήθηκε σε σύγκριση με τα συνομήλικά τους WT 14 ημέρες μετά την BLM, στην κορύφωση της νόσου (η οποία υποχωρεί την 21^η ημέρα μετά την χορήγηση BLM σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες).

Μετά το ζύγισμα, οι αναπνευστικές λειτουργίες μετρήθηκαν με το FlexiVent (SCIREQ, Μόντρεαλ, Καναδάς), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και όπως περιεγράφηκε προηγουμένως[68, 154]. Η ευθανασία πραγματοποιήθηκε ανθρώπινα σε θάλαμο CO₂ με σταδιακή πλήρωση και ακολούθησε αφαίμαξη.

Το **βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF)** λήφθηκε με πλύση των πνευμόνων με 1ml αποστειρωμένου χλωριούχου νατρίου 0,9% τρεις φορές. Μετά την απομόνωση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1200g για 10 λεπτά στους 4°C, το πρώτο υπερκείμενο BALF αποθηκεύτηκε στους -80°C για μετρήσεις πρωτεϊνών και κολλαγόνου. Για την εκτίμηση της **πνευμονικής φλεγμονής**, τα κύτταρα του BALF επαναδιαλύθηκαν σε 1 ml φυσιολογικού ορού, χρωματίστηκαν με διάλυμα Trypan Blue 0,4% και καταμετρήθηκαν με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου Neubauer. Τα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης στο BALF, ένδειξη **πνευμονικού οιδήματος και αγγειακής διαρροής**, εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Bradford σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Σε πλάκα 96 πηγαδιών τοποθετούνται 5μl από κάθε δείγμα BALF, ακολουθεί η προσθήκη 245 μl αντιδραστηρίου 1x Bradford και επώαση για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι τιμές απορρόφησης στα 595nm, με τη χρήση φασματογράφου, και μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης (mg/ml) με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης ορού βοοειδών (BSA 0-2 mg/ml). Το ολικό **διαλυτό κολλαγόνο** στα BALFs ποσοτικοποιήθηκε με τη δοκιμασία Sirius Red. 50μl δειγμάτων BALF, αραιωμένα σε 350μl οξικού οξέος 0,5M, επώαστηκαν για 30 λεπτά με 400μl Direct σε RT, στο σκοτάδι. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 12000g για 10 λεπτά και απομόνωση 200μl από τα υπερκείμενα. Οι τιμές της απορρόφησης μετρήθηκαν στα 540nm, με τη χρήση φασματογράφου, και μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης (μg/ml) με τη χρήση πρότυπης καμπύλης κολλαγόνου I ουράς αρουραίου (0-500 μg/ml).

Ιστολογία

Ο δεξιός λοβός του πνεύμονα σταθεροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας σε 10% ουδέτερη ρυθμισμένη φορμόλη και ενσωματώθηκε σε παραφίνη. Τομές πνεύμονα μεγέθους 5mm του κόπηκαν με χρήση μικροτόμου και χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (**H&E**) με τα συνήθη πρωτόκολλα. Η ανάπτυξη της ίνωσης ποσοτικοποιήθηκε από δύο ανεξάρτητους κριτές, με τυφλό τρόπο, με βάση μια τροποποιημένη βαθμολογία Ashcroft (0, φυσιολογικός πνεύμονας- 1, απομονωμένα κυψελιδικά διαφράγματα με ήπιες ινωτικές αλλαγές, 2, ινωτικές μεταβολές των κυψελίδων με σχηματισμό κόμβων- 3, συνεχόμενα ινωτικά τοιχώματα των κυψελίδων- 4, μεμονωμένες ινωτικές μάζες- 5, συρρέουσες ινωτικές μάζες- 6, μεγάλες συνεχόμενες ινωτικές μάζες- 7, φυσαλίδες αέρα- 8, ινώδης εξάλειψη). Για τη χρώση του κολλαγόνου **Fast Green-Sirius Red (F.G/S.R)**, οι τομές των πνευμόνων αποπαραφινώθηκαν σε ξυλένιο και αιθανόλη και επώαστηκαν σε διάλυμα Bouin (75% πικρικό οξύ/ 25% φορμαλδεΰδη/ 1% οξικό οξύ), για 1 ώρα στους 56°C, ακολουθούμενη από χρώση με Fast Green 0,04% σε πικρικό οξύ για 15 λεπτά και Sirius Red 0,1%/Fast Green 0,04% διαλυμένο σε πικρικό οξύ για 40 λεπτά. Οι χρωματισμένες τομές πλύθηκαν με οξικό οξύ, στη συνέχεια αφυδατώθηκαν και τοποθετήθηκαν με DPX. Τα PCLS, που απομονώθηκαν και κόπηκαν όπως περιγράφεται κατωτέρω, χρωματίστηκαν με H&E. Για την χρώση **X-gal (Lac-Z)**, οι φρεσκοαπομονωμένοι πνεύμονες ποντικών γέμισαν με 0,1 g/ml σακχαρόζης σε 50% OCT/PBS, ακολουθούμενη από την ταυτόχρονη ενσωμάτωση και κατάψυξη σε OCT, χρησιμοποιώντας ισοπεντάνιο και ξηρό πάγο. Τομές 6-10 μm κόπηκαν με τη χρήση κρυοτόμου και σταθεροποιήθηκαν σε 2% φορμαλδεΰδη/ 0,2% γλουταραλδεΰδη για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, πλύθηκαν δύο φορές σε κρύο PBS/ 2 mM MgCl₂ για 10 λεπτά και χρωματίστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας με διάλυμα χρώσης X-gal (2 mg/mL X-gal σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,1 M pH=7,3, 0,01% δεοξυχολικό νάτριο, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5,7 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 0,02% NP-40) στους 37°C στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS/2 mM MgCl₂ και dH₂O για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χρωματίστηκαν με ηωσίνη και ακολούθησε αφυδάτωση και τοποθέτηση DPX. Η **απεικόνιση** πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Ιαπωνία) συνδεδεμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Q Imaging EXI Aqua, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Q-Capture Pro 7. Για τις μελέτες **ανοσοϊστοχημείας**, οι τομές των πνευμόνων αποπαραφινώθηκαν σε ξυλένιο,

επανυδατώθηκαν σε βαθμίδα αιθανόλης και πλύθηκαν για λίγο με νερό. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες διατηρήθηκαν σε νερό βρύσης μέχρι να είναι έτοιμες για την ανάκτηση αντιγόνου με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου με pH 6,0 με σε υψηλή θερμοκρασία για 20 λεπτά. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων (10% NGS/2% BSA) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Μετά το πλύσιμο, επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζοντα χρωμοφόρα, αραιωμένα στο διάλυμα 10% NGS/2% BSA. Στη συνέχεια, οι τομές πλύθηκαν 3 φορές με PBS-T και τοποθετήθηκαν σε μέσο που περιείχε DAPI για την απεικόνιση των πυρήνων. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συνοπτικού συστήματος TCS SP8X White Light Laser (Leica).

***In vitro/ex vivo* κυτταρικό μοντέλο πνευμονικών ινοβλαστών (III)**

Οι φυσιολογικοί ινοβλάστες του ανθρώπινου πνεύμονα (NHLFs) και οι **III-AIII** απομονώθηκαν από φρέσκα δείγματα ιστού με την τοποθέτηση αρκετών τεμαχίων 2-3 mm σε πιάτα κυτταρικής καλλιέργειας 10 cm με DMEM εμπλουτισμένο με διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, 10% FBS στους 37° C και 5% CO₂ σε υγραποιημένη ατμόσφαιρα. 10-14 ημέρες μετά την καλλιέργεια, οι πολλαπλασιαζόμενοι ινοβλάστες περιβάλλουν τα κομμάτια ιστού, τα οποία στη συνέχεια αφαιρούνται και τα κύτταρα αποκολλώνται με διάλυμα θρυψίνης-EDTA και επανατοποθετούνται σε φιάλες ιστοκαλλιέργειας F75 (P0) μέχρι να πολλαπλασιαστούν. Τα αφαιρεθέντα κομμάτια ιστού επανατοποθετήθηκαν σε νέα πιάτα κυτταρικής καλλιέργειας 10 cm για έναν δεύτερο γύρο εκβλάστησης ινοβλαστών στις ίδιες συνθήκες όπως παραπάνω. Μετά από 3 περάσματα παρατηρούνται ομοιογενείς αποικίες ινοβλαστών- οι AIII χρησιμοποιούνται μέχρι το πέραςμα 7-8. Παρόμοια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ανεξάρτητα για έναν επιπλέον κλώνο NHLF (Εικ. S3A-B), όπως έχει ήδη δημοσιευθεί¹⁰.

Πρωτογενείς φυσιολογικοί πνευμονικοί ινοβλάστες ποντικών (NMLFs) απομονώθηκαν από ποντίκια C57Bl6/J ηλικίας 8-10 εβδομάδων ή/και από ποντίκια που υποβλήθηκαν σε χορήγηση BLM. Κατά τη θυσία, οι πνεύμονες αφαιρέθηκαν σε DMEM. Στη συνέχεια, τεμαχίστηκαν και χωνεύτηκαν με 0,7 mg/ml κολλαγενάσης τύπου IV (C5138-Sigma), για 1h στους 37°C. Η πέψη ακολουθήθηκε από διήθηση και το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 1200 rpm για 5 λεπτά. Τέλος, το ίζημα

επαναιωρήθηκε σε DMEM που περιείχε 10% FBS. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο πέρασμα 2-3.

Οι NHLFs, οι ΙΠΙ-ΑΠΙ, οι NMLFs και οι ινοβλάστες ποντικών και ανθρώπινου εμβρυϊκού πνεύμονα (κυτταρικές σειρές **3T3** και **MRC5** αντίστοιχα) καλλιεργήθηκαν σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό βοοειδών (FBS) και στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη και αμφοτερικίνη και επώαστηκαν στους 37°C και 5% CO₂. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 60-80%, κατά τη διάρκεια της νύχτας με DMEM χωρίς ορό (+ 0,1% BSA) και εκτέθηκαν σε 10 ng/ml TGF-β1 για 24 ώρες σε DMEM χωρίς ορό. Στα δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης του TGFβ (7,5% BSA σε H₂O). Για τις φαρμακολογικές μελέτες, τα NHLF καλλιεργούνταν σε πλάκες 6 πηγαδιών, απουσία ορού και υφίστανται προκατεργασία για 1h με τις αναφερόμενες αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαφόρων παραγόντων και τους διαλύτες τους στα δείγματα ελέγχου. Μετά από μία ώρα προεπεξεργασίας, τα κύτταρα επώαστηκαν με TGFβ ως συνήθως.

Ο **πολλαπλασιασμός** όλων των καλλιεργειών ΙΠΙ ποσοτικοποιήθηκε με τη δοκιμασία **MTT** σε πλάκες 96 πηγαδιών, όπου ένα κοινό διάλυμα DMEM και MTT προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο. Μετά από επώαση για 4 ώρες και αφού επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός μωβ κρυστάλλων, το μέσο απομακρύνθηκε και προστέθηκε όξινη ισοπροπανόλη σε κάθε φρεάτιο για να διαλυθεί το κρυσταλλικό προϊόν φορμαζίνης. Οι τιμές απορρόφησης προσδιορίστηκαν στα 570 nm και αφαιρέθηκε το υπόβαθρο στα 660 nm με τη χρήση φωτόμετρου μικροπλακών OPTImax (Molecular Devices).

Οι ικανότητες εξάπλωσης και μετανάστευσης των ΙΠΙ αξιολογήθηκαν σε μια δοκιμασία πληγής από γρατζουνιά (scratch wound assay). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών, όπως παραπάνω, και αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι τη πλήρη κάλυψη των πηγαδιών. Μετά προστέθηκε TGFβ, όπως περιγράφεται παραπάνω. Δημιουργήθηκε πληγή με τη χρήση αποστειρωμένου άκρου πιπέτας. Η πλάκα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα ιστοκαλλιέργειας στους 37°C και λήφθηκαν φωτογραφίες με αντίστροφο μικροσκόπιο σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Η **μετανάστευση** και η **εισβολή** ποσοτικοποιήθηκαν επίσης με θαλάμους Boyden σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 49. Εν συντομία, οι ΙΠΙ προστέθηκαν στον άνω θάλαμο, ο οποίος ήταν προεπικαλυμμένος με υπόστρωμα aECM (ή όχι για μετανάστευση) και αφέθηκαν επί 6 ώρες να εισχωρήσουν/μεταναστεύσουν μέσω της μεμβράνης transwell στην κάτω πλευρά, η οποία ήταν σε επαφή με το υλικό στο οποίο δεν είχε προστεθεί ορός. Στη συνέχεια, τα

κύτταρα που παρέμειναν στον άνω θάλαμο απομακρύνθηκαν, ενώ τα κύτταρα που εισέβαλαν ή μετανάστευσαν, μετά από πλύσεις και σταθεροποίηση, χρωματίστηκαν. Επιπλέον, τα βαμμένα κύτταρα λύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για 20 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 550 nm με το φωτόμετρο μικροπλακών TECAN Sunrise.

Η **πρωτεολυτική ικανότητα** των ΠΙ αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία αποικοδόμησης ζελατίνης συζευγμένης με φλουορεσκεΐνη. Καλυπτρίδες 12 mm πλύθηκαν με 20% νιτρικό οξύ, επώαστηκαν με 50 µg/ml πολυ-L-λυσίνης, και με 0,5% γλουταραλδεΐδη και στη συνέχεια επικαλύφθηκαν για 20 λεπτά με 0,2% ζελατίνη συζευγμένη με φλουορεσκεΐνη (Invitrogen, Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate: G13187) σε ρυθμιστικό φυσιολογικό ορό φωσφορικών αλάτων (PBS) που περιείχε 2% σακχαρόζη. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με NaBH₄, πλύθηκαν με PBS και μεταφέρθηκαν σε νέα πλάκα 24 πηγαδιών. Οι ινοβλάστες σπάρθηκαν στις καλυπτρίδες επικαλυμμένα με ζελατίνη και υποβλήθηκαν σε θεραπεία με TGF-β1 όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Μετά από 24 ώρες, το μέσο αντικαταστάθηκε με πλήρες μέσο και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε χρώση ανοσοφθορισμού, 24-48 ώρες αργότερα. Η ποσοτικοποίηση της αποικοδόμησης πραγματοποιήθηκε με το Image J.

Για τις **χρώσεις ανοσοϊστοχημείας**, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδα (20.000 κύτταρα/καλυπτρίδα) και μετά από απουσία ορού, επώαστηκαν με TGF-β1 ως συνήθως. Τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν με 4% PFA για 15 λεπτά και επεξεργάστηκαν με 0,1% Triton X για 10 λεπτά. Ακολούθησε αποκλεισμός την μη ειδική θέσεων με 2% BSA σε PBS για 1 ώρα σε RT. Τα κύτταρα επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C με τα πρωτογενή αντισώματα. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα πλύθηκαν και επώαστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα και συζευγμένη φαλοειδίνη σε 1%BSA/PBS για 60min σε RT. Τέλος, μετά από πλύσεις, οι καλυπτρήριες πλάκες τοποθετήθηκαν με μια σταγόνα mounting Fluoroshield medium (που περιέχει DAPI για τη σήμανση των πυρήνων).

Η **παραγωγή εξωκυττάριας ECM (aECM)** από πνεύμονες ποντικών με αφαίρεση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με βάση παρόμοια πρωτόκολλα για άλλους ιστούς[174, 175]. Εν συντομία, ολόκληροι πνεύμονες απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις SDS (0,01, 0,1, 1%) σε διάλυμα PBS, με επώαση 24 ωρών για κάθε συγκέντρωση SDS. Για το τελικό στάδιο, οι πνευμονικοί ιστοί από τους οποίους απομακρύνθηκαν τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS

για τουλάχιστον 3 ημέρες, κόπηκαν σε μικρά κομμάτια και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι κατεψυγμένοι ιστοί λυοφιλοποιήθηκαν με λυοφιλοποιητή και στη συνέχεια μετατράπηκαν σε σκόνη σε υγρό άζωτο. Για την παραγωγή υποστρώματος ECM, η σκόνη της μήτρας διαλυτοποιήθηκε μέσω ενζυμικής πέψης. Χρησιμοποιήθηκε πεψίνη (Sigma-Aldrich, P6887) η οποία διαλύθηκε σε 0,1 M HCl για να επιτευχθεί συγκέντρωση 1 mg/ml. Περίπου 10 mg της σκόνης ECM προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος πεψίνης, προκειμένου να διαλυτοποιηθούν τα συστατικά της ECM. Μετά από περίπου 48 ώρες, η μήτρα αραιώθηκε με οξικό οξύ 0,1 M για να παραχθεί διάλυμα ECM πνεύμονα συγκέντρωσης 5 mg/ml, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα επικάλυψης για τα κύτταρα.

Τομές πνεύμονα κομμένες με ακρίβεια (Precision cut lung slices-PCLS)

Σε ποντίκια C57-BL/6, ηλικίας 8-10 εβδομάδων, χορηγήθηκε SAL/BLM όπως περιγράφεται παραπάνω. Την 11η ημέρα, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και οι πνεύμονες, μετά την απομάκρυνση του αίματος, διογκώθηκαν με 1ml με 1,5% Low Melting αγαρόζη (15517-014-Invitrogen) σε φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια, οι πνεύμονες απομονώθηκαν και επώστηκαν σε μέσο RPMI (Thermo Fisher Scientific) συμπληρωμένο με 10% FBS και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη για 30 λεπτά στους 4°C για να επιτραπεί ο πολυμερισμός της αγαρόζης. Ο αριστερός λοβός των γεμισμένων με αγαρόζη πνευμόνων, κόπηκε σε φέτες 200μm (PCLS) με Vibratome. Στη συνέχεια, τα PCLS καλλιεργήθηκαν σε 700 μL μέσου RPMI συμπληρωμένου με 10% FBS και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη σε πλάκες 24 πηγαδιών σε τυπικές συνθήκες (37°C και 5% CO₂) κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έπειτα, τα PCLS επώστηκαν με 2μm A-419259 (αναστολέας της οικογένειας Src) και H₂O για 3 διαδοχικές ημέρες, αλλάζοντας τη θεραπεία καθημερινά. Την 14η ημέρα, τα PCLS μονιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας με PFA στους 4°C, έως ότου οι φέτες ενσωματωθούν σε παραφίνη. Τέλος, τομές 5μm των PCLS κόπηκαν με χρήση μικροτόμου και χρωματίστηκαν για H&E, F.G/S.R και αντισώματα αντίστοιχα.

Αντισώματα-Αντιδραστήρια

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη περιλαμβάνουν: anti-Tks5 (SH3 domain) rabbit monoclonal antibody (Merck, 3174822, 1:100), anti-SH3PXD2A mouse monoclonal antibody (Origene, clone OTI1F5-TA811757S, 1:250), col1a1 rabbit monoclonal antibody (Thermo Scientific, RE2209815, 1:100),

anti-A-actin (sma) mouse monoclonal antibody,(Origene, UM800129, 1:250), recombinant Anti-Cortactin antibody (Abcam,ab81208, 1:500), Alexa Fluor™ 633 Phalloidin (Invitrogen, A22284, 1:50), MMP-9 (D6O3H) XP Rabbit monoclonal Antibody (Cell signaling #13667, 1:100). Τα δευτεροταγή αντισώματα περιλαμβάνουν: Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (a11008), Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (a21428), Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (a11029) Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 555 (a221424). Για τις φαρμακολογικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ουσίες:A-419259 inhibitor SML0446 (Sigma-Aldrich), Nintedanib SML2848 (Sigma-Aldrich) and Pirferidone P2116 (Sigma-Aldrich).

Απομόνωση RNA Ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR)

Στα ανθρώπινα δείγματα, το RNA εξήχθη από 30 - 50 mg κατεψυγμένου πνευμονικού ιστού σε 700 µL Qiazol (Lysis buffer, Qiagen, Valencia, CA) με διάσπαση του ιστού και ομογενοποίηση με ηλεκτρικό ομογενοποιητή (PolyTron homogenizer H3660-2A, Cardinal Health, Dublin, OH) στις 19.000 στροφές ανά λεπτό για 15 δευτερόλεπτα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το RNA καθαρίστηκε με το κιτ miRNeasy Mini (217004, Qiagen, Valencia, CA) με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου συστήματος Qiacube (9001292, Qiagen, Valencia, CA). Η καθαρότητα του RNA επαληθεύτηκε με τη χρήση NanoDrop στα 260 nm και η ποιότητα του RNA αξιολογήθηκε με τη χρήση του βιοαναλυτή Agilent 2100 (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA). Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με εκκινητές Taqman όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του *B2M*.

Στα δείγματα ποντικών το RNA εξήχθη από τον αριστερό λοβό του πνεύμονα χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Tri Reagent (TR-118 Invitrogen) και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase (RQ1 RNase-free DNase) πριν από την RT-PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 2 µg ολικού RNA ανά δείγμα σε αντίδραση 20-µl χρησιμοποιώντας την M-MLV RT (Promega). Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανίχνευσης PCR πραγματικού χρόνου BioRad CFX96 Touch™ (Bio-Rad

Laboratories). Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του B2m. Η θερμοκρασία όλων των εκκινητών ήταν 58°C. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τις RT και τις γονιδιωματικές PCR απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητές και αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στην RT και στην γονιδιωματική PCR.		
Ανθρωπός	Περιγραφή	Αλληλουχία- Lot (για taqman)
	m1 SH3PXD2A	Hs00206037
	m1 B2M	Hs00984230
	B2M F	AGATGAGTATGCCTGCCGTG
	B2M R	CTGCTTACATGTCTGGATCCCA
	TKS5 LONG F	CTCCCAAGAAGGACGTGACA
	TKS5 LONG R	CTCTTGGACACTTCCCCAGT
	COL1A1 F	CGAAGACATCCCACCAATCAC
	COL1A1 R	CATCGCACAAACACCTTGCC
Ποντίκι	B2m F	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA
	B2m R	CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTCT
	Tks5 F	GGAGCCCCTCTAAACACTATGT
	Tks5 R	GGCCACCTTCAATAGGAAACTT
	Tks5 long F	TTATCAACGTGACCTGGTCTG
	Tks5 long R	TTCGGATCCTTCTGGCCAC
	Tks5short F	TGGCTCACCGCGTGCTTTCTG
	Tks5 short R	CCTTGCTCTTCAGATGTGCTCACAA
	Tks5 tm1b-d (ex11-12) F	AAGACGAGATCGGCTTCGAG
	Tks5 tm1b-d (ex11-12) R	TCCCTATGATCTCCACCGGA
	Col1a1 F	CTACTACCGGGCCGATGATG
	Col1a1 R	CGATCCAGTACTCTCCGCTC
Εκκινητές γονοτύπησης ποντικών	(A) CAS_R1_Term	TCGTGGTATCGTTATGCGCC
	(B) Sh3pxd2a 270538 F	CTGCCCACCAAGTTCTTTCC
	(C) Sh3pxd2a 270538 R	AAAGCAGATCCCCCAGACAG
	(D) Tm1b prom F	CGGTCGCTACCATTAACAGT
	(E) Floxed LR	ACTGATGGCGAGCTCAGACC
	(F) Sh3pxd2a F	TATCCCTGGAAGCCTTCATCTGG
	(G) Sh3pxd2a R1	GCAGCGTGAAAGCAGATCCC
	(H) Sh3pxd2a R2	GCTGTGCTTTTAGCCACTGCTGC
	Long range 5' arm F	TTGTCGTGGCCTCTCTGAAGCAT
	Long range 5' arm R	TCACCTTCTACCCCAGACCTTGG
	Long range 3' arm F	AAGTATAGAACTTCGTGAGATAACTTCG
	Long range 3' arm R	GCGTTGCAGAGGATCGGTAAGCTG

Βιοπληροφορική και στατιστική.

Αλληλούχιση RNA

Παρασκευάστηκαν έξι δείγματα ολικού RNA και η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε με nanodrop (φασματοφωτόμετρο ND1000 - PEQLAB). Τα δείγματα μετρήθηκαν σε συγκέντρωση 400-500ng/μl και επομένως χρησιμοποιήθηκε 1μl RNA, από κάθε δείγμα, για να προχωρήσει η προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Η ποιότητα του RNA κάθε δείγματος μετρήθηκε στον βιοαναλυτή (Agilent Technologies) με τη χρήση των αντιδραστηρίων και του πρωτοκόλλου Agilent RNA 6000 Nano Kit. Για την προετοιμασία των βιβλιοθηκών ανά δείγμα χρησιμοποιήθηκε το 3' mRNA-Seq Library Prep Kit Protocol for Ion Torrent (QuantSeq-LEXOGEN™ Vienna, Austria) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, η δημιουργία βιβλιοθήκης ξεκίνησε με το oligodT priming που περιέχει τις συμβατές με την Ion Torrent αλληλουχίες συνδέσμου. Χρησιμοποιήθηκαν 5 έως 500ng ανά 5μl RNA από κάθε δείγμα για τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας. Μετά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας απομακρύνθηκαν υπολείμματα RNA και ξεκίνησε η σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας με τυχαίο εκκινητή, ο οποίος περιείχε συμβατές με την Ion Torrent αλληλουχίες συνδέσμου στο 5' άκρο του, και μια πολυμεράση. Στο σημείο αυτό εισήχθησαν γραμμωτοί κώδικες. Η σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας ακολουθήθηκε από ένα στάδιο καθαρισμού με μαγνητικά σφαιρίδια και η προκύπτουσα καθαρισμένη βιβλιοθήκη ενισχύθηκε για 14 κύκλους και καθαρίστηκε εκ νέου. Η ποιότητα και η ποσότητα κάθε βιβλιοθήκης αξιολογήθηκε σε βιοαναλυτή με τη χρήση των αντιδραστηρίων και του πρωτοκόλλου του DNA High Sensitivity Kit (Agilent Technologies). Οι ποσοτικοποιημένες βιβλιοθήκες συγκεντρώθηκαν μαζί σε τελική συγκέντρωση 7pM. Η ομάδα βιβλιοθηκών υποβλήθηκε σε επεξεργασία στο σύστημα Ion Proton One Touch, όπου οι βιβλιοθήκες υποδείχθηκαν και εμπλουτίστηκαν είτε με το Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit (ThermoFisher Scientific) και αλληλουχήθηκαν, με το Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit σε Ion Proton PI™ V2 chips (ThermoFisher Scientific) σύμφωνα με τα διαθέσιμα στο εμπόριο πρωτόκολλα. Η αλληλούχιση 3' RNA πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Ion Proton™ System 13, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον διακομιστή Ion Torrent.

Επανεξέταση δεδομένων Single cell RNA-seq

Τα δεδομένα αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου λήφθηκαν από το GSE122960 και επεξεργάστηκαν με το πακέτο R Seurat (v.3.1.2 & 4.0.5)[176, 177]. Εφαρμόστηκε παρόμοια με την αρχική στρατηγική ανάλυσης δεδομένων. Αρχικά, κάθε δείγμα επεξεργάστηκε μόνο του. Μετά την αφαίρεση των κυττάρων και των γονιδίων χαμηλής ποιότητας, τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν με τη μέθοδο LogNormalize του Seurat και στη συνέχεια επιλέχθηκαν τα κορυφαία μεταβλητά χαρακτηριστικά με τη μέθοδο vst. Τα δεδομένα κατηγοριοποιήθηκαν πριν από την εφαρμογή της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (principal component analysis, PCA) και την επιλογή των κορυφαίων κύριων συνιστωσών. Οι τελευταίες χρησιμοποιήθηκαν για μια ομαδοποίηση κυττάρων με τη βοήθεια γραφήματος Shared Nearest Neighbor (SNN) και τέλος, πραγματοποιήθηκε μείωση της διαστατικότητας t-SNE. Η τυποποίηση των κυττάρων ακολούθησε όσο το δυνατόν περισσότερο αυτή της αρχικής ανάλυσης. Η ενσωμάτωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τον τυπικό αγωγό ενσωμάτωσης Seurat v3 αρχικά για δείγματα εντός κάθε και στη συνέχεια μεταξύ φαινοτύπων (δότης και ΙΙΙ). Τα ολοκληρωμένα δεδομένα επαναδιαβαθμίστηκαν, επαναλήφθηκε η ομαδοποίηση και η μείωση της διαστατικότητας. Οι τύποι κυττάρων που κληρονομήθηκαν από την ανάλυση μεμονωμένων δειγμάτων επικυρώθηκαν και διορθώθηκαν όποτε απαιτήθηκε σύμφωνα με την αρχική δημοσίευση του συνόλου δεδομένων. Τα γονίδια-δείκτες προσδιορίστηκαν με τη χρήση του Wilcoxon Rank Sum test που εφαρμόστηκε στην υποδοχή "RNA" του αντικειμένου ολοκληρωμένων δειγμάτων. Ως κατώτατα όρια διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν απόλυτες φορές μεταβολής τουλάχιστον 1,2 σε φυσική κλίμακα και p-value διορθωμένη κατά Bonferroni μικρότερη από 0,05. Οι υπο-ομάδες ινοβλαστών προσδιορίστηκαν με ανάλυση 0,1 αφού απομονώθηκαν τα κύτταρα ινοβλαστών από το υπόλοιπο σύνολο δεδομένων, επαναπροσδιορίστηκαν σε κλίμακα και βρέθηκαν νέα μεταβλητά χαρακτηριστικά όπως παραπάνω.

Επεξεργασία δεδομένων

Τα αρχεία FASTQ της Quant-Seq (Lexogen) που προέκυψαν από τη διαδικασία αλληλούχισης Ion Proton επεξεργάστηκαν με το Trim Galore (v.0.6.51) για την αφαίρεση των άκρων ανάγνωσης χαμηλής ποιότητας με βαθμολογία Phred 20. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε διαδικασία ευθυγράμμισης δύο βημάτων. Οι προ-επεξεργασμένες αναγνώσεις ευθυγραμμίστηκαν με το γονιδίωμα αναφοράς GRCm38 (Ensembl) με το HISAT2 (v.2.2.1) και, στη συνέχεια, οι αναγνώσεις που παρέμειναν

χωρίς χαρτογράφηση υποβλήθηκαν σε δεύτερο γύρο ευθυγράμμισης με τη χρήση του BOWTIE2 (v.2.3.5.1).

Υπολογιστική ανάλυση

Η ανάλυση των αρχείων BAM που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με το metaseqR2 (v.1.9.2)[178]. Εν συντομία, τα ακατέργαστα αρχεία BAM, ένα ανά δείγμα, συνοψίστηκαν σε έναν πίνακα καταμέτρησης αναγνώσεων 3' UTR, χρησιμοποιώντας το πακέτο GenomicRanges (v1.44.0)[179] και το Ensembl mouse genome mm10. Για την καταμέτρηση των UTR λήφθηκε υπόψη ολόκληρη η περιοχή 3' UTR, με ελάχιστο μήκος 300 ζεύγη βάσεων και 50 ζεύγη βάσεων για να πλαισιώσει το άκρο UTR. Στον προκύπτοντα πίνακα καταμέτρησης αναγνώσεων, κάθε γραμμή αντιπροσώπευε μια περιοχή 3' UTR και κάθε στήλη ένα δείγμα Quant-Seq. Στη συνέχεια, οι αναγνώσεις συνοψίστηκαν ανά γονίδιο και ο επιστρεφόμενος πίνακας αριθμού γονιδίων κανονικοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου EDA-Seq (v.2.26.1)[180] αφού αφαιρέθηκαν τα γονίδια που είχαν μηδενικές αναγνώσεις σε όλα τα δείγματα. Μετά την κανονικοποίηση, οι μετρήσεις των γονιδίων φιλτράρονταν για πιθανά ψευδή αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες επιλογές φιλτραρίσματος γονιδίων. Ο φιλτραρισμένος πίνακας μετρήσεων γονιδίων υποβλήθηκε σε ανάλυση διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιώντας διαδοχικά και τις εννέα επιμέρους μεθόδους στατιστικής ανάλυσης που υποστηρίζονται από το metaseqR2. Στη συνέχεια, οι p-τιμές τους συνδυάστηκαν με τον αλγόριθμο PANDORA για να ληφθούν υπόψη, μεταξύ άλλων, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν. Ως κατώτατα όρια διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν διορθωμένες κατά Benjamini-Hochberg τιμές p-value του PANDORA μικρότερες από 0,05 και απόλυτη αναδιπλούμενη μεταβολή τουλάχιστον 1,2. Οι κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης που απαιτούνται για κάθε heatmap ανακτήθηκαν και τυποποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα. Η ιεραρχική ομαδοποίηση των δειγμάτων και των γονιδίων βασίζεται στην υπολογιζόμενη ευκλείδεια απόσταση

Ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διαφορικής έκφρασης ταξινομήθηκαν κατά φθίνουσα πολλαπλή μεταβολή και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (GSEA) έναντι όρων της γονιδιακής οντολογίας[181] χρησιμοποιώντας το πακέτο ανάλυσης clusterProfiler (v.4.0.5)[182].

Χρησιμοποιήθηκε το υπογεγραμμένο κανονικοποιημένο σκορ εμπλουτισμού (NES) για την απομόνωση της κορυφής των σημαντικά εμπλουτισμένων επαγόμενων (NES > 0) και κατασταλμένων (NES < 0) όρων (προσαρμοσμένη τιμή $p < 0,05$)

Text mining

Η βασική γραμμή δεδομένων PubMed 2022 μεταφορτώθηκε από τον αντίστοιχο ιστότοπο FTP. Το πακέτο XML R (v.3.99.0.8) χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός κορμού με βάση την περίληψη, ο οποίος στη συνέχεια αναζητήθηκε με το πακέτο rentrez R (v.1.2.3) για *IPF[All Fields] OR ("pulmonary fibrosis"[MeSH Terms] OR "pulmonary fibrosis"[All Fields]) OR ("lung diseases, interstitial"[MeSH Terms] OR "interstitial lung diseases"[All Fields] OR "interstitial lung disease"[All Fields])* όπου περιείχε στοιχεία. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ατομοποίηση των ανθρώπινων γονιδιακών συμβόλων HGNC με τη χρήση του πακέτου pubmed.mineR[183] (v.1.0.19) και τα ανακτηθέντα γονίδια διασταυρώθηκαν με τα ανθρώπινα ομόλογα των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων Quant-seq των ποντικών. Η χαρτογράφηση των χαρακτηριστικών ομόλογων προέκυψε μέσω του πακέτου biomaRt R[184] (v. 2.48.3).

Ανάλυση παραγόντων μεταγραφής

Η ανάλυση παραγόντων μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου DoRothEA R[185] (v.1.4.2). Εξετάστηκαν όλοι οι ρυθμιστές μεταγραφικών παραγόντων-στόχων των ποντικών για τους υψηλής ποιότητας ("A" επίπεδο εμπιστοσύνης) στόχους που περιλάμβαναν οποιοδήποτε από τα διαφοροποιημένα εκφραζόμενα γονίδια Quant-seq. Το επακόλουθο φιλτράρισμα διατήρησε εκείνα τα ζεύγη αλληλεπίδρασης όπου και οι δύο αλληλεπιδρώντες βρέθηκαν σημαντικά απορρυθμισμένοι στο πείραμα μαζικής αλληλούχισης. Με βάση τον τρόπο ρύθμισης (mor) όπως περιγράφεται στη βάση δεδομένων DoRothEA και τα δεδομένα διαφορετικής έκφρασης που προέκυψαν από την Quant-seq, διατηρήθηκαν ζεύγη με την ίδια ή την αντίθετη κατεύθυνση απορρύθμισης σε περιπτώσεις ενεργοποίησης ή καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα, αντίστοιχα.

Ανάλυση CMap/LINCS

Η αναζήτηση στη βάση δεδομένων CMap/LINCS (<https://clue.io/query>) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των 150 κορυφαίων γονιδίων που ρυθμίζονται προς τα πάνω και των 150 κορυφαίων γονιδίων που ρυθμίζονται προς τα κάτω, ταξινομημένα

με βάση τη διπλή μεταβολή. Το 150 αποτελούσε τον μέγιστο αριθμό γονιδίων που υποστηρίζονταν από την πλατφόρμα. Διερευνήθηκαν δεδομένα γονιδιακής έκφρασης L1000 από το Expanded CMap LINCS Resource 2020 (τελευταία ενημέρωση 23/11/2021). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πακέτο R cmapR (v.1.4.0). Οι διορθωμένες με FDR τιμές p-values μικρότερες από 0,05 χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των υπογραφών που είχαν στατιστικά σημαντική σύνδεση με την παρεχόμενη και η υπογεγραμμένη κανονικοποιημένη βαθμολογία συνδεσιμότητας (NCS) χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση μεταξύ παρόμοιων και αντίθετων υπογραφών. Έμφαση δόθηκε σε ενώσεις (trt_cp) και πεπτίδια (trt_lig) με ήδη γνωστό μηχανισμό δράσης και γνωστούς στόχους. Απορρίφθηκαν σύνολα δεδομένων που περιλάμβαναν μόνο μία επανάληψη ή/και διάρκεια θεραπείας διαφορετική από 24 ώρες.

Πίνακες

Πίνακας 1. Έκφραση mRNA *TKS5* σε ομάδες ασθενών με ΙΠΙ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Όλα τα κανονικοποιημένα και επανεξεταζόμενα σύνολα δεδομένων προέρχονται από το Fibromine (Fanidis, Moulos et al. 2021).

PMID	Samples	GEO dataset	Platform	IPF/Ctrl	FC	FDR
19363140	Lungs of patients collected during pulmonary transplant compared with control ones derived from cancer free lung margins.	GSE10667	GPL4133	21/14	1.29	3.43E-02
30111332	Fresh frozen lung samples from IPF patients were compared to normal lung tissue flanking pulmonary cancer areas.	GSE110147	GPL6244	22/11	-1.23	1.95E-03
21241464	IPF lung tissue originated from LTRC were assessed in comparison to healthy lung tissue of cancer patients and a lung transplant.	GSE21369	GPL570	11/6	2.09	4.81E-02
21974901	IPF lung samples transcriptional profile was compared to that of control samples from lung volume reduction during transplantation.	GSE24206	GPL570	8/6	2.10	1.08E-02
26560100	IPF lung samples were compared to healthy ones collected during an exploratory surgery.	GSE47460	GPL6480	28/15	1.23	3.69E-03
26560100		GSE47460	GPL14550	84/75	1.31	1.54E-20
21360508	Microarray data from IPF patients were juxtaposed to data from control individuals.	GSE48149	GPL16221	12/5	1.56	2.79E-03
25217476	Differences between IPF and control transcriptomic profile were examined based on lung biopsies or explants.	GSE53845	GPL6480	39/7	1.28	1.24E-02
28230051	LTRC IPF and control samples were examined to identify transcriptional differences between disease and steady state conditions.	GSE92592	GPL11154	19/18	1.78	4.24E-06
29329637	Scarred regions from explanted lungs were compared to healthy control lung tissues.	GSE99621	GPL16791	8/8	1.52	3.70E-03

PMID: PubMed ID; GEO: gene expression database - datasets are hyperlinked; Platform: the hyperlinked numbers indicate the profiling technology; FC: fold change; FDR: false discovery rate; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; LTRC: Lung Tissue Research Consortium.

Πίνακας 2. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των δοτών πνευμονικού ιστού.

Characteristic	IPF (n=20)	Control (n=9)	COPD (n=19)
Age (yr)(Mean ± SD)	64.8 ± 8.3	68.8 ± 13.9	67.9 ± 14.1
Gender, n (%)			
Males	13 (65%)	4 (44.4)	14 (73.6%)
Females	7 (35%)	50 (55.6)	5 (26.4%)
Race, n (%)			
White	19 (95%)	9 (100%)	19 (100%)
Hispanic	1 (5%)	0	0
Pulmonary function tests (Mean ± SD)			
FVC%	66 ± 14	94 ± 16	76.4 ± 14.2
DLCO%	46 ± 15	86 ± 13	58.9 ± 21.2
FEV1%	73 ± 14	93 ± 11	53.3 ± 21.2

*FVC%: Forced vital capacity percent predicted; DLCO%: Carbon monoxide diffusing capacity percent predicted; FEV1% Forced expiratory volume in 1 second percent predicted.

Πίνακας 3. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των δοτών πνευμονικών ινοβλαστών.

Characteristic	IPF (n=5)	Control (n=5)
Age (yr)(Mean ± SD)	73.8 ± 20	64.8 ± 10
Gender, n (%)		
Males	4 (57%)	3 (60%)
Females	3 (43%)	2 (40%)
Pulmonary function tests (Mean ± SD)		
DLCO%	48 ± 11	52 ± 12
FEV1/FVC%	96 ± 7**	72 ± 10
Podosomes		
% Cells with podosomes/area	52 ± 12****	10.4 ± 4
Podosomes/cell	3 ± 1****	1 ± 1

*FVC%: Forced vital capacity percent predicted, DLCO%: Carbon monoxide diffusing capacity percent predicted, FEV1% Forced expiratory volume in 1 second percent predicted. Statistical significance was assessed between IPF and control groups with unpaired t-test followed by Welch's correction; **/**** denote $p < 0.01/0.0001$.

Πίνακας 4, 5. Απορρυθμισμένα γονίδια και μονοπάτια σε Tks5^{+/-} ΠΙ μετά την κατεργασία με TGFβ.

<mailto:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.25.522705v1.supplementary-material>

Πίνακας 6. Ενώσεις με παρόμοιο μεταγραφικό προφίλ με εκείνο των ινοβλαστών πνεύμονα Tks5^{+/-} που διεγείρονται από τον TGFβ.

NCS	Name	Main Target	Targets	Cell line	PMID	IPF Relevance
1.760	GSK-1070916	Aurora kinase	AURKB AURKC AURKA CYP2D6 CYP3A4	BT20	32761869	Inhibition of Aurora Kinase B attenuates fibroblast activation and pulmonary fibrosis
1.733	PSB-069	NTPDase	ENTPD1 ENTPD2 ENTPD3	MCF7	-	-
1.716	SANT-2	Smoothed receptor	SMO DHH HPTCH1 SHH	HA1E	-	-
1.697	entinostat	HDAC	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC9	YAPC	28315487	Reversion of TGFβ1-induced, XPLN/SPARK-mediated extracellular matrix turnover in human foetal lung fibroblast cell line
1.695	pazopanib	VEGFR KIT PDGFR	KDR KIT FLT1 FLT4 PDGFRB PDGFRA BR AF CYP2B6 CYP2C8 CYP2E1 DDR2 CSF1R FGF1 FGFR1 FGFR3 ITK SH2B3	MCF10A	21992121 27279371	Tyrosine kinase inhibitor attenuated worsening of lung function, maintained quality of life and reduced acute exacerbations of IPF patients PDGFR inhibition attenuated enhanced differentiation and proliferation of myofibroblasts
1.683	crizotinib	ALK	ALK MET CYP2B6 CYP3A5 MST1R ROS1	TMD8	15563636	PDGFB1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor
1.671	emetine	Protein synthesis	RPS2	A375	18503048	Increase of Sulf1 mRNA levels, a potential negative regulator of TGFβ-1 induced fibrogenesis, through inhibition of protein translation
1.667	TAK-875	Insulin	FFAR1 INS	A375	-	-
1.664	filgotinib	JAK	JAK1 JAK2 JAK3 TYK2	XC.L10	29440315	Block of endothelial to mesenchymal transition and artery smooth muscle cell to myofibroblast transition via JAK inhibition thus reducing bleomycin-induced pulmonary fibrosis
1.664	arofylline	Phosphodiesterase	PDE4A PDE4B PDE4C PDE4D	PC3	-	-
1.663	raloxifene	Estrogen receptor	ESR1 ESR2 ACVRL1 ENG	HT29	35841004	Reduction of systemic sclerosis iPSC-derived fibroblast proliferation, production

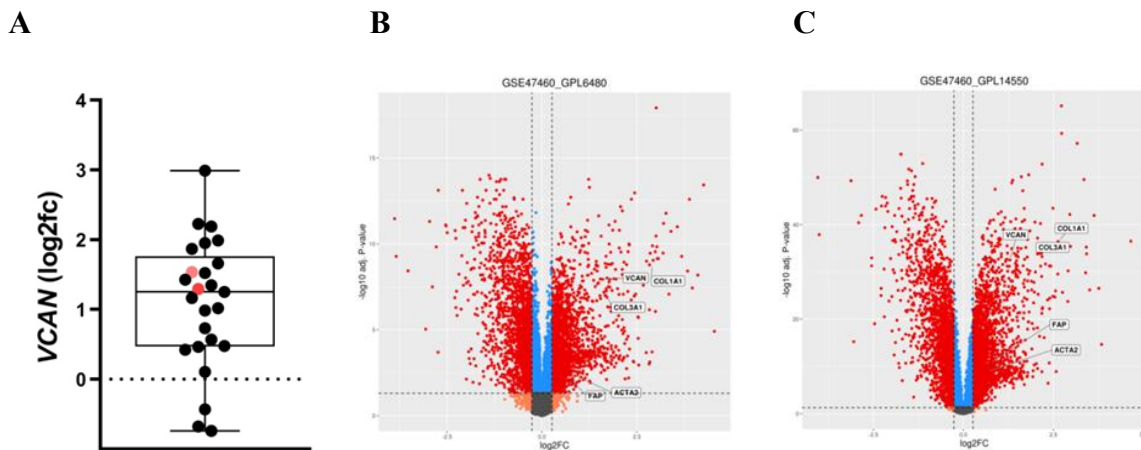
						of extracellular matrix and skin fibrosis in human organoids and mouse model.
1.661	WH-4023	Src	LCK/SRC/ABL1	MCF10A	35998281	Saracatinib, a Selective Src Kinase Inhibitor, Blocks Fibrotic Responses in Preclinical Models of Pulmonary Fibrosis
1.661	brefeldin-a	Protein synthesis BIG1	ARFGEF1 ARFGEF2 GBF1 ARF1 CYTH2	HCT116	8479043	Inhibition of intracellular degradation and thus secretion of collagen in normal human fetal lung fibroblasts
1.655	TGX-221	PI3K	PIK3CB PIK3CD	MCF10A	21984893	PI3K inhibition attenuates myofibroblast differentiation in the human lungs
1.654	motesanib	KIT PDGFR VEGFR	FLT1 FLT4 KDR KIT PDGFR RET	MCF10A	-	-

NCS: Normalized connectivity score; PMID: PubMed ID; IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis

2.2 Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου Versican στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ύψωσης

2.2.1 *In silico* μελέτη των επιπέδων έκφρασης σε ασθενείς με ΙΠΠ

Για να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή του *VERSICAN* (*VCAN*) στην ΙΠΠ, η έκφραση του *VCAN* διερευνήθηκε σε σύνολα μεταγραφικών δεδομένων της ΙΠΠ, τα οποία προέρχονται από το Fibromine (<http://www.fibromine.com/Fibromine/>) μια βάση δεδομένων για την ανακάλυψη γονιδίων στόχων της ΙΠΠ. Η έκφραση του *VCAN* βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην πλειοψηφία του συνόλου δεδομένων που διερευνούν την έκφραση γονιδίων στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΠ έναντι ατόμων ελέγχου (Εικόνα. 56A), συμπεριλαμβανομένων δύο από τα μεγαλύτερα (Εικόνα 56B, C).

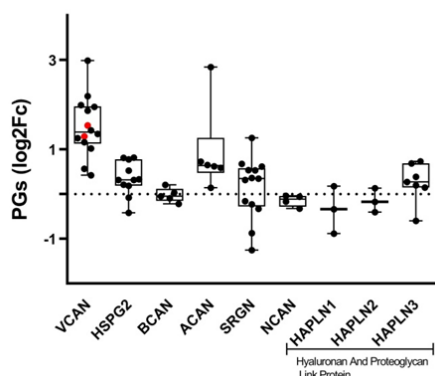


Εικόνα 56: *In silico* ανάλυση επιπέδων έκφρασης *VCAN* σε ασθενείς με ΙΠΠ. Α) Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης του *VCAN* στα σύνολα δεδομένων του Fibromine. Β-Γ) Αντιπροσωπευτικά Volcano plot στα οποία απεικονίζεται η έκφραση του *VCAN* καθώς και η έκφραση γνωστών γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

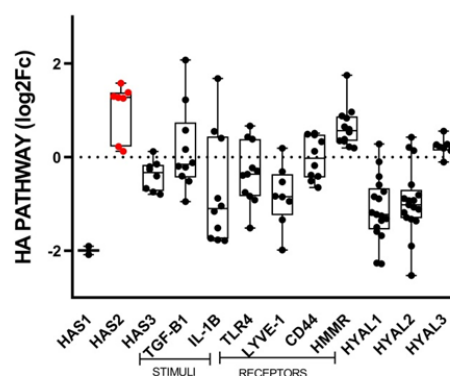
Με την χρήση του ίδιου διαδικτυακού εργαλείου εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης και άλλων πρωτεογλυκανών καθώς επίσης και η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σύνθεσης και αποικοδόμησης του υαλουρονικού οξέος. Βρέθηκε ότι το *VCAN* είναι η πιο ευρέως εκφραζόμενη πρωτεογλυκάνη στον πνεύμονα

ασθενών με ΙΙΙ (Εικόνα 57Α) και ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν απορυθμισμένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι του υαλουρονικού στα ίδια σύνολα δεδομένων (Εικόνα 57Β).

A



B

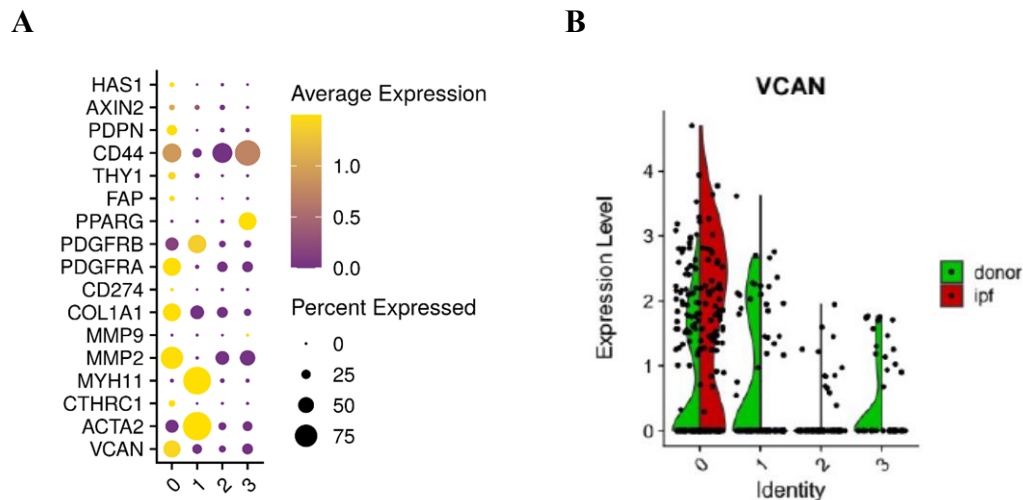


Εικόνα 57: In silico ανάλυση επιπέδων έκφρασης πρωτεογλυκανών A) και γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σύνθεσης και αποικοδόμησης του υαλουρονικού B) σε ασθενείς με ΙΙΙ.

Για την εύρεση του κυτταρικού τύπου των πνευμόνων που εκφράζουν το *VCAN*, χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο UCSC cell browser (<https://www.nupulmonary.org/resources/>) το οποίο περιλαμβάνει δεδομένα από ανάλυση single-cell RNA-Sequencing που προέρχονται από 8 ασθενείς με ΙΙΙ και 8 υγιείς δότες. Από το σύνολο των κυτταρικών τύπων του πνεύμονα το *VCAN* εκφράζεται κυρίως από μακροφάγα πνευμονικούς ινοβλάστες μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα στους πνεύμονες ασθενών με ΙΙΙ.

Εστιάζοντας παραπάνω στους ινοβλάστες, που αποτελούν βασικά κύτταρα στην εξέλιξη της ΙΙΙ, πραγματοποιήθηκε μετά ανάλυση των διαθέσιμων δεδομένων με σκοπό την εύρεση του ειδικού κυτταρικού υποσυνόλου των ινοβλαστών που εκφράζουν το γονίδιο. Από την ανάλυση προέκυψαν 4 επιμέρους υποκατηγορίες ινοβλαστών (clusters), το καθένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Από αυτά το cluster 0 είναι ο υποπληθυσμός ινοβλαστών που εκφράζει κολλαγόνο ενώ το cluster 1 είναι ο πληθυσμός που εκφράζει την α ακτίνη λείου μυός. Το *VCAN* βρέθηκε να εκφράζεται κυρίως στο cluster 0 που εκφράζει κολλαγόνο και γονίδια όπως η *MMP2*, *PDGFRA*, *CD44* (Εικόνα 58Α). Το πιο σημαντικό εύρημα που προκύπτει από αυτήν την ανάλυση είναι ότι στο συγκεκριμένο

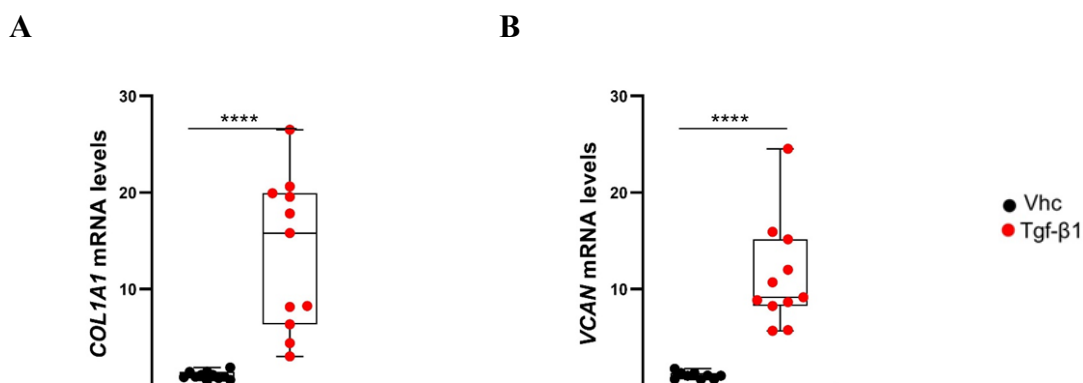
cluster η έκφραση του *VCAN* εντοπίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με ΙΠΙ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Εικόνα 58B).



Εικόνα 58: Έκφραση του *Vcan* στους υποπληθυσμούς των ινοβλαστών A) Σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους υποπληθυσμών των ινοβλαστών, όπως προκύπτουν από μετά-ανάλυση των διαθέσιμων δεδομένων. B) Στο cluster 0, στο οποίο εκφράζεται κυρίως το *VCAN*, η έκφραση εντοπίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με ΙΠΙ.

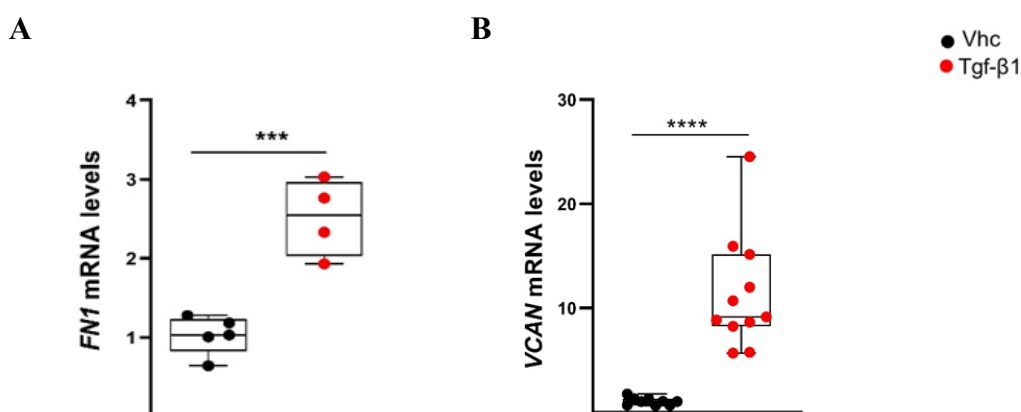
2.2.2 *In vitro* μελέτη των επιπέδων έκφρασης σε σειρές πνευμονικών ινοβλαστών

Για την περαιτέρω εξέταση της έκφρασης του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε το *in vitro* μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης, στο οποίο πραγματοποιείται καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία του προ-ινωτικού παράγοντα TGFβ. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς ανθρώπινοι πνευμονικοί ινοβλάστες, οι οποίοι επωαστήκαν για 24 ώρες με 10ng/ml TGFβ. Μετά την απομόνωση του RNA, εξετάστηκαν τα επίπεδα mRNA έκφρασης του ινωτικού γονιδίου *COL1A1* τα οποία, όπως αναμένεται, αυξάνονται μετά την επώαση με TGFβ. Βρέθηκε ότι η διέγερση με TGFβ αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του *VCAN* σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες, (Εικόνα 59).



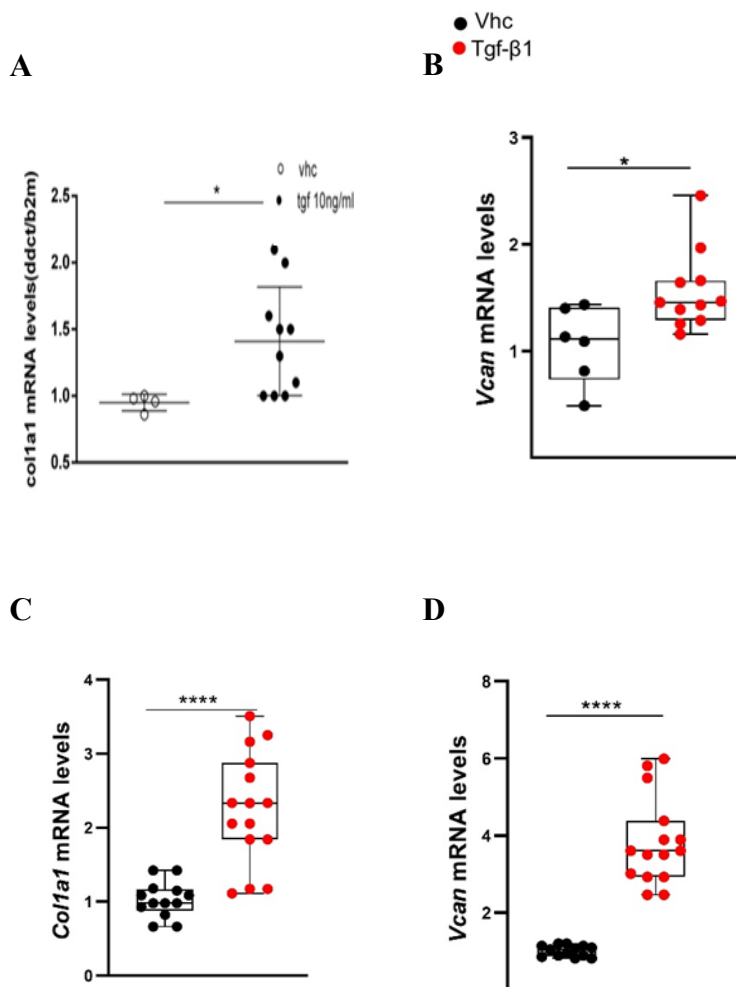
Εικόνα 59: Αυξημένη έκφραση του *VCAN* σε πρωτογενείς ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες, μετά την επώαση με *TGFβ*. Α) Αυξημένα επίπεδα mRNA έκφρασης του ινωτικού γονιδίου *COL1A1* μετά την επώαση με *TGFβ*. Β) Αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *VCAN*. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MRC5. Τα κύτταρα MRC-5 είναι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες του πνεύμονα. Πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα και σαν γονίδιο αναφοράς της ίνωσης χρησιμοποιήθηκε η *FN1*, το οποίο επίσης αυξάνεται παρουσία TGFβ. Όπως και στους πρωτογενείς ινοβλάστες, έτσι και στην κυτταρική σειρά ότι ο TGFβ επάγει την έκφραση του *VCAN* (Εικόνα 60).



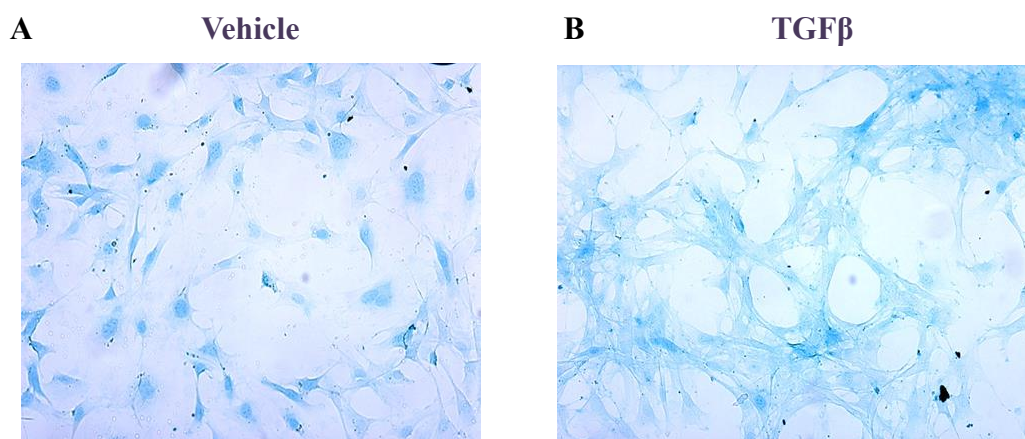
Εικόνα 60: Αυξημένη έκφραση του *VCAN* στην κυτταρική σειρά MRC5, μετά την επώαση με *TGFβ*. Α) Αυξημένα επίπεδα mRNA έκφρασης του ινωτικού γονιδίου *FN1* μετά την επώαση με *TGFβ*. Β) Αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *VCAN*.

Η έκφραση του *Vcan* μελετήθηκε και σε πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών για να επαληθευτούν τα παραπάνω ευρήματα. Έτσι πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα τόσο σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών όσο και σε κυτταρική σειρά εμβρυϊκών πνευμονικών ινοβλαστών (3T3). Όπως και στους ανθρώπινους, έτσι και στους πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών, ο TGFβ αυξάνει την έκφραση του *Vcan* σε επίπεδο mRNA (Εικόνα 61).



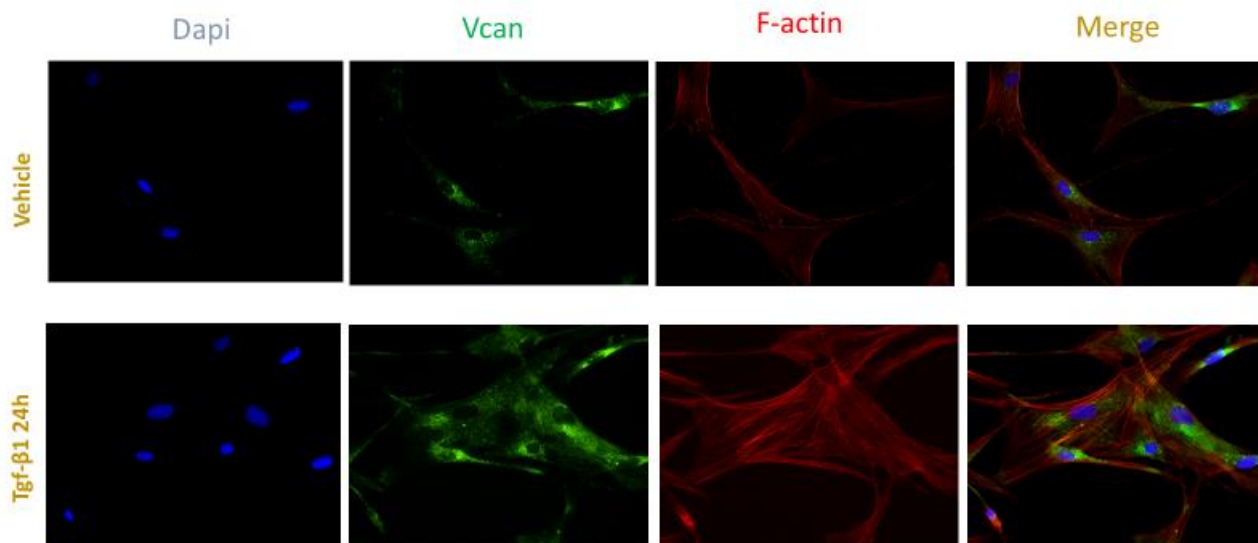
Εικόνα 61: Αυξημένη έκφραση του *Vcan* σε πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών, μετά την επώαση με TGFβ. A,C) Αυξημένα επίπεδα mRNA έκφρασης του ινωτικού γονιδίου *Col1a1* μετά την επώαση με TGFβ, σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών(A) και στην κυτταρική σειρά εμβρυϊκών πνευμονικών ινοβλαστών 3T3. B,D) Αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Vcan* σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών(C) και στην κυτταρική σειρά εμβρυϊκών πνευμονικών ινοβλαστών 3T3 (D).

Στην κυτταρική σειρά 3T3 πραγματοποιήθηκε χρώση Alcian Blue παρουσία TGFβ, η οποία ανιχνεύει την ύπαρξη πρωτεογλυκανών και γλυκοζαμινογλυκανών. Η επώαση με TGFβ αυξάνει την παρουσία πρωτεογλυκανών στους 3T3 ινοβλάστες. Μάλιστα, ο TGFβ φαίνεται να επηρεάζει την θέση τους και από τον πυρήνα του κυττάρου που εντοπίζονται σε φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 62Α, σκούρο μπλε) επάγει την μετατόπιση τους στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 62Β).



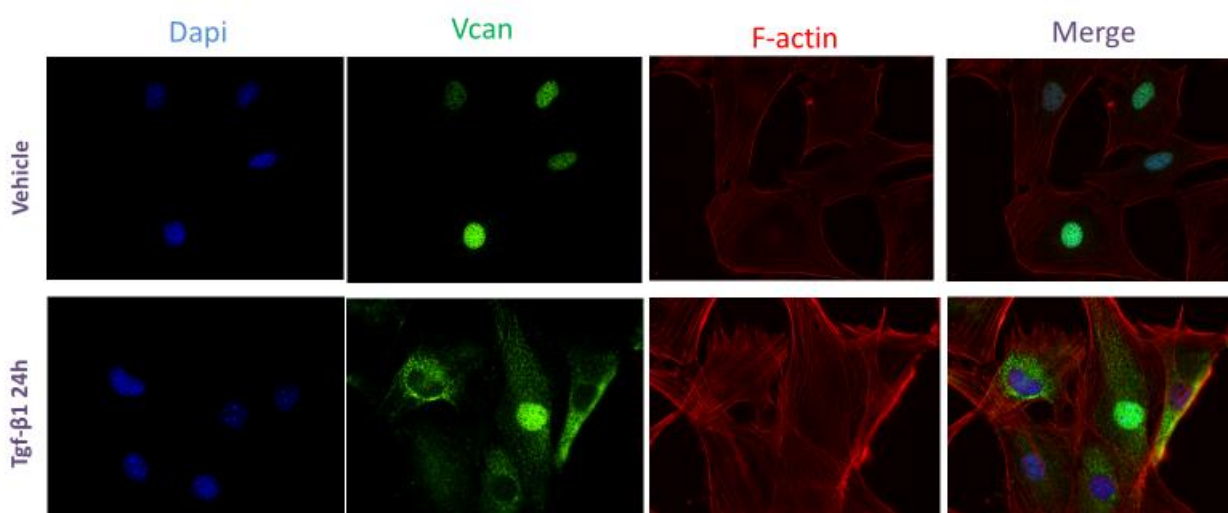
Εικόνα 62: Ο TGFβ επάγει την έκφραση των πρωτεογλυκανών σε εμβρυϊκούς πνευμονικούς ινοβλάστες. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση Alcian blue σε κύτταρα 3T3 χωρίς την παρουσία παράγοντα (Α) και μετά από επώαση με TGFβ (Β).

Μετά την μελέτη του *VCAN* σε επίπεδο RNA εξετάστηκε και η έκφραση του σε επίπεδο πρωτεΐνης με την χρήση ανοσοφθορισμού. Πραγματοποιήθηκε χρώση με αντίσωμα έναντι της *VCAN* σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες. Επιπλέον εξετάστηκε και ο κυτταροσκελετός των ινοβλαστών με χρώση για την F-ακτίνη. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 63 ο TGFβ επάγει την έκφραση της *VCAN* και σε επίπεδο πρωτεΐνης.



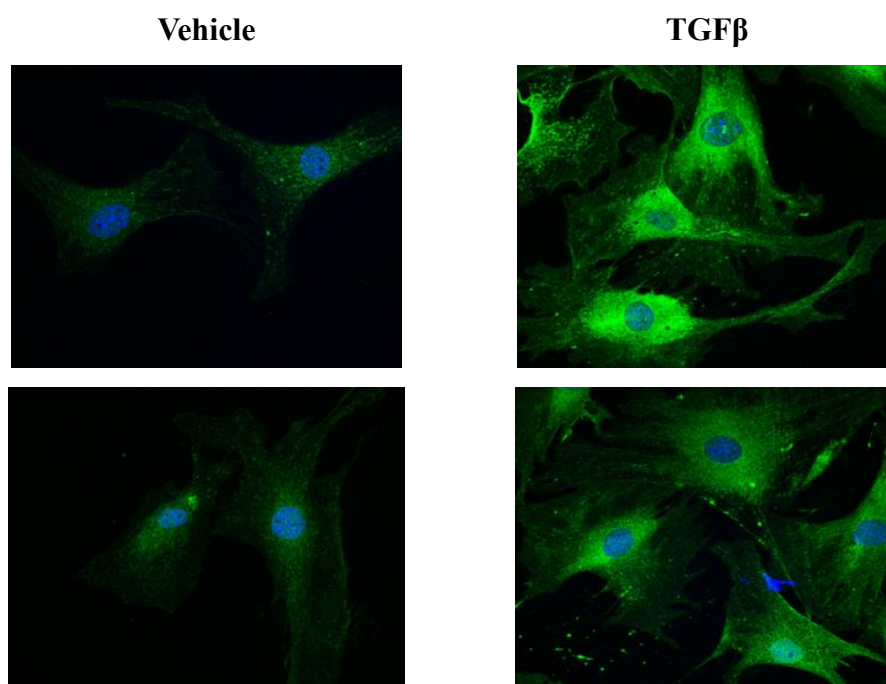
Εικόνα 63: Αυξημένη έκφραση του VCAN σε πρωτογενείς ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες, μετά την επώαση με TGFβ. Πραγματοποιήθηκε διπλή χρώση ανοσοφθορισμού, μετά την διέγερση με TGFβ. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, στις οποίες με μπλε χρώμα φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων, με πράσινο η πρωτείνη VCAN και με κόκκινο ο σκελετός του κυττάρου.

Όσον αφορά τους πνευμονικούς ινοβλάστες των ποντικών, διαπιστώθηκε ότι ο TGFβ, επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης τόσο στην κυτταρική σειρά 3T3 (Εικόνα 64), όσο και σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες (Εικόνα 65).



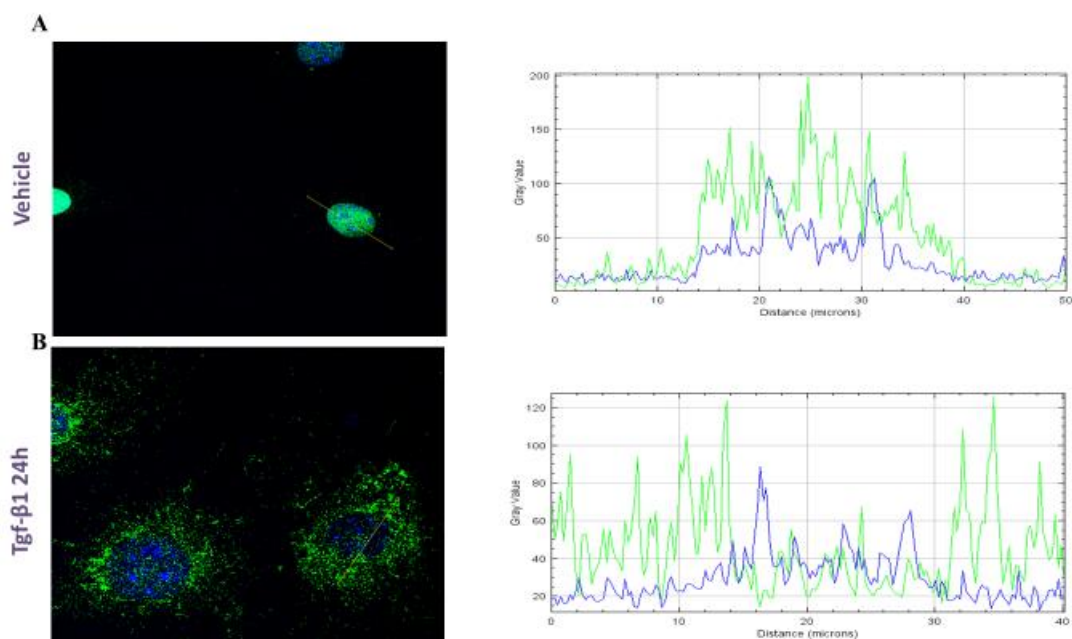
Εικόνα 64: Αυξημένη έκφραση του Vcan σε πνευμονικούς εμβρυϊκούς ινοβλάστες, μετά την επώαση με TGFβ. Πραγματοποιήθηκε διπλή χρώση ανοσοφθορισμού, μετά

την διέγερση με TGFβ. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, στις οποίες με μπλε χρώμα φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων, με πράσινο η πρωτείνη VCAN και με κόκκινο ο σκελετός του κυττάρου.



Εικόνα 65: Αυξημένη έκφραση του Vcan σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες, μετά την επώαση με TGFβ. Πραγματοποιήθηκε διπλή χρώση ανοσοφθορισμού, μετά την διέγερση με TGFβ. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες, στις οποίες με μπλε χρώμα φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων και με πράσινο η πρωτείνη VCAN.

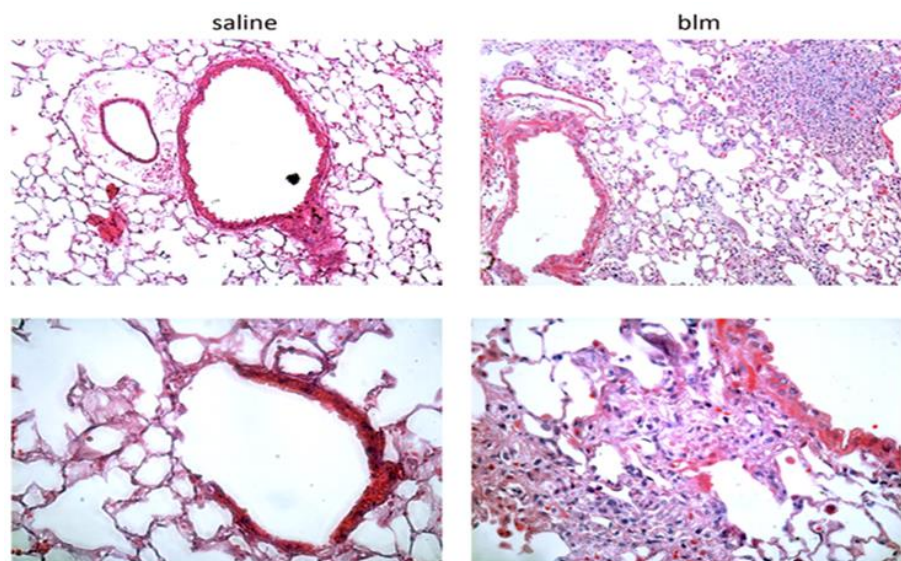
Όπως και με την χρώση Alcian Blue, έτσι και στον ανοσοφθορισμό, ο TGFβ εκτός από την ικανότητά του να επάγει την έκφραση του Vcan, επάγει επίσης τη μετατόπιση της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 60-70%. Η ανάλυση K-curve, τόσο σε μη διεγερμένους ινοβλάστες, όσο και σε ινοβλάστες μετά την διέγερση με TGFβ, έδειξε ότι ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες η μέγιστη ένταση σήματος τόσο του πυρήνα όσο και της πρωτεΐνης ταυτίζονται (Εικόνα 66Α), μετά την διέγερση με τον TGFβ η πρωτεΐνη μετατοπίζεται και το μέγιστο σήμα της ανιχνεύεται σε περιοχές εκτός του πυρήνα (Εικόνα 66Β), Αυτή η πρωτότυπη απόκριση του TGFβ, παρατηρήθηκε σε ποντίκια, κυρίως σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες, και πιθανόν εμπλέκεται σε κυτταρικές βιολογικές διεργασίες απαραίτητες για την ανάπτυξη.



Εικόνα 66: Ο TGFβ επάγει την μετατόπιση της πρωτεΐνης Vcan από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Διαγράμματα από την ανάλυση K-curve που πραγματοποιήθηκε στις υποδεικνυόμενες φωτογραφίες που προέκυψαν από χρώση ανοσοφθορισμού σε 3T3 κύτταρα μετά από διέγερση με διαλύτη (A) ή TGFβ (B).

2.2.3 In vivo μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου Vcan σε ποντίκια άγριου τύπου μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

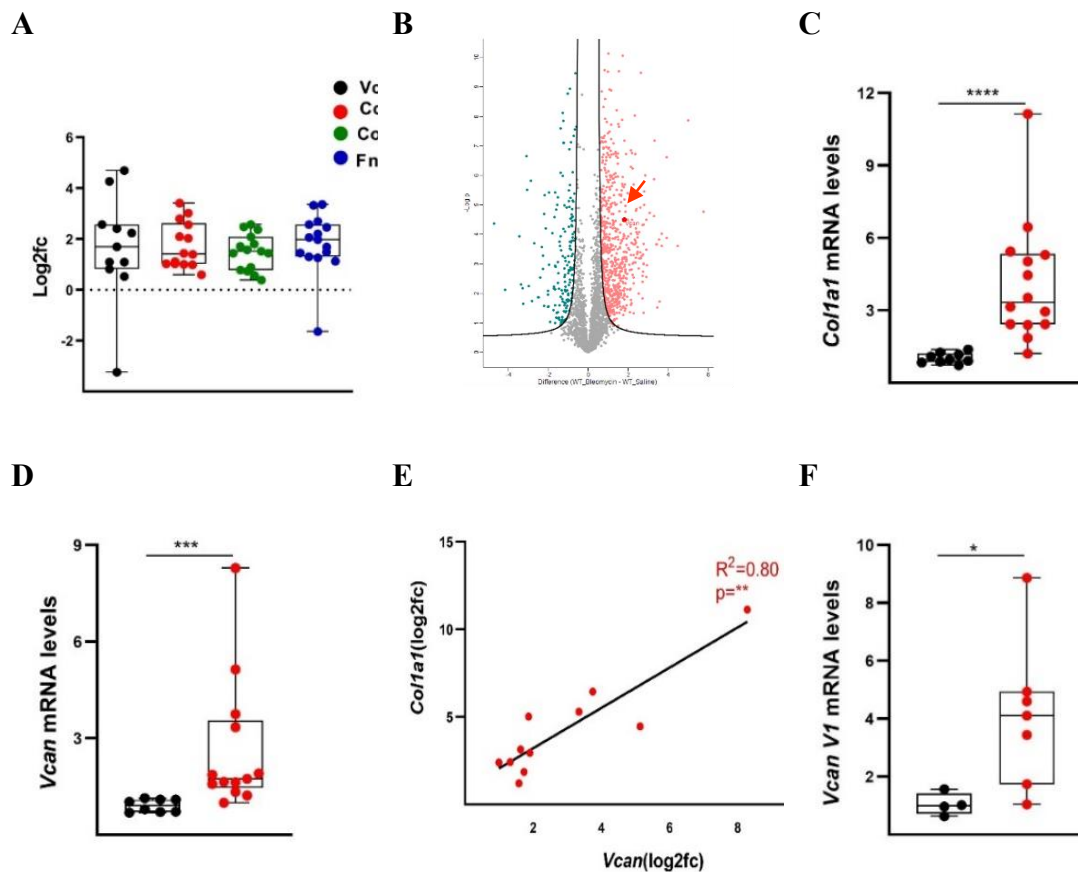
Για να εξετάσουμε την πιθανή συμμετοχή του Vcan στη ρύθμιση των παθογόνων μονοπατιών κατά την ίνωση, επιδιώξαμε να εξετάσουμε τα επίπεδα έκφρασης του στους πνεύμονες ποντικών μετά την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Η χρώση Alcian Blue σε ινωτικούς πνεύμονες έδειξε ότι μετά την χορήγησης μπλεομυκίνης, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεογλυκανών αυξάνονται και εντοπίζονται κυρίως στο βρογχικό επιθήλιο και τις ινωτικές περιοχές του πνεύμονα (Εικόνα 67).



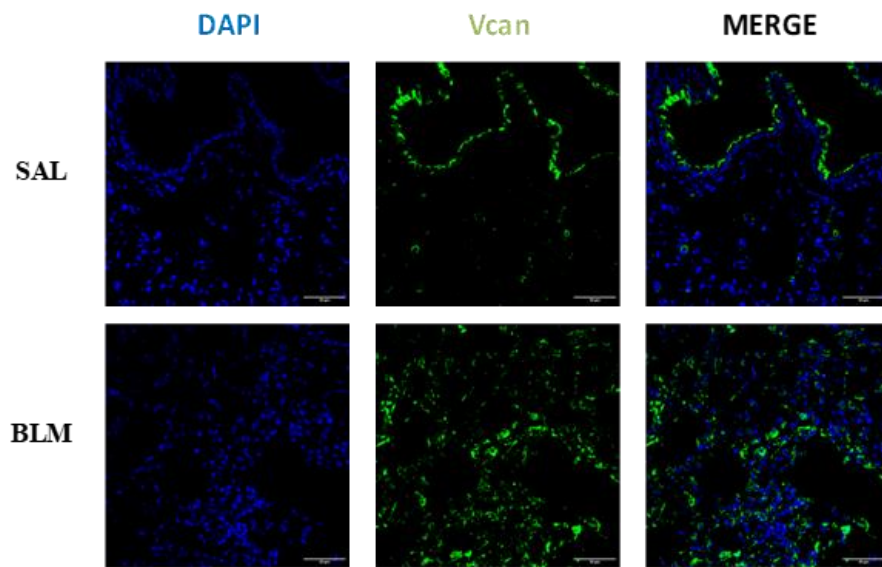
Εικόνα 67: Αυξημένη εναπόθεση πρωτεογλυκανών στο βρογχικό επιθήλιο και τις ινωτικές περιοχές των πνευμόνων ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες πνευμόνων μετά από χρώση Alcian Blue, μεγέθυνσης 20x (πρώτη σειρά) και 40x(δεύτερη σειρά) που προέρχονται από υγιή ποντίκια και από ποντίκια με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση.

Για να διερευνήσουμε *in silico* την έκφραση του *Vcan* στον πνευμονικό ιστό των ποντικών μετά τη χορήγηση μπλεομυκίνης, χρησιμοποιήθηκε το Fibromine. Η έκφραση του *Vcan*, καθώς και η έκφραση γνωστών ινωτικών γονιδίων, βρέθηκε αυξημένη (Εικόνα. 68A) σε σύνολα δεδομένων που προέρχονταν από ποντίκια με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Για την επιβεβαίωση των *in silico* αποτελεσμάτων, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *Vcan* σε ποντίκια άγριου τύπου ηλικίας 8-10 εβδομάδων μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση φασματομετρίας μάζας, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης *Vcan* αυξάνονται στους ινωτικούς πνεύμονες (Εικόνα 68B). Πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τους πνεύμονες φυσιολογικών και ινωτικών ποντικών στους οποίους, όπως αναμένεται, τα επίπεδα έκφρασης του *Colla1* ανιχνεύονται αυξημένα στους ινωτικούς πνεύμονες (Εικόνα 68C) Στα ίδια ποντίκια, τα επίπεδα mRNA του *Vcan*, ανιχνεύονται αυξημένα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. (Εικόνα. 68D), και συσχετίζονται με την έκφραση mRNA του *Colla1* (Εικόνα 68E). Επιπλέον, η κύρια ισομορφή V1 βρέθηκε επίσης αυξημένη σε επίπεδο mRNA (Εικόνα 68F) στους ινωτικούς πνεύμονες, μετά τη χορήγηση BLM.

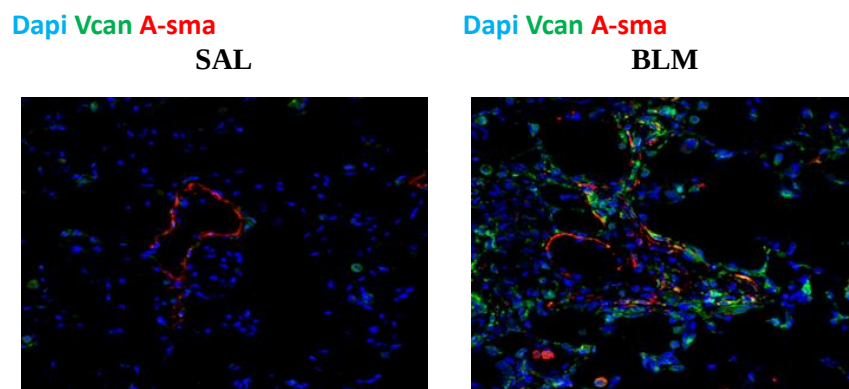
Αντίστοιχα, η χρώση ανοσοφθορισμού σε ινωτικούς πνεύμονες ποντικών, εντόπισε το Vcan στο βρογχικό επιθήλιο στα μακροφάγα και στις ινωτικές περιοχές (Εικόνα 68G), ευρήματα που επαληθεύουν τα δεδομένα αλληλούχισης RNA ενός κυττάρου της ΙΠΙ. Εστιάζοντας περαιτέρω στις ινωτικές περιοχές, η διπλή χρώση με αSMA, δείκτης ενεργοποίησης των ινοβλαστών τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο, έδειξε ότι η αυξημένη χρώση Vcan στις ινωτικές περιοχές εντοπίζεται επίσης με ένα υποσύνολο των ινοβλαστών που εκφράζουν asma (Εικόνα 68H). Τέλος απομονώθηκαν πνευμονικοί ινοβλάστες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των ινωτικών γονιδίων καθώς και του *Vcan*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ινωτικό προφίλ που δημιουργείται μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης διατηρείται *ex vivo*, καθώς ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ινωτικών γονιδίων καθώς επίσης του *Vcan* και της κύριας ισομορφής *V1*, όπως συμβαίνει και *in vivo* μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (Εικόνα 68I-L).



G



H

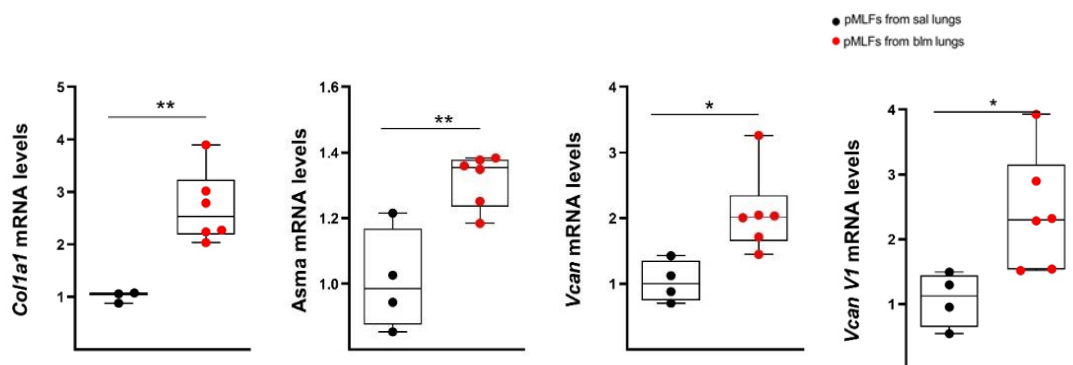


I

G

K

L



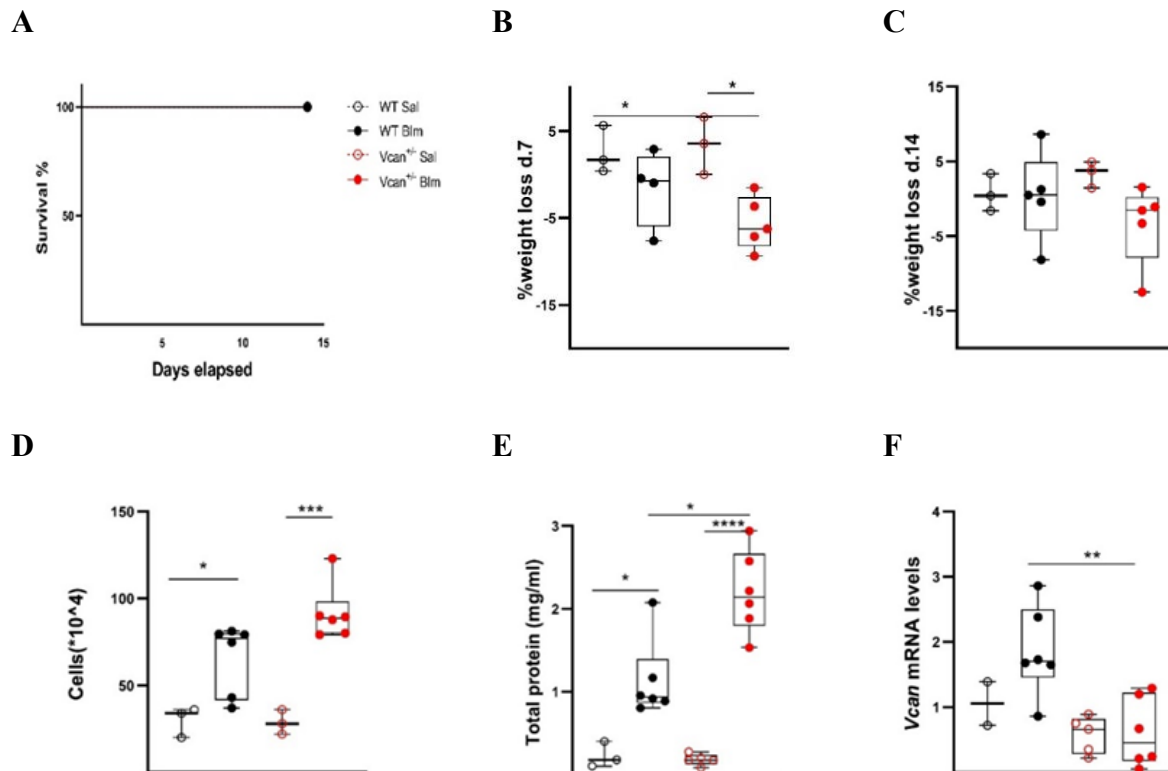
Εικόνα 68: Αυξημένη έκφραση του *Vcan* σε ινωτικούς πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Α) *In silico* ανάλυση επιπέδων έκφρασης ινωτικών γονιδίων και *Vcan* σε σύνολα δεδομένων από ποντίκια με επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση Β) Επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης *Vcan* στους πνεύμονες ποντικών με επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση, όπως ανιχνεύθηκαν με φασματομετρία μάζας. C-D) Επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων *Colla1* και *Vcan*, μετά την χορήγηση BLM. Ε) Διάγραμμα συσχέτισης της έκφρασης *Colla1* και *Vcan* στους ινωτικούς πνεύμονες. F) Επίπεδα mRNA έκφρασης της ισομορφής *Vcan* VI, μετά την χορήγηση BLM. G) Αντιπροσωπευτικές εικόνες φυσιολογικών και ινωτικών πνευμόνων ποντικών μετά από χρώση ανοσοφθορισμού έναντι του *Vcan*. Η) Αντιπροσωπευτικές εικόνες φυσιολογικών και ινωτικών πνευμόνων ποντικών μετά από διπλή χρώση ανοσοφθορισμού έναντι του *Vcan* και του *A-sma*. I-L) Αυξημένα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων *Colla1*, *A-sma*, *Vcan*, *Vcan* VI, σε πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών άγριου τύπου, που απομονώθηκαν 14 ημέρες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

2.2.4 Η μερική ανεπάρκεια του γονιδίου *Vcan* χειροτερεύει την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση

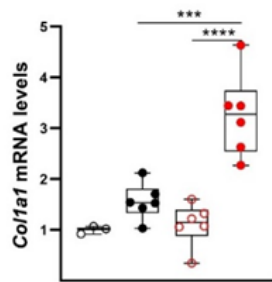
Για να αναλυθεί γενετικά ο πιθανός ρόλος του γονιδίου *Vcan* στην πνευμονική ίνωση, χορηγήθηκε μπλεομυκίνη σε ετερόζυγα ποντίκια για το γονίδιο *Vcan* (*Vcan*^{+/-}). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από διασταύρωση ετερόζυγων ποντικών *Vcan*^{+/-} δεν προκύπτουν ομόζυγοι απόγονοι, λόγω καρδιαγγειακών προβλημάτων των εμβρύων, γεγονός που υποδεικνύει ότι το *Vcan* έχει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ποντικών. Μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης- φυσιολογικού ορού σε ποντίκια *Vcan*^{+/-} και άγριου τύπου αναλύθηκαν οι βασικοί δείκτες που αξιολογούν το ινωτικό προφίλ.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη θνησιμότητα μετά τη χορήγηση BLM, μεταξύ των πειραματικών ομάδων (Εικόνα. 69Α). Η χορήγηση BLM σε ποντίκια *Vcan*^{+/-} είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη απώλεια βάρους (Εικόνα. 69B-C), γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη συστηματική επιβάρυνση της νόσου σε σύγκριση με τα συνομήλικά τους ποντίκια άγριου τύπου. Τα πνευμονικά διηθητικά κύτταρα στο βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF), βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στα ποντίκια *Vcan*^{+/-}

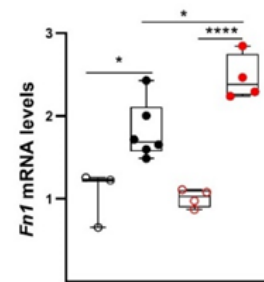
(Εικόνα 69D). Το πνευμονικό οίδημα βρέθηκε επίσης σημαντικά αυξημένο στα ποντίκια *Vcan*^{+/-} (Εικόνα 69E), όπως υποδεικνύεται από τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης του BALF. Τα επίπεδα mRNA *Vcan*, όπως αναμένεται, βρέθηκαν μειωμένα στις πειραματικές ομάδες *Vcan*^{+/-}. Στον πνευμονικό ιστό των ίδιων ποντικών, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA των *Colla1* και *Fnl* μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (Εικόνα. 69F-H). Επιπλέον, η ιστολογική ανάλυση έδειξε ότι στους πνεύμονες των ποντικών *Vcan*^{+/-} η ίνωση ήταν σημαντικά εκτεταμένη, όπως υποδεικνύεται με τη χρώση H&E (Εικόνα 69I) και όπως αντικατοπτρίζεται στη βαθμολογία Ashcroft (Εικόνα 69J). Αντίστοιχα, η χρώση Sirius red/Fast green υπέδειξε αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στα ποντίκια *Vcan*^{+/-} μετά την χορήγηση BLM, (Εικόνα 69K).



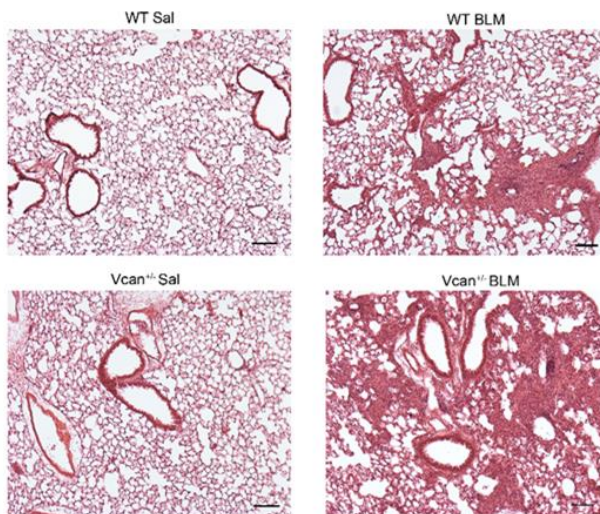
G



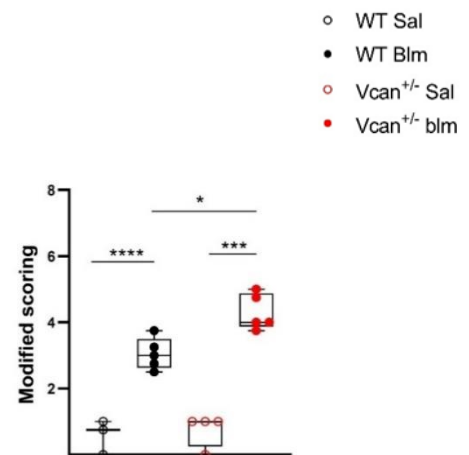
H



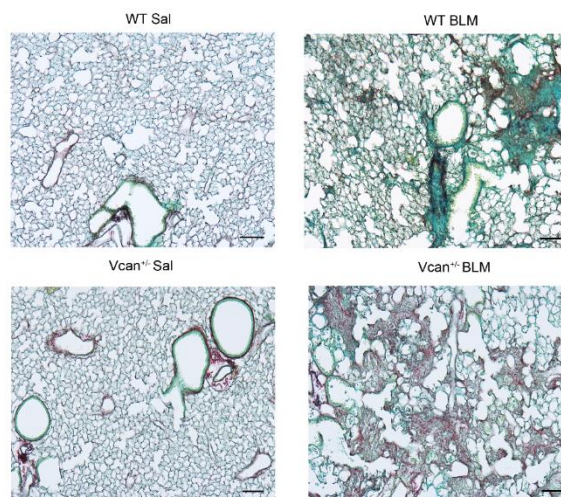
I



J



K



Εικόνα 69: Η μερική ανεπάρκεια του γονιδίου *Vcan* χειροτερεύει την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Α) Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meyer μετά τη χορήγηση BLM. Β-Γ) Μεταβολή βάρους 7 και 14 ημέρες μετά τη χορήγηση BLM. Δ)

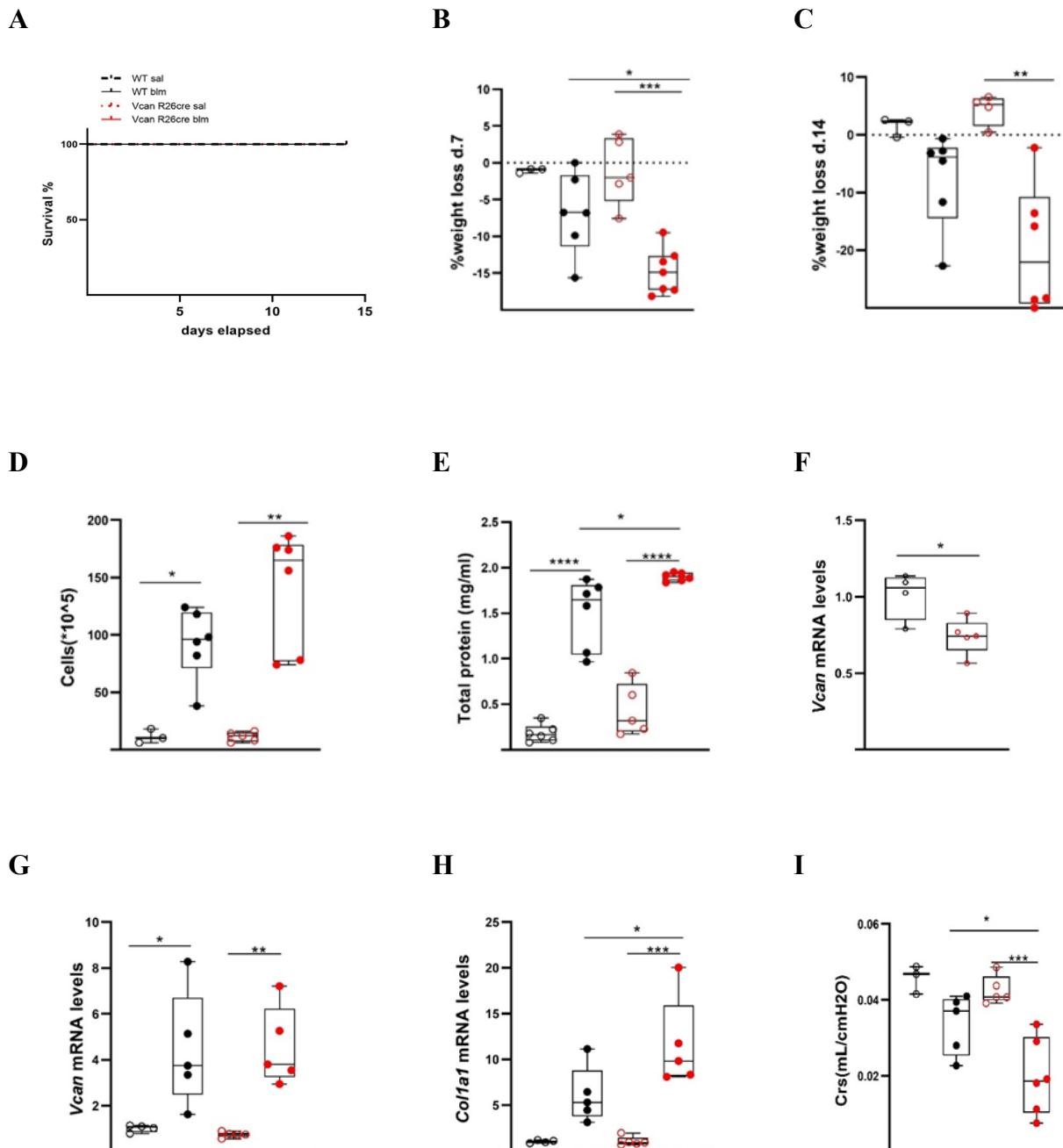
Αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στα BALFs. E) Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στα BALFs. F-H) Επίπεδα mRNA των *Vcan*, *Colla1* και *Fn1* στους πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης I) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές πνευμόνων ποντικού των υποδεικνυόμενων γονότυπων, μετά από χρώση H&E J). Ποσοτικοποίηση της δριμύτητας της ίνωσης μέσω της βαθμολόγησης Ashcroft. K) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές πνευμόνων ποντικού των υποδεικνυόμενων γονότυπων, μετά από χρώση Sirius red/Fast green.

2.2.5 Τα μειωμένα επίπεδα του γονιδίου *Vcan* οδηγούν σε χειρότερη πνευμονική ίνωση σε κατά επιλογή knockout ποντίκια.

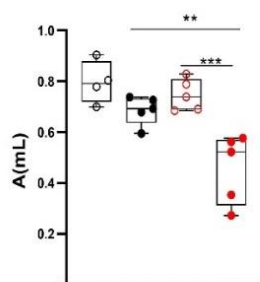
Για να επαληθεύσουμε ότι ο συμπαγής ινωτικός φαινότυπος που προκύπτει από την μείωση του *Vcan*, δεν οφείλεται σε διαταραχές που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, λόγω των μειωμένων επιπέδων *Vcan*, πραγματοποιήθηκε το μοντέλο της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης σε κατά επιλογή knockout ποντίκια για το *Vcan*, στα οποία το γονίδιο έχει διαγραφεί από όλους τους ιστούς στην ενήλικη ζωή. Για τη δημιουργία των υπό συνθήκη αλληλόμορφων *Vcan* knockout, το εξώνιο 2 του γονιδίου πλαισιώθηκε από 2 θέσεις loxP. Τα ποντίκια που έφεραν αλληλόμορφα με θέσεις loxP, διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την R26 Cre ERT2 ρεκομπινάση, η οποία ενεργοποιείται μετά την χορήγηση tamoxifen. Οι απόγονοι που εξέφραζαν την cre ρεκομπινάση, δεν εξέφραζαν το *Vcan* σε όλους τους ιστούς, στην ενήλικη ζωή.

Και οι δύο πειραματικές ομάδες εμφανίστηκαν με μηδενική θνησιμότητα μετά τη χορήγηση BLM (Εικόνα 70A). Όπως εμφανίστηκε και στα ποντίκια *Vcan*^{+/-}, τα κατά επιλογή ποντίκια με μειωμένα επίπεδα *Vcan* παρουσίασαν αυξημένη απώλεια βάρους (Εικόνα 70B-C), αυξημένα πνευμονικά διηθητικά κύτταρα (Εικόνα. 70D) και αυξημένο πνευμονικό οίδημα (Εικόνα. 70E), μετά τη χορήγηση BLM. Τα μειωμένα επίπεδα mRNA του *Vcan* στους πνεύμονες των κατά επιλογή knockout ποντικών συνοδεύονταν από αυξημένα επίπεδα *Colla1* στον πνευμονικό ιστό των ίδιων ποντικών (Εικόνα 70F-H). Η αυξημένη ίνωση είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω επιδείνωση των αναπνευστικών λειτουργιών των κατά επιλογή knockout ποντικών για το *Vcan* μετά τη χορήγηση BLM (Εικόνα 70I-L). Τα μειωμένα επίπεδα *Vcan* επαληθεύτηκαν επίσης με χρώση για *Vcan* στα κύτταρα BALF (Εικόνα 70M). Τα ίδια κύτταρα χρωματίστηκαν επίσης για *Colla1*. Όπως αναμενόταν, τα μακροφάγα του

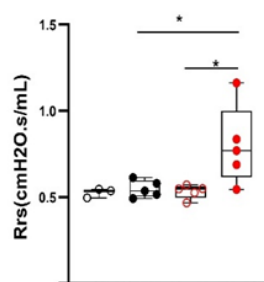
BALF από τις ομάδες BLM, εκφράζουν *Col1a1*. Τα κατά επιλογή knockout ποντίκια για το *Vcan* εμφανίστηκαν με αυξημένη έκφραση *Col1a1* εκτός από τα μακροφάγα, και σε άλλα κύτταρα BALF (Εικόνα 70N). Κατά συνέπεια, η γενετική ανεπάρκεια του *Vcan* φαίνεται να επιδεινώνει σχετικά την επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση, καθιερώνοντας έτσι έναν σημαντικό προστατευτικό ρόλο του *Vcan* στην παθογένεια της ίνωσης.



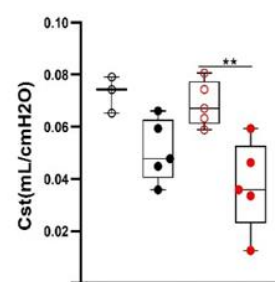
G



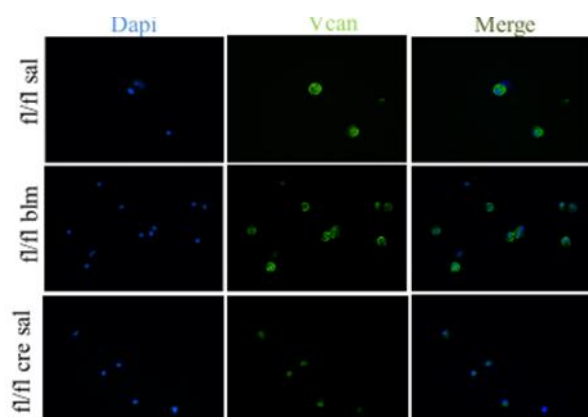
K



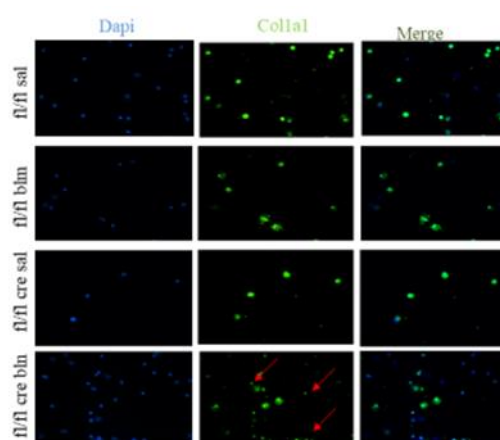
L



M



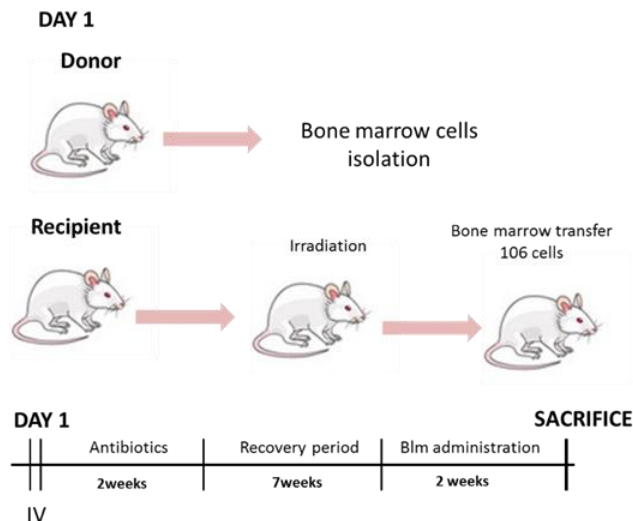
N



Εικόνα 70: Τα μειωμένα επίπεδα του γονιδίου *Vcan* οδηγούν σε χειρότερη πνευμονική ίνωση σε κατά επιλογή *knockout* ποντίκια. Α) Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meyer μετά τη χορήγηση BLM. Β-Γ) Μεταβολή βάρους 7 και 14 ημέρες μετά τη χορήγηση BLM. Δ) Αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στα BALFs. Ε) Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στα BALFs. F) Επαλήθευση μείωσης των επιπέδων mRNA του *Vcan* σε ποντίκια που έχουν λάβει φυσιολογικό όρο. G,H) Επίπεδα mRNA των *Vcan*, *Colla1* στους πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. I-L) Αντιπροσωπευτικές αναπνευστικές λειτουργίες των ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης, όπως μετρήθηκαν με το FlexiVent. M) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ανοσοφθορισμού έναντι του *Vcan*, στα κύτταρα του BALF ποντικών των υποδεικνυόμενων γονότυπων. N) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από χρώση ανοσοφθορισμού έναντι του *Colla1*, στα κύτταρα του BALF ποντικών των υποδεικνυόμενων γονότυπων.

2.2.6 Η γενετική διαγραφή του *Vcan* είτε από στρωματικά είτε από αιμοποιητικά κύτταρα επιδεινώνει την πνευμονική ίνωση

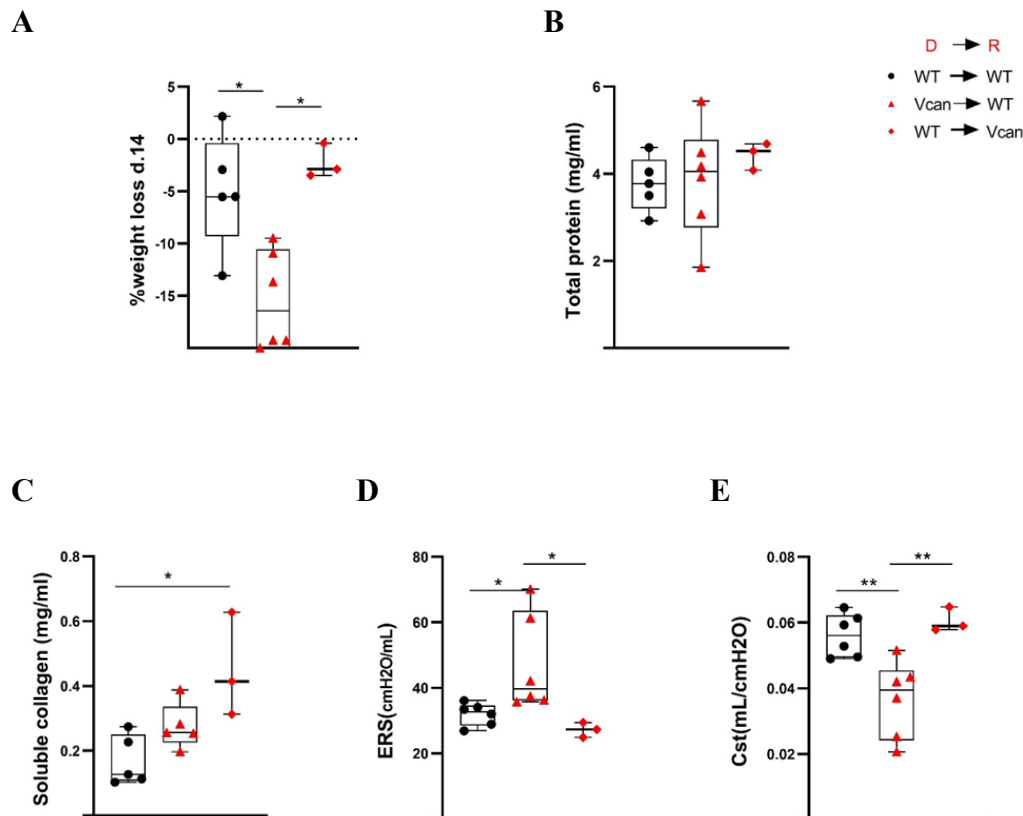
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γονίδιο *Vcan* εκφράζεται κυρίως από ινοβλάστες και μονοκύτταρα. Για να εντοπιστεί ποιος κυτταρικός τύπος είναι υπεύθυνος για την χειροτέρευση της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης που παρατηρείται απουσία του *Vcan* σε ποντίκια, πραγματοποιήθηκε πείραμα μεταφοράς μυελού των οστών. Για το πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές ομάδες δοτών, ποντίκια άγριου τύπου και ποντίκια με 50% μειωμένη έκφραση του γονιδίου *Vcan*, τα οποία ακτινοβολήθηκαν για να καταστραφούν τα αιμοποιητικά τους κύτταρα. Μετά την ακτινοβολήση στα ζώα αυτά πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια έγχυση κυττάρων μυελού των οστών απομονωμένων από wt και *Vcan*^{+/-} ποντίκια, για την ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στα παραγόμενα χιμαιρικά ποντίκια που φέρουν αιμοποιητικά κύτταρα με το γενετικό υπόβαθρο του δότη, χορηγήθηκε στη συνέχεια BLM και η δριμύτητα της νόσου εκτιμήθηκε 14 ημέρες μετά τη χορήγηση BLM.



Εικόνα 71: Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής του πειράματος μεταμόσχευσης μυελού των οστών.

Τα ποντίκια των οποίων τα αιμοποιητικά κύτταρα είχαν μειωμένα επίπεδα *Vcan*, παρουσίασαν μεγαλύτερη απώλεια βάρους 14 μέρες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (Εικόνα 72Α), γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη συστηματική επιβάρυνση. Παρόλα αυτά η γενετική διαγραφή του *Vcan* τόσο στα στρωματικά όσο

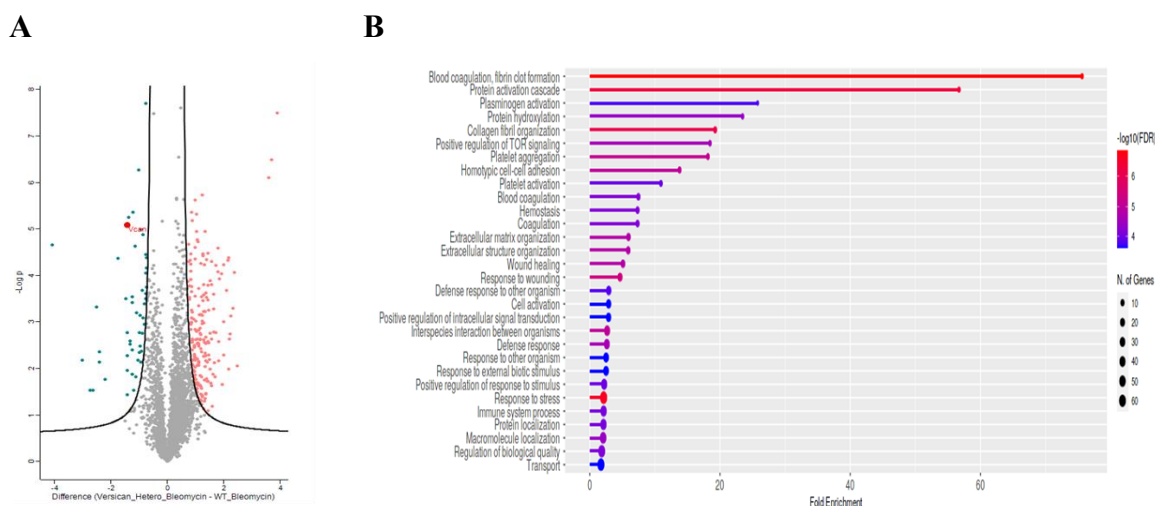
και στα αιμοποιητικά κύτταρα, οδηγεί σε σοβαρότερη μορφή πνευμονικής ίνωσης σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου, όπως αντικατοπτρίζεται στην ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Εικόνα 72B) και διαλυτού κολλαγόνου (Εικόνα 72C) στο BALF αλλά και στις αναπνευστικές λειτουργίες των ποντικών (Εικόνα 72D-E). Επομένως, οι ρυθμιστικές λειτουργίες του *Vcan* στην ίνωση είναι ενεργές τόσο στα αιμοποιητικά όσο και στα στρωματικά κύτταρα.



Εικόνα 72: Η γενετική διαγραφή του *Vcan* είτε από στρωματικά είτε από αιμοποιητικά κύτταρα χειροτερεύει την επαγόμενη από *BLM* πνευμονική ίνωση. Α) Απώλεια βάρους 14 μέρες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Β) Ποσότητα ολικής πρωτεΐνης στο BALF. Γ) Ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου στο BALF. Δ-Ε) Αντιπροσωπευτικοί δείκτες αναπνευστικής λειτουργίας, όπως μετρήθηκαν στο Flexivent.

2.2.7 Ανάλυση φασματομετρίας μάζας στους πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα *Vcan*, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης

Το *Vcan* αποτελεί μια μεγάλη πρωτεογλυκάνη της εξωκυττάριας μήτρας, και η απουσία του πιθανώς επηρεάζει και άλλες πρωτεΐνες και μονοπάτια που μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης. Για να εντοπιστούν άλλα πιθανά μόρια στόχοι που απορρυθμίζονται στον πνεύμονα όταν τα επίπεδα του *Vcan* μειώνονται, πραγματοποιήθηκε φασματομετρία μάζας σε πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών *Vcan*^{+/-} μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Η μείωση των επιπέδων του *Vcan* επηρεάζει 245 πρωτεΐνες του πνεύμονα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Η πλειοψηφία αυτών (195) αυξάνεται, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό μειώνονται, όπως απεικονίζεται σχηματικά στο γράφημα Volcano (Εικόνα 73Α). Επιπλέον, με την ίδια ανάλυση επαληθεύτηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης *Vcan* μειώνονται στα ετερόζυγα knockout ποντίκια σε σχέση με την έκφραση στους πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Από την ανάλυση εμπλουτισμού προκύπτει ότι οι πρωτεΐνες που αυξάνονται στους πνεύμονες ποντικών με μειωμένα επίπεδα *Vcan* επηρεάζουν κύριες διαδικασίες της ίνωσης, όπως την πήξη του αίματος, τον καταρράκτη ενεργοποίησης πρωτεϊνών, την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και το κλείσιμο της πληγής (Εικόνα 73Β). Αντίστοιχη ανάλυση στις πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση δείχνει ότι οι βιολογικές διεργασίες που επηρεάζονται εμπλέκονται με τελομερή, δραστικά είδη οξυγόνου και αρνητική ρύθμιση της διαδικασίας πήξης του αίματος. Συμπερασματικά, τα μειωμένα επίπεδά *Vcan* στους πνεύμονες ποντικών επηρεάζουν μια πληθώρα πρωτεϊνών και μονοπατιών, τα περισσότερά από τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

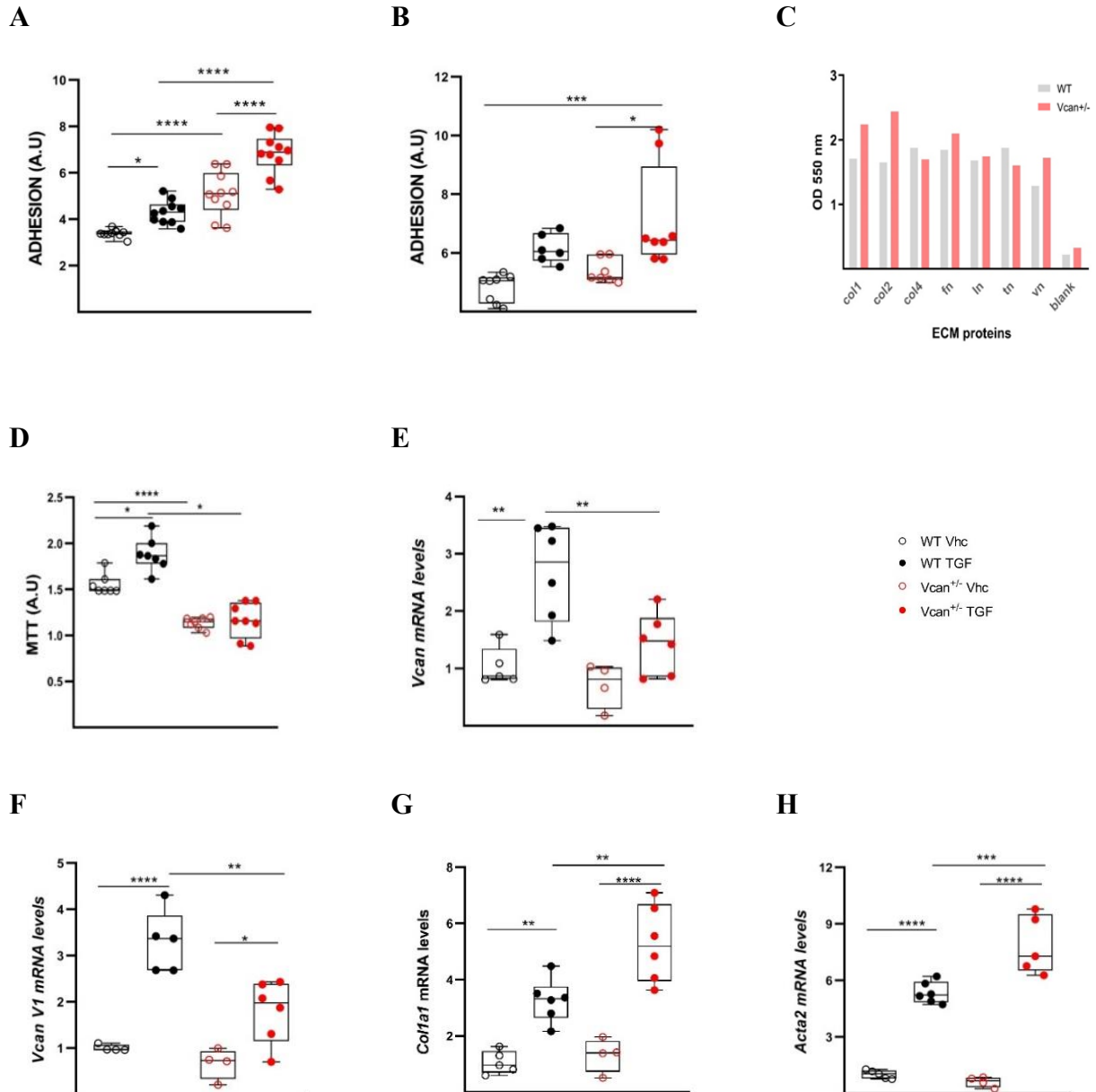


Εικόνα 73: Ανάλυση φασματομετρίας μάζας στους πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα *Vcan* A) Διάγραμμα Volcano στο οποίο αναπαρίστανται οι πρωτεΐνες που απορρυθμίζονται στους πνεύμονες ποντικών *Vcan*^{+/-} σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Με ροζ χρώμα αναπαρίστανται οι πρωτεΐνες που αυξάνονται απουσία του *Vcan* ενώ με πράσινο οι πρωτεΐνες που μειώνονται. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίσταται η πρωτεΐνη *Vcan* η έκφραση της οποίας μειώνεται. B) Ανάλυση εμπλουτισμού των πρωτεϊνών που βρέθηκαν αυξημένες στους πνεύμονες των ποντικών *Vcan*^{+/-}.

2.2.8 *In vitro* διέγερση των *Vcan*^{+/-} πνευμονικών ινοβλαστών με TGFβ.

Για να μελετηθεί ο ρόλος του *Vcan* συγκεκριμένα στον ινοβλάστη, απομονώθηκαν πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες από ποντίκια άγριου τύπου και ποντίκια με μειωμένα επίπεδα *Vcan* και επώαστηκαν με TGFβ, με σκοπό την εξέταση των κυτταρικών λειτουργιών τους *in vitro*. Οι *Vcan*^{+/-} ινοβλάστες εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης τόσο στο πλαστικό (Εικόνα 74A) όσο και σε υπόστρωμα κολλαγόνου (Εικόνα 74B). Παρουσία TGFβ, αυτή η ιδιότητα ισχυροποιείται περαιτέρω. Η αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα που παρουσιάζουν οι ινοβλάστες με μειωμένα επίπεδα *Vcan* και παρατηρείται εκτός από το κολλαγόνο και σε άλλα υποστρώματα (Εικόνα 74C). Οι ινοβλάστες *Vcan*^{+/-} παρουσιάζονται με μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού (Εικόνα 74D). Μειωμένα επίπεδα mRNA τόσο του *Vcan* όσο και της κύριας ισομορφής του γονιδίου *Vcan VI*

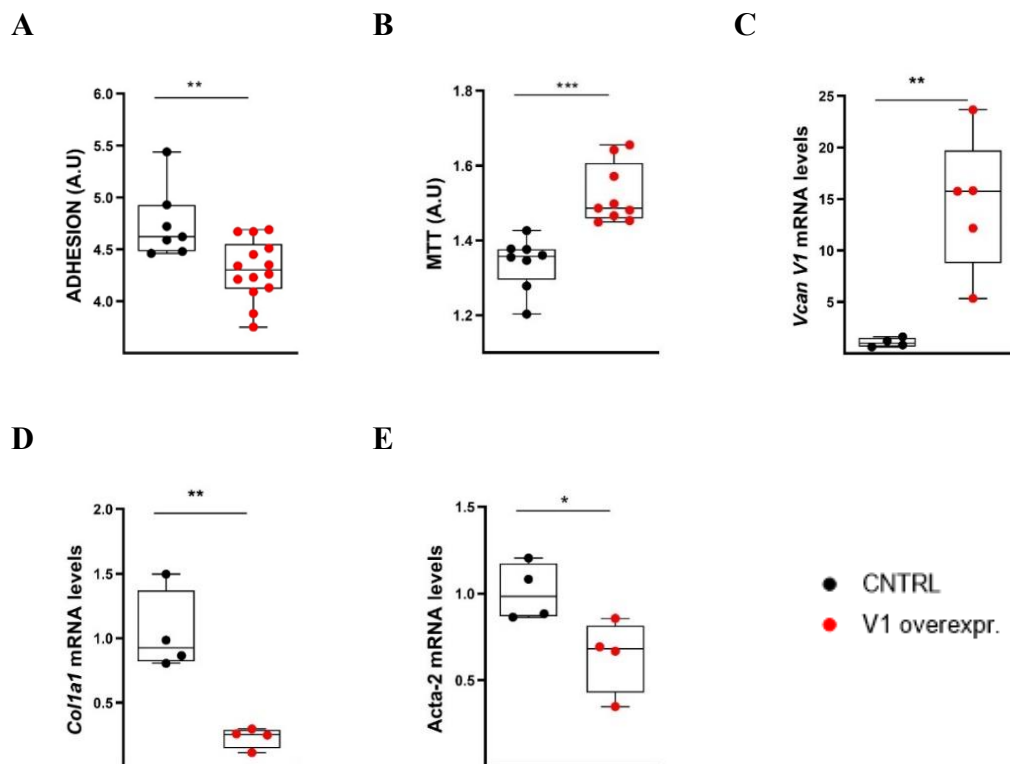
ανιχνεύονται παρουσία TGFβ (Εικόνα 74E-F). Η διέγερση με TGFβ οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των ινωτικών γονιδίων *Colla1* και *Acta2* στους *Vcan*^{+/-} πνευμονικούς ινοβλάστες (Εικόνα 74G-H), αποτέλεσμα που επαληθεύει το *in vivo* πείραμα.

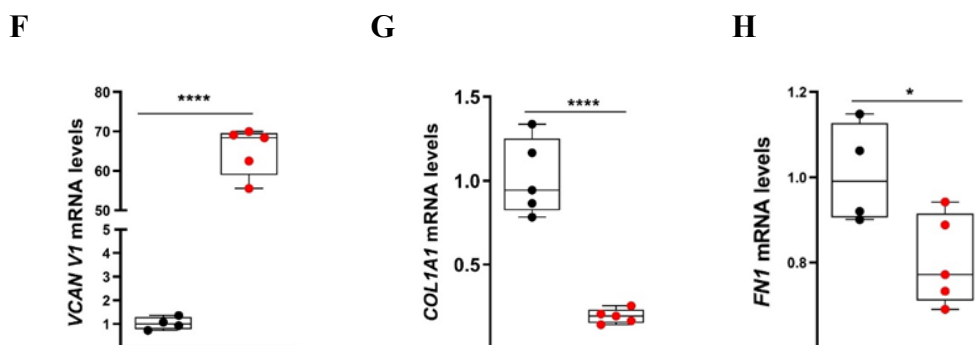


Εικόνα 74: Οι απλοανεπαρκείς *Vcan*^{+/-} πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες παρουσιάζουν διαφορές σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, ενώ η διέγερση με TGFβ1, επηρεάζει την έκφραση mRNA των ινωτικών γονιδίων. Α) Προσκόλληση κυττάρων σε πλαστικό, παρουσία TGFβ. Β) Προσκόλληση κυττάρων σε υπόστρωμα κολλαγόνου, παρουσία TGFβ. Γ) Προσκόλληση κυττάρων σε διαφορετικά υποστρώματα

D) Ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, παρουσία TGFβ. E-H) Επίπεδα mRNA έκφρασης των *Vcan*, *Vcan V1*, *Col1a1*, *Acta2* μετά από διέγερση με TGFβ.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση του *Vcan* με την χρήση πλασμιδίου που υπερεκφράζει την ισομορφή V1, τόσο στην κυτταρική σειρά 3T3 όσο και πρωτογενείς ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες. Η υπερέκφραση της V1 οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης και αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων 3T3 (Εικόνα 75A-B). Επαληθεύτηκε ότι τα κύτταρα αυτά υπερεκφράζουν την V1 ισομορφή (Εικόνα 75C) και στην συνέχεια εξετάστηκαν τα επίπεδα mRNA των ινωτικών γονιδίων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υπερέκφραση της ισομορφής V1 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Col1a1* και *Acta2* (Εικόνα 75D-E). Η μειωμένη έκφραση σε επίπεδο mRNA των ινωτικών γονιδίων επαληθεύτηκε και σε ανθρώπινους πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες (Εικόνα 75F-H). Συμπερασματικά, οι *Vcan*^{+/-} πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες παρουσιάζουν διαφορές σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, ενώ η διέγερση με TGFβ, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA των ινωτικών γονιδίων, φαινόμενο που αντιστρέφεται με την υπερέκφραση της V1 ισομορφής.





Εικόνα 75: Η υπερέκφραση της ισομορφής V1 του γονιδίου *Vcan* επηρεάζει την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση των ινωτικών γονιδίων σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Α) Μειωμένη προσκόλληση των 3T3 ινοβλαστών, μετά την υπερέκφραση της V1 ισομορφής Β) Αυξημένος πολλαπλασιασμός 3T3 ινοβλαστών, μετά την υπερέκφραση της V1 ισομορφής C-E) Επίπεδα mRNA έκφρασης των, *Vcan* V1, *Colla1*, *Acta2* σε 3T3 ινοβλάστες, μετά την υπερέκφραση της V1 ισομορφής. F-H) Επίπεδα mRNA έκφρασης των, *VCAN* V1, *COL1A1*, *FN1* σε πρωτογενείς ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες, μετά την υπερέκφραση της V1 ισομορφής.

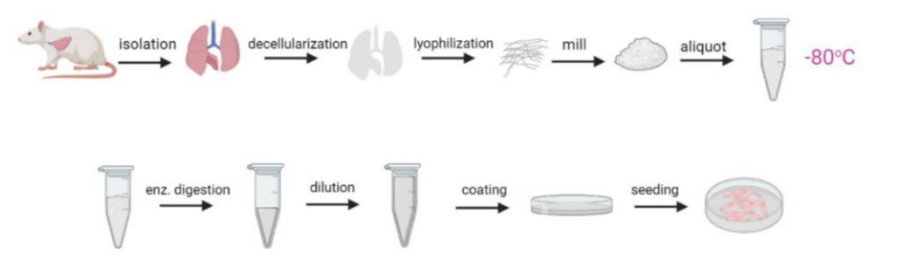
2.2.9 Η διαγραφή του *Vcan* από το aECM επηρεάζει τις κυτταρικές λειτουργίες των πνευμονικών ινοβλαστών άγριου τύπου, μετά από διέγερση TGFβ, και επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην οργάνωση της ECM, την προσκόλληση και τη μετανάστευση.

Το *Vcan*, όπως αποδείχθηκε με τις *in silico* μελέτες, αποτελεί την κύρια πρωτεογλυκάνη που ανιχνεύεται στον πνεύμονα με ΙΠΙ. Ο κύριος ρόλος των πρωτεογλυκανών του πνεύμονα σχετίζεται με την διατήρηση της εξωκυττάριας μήτρας. Επομένως, τα μειωμένα επίπεδά του *Vcan* στον πνεύμονα πιθανώς επηρεάζουν την ακεραιότητα και την οργάνωση της πνευμονικής εξωκυττάριας μήτρας, και μέσω αυτού τις ιδιότητες των κυττάρων του πνεύμονα και οδηγούν σε χειρότερη πνευμονική ίνωση.

Για να μελετηθεί ο τρόπος που τα μειωμένα επίπεδα *Vcan* επιδρούν στην εξωκυττάρια μήτρα, δημιουργήθηκε αρχικά εξωκυττάρια μήτρα (aECM) από

πνευμονικό ιστό ποντικών άγριου τύπου και ινοβλάστες πνεύμονα που προέρχονται από κυτταρικές σειρές ή από ποντίκια άγριου τύπου. Ο τρόπος δημιουργίας αυτού του υποστρώματος προέκυψε από τροποποίηση ήδη δημοσιευμένων μελετών δημιουργίας εξωκυττάριας μήτρας από διαφορετικά όργανα ή διαφορετικά θηλαστικά, και αναπαρίσταται συνοπτικά στην εικόνα 76. Συνοπτικά για την δημιουργία εξωκυττάριας μήτρας από πνεύμονες ποντικών (Εικόνα 76Α), η απομόνωση των πνευμόνων ακολουθείται από την απομάκρυνση των κυττάρων που φυσιολογικά υπάρχουν στον πνεύμονα με κατεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις SDS. Στην συνέχεια ο πνεύμονας λυοφιλοποιείται και διατηρείται σε σκόνη. Έπειτα ακολουθεί ενζυματική κατεργασία, διαλυτοποίηση και επίστρωση του υποστρώματος. Για την δημιουργία εξωκυττάριας μήτρας από ινοβλάστες (Εικόνα 76Β), οι ινοβλάστες επιστρώνονται σε μεγάλη πυκνότητα και προστίθεται ασκορβικό οξύ, το οποίο διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διευκολύνοντας την παραγωγή κολλαγόνου. Μόλις οι ινοβλάστες παράγουν την εξωκυττάρια μήτρα, ακολουθεί κατεργασία με υδροξείδιο του αμμωνίου, για να απομακρυνθούν οι ζωντανοί ινοβλάστες που παρήγαγαν την μήτρα και το υπόστρωμα που δημιουργείται είναι έτοιμο για χρήση.

A



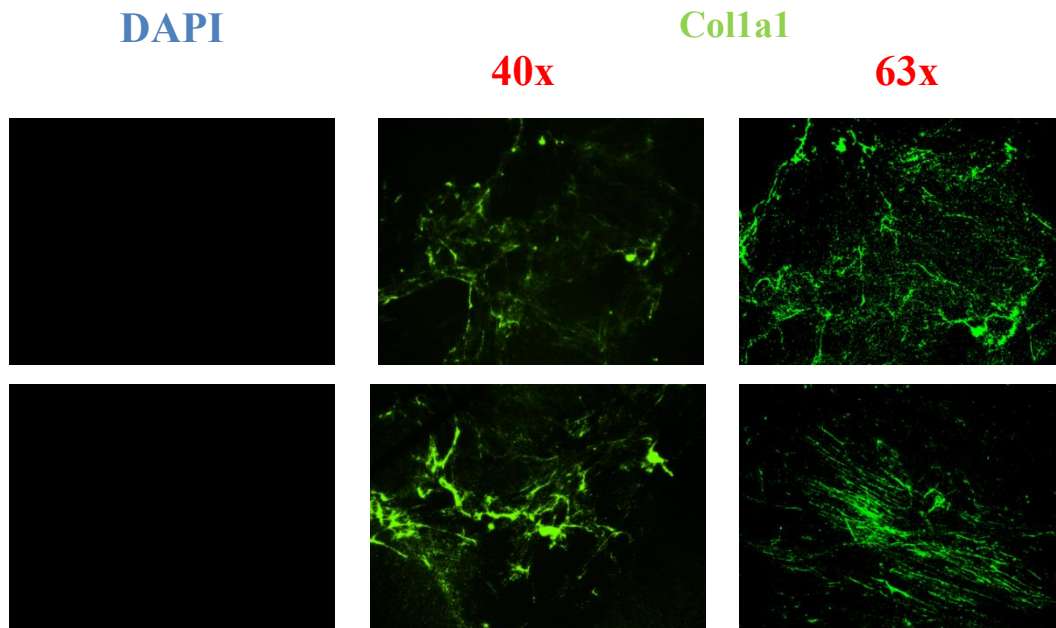
B



Εικόνα 76: Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας εξωκυττάριας μήτρας (αECM) από πνεύμονες ποντικών Α) και από πνευμονικούς ινοβλάστες Β).

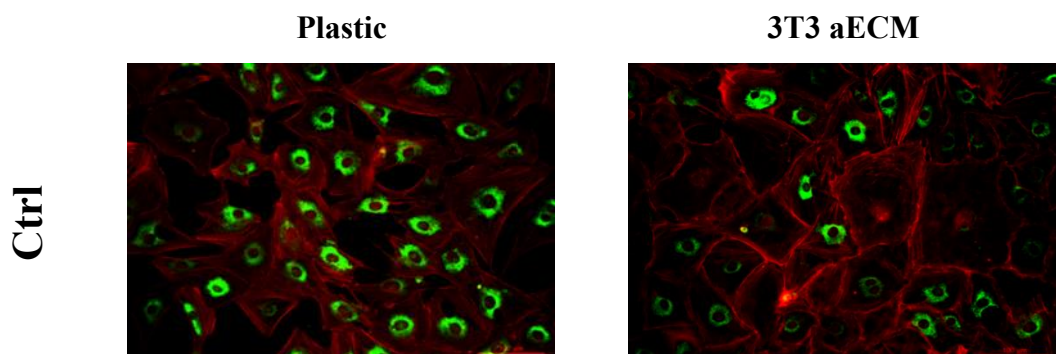
Μετά την δημιουργία των πρώτων υποστρωμάτων ακολούθησε χρώση ανοσοφθορισμού για Col1a1 και DAPI, πριν την ανακαλλιέργεια άλλων ινοβλαστών. Επαληθεύτηκε με την χρώση με DAPI ότι στα υποστρώματα έχει πραγματοποιηθεί

επιτυχώς η απομάκρυνση των κυττάρων, και η χρώση με Colla1 έδειξε ότι το παραγόμενο υπόστρωμα είναι πλούσιο σε ίνες κολλαγόνου (Εικόνα 77).

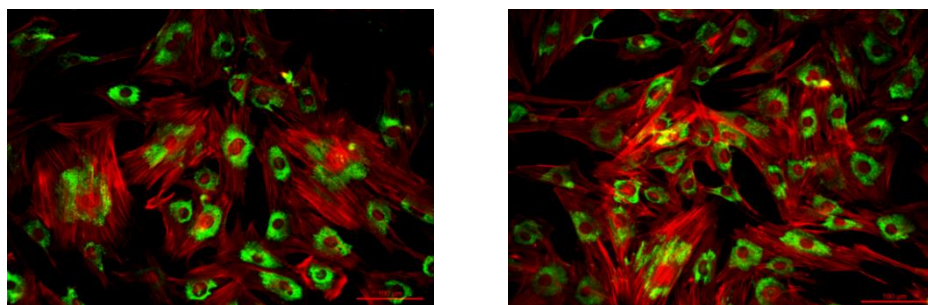


Εικόνα 77: Αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης ανοσοφθορισμού για *Colla1* και *DAPI* σε *aECM* που δημιουργήθηκε από την κυτταρική σειρά εμβρυικών ινοβλαστών *3T3*.

Η καλλιέργεια κυττάρων *3T3* σε πλαστικό και εξωκυττάρια μήτρα που δημιουργήθηκε από τα ίδια κύτταρα, και η μετέπειτα διέγερση με $TGF\beta$, απέδειξε ότι το παραγόμενο κυτταρικό υπόστρωμά μπορεί να λειτουργήσει ως ένα αυτοτελές *in vitro* σύστημα για την καλλιέργεια των πνευμονικών ινοβλαστών. Συγκεκριμένα η χρώση των κυττάρων για *Colla* και F-ακτίνη έδειξε ότι τα κύτταρά που καλλιεργούνται στο υπόστρωμα έχουν καλύτερο κυτταροσκελετό σε σχέση με το πλαστικό, εμποδίζοντας την αυτό-ενεργοποίηση τους και επιτρέποντας την καλύτερη εκτίμηση των αποκρίσεων του $TGF\beta$ (Εικόνα 78).



TGFβ

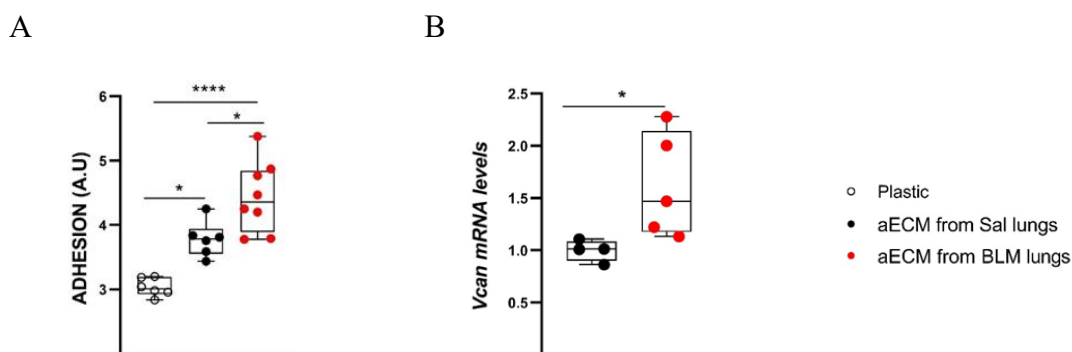


Colla1 F-actin

Εικόνα 78: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες χρώσης ανοσοφθορισμού για *Colla1* και *F-actin*, μετά από διέγερση με TGFβ, σε κύτταρα 3T3 που καλλιεργήθηκαν σε πλαστικό και aECM που δημιουργήθηκε από ινοβλάστες 3T3.

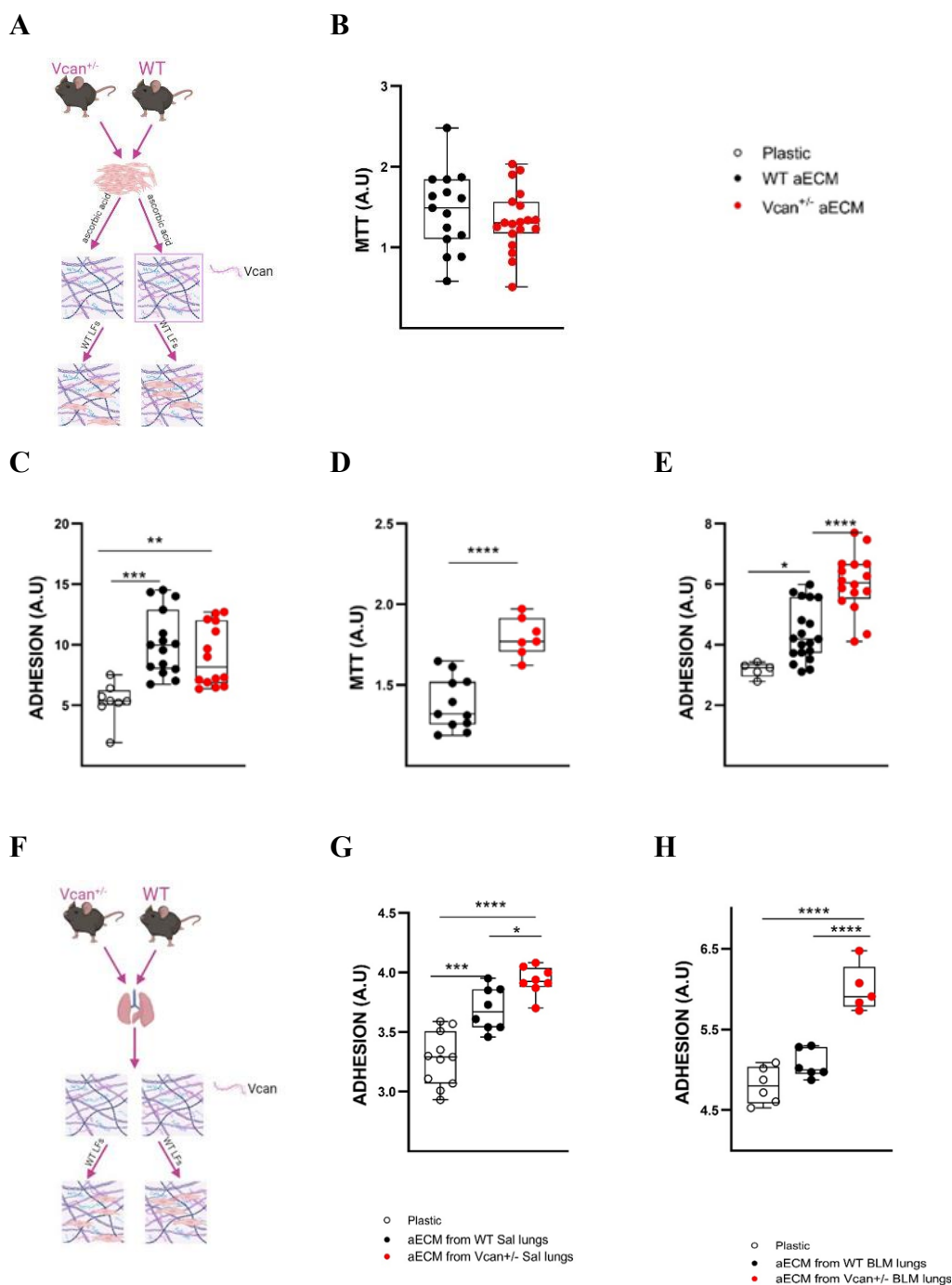
Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του συγκεκριμένου συστήματος καλλιέργειας είναι η δυνατότητα δημιουργίας ινωτικής εξωκυττάριας μήτρας, από πνεύμονες ή ινοβλάστες ποντικών, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Επιπλέον, ανάλογα με τα διαγονιδιακά ζώα που είναι διαθέσιμα σε κάθε μονάδα-ερευνητικό εργαστήριο υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας εξωκυττάριας μήτρας από ζώα knockout ή ετερόζυγα knockout, με συνέπεια η παραγόμενη εξωκυττάρια μήτρα να μην περιέχει ή να εκφράζει μειωμένες ποσότητες κάποιας πρωτεΐνης.

Μετά την βελτιστοποίηση του συστήματος εξωκυττάριας μήτρας από ινοβλάστες, εξετάστηκαν πιθανές διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στην πνευμονική aECM από ποντίκια μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Έτσι απομονώθηκε πνευμονική εξωκυττάρια μήτρα από ζώα που έλαβαν φυσιολογικό όρο και μπλεομυκίνη στην οποία, μετά την κατεργασία της επιστρώθηκαν ινοβλάστες άγριου τύπου, για μελέτη ικανότητας προσκόλλησης και επιπέδων mRNA του *Vcan*. Οι ινοβλάστες άγριου τύπου παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στην ινωτική aECM (Εικόνα 79A). Επιπλέον η ινωτική aECM φαίνεται να επάγει την έκφραση σε επίπεδο mRNA του *Vcan* (Εικόνα 79B). Ο τρόπος που η ινωτική εξωκυττάρια μήτρα επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες, όπως η προσκόλληση και την έκφραση γονιδίων, χωρίς την ύπαρξη άλλου ερεθίσματος, αναδεικνύει τον σημαντικό της ρόλο και την χρησιμότητα του εργαλείου για *in vitro* μελέτες.



Εικόνα 79: Η καλλιέργεια ινοβλαστών άγριου τύπου σε ινωτική εξωκυττάρια μήτρα επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες και την έκφραση γονιδίων. Α) Διάγραμμα προσκόλλησης κυττάρων σε πλαστικό και εξωκυττάρια μήτρα που προέρχεται από πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση φυσιολογικού όρου και εξωκυττάρια μήτρα από πνεύμονες ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Β) Επίπεδα mRNA του γονιδίου Vcan κυττάρων άγριου τύπου που έχουν καλλιεργηθεί σε φυσιολογική και ινωτική πνευμονική aECM. Αντιπροσωπευτικό πείραμα από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

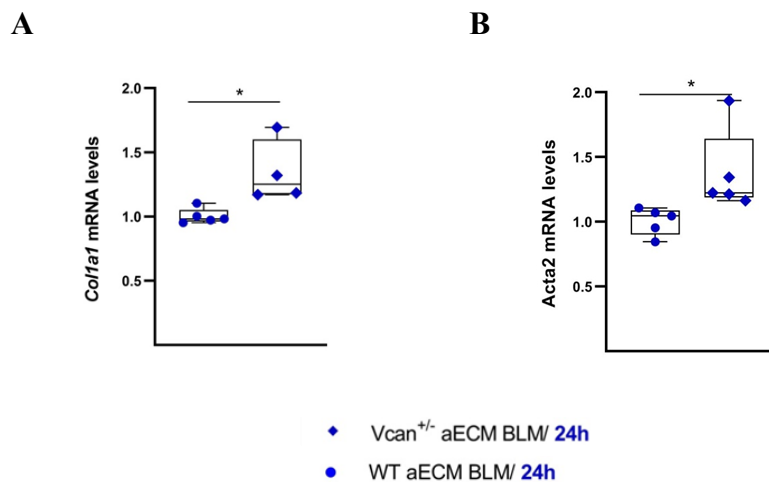
Για να διερευνηθεί αν τα μειωμένα επίπεδα Vcan στο υπόστρωμα επηρεάζουν κυτταρικές λειτουργίες ινοβλαστών άγριου τύπου, δημιουργήθηκε aECM από πνευμονικούς ινοβλάστες Vcan^{+/-} και WT ποντικών (Εικόνα 80Α), στο οποίο επιστρώθηκαν ινοβλάστες άγριου τύπου και μελετήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού και προσκόλλησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυσιολογικοί ινοβλάστες δεν παρουσιάζουν διαφορές στον πολλαπλασιασμό και στην προσκόλληση στα 2 διαφορετικά υποστρώματα (Εικόνα 80Β-Γ). Το αποτέλεσμα διαφέρει, αν τα κύτταρα που επιστρώνονται στο υπόστρωμα, έχουν διεγερθεί με TGFβ. Συγκεκριμένα, οι ινοβλάστες άγριου τύπου που έχουν επωαστεί με TGFβ, εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης και αυξημένο πολλαπλασιασμό σε υπόστρωμα κυττάρων που παράγεται από ινοβλάστες με μειωμένα επίπεδα Vcan (Εικόνα 80Δ-Ε). Το πείραμα προσκόλλησης, παρουσία TGFβ πραγματοποιήθηκε και σε ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογική και ινωτική εξωκυττάρια μήτρα από πνεύμονες WT και Vcan^{+/-} και επαληθεύτηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 80Φ-Η). Μάλιστα τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε Vcan^{+/-} aECM που προέρχεται από πνεύμονες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης παρουσιάζουν την μέγιστη προσκόλληση, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του Vcan στο υπόστρωμα αυξάνουν περαιτέρω τις ιδιότητες προσκόλλησης που εμφανίζει η ινωτική εξωκυττάρια μήτρα



Εικόνα 80: Τα μειωμένα επίπεδά του *Vcan* στο υπόστρωμα, επηρεάζουν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παρουσία *TGFβ*. Α) Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας εξωκυττάριας μήτρας από *Vcan*^{+/-} και *WT* πνευμονικούς ινοβλάστες. Β) Πολλαπλασιασμός κυττάρων άγριου τύπου σε διαφορετικά υποστρώματα. Γ) Προσκόλληση κυττάρων άγριου τύπου σε διαφορετικά υποστρώματα. Δ) Πολλαπλασιασμός κυττάρων άγριου τύπου, μετά από διέγερση με *TGFβ*, σε διαφορετικά υποστρώματα. Ε) Προσκόλληση κυττάρων άγριου τύπου, μετά από διέγερση με *TGFβ*, σε

διαφορετικά υποστρώματα F) Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας εξωκυττάριας μήτρας από *Vcan*^{+/-} και WT πνεύμονες. G-H) Προσκόλληση κυττάρων άγριου τύπου, μετά από διέγερση με TGFβ, σε διαφορετικά υποστρώματα που προέρχονται από φυσιολογικούς (G) και ινωτικούς (H) πνεύμονες.

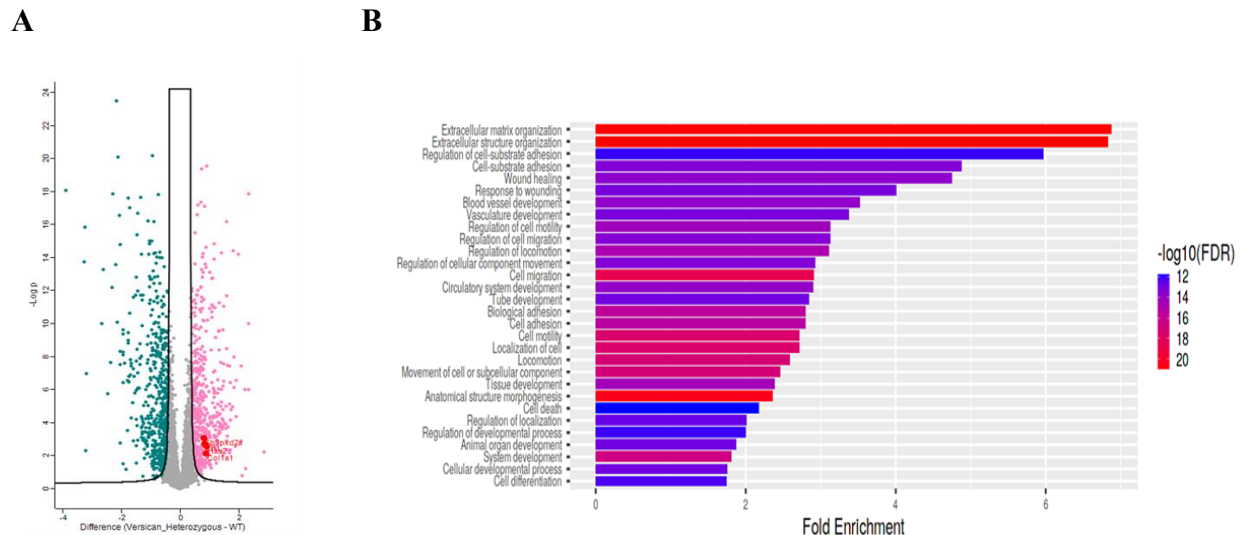
Στην συνέχεια μελετήθηκε το αν η εξωκυττάρια μήτρα που προέρχεται από ινωτικούς πνεύμονες με μειωμένες ποσότητες *Vcan* επηρεάζει την έκφραση ινωτικών γονιδίων. Για να πραγματοποιηθεί αυτό το πείραμα επιστρώθηκαν ινοβλάστες άγριου τύπου σε aECM πνευμόνων που προέρχονται από ζώα WT και *Vcan*^{+/-}, και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Colla1* και *Acta2* 24 ώρες μετά. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι τα μειωμένα επίπεδα *Vcan* στο ινωτικό υπόστρωμα προάγουν την έκφραση των ινωτικών γονιδίων (Εικόνα 81A-B).



Εικόνα 81: Η εξωκυττάρια μήτρα που δημιουργείται από *Vcan*^{+/-} πνεύμονες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης επάγει την έκφραση των ινωτικών γονιδίων. Σχηματική αναπαράσταση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων *Colla1*, *Acta2* σε ινοβλάστες άγριου τύπου που έχουν επιστρωθεί σε διαφορετικά ινωτικά υποστρώματα.

Για να διερευνηθεί εκτός από τις ιδιότητες των κυττάρων που επιστρώνονται πάνω στην aECM, πώς τα μειωμένα επίπεδα *Vcan* επηρεάζουν την έκφραση άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, πραγματοποιήθηκε φασματομετρία μάζας σε εξωκυττάρια μήτρα που έχει δημιουργηθεί από ινοβλάστες ποντικών άγριου τύπου και *Vcan*^{+/-}. Η απουσία του *Vcan* από το υπόστρωμα επηρεάζει την έκφραση περισσότερων από 1000 πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, όπως φαίνεται και στο παρακάτω

γράφημα Volcano (Εικόνα 82Α). Μεταξύ των πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται όταν τα επίπεδα του Vcan στο υπόστρωμα είναι μειωμένα, βρίσκονται πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας που εμπλέκονται και στην παθογένεια της ίνωσης, όπως το Colla1 και η Fn1 η συνθάση του υαλουρονικού 2 και η πρωτεϊνη προσαρμογέας Tks5. Η ανάλυση εμπλουτισμού που πραγματοποιήθηκε στις πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται δείχνει ότι τα κύρια μονοπάτια που απορυθμίζονται απουσία του Vcan, περιλαμβάνουν την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας, ρύθμιση της προσκόλλησης, επούλωση πληγών, ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας και ρύθμιση της μετανάστευσης (Εικόνα 82Β). Συνολικά τα μειωμένα επίπεδα Vcan στην εξωκυττάρια μήτρα, επηρεάζουν την έκφραση άλλων πρωτεϊνών του υποστρώματος, με αποτέλεσμα την δημιουργία «απορυθμισμένης» εξωκυττάριας μήτρας, η οποία επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες όπως η προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός.



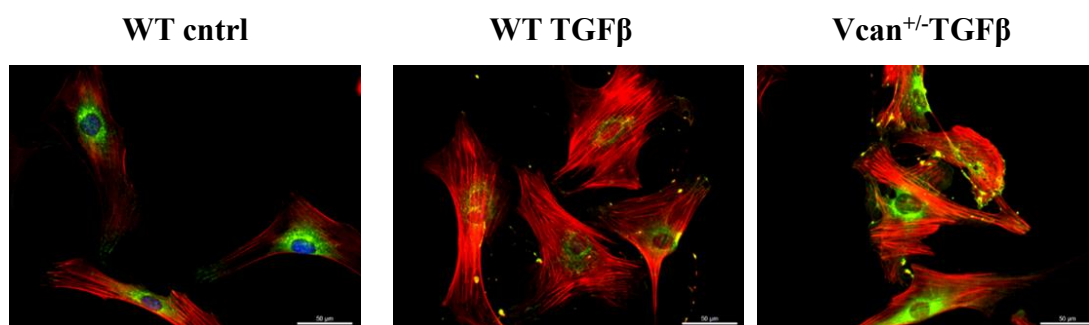
Εικόνα 82: Ανάλυση φασματομετρίας μάζας στην εξωκυττάρια μήτρα που παράγεται από ινοβλάστες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα Vcan. Α) Διάγραμμα Volcano στο οποίο αναπαρίστανται οι πρωτεΐνες που απορρυθμίζονται στους εξωκυττάρια μήτρα Vcan^{+/-} σε σχέση με την άγριου τύπου. Με ροζ χρώμα αναπαρίστανται οι πρωτεΐνες που αυξάνονται απουσία του Vcan ενώ με πράσινο οι πρωτεΐνες που μειώνονται. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται χαρακτηριστικές πρωτεΐνες όπως το Colla1, Fn1, Has2, Sh3pxd2a η έκφραση των οποίων αυξάνεται. Β) Ανάλυση εμπλουτισμού των πρωτεϊνών που βρέθηκαν αυξημένες στην εξωκυττάρια μήτρα που παράγεται από πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών Vcan^{+/-}.

2.2.10 Οι $Vcan^{+/-}$ πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν προεξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, που οδηγούν σε αυξημένη εισβολή στην ECM.

Όπως αναφέρθηκε, τα μειωμένα επίπεδα $Vcan$, επηρεάζουν την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας και την προσκόλληση των κυττάρων, αλλά και μονοπάτια που σχετίζονται με την κινητικότητα και την μετανάστευση των κυττάρων. Η κυτταρική μετανάστευση στον πνεύμονα είναι μια ουσιαστική διαδικασία που επιτρέπει στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να επιθεωρούν και να προστατεύουν το αναπνευστικό σύστημα, και όταν απορυθμίζεται εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΙΠΠ. Επιπλέον, τα μειωμένα επίπεδα του $Vcan$ από το υπόστρωμα, οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης προσαρμογέα $Tks5$, που διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο την διαδικασία της μετανάστευσης, μέσω της συμμετοχής της στην δημιουργία ποδοσωμάτων στα κύτταρα.

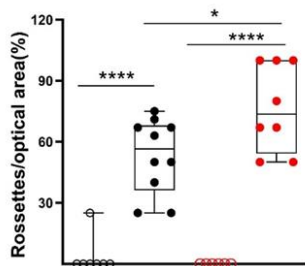
Για την μελέτη του τρόπου που το $Vcan$ μπορεί να εμπλέκεται στην μετανάστευση και εισβολή, απομονώθηκαν πρωτογενείς πνευμονικοί ινοβλάστες άγριου τύπου και $Vcan^{+/-}$, στους οποίους πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού για F ακτίνη και cortactin, κύρια πρωτεΐνη των ποδοσωμάτων, μετά από διέγερση με $TGF\beta$. Η χρώση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι οι $Vcan^{+/-}$ πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν, παρουσία $TGF\beta$ προεξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, σημαντικά περισσότερες από αυτές που σχηματίζουν οι ινοβλάστες άγριου τύπου μετά από διέγερση με $TGF\beta$ (Εικόνα 83A). Η ποσοτικοποίηση του αριθμού ροζετών ανά οπτικό πεδίο (Εικόνα 83B) και ανά κύτταρο (Εικόνα 83C) επαλήθευσε ότι τα μειωμένα επίπεδα $Vcan$ στον ινοβλάστη οδηγούν σε αυξημένο αριθμό ποδοσωμάτων, παρουσία $TGF\beta$.

A

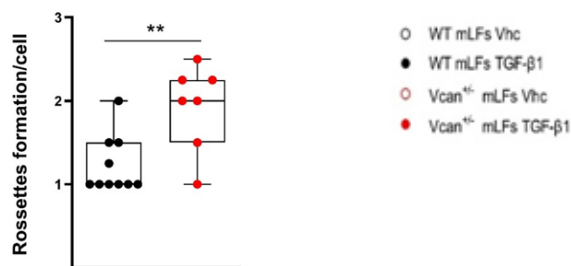


DAPI-Cortactin F-actin

B

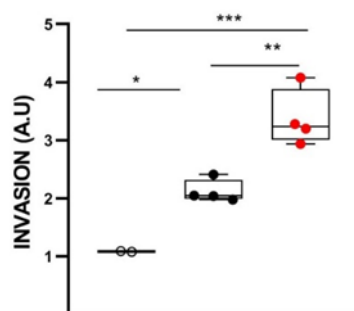


C



Εικόνα 83: Οι απλοανεπαρκείς $Vcan^{+/-}$ πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν προεξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, παρουσία $TGF\beta$. Α) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες χρώσης ανοσοφθορισμού έναντι *Cortactin* και *F actin* σε πνευμονικούς ινοβλάστες άγριου τύπου και $Vcan^{+/-}$ μετά από διέγερση με $TGF\beta$. Β-Γ) Ποσοτικοποίηση αριθμού ροζετών ανά οπτικό πεδίο και ανά κύτταρο αντίστοιχα.

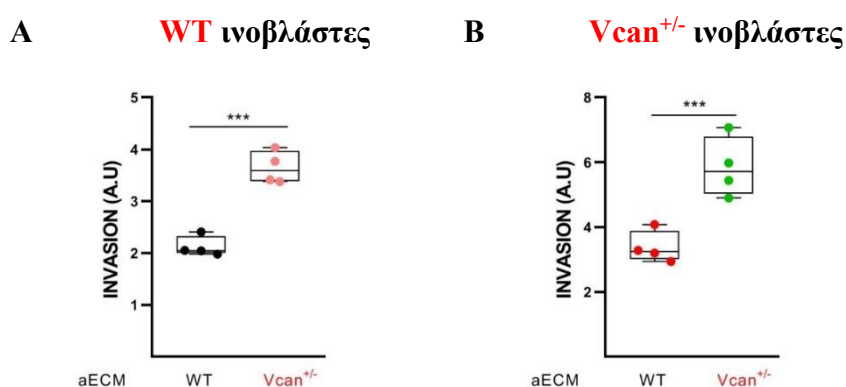
Στην συνέχεια εξετάστηκε αν οι ροζέτες που σχηματίζονται στους $Vcan^{+/-}$ ινοβλάστες, επηρεάζουν την ικανότητα εισβολής, παρουσία $TGF\beta$. Για να πραγματοποιηθεί αυτό το πείραμα επιστρώθηκε aECM από πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου σε φρεάτια μετανάστευσης transwell στα οποία έπειτα προστέθηκαν ινοβλάστες και εξετάστηκε η ικανότητα εισβολής τους. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ροζέτες που σχηματίζονται στους $Vcan^{+/-}$ ινοβλάστες, παρουσία $TGF\beta$, οδηγούν σε αυξημένη ικανότητα εισβολής στην εξωκυττάρια μήτρα (Εικόνα 84).



Εικόνα 84: Οι $Vcan^{+/-}$ πνευμονικοί ινοβλάστες παρουσιάζουν αυξημένοι ικανότητα εισβολής σε σχέση με τους ινοβλάστες άγριου τύπου, παρουσία $TGF\beta$. Ποσοτικοποίηση της ικανότητας εισβολής των WT και $Vcan^{+/-}$ ινοβλαστών (μαύρο,

κόκκινο) μετά από διέγερση με TGFβ. Σαν δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες WT, οι οποίοι δεν είχαν επωαστεί με TGFβ.

Τέλος εξετάστηκε αν η ικανότητα εισβολής των κυττάρων παρουσία TGFβ, επηρεάζεται από υπόστρωμα με μειωμένες ποσότητες Vcan, όπως συμβαίνει στην προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό. Έτσι, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα με 2 διαφορετικά υποστρώματα που προέρχονταν από WT και Vcan^{+/-} ινοβλάστες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εξωκυττάρια μήτρα που προέρχεται από πνεύμονές ποντικών με μειωμένη ποσότητα Vcan, προάγει την μετανάστευση τόσο των WT όσο και των Vcan^{+/-} ινοβλαστών (Εικόνα 85).



Εικόνα 85: Η εξωκυττάρια μήτρα που προέρχεται από πνεύμονές ποντικών με μειωμένη ποσότητα Vcan, προάγει την μετανάστευση των ινοβλαστών. Ποσοτικοποίηση της ικανότητας εισβολής ινοβλαστών άγριου τύπου A) και Vcan^{+/-} ινοβλαστών σε εξωκυττάρια μήτρα με φυσιολογικά και μειωμένα επίπεδα Vcan.

Συμπερασματικά, οι Vcan^{+/-} πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν αυξημένο αριθμό ροζετών, παρουσία TGFβ, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη ικανότητα εισβολής σε σχέση με τους ινοβλάστες άγριου τύπου. Επιπλέον το υπόστρωμα που παράγεται από πνεύμονες ποντικών με μειωμένα επίπεδα Vcan, οδηγεί σε αυξημένη εισβολή των WT και Vcan^{+/-} ινοβλαστών.

Συμπεράσματα Συζήτηση

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής εξετάζει τον ρόλο του γονιδίου *Vcan* στην παθογένεια της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης. Η πρωτείνη *Vcan* αποτελεί κύρια πρωτείνη της εξωκυττάριας μήτρας ή οποία συνδέεται με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών και επηρεάζει την δομή και την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας. Η ανώμαλη αναδιαμόρφωση της ECM στην ΙΠΙ διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια της νόσου συμβάλλοντας στην δυσκαμψία του πνευμονικού ιστού, καθώς και στη μεταβολή της κυτταρικής σηματοδότησης και στην προώθηση της ενεργοποίησης προϊνωτικών μονοπατιών. Επιπλέον, αποτελεί κύρια πρωτεΐνη σύνδεσης του υαλουρονικού οξέος, μόριο το οποίο έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεια της ΙΠΙ. Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στην διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου στην παθογένεια της νόσου.

Η έκφραση του *VCAN* βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στην πλειοψηφία των *in silico* συνόλου δεδομένων του Fibromine, που διερευνούν την έκφραση γονιδίων στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ έναντι ατόμων ελέγχου. Οι κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν των *VCAN* στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ είναι κυρίως τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες. Εστιάζοντας παραπάνω στους ινοβλάστες, βρέθηκε ότι το *VCAN* εκφράζεται στον πνεύμονα από το υποσύνολο των ινοβλαστών που εκφράζει κολλαγόνο. Μάλιστα, στο συγκεκριμένο υποσύνολο, η έκφραση του *VCAN* εντοπίζεται στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με ΙΠΙ σε σχέση με κύτταρα που προέρχονται από υγιείς μάρτυρες. Με *in silico* ανάλυση βρέθηκε επίσης ότι το *VCAN* είναι η πιο ευρέως εκφραζόμενη πρωτεογλυκάνη στον πνεύμονα με ΙΠΙ. Τέλος, αυξημένη έκφραση του *Vcan* ανιχνεύεται επίσης σε σύνολα δεδομένων από επαγόμενη από BLM πνευμονική ίνωση.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in vitro* εξέταση των επιπέδων έκφρασης του *VCAN*, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα πνευμονικών ινοβλαστών (πρωτογενείς και κυτταρικές σειρές) που προέρχονταν τόσο από ανθρώπινους πνεύμονες όσο και από πνεύμονες ποντικών. Οι ινοβλάστες αυτοί επωάστηκαν με τον κύριο προϊνωτικό παράγοντα TGFβ, και στην συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με Real-Time PCR και της πρωτεΐνης με ανοσοφθορισμό. Αποδείχθηκε ότι ο TGFβ προάγει την έκφραση του *VCAN* *in vitro*

τόσο σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες όσο και σε πνευμονικούς ινοβλάστες ποντικών.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε *in vivo* μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Vcan* σε ποντίκια άγριου τύπου μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Η πειραματική ομάδα που έλαβε μπλεομυκίνη, παρουσιάστηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Vcan* και της κύριας ισομορφής *V1* σε επίπεδο mRNA αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπως αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας. Η χρώση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι η έκφραση του *Vcan* εντοπίζεται κυρίως στο βρογχικό επιθήλιο και στις ινωτικές/ινοβλαστικές περιοχές των ινωτικών πνευμόνων μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης.

Κατόπιν, χορηγήθηκε μπλεομυκίνη σε ετερόζυγα ποντίκια για το γονίδιο *Vcan* (*Vcan*^{+/-}), για να μελετηθεί πως τα μειωμένα επίπεδά του γονιδίου επηρεάζουν την εξέλιξη της ίνωσης *in vivo*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μερική ανεπάρκεια του γονιδίου *Vcan* χειροτερεύει την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση, καθώς τα ζώα με μειωμένα επίπεδα *Vcan* μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης παρουσιάζουν μεγαλύτερη απώλεια βάρους, μεγαλύτερο αριθμό διηθητικών φλεγμονωδών κυττάρων και ολικής πρωτεΐνης στο BALF, αυξημένη έκφραση ινωτικών γονιδίων αυξημένες ινωτικές περιοχές στους πνεύμονες τους, καθώς και αυξημένη ποσότητα κολλαγόνου.

Για να εντοπιστεί ποιος κυτταρικός τύπος είναι κυρίως υπεύθυνος για την χειροτέρευση της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης που παρατηρείται απουσία του *Vcan* σε ποντίκια, πραγματοποιήθηκε πείραμα μεταφοράς μυελού των οστών, και κατόπιν χορήγηση μπλεομυκίνης. Η διαγραφή του *Vcan* και από τους 2 κυτταρικούς τύπους, οδηγεί σε χειροτέρευση της πνευμονικής ίνωσης. Επομένως, οι ρυθμιστικές λειτουργίες του *Vcan* στην ίνωση είναι ενεργές τόσο στα αιμοποιητικά όσο και στα στρωματικά κύτταρα.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση φασματομετρίας μάζας στους πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα *Vcan*, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι πνεύμονες των ποντικών με μειωμένα επίπεδα *Vcan* παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών που επηρεάζουν κύριες διαδικασίες της ίνωσης, όπως την πήξη του αίματος, την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Η *in vitro* διέγερση των Vcan^{+/-} πνευμονικών ινοβλαστών με TGF-β1, ανέδειξε ότι οι πνευμονικοί ινοβλάστες με μειωμένα επίπεδα Vcan, παρουσιάζουν διαφορές σε σχέση με τους ινοβλάστες άγριου τύπου, σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός. Επιπλέον, οι ινοβλάστες με μειωμένα επίπεδα Vcan παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των ινωτικών γονιδίων, παρουσία TGFβ. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύει το *in vivo* αποτέλεσμα, στο οποίο η έκφραση των ινωτικών γονιδίων αυξάνεται σε ποντίκια Vcan^{+/-} μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης, και αντιστρέφεται με την υπερέκφραση της ισομορφής V1 του γονιδίου σε πνευμονικούς ινοβλάστες *in vitro*.

Έπειτα, δημιουργήθηκε εξωκυττάρια μήτρα από πνευμονικούς ινοβλάστες και πνεύμονες ποντικών άγριου τύπου και ποντικών με μειωμένα επίπεδα Vcan, στους οποίους επιστρώθηκαν ινοβλάστες άγριου τύπου και εξετάστηκαν οι κυτταρικές τους ιδιότητες. Τα μειωμένα επίπεδα Vcan στο υπόστρωμα επηρεάζουν την προσκόλλησή τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση των ινωτικών γονιδίων. Η ανάλυση φασματομετρίας μάζας που πραγματοποιήθηκε σε εξωκυττάρια μήτρα από ινοβλάστες ποντικών άγριου τύπου και Vcan^{+/-}, έδειξε ότι η απουσία του Vcan από το υπόστρωμα επηρεάζει την έκφραση περισσότερων από 1000 πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, μεταξύ των οποίων βρίσκονται πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας που εμπλέκονται και στην παθογένεια της ίνωσης, όπως το Colla1 και η Fn1 και η πρωτεϊνη προσαρμογέας Tks5. Η ανάλυση εμπλουτισμού που πραγματοποιήθηκε στις πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται δείχνει ότι τα κύρια μονοπάτια που απορυθμίζονται απουσία του Vcan, περιλαμβάνουν την οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας, η ρύθμιση της προσκόλλησης, η επούλωση πληγών, η ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας και η ρύθμιση της μετανάστευσης.

Για να διερευνηθεί ο τρόπος που το Vcan εμπλέκεται στην μετανάστευση και εισβολή, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού μετά από διέγερση με TGFβ σε πρωτογενείς πνευμονικούς ινοβλάστες άγριου τύπου και Vcan^{+/-}. Η χρώση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι οι Vcan^{+/-} πνευμονικοί ινοβλάστες σχηματίζουν, παρουσία TGFβ προεξέχουσες ροζέτες ποδοσωμάτων, σημαντικά περισσότερες από αυτές που σχηματίζουν οι ινοβλάστες άγριου τύπου μετά από διέγερση με TGFβ, οι οποίες οδηγούν σε μεγαλύτερη ικανότητα εισβολής. Επιπλέον το υπόστρωμα που παράγεται από πνεύμονες ποντικών με μειωμένα επίπεδα Vcan, οδηγεί σε αυξημένη εισβολή των WT και Vcan^{+/-} ινοβλαστών.

Συμπερασματικά, τα μειωμένα επίπεδά της πρωτεΐνης *Vcan* στην εξωκυττάρια μήτρα, επηρεάζουν την έκφραση άλλων πρωτεϊνών του υποστρώματος, με αποτέλεσμα την δημιουργία «απορυθμισμένης» εξωκυττάριας μήτρας με ανώμαλη σύσταση, η οποία επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες όπως η προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός και η εισβολή. Επιπλέον, η έκφραση του *Vcan* από τους ινοβλάστες φαίνεται να προστατεύει τα ποντίκια από την πνευμονική ίνωση, μειώνοντας την προσκόλλησή και την εισβολή τους στην ECM.

3 Βιβλιογραφία

1. Podolanczuk, A.J., et al., *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: State of the Art for 2023*. Eur Respir J, 2023.
2. Raghu, G., *Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011*. Eur Respir J, 2011. **37**(4): p. 743-6.
3. Gribbin, J., et al., *Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK*. Thorax, 2006. **61**(11): p. 980-5.
4. Navaratnam, V., et al., *The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K.* Thorax, 2011. **66**(6): p. 462-7.
5. *American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 277-304.
6. Maher, T.M., et al., *Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Res, 2021. **22**(1): p. 197.
7. Bouros, D., et al., *Design, Rationale, Methodology, and Aims of a Greek Prospective Idiopathic Pulmonary Fibrosis Registry: Investigating Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Greece (INDULGE IPF)*. Respiration, 2018. **96**(1): p. 41-47.
8. Karakatsani, A., et al., *Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece*. Respir Med, 2009. **103**(8): p. 1122-9.
9. Jo, H.E., et al., *Baseline characteristics of idiopathic pulmonary fibrosis: analysis from the Australian Idiopathic Pulmonary Fibrosis Registry*. Eur Respir J, 2017. **49**(2).
10. Martinez, F.J., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17074.
11. Wuyts, W.A., et al., *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Best Practice in Monitoring and Managing a Relentless Fibrotic Disease*. Respiration, 2020. **99**(1): p. 73-82.
12. Travis, W.D., et al., *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(6): p. 733-48.
13. Raghu, G., et al., *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 788-824.
14. Raghu, G., et al., *An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(2): p. e3-19.
15. Raghu, G., et al., *Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. **198**(5): p. e44-e68.
16. Papiris, S.A., et al., *Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Clinical Perspective*. Diagnostics (Basel), 2022. **12**(12).
17. Meltzer, E.B., et al., *Familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis: making the diagnosis from peripheral blood*. BMC Genomics, 2014. **15**(1): p. 902.
18. Yang, I.V., et al., *MUC5B and Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12 Suppl 2**(Suppl 2): p. S193-9.
19. Li, X., et al., *Toll-Interacting Protein in Pulmonary Diseases. Abiding by the Goldilocks Principle*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021. **64**(5): p. 536-546.

20. Podolanczuk, A.J., et al., *Update in Interstitial Lung Disease 2020*. Am J Respir Crit Care Med, 2021. **203**(11): p. 1343-1352.
21. Allen, R.J., et al., *Genetic variants associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in people of European ancestry: a genome-wide association study*. Lancet Respir Med, 2017. **5**(11): p. 869-880.
22. Armanios, M.Y., et al., *Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2007. **356**(13): p. 1317-26.
23. Steele, M.P., et al., *Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(9): p. 1146-52.
24. Kreuter, M., et al., *Impact of Comorbidities on Mortality in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151425.
25. Tzouvelekis, A., et al., *Lung cancer in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. A retrospective multicenter study in Greece*. Pulm Pharmacol Ther, 2020. **60**: p. 101880.
26. Karampitsakos, T., et al., *Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Pulm Pharmacol Ther, 2017. **45**: p. 1-10.
27. Karampitsakos, T., et al., *Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A retrospective multicentre study in Europe*. Respirology, 2023. **28**(1): p. 56-65.
28. Papaioannou, O., et al., *Metabolic Disorders in Chronic Lung Diseases*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 246.
29. Klein, O.L., et al., *Systematic review of the association between lung function and Type 2 diabetes mellitus*. Diabet Med, 2010. **27**(9): p. 977-87.
30. Wang, D., et al., *Diabetes Mellitus Contributes to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Review From Clinical Appearance to Possible Pathogenesis*. Front Public Health, 2020. **8**: p. 196.
31. Ghisa, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis and GERD: links and risks*. Ther Clin Risk Manag, 2019. **15**: p. 1081-1093.
32. Lancaster, L.H., et al., *Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis*. Chest, 2009. **136**(3): p. 772-778.
33. Caminati, A., et al., *Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis: an underestimated issue*. Eur Respir Rev, 2019. **28**(153).
34. Zaman, T. and J.S. Lee, *Risk factors for the development of idiopathic pulmonary fibrosis: A review*. Curr Pulmonol Rep, 2018. **7**(4): p. 118-125.
35. American Thoracic, S. and S. European Respiratory, *American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 277-304.
36. Society, B.T. and S.O. Committee, *The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. Introduction*. Thorax, 1999. **54 Suppl 1**(Suppl 1): p. S1-14.
37. Richeldi, L., et al., *Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2003. **2003**(3): p. CD002880.
38. Papiris, S.A., et al., *The New Idiopathic Pulmonary Fibrosis Acute Exacerbations Document: One Step Ahead but Still Suspended in the Air*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(2): p. 267-269.
39. Papiris, S.A., et al., *Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbation: defenders or killers?* Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(5): p. 587-8.
40. Papiris, S.A., et al., *Clinical review: idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations-unravelling Ariadne's thread*. Crit Care, 2010. **14**(6): p. 246.

41. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research, N., et al., *Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2012. **366**(21): p. 1968-77.
42. Noble, P.W., et al., *Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials*. Lancet, 2011. **377**(9779): p. 1760-9.
43. Papiris, S.A., et al., *Pirfenidone treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: too much of a great expectation?* Eur Respir J, 2012. **40**(3): p. 794-5.
44. Spagnolo, P., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development*. Pharmacol Ther, 2021. **222**: p. 107798.
45. Justet, A., et al., *Safety and efficacy of pirfenidone and nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and carrying a telomere-related gene mutation*. Eur Respir J, 2021. **57**(2).
46. Tzouvelekis, A., et al., *Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 142.
47. Spagnolo, P., et al., *Shedding light on developmental drugs for idiopathic pulmonary fibrosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2020. **29**(8): p. 797-808.
48. Raghu, G., et al., *FG-3019 anti-connective tissue growth factor monoclonal antibody: results of an open-label clinical trial in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2016. **47**(5): p. 1481-91.
49. Tager, A.M., 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): p. 45-54.
50. Ninou, I., C. Magkrioti, and V. Aidinis, *Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 180.
51. Magkrioti, C., et al., *Autotaxin and chronic inflammatory diseases*. J Autoimmun, 2019. **104**: p. 102327.
52. Oikonomou, N., et al., *Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **47**(5): p. 566-74.
53. Antoniou, K.M., et al., *Precision medicine in idiopathic pulmonary fibrosis therapy: From translational research to patient-centered care*. Curr Opin Pharmacol, 2021. **57**: p. 71-80.
54. Li, H., et al., *Src family kinases and pulmonary fibrosis: A review*. Biomed Pharmacother, 2020. **127**: p. 110183.
55. Ahangari, F., et al., *Saracatinib, a Selective Src Kinase Inhibitor, Blocks Fibrotic Responses in Preclinical Models of Pulmonary Fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2022. **206**(12): p. 1463-1479.
56. Wynn, T.A., *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis*. J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1339-50.
57. Selman, M. and A. Pardo, *The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Cell Signal, 2020. **66**: p. 109482.
58. Sivakumar, P., et al., *Into the matrix: targeting fibroblasts in pulmonary fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2012. **18**(5): p. 462-9.
59. Gu, Y., et al., *The emerging roles of interstitial macrophages in pulmonary fibrosis: A perspective from scRNA-seq analyses*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 923235.
60. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 450-462.
61. Braga, T.T., J.S. Agudelo, and N.O. Camara, *Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 602.
62. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
63. Duffield, J.S., et al., *Host responses in tissue repair and fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 241-76.

64. Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, *The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers*. Proc Am Thorac Soc, 2012. **9**(3): p. 111-6.
65. Tashiro, J., et al., *Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 118.
66. Li, S., J. Shi, and H. Tang, *Animal models of drug-induced pulmonary fibrosis: an overview of molecular mechanisms and characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2022. **38**(5): p. 699-723.
67. Manali, E.D., et al., *Static and dynamic mechanics of the murine lung after intratracheal bleomycin*. BMC Pulm Med, 2011. **11**: p. 33.
68. Barbayianni, I., et al., *Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 269.
69. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
70. Karamanos, N.K., et al., *A guide to the composition and functions of the extracellular matrix*. Febs j, 2021. **288**(24): p. 6850-6912.
71. Tomos, I.P., et al., *Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis. It is the 'bed' that counts and not 'the sleepers'*. Expert Rev Respir Med, 2017. **11**(4): p. 299-309.
72. Theocharis, A.D., D. Manou, and N.K. Karamanos, *The extracellular matrix as a multitasking player in disease*. Febs j, 2019. **286**(15): p. 2830-2869.
73. Kyriakopoulou, K., et al., *Trends in extracellular matrix biology*. Mol Biol Rep, 2023. **50**(1): p. 853-863.
74. Pieta C Wijsman, L.H.v.S., Daniël M de Bruin, Jouke T Annema, Huib AM Kerstjens, Onno M Mets, Maarten van den Berge, Peter I Bonta, Janette K Burgess, *Imaging the pulmonary extracellular matrix*. Current Opinion in Physiology,, 2021. **22**.
75. Tschumperlin, D.J., et al., *Mechanosensing and fibrosis*. J Clin Invest, 2018. **128**(1): p. 74-84.
76. Upagupta, C., et al., *Matrix abnormalities in pulmonary fibrosis*. Eur Respir Rev, 2018. **27**(148).
77. Herrera, J., C.A. Henke, and P.B. Bitterman, *Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis*. J Clin Invest, 2018. **128**(1): p. 45-53.
78. Cejudo-Martin, P., et al., *Genetic disruption of the sh3pxd2a gene reveals an essential role in mouse development and the existence of a novel isoform of tks5*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107674.
79. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;q=ENSG00000107957;r=10:103594027-103855543;t=ENST00000355946.
80. Li, C.M., et al., *Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma*. Genes Dev, 2013. **27**(14): p. 1557-67.
81. Kudlik, G., et al., *Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
82. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001683-IPR001452>.
83. Moodley, S., et al., *XB130/Tks5 scaffold protein interaction regulates Src-mediated cell proliferation and survival*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(24): p. 4492-502.
84. Oikawa, T., et al., *Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion*. J Cell Biol, 2012. **197**(4): p. 553-68.
85. Courtneidge, S.A., *Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 129-32.

86. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000107957SH3PXD2A/tissue#gene-information>.
87. Linder, S., *Invadosomes at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 17): p. 3009-13.
88. Di Martino, J., et al., *The microenvironment controls invadosome plasticity*. J Cell Sci, 2016. **129**(9): p. 1759-68.
89. Murphy, D.A. and S.A. Courtneidge, *The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(7): p. 413-26.
90. Block, M.R., et al., *Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 491-506.
91. Linder, S., *The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(3): p. 107-17.
92. Paz, H., N. Pathak, and J. Yang, *Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis*. Oncogene, 2014. **33**(33): p. 4193-202.
93. Kurisu, S. and T. Takenawa, *The WASP and WAVE family proteins*. Genome Biol, 2009. **10**(6): p. 226.
94. Takenawa, T. and H. Miki, *WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 10): p. 1801-9.
95. Rohatgi, R., et al., *The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly*. Cell, 1999. **97**(2): p. 221-31.
96. Murphy, D.A., et al., *A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22499.
97. Stylli, S.S., et al., *Expression of the adaptor protein Tks5 in human cancer: prognostic potential*. Oncol Rep, 2014. **32**(3): p. 989-1002.
98. Blouw, B., et al., *The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121003.
99. Seals, D.F., et al., *The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 155-65.
100. Iizuka, S., et al., *The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 78473-78486.
101. Burger, K.L., et al., *Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells*. Prostate, 2014. **74**(2): p. 134-48.
102. Stanton, H., et al., *Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(12): p. 1616-29.
103. Wight, T.N., *Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan*. Matrix Biol, 2017. **60-61**: p. 38-56.
104. Tang, F., et al., *Defining the versican interactome in lung health and disease*. Am J Physiol Cell Physiol, 2022. **323**(2): p. C249-c276.
105. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000038427-VCAN/tissue>.
106. Wight, T.N., et al., *Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 512.
107. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
108. Herrera, J., et al., *Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis*. JCI Insight, 2019. **4**(1).
109. Zhang, Z., L. Miao, and L. Wang, *Inflammation amplification by Versican: the first mediator*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(6): p. 6873-6882.

110. Yeung, T.L., et al., *TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2013. **73**(16): p. 5016-28.
111. Yu, S., R. Han, and R. Gan, *The Wnt/ β -catenin signalling pathway in Haematological Neoplasms*. *Biomark Res*, 2022. **10**(1): p. 74.
112. Theocharis, A.D., *Versican in health and disease*. *Connect Tissue Res*, 2008. **49**(3): p. 230-4.
113. Islam, S. and H. Watanabe, *Versican: A Dynamic Regulator of the Extracellular Matrix*. *J Histochem Cytochem*, 2020. **68**(11): p. 763-775.
114. Natasha, M., *"Targeting versican as a therapeutic strategy in Duchenne muscular dystrophy."* 2018.
115. Wu, Y.J., et al., *The interaction of versican with its binding partners*. *Cell Res*, 2005. **15**(7): p. 483-94.
116. Wight, T.N. and M.J. Merrilees, *Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican*. *Circ Res*, 2004. **94**(9): p. 1158-67.
117. Wight, T.N., et al., *Versican and the regulation of cell phenotype in disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(8): p. 2441-51.
118. Sheng, W., et al., *The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(3): p. 1330-40.
119. Chen, C., et al., *The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 64.
120. Suwan, K., et al., *Versican/PG-M Assembles Hyaluronan into Extracellular Matrix and Inhibits CD44-mediated Signaling toward Premature Senescence in Embryonic Fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(13): p. 8596-604.
121. Choocheep, K., et al., *Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(27): p. 21114-25.
122. Yamagata, M. and J.R. Sanes, *Versican in the developing brain: lamina-specific expression in interneuronal subsets and role in presynaptic maturation*. *J Neurosci*, 2005. **25**(37): p. 8457-67.
123. Wight, T.N., I. Kang, and M.J. Merrilees, *Versican and the control of inflammation*. *Matrix Biol*, 2014. **35**: p. 152-61.
124. Andersson-Sjöland, A., et al., *Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders*. *Glycobiology*, 2015. **25**(3): p. 243-51.
125. Wu, L., et al., *Deposition of insoluble elastin by pulmonary fibroblasts from patients with COPD is increased by treatment with versican siRNA*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017. **12**: p. 267-273.
126. Kang, I., et al., *Versican Deficiency Significantly Reduces Lung Inflammatory Response Induced by Polyinosine-Polycytidylic Acid Stimulation*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(1): p. 51-63.
127. Paul A. Keire, I.K., Thomas N. Wight, *Versican: Role in Cancer Tumorigenesis*. Springer ed. *Extracellular Matrix in Tumor Biology 2017, Biology of Extracellular Matrix*: Springer, Cham.
128. Plikus, M.V., et al., *Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease*. *Cell*, 2021. **184**(15): p. 3852-3872.
129. Li, Y., et al., *Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44*. *J Exp Med*, 2011. **208**(7): p. 1459-71.
130. Lovgren, A.K., et al., *β -arrestin deficiency protects against pulmonary fibrosis in mice and prevents fibroblast invasion of extracellular matrix*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(74): p. 74ra23.
131. Karvonen, H.M., et al., *Myofibroblasts in interstitial lung diseases show diverse electron microscopic and invasive features*. *Lab Invest*, 2012. **92**(9): p. 1270-84.

132. White, E.S., et al., *Integrin alpha4beta1 regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(4): p. 436-42.
133. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
134. Paterson, E.K. and S.A. Courtneidge, *Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance*. FEBS J, 2018. **285**(1): p. 8-27.
135. Hoshino, D., K.M. Branch, and A.M. Weaver, *Signaling inputs to invadopodia and podosomes*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 14): p. 2979-89.
136. Fanidis, D., P. Moulos, and V. Aidinis, *Fibromine is a multi-omics database and mining tool for target discovery in pulmonary fibrosis*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 21712.
137. Reyfman, P.A., et al., *Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Provides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2019. **199**(12): p. 1517-1536.
138. Mouratis, M.A. and V. Aidinis, *Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin*. Curr Opin Pulm Med, 2011. **17**(5): p. 355-61.
139. Seals, D.F., et al., *The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 155-165.
140. Auwerx, J., et al., *The European dimension for the mouse genome mutagenesis program*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 925-7.
141. Raess, M., et al., *INFRAFRONTIER: a European resource for studying the functional basis of human disease*. Mamm Genome, 2016. **27**(7-8): p. 445-50.
142. Ehlich, H., et al., *INFRAFRONTIER quality principles in systemic phenotyping*. Mamm Genome, 2022. **33**(1): p. 120-122.
143. Schwenk, F., U. Baron, and K. Rajewsky, *A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(24): p. 5080-1.
144. Farley, F.W., et al., *Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice*. Genesis, 2000. **28**(3-4): p. 106-10.
145. Subramanian, A., et al., *A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1437-1452.e17.
146. Wells, A.U., et al., *Nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung diseases-subgroup analyses by interstitial lung disease diagnosis in the INBUILD trial: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial*. Lancet Respir Med, 2020. **8**(5): p. 453-460.
147. Foxall, E., et al., *PAK4 Kinase Activity Plays a Crucial Role in the Podosome Ring of Myeloid Cells*. Cell Rep, 2019. **29**(11): p. 3385-3393.e6.
148. Rafiq, N.B.M., et al., *Podosome assembly is controlled by the GTPase ARF1 and its nucleotide exchange factor ARNO*. J Cell Biol, 2016. **216**(1): p. 181-197.
149. Rottiers, P., et al., *TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 23): p. 4311-8.
150. Varon, C., et al., *Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3582-94.
151. Charbonneau, M., et al., *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Activation Promotes the Prodestructive Invadosome-Forming Phenotype of Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis*. J Immunol, 2016. **196**(8): p. 3264-75.
152. Quintavalle, M., et al., *MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. J Cell Biol, 2010. **189**(1): p. 13-22.

153. Spuul, P., et al., *VEGF-A/Notch-Induced Podosomes Proteolyse Basement Membrane Collagen-IV during Retinal Sprouting Angiogenesis*. *Cell Rep*, 2016. **17**(2): p. 484-500.
154. Zannikou, M., et al., *MAP3K8 Regulates Cox-2-Mediated Prostaglandin E(2) Production in the Lung and Suppresses Pulmonary Inflammation and Fibrosis*. *J Immunol*, 2021. **206**(3): p. 607-620.
155. van Helden, S.F.G., et al., *A Critical Role for Prostaglandin E₂ in Podosome Dissolution and Induction of High-Speed Migration during Dendritic Cell Maturation*. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 1567-1574.
156. Iizuka, S., et al., *Crosstalk between invadopodia and the extracellular matrix*. *Eur J Cell Biol*, 2020. **99**(7): p. 151122.
157. Artym, V.V., et al., *Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network*. *J Cell Biol*, 2015. **208**(3): p. 331-50.
158. Juin, A., et al., *Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway*. *J Cell Biol*, 2014. **207**(4): p. 517-33.
159. Alexander, N.R., et al., *Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity*. *Curr Biol*, 2008. **18**(17): p. 1295-9.
160. White, E.S., *Lung extracellular matrix and fibroblast function*. *Ann Am Thorac Soc*, 2015. **12 Suppl 1**(Suppl 1): p. S30-3.
161. Burgstaller, G., et al., *The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease*. *Eur Respir J*, 2017. **50**(1).
162. Pardo, A. and M. Selman, *Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Ann Am Thorac Soc*, 2016. **13 Suppl 5**: p. S417-s421.
163. Zhou, Y., et al., *Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(3): p. 1096-108.
164. Zhao, P., et al., *The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity*. *J Cell Sci*, 2016. **129**(7): p. 1355-65.
165. Geng, Y., et al., *PD-L1 on invasive fibroblasts drives fibrosis in a humanized model of idiopathic pulmonary fibrosis*. *JCI Insight*, 2019. **4**(6).
166. Ahluwalia, N., et al., *Fibrogenic Lung Injury Induces Non-Cell-Autonomous Fibroblast Invasion*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016. **54**(6): p. 831-42.
167. Jiang, D., et al., *Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(6): p. 2049-57.
168. Liu, X., et al., *HER2 drives lung fibrosis by activating a metastatic cancer signature in invasive lung fibroblasts*. *J Exp Med*, 2022. **219**(10).
169. Jaeger, B., et al., *Airway basal cells show a dedifferentiated KRT17(high) Phenotype and promote fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Nat Commun*, 2022. **13**(1): p. 5637.
170. Ahangari, F., et al., *Saracatinib, a Selective Src Kinase Inhibitor, Blocks Fibrotic Responses in Preclinical Models of Pulmonary Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022.
171. Hu, M., et al., *Therapeutic targeting of SRC kinase in myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014. **351**(1): p. 87-95.
172. Lu, Y.Y., et al., *Interaction of Src and Alpha-V Integrin Regulates Fibroblast Migration and Modulates Lung Fibrosis in A Preclinical Model of Lung Fibrosis*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46357.
173. Tzouvelekis, A., et al., *SH2 Domain-Containing Phosphatase-2 Is a Novel Antifibrotic Regulator in Pulmonary Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017. **195**(4): p. 500-514.
174. DeQuach, J.A., et al., *Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture*. *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. e13039.

175. Kawai, N., et al., *Induction of lung-like cells from mouse embryonic stem cells by decellularized lung matrix*. Biochem Biophys Rep, 2018. **15**: p. 33-38.
176. Stuart, T., et al., *Comprehensive Integration of Single-Cell Data*. Cell, 2019. **177**(7): p. 1888-1902.e21.
177. Hao, Y., et al., *Integrated analysis of multimodal single-cell data*. Cell, 2021. **184**(13): p. 3573-3587.e29.
178. Fanidis, D. and P. Moulos, *Integrative, normalization-insusceptible statistical analysis of RNA-Seq data, with improved differential expression and unbiased downstream functional analysis*. Briefings in Bioinformatics, 2020.
179. Lawrence, M., et al., *Software for Computing and Annotating Genomic Ranges*. PLOS Computational Biology, 2013. **9**(8): p. e1003118.
180. Risso, D., et al., *GC-Content Normalization for RNA-Seq Data*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**(1): p. 480-480.
181. The Gene Ontology, C., *The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine*. Nucleic Acids Research, 2021. **49**(D1): p. D325-D334.
182. Yu, G., et al., *clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters*. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2012. **16**(5): p. 284-287.
183. Rani, J., A.R. Shah, and S. Ramachandran, *pubmed.mineR: An R package with text-mining algorithms to analyse PubMed abstracts*. Journal of Biosciences, 2015. **40**(4): p. 671-682.
184. Durinck, S., et al., *Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt*. Nature Protocols, 2009. **4**(8): p. 1184-1191.
185. Garcia-Alonso, L., et al., *Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities*. Genome Research, 2019. **29**(8): p. 1363-1375.

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

SRC and TKS5 mediated podosome formation in fibroblasts promotes extracellular matrix invasion and pulmonary fibrosis

Received: 5 February 2023

Accepted: 11 September 2023

Published online: 21 September 2023

 Check for updates

Ilianna Barbayianni^{1,7}, Paraskevi Kanellopoulou^{1,7}, Dionysios Fanidis¹, Dimitris Nastos¹, Eleftheria-Dimitra Ntouskou¹, Apostolos Galaris¹, Vaggelis Harokopos¹, Pantelis Hatzis¹, Eliza Tsitoura², Robert Homer³, Naftali Kaminski⁴, Katerina M. Antoniou², Bruno Crestani⁵, Argyrios Tzouvelekis⁶ & Vassilis Aidinis¹✉

The activation and accumulation of lung fibroblasts resulting in aberrant deposition of extracellular matrix components, is a pathogenic hallmark of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, a lethal and incurable disease. In this report, increased expression of TKS5, a scaffold protein essential for the formation of podosomes, was detected in the lung tissue of Idiopathic Pulmonary Fibrosis patients and bleomycin-treated mice. The profibrotic milieu is found to induce *TKS5* expression and the formation of prominent podosome rosettes in lung fibroblasts, that are retained ex vivo, culminating in increased extracellular matrix invasion. *Tks5*^{-/-} mice are found resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis, largely attributed to diminished podosome formation in fibroblasts and decreased extracellular matrix invasion. As computationally predicted, inhibition of src kinase is shown to potently attenuate podosome formation in lung fibroblasts and extracellular matrix invasion, and bleomycin-induced pulmonary fibrosis, suggesting pharmacological targeting of podosomes as a very promising therapeutic option in pulmonary fibrosis.

Tissue fibrosis is a pathogenic process that affects most organs and constitutes a complication of many chronic diseases including cancer; such fibroproliferative disorders account for >45% of all disease-related deaths worldwide¹. Among them, Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, interstitial lung disease affecting mostly older adults. IPF patients exhibit progressive worsening of respiratory functions, which lead to dyspnea and eventually to respiratory failure.

Histologically, IPF is characterized by lung parenchymal scarring, as evident by a usual interstitial pneumonia (UIP) profile, characterized by patchy dense fibrosis with architectural distortion and a subpleural and paraseptal preference, and is distinguished by the presence of fibroblast foci². Although the etiopathogenesis of IPF remains largely elusive, the prevailing hypothesis suggests that the mechanisms driving IPF involve age-related aberrant recapitulation of developmental

¹Institute for Fundamental Biomedical Research, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece. ²Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece. ³Department of Pathology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA. ⁴Department of Internal Medicine, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA. ⁵Department of Pulmonology, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France. ⁶Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, University of Patras, Patras, Greece. ⁷These authors contributed equally: Ilianna Barbayianni, Paraskevi Kanellopoulou. ✉ e-mail: V.Aidinis@Fleming.gr

programs and reflect abnormal, deregulated wound healing in response to persistent alveolar epithelial damage, resulting in the accumulation of lung fibroblasts (LFs)³.

LFs are the main effector cells in pulmonary fibrosis, secreting exuberant amounts of extracellular matrix (ECM) components, such as different types of collagens. LFs also secrete a variety of ECM remodeling enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs), thus coordinating the overall ECM structural organization and consequently the mechanical properties of the lung⁴. LF activation upon fibrogenic cues, such as TGF β or other growth factors (including PDGF and VEGF), is characterized by the expression of alpha smooth muscle actin (α SMA/ACTA2), and/or increased collagen expression, as exemplified by COL1A1^{5,6}. ECM fibrotic remodeling and resulting mechanical cues are considered as crucial stimulating and perpetuating factors for LF activation^{6,7}, while the chemoattraction of LFs to various signals and their resistance to apoptosis has been suggested to promote respectively their recruitment and accumulation^{5,6}.

Fibroblast accumulation in pulmonary fibrosis has also been suggested to be mediated by their ability to invade the underlying ECM, and increased ECM invasion of fibroblasts isolated from the lung tissue of IPF patients or animal models has been reported^{8–11}. Activation of invasion, critical for embryonic development, is among the well-established hallmarks of cancer¹², and one of the many shared hallmarks between cancer cells and activated LFs¹³. Invasion critically relies on the proteolysis of the underlying ECM via invadopodia in cancer cells and podosomes in other cell types^{14,15}.

Podosomes are comprised of a filamentous (F)-actin-rich core enriched in actin-regulating proteins, such as the Arp2/3 complex and cortactin (CTTN), and are surrounded by a ring of scaffold proteins, most notably SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A; commonly known as tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains, TKS5)^{14–16}. The effector molecules of the podosomes are various proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs, mainly 2, 9, and 14) that digest the ECM locally, thus stimulating the invasion and migration of podosome bearing cells^{16,17}.

Tks5 expression is necessary for neural crest cell migration during embryonic development in zebrafish¹⁸, and homozygous disruption of *Tks5* in mice resulted in neonatal death¹⁹. Beyond embryonic development, which heavily relies on migration and invasion, increased TKS5 expression has been reported in different types of cancers^{14–16}, including lung adenocarcinoma, where it was suggested to mediate metastatic invasion²⁰. Pulmonary fibrosis confers one of the highest risks for lung cancer development, while many similarities between activated LFs and cancer cells have been suggested, including ECM invasion¹³. Therefore, in this report we investigated a possible role of TKS5 and podosomes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis employing in silico analysis of publicly available human and mouse transcriptomic datasets, de novo analysis of human samples and associated clinical data, disease modeling in mice, ex vivo/in vitro human/mouse cell cultures and dedicated functional assays, as well as pharmacologic validation experiments. In this context, increased *Tks5* expression is detected in both human and mouse fibrotic lungs, primarily expressed in LFs. The profibrotic milieu, is shown to induce TKS5 expression and the formation of prominent podosome rosettes in fibroblasts, culminating in increased ECM invasion. Haploinsufficient *Tks5*^{+/-} mice are found resistant to BLM-induced pulmonary fibrosis, largely attributable to diminished podosome formation in LFs and decreased ECM invasion. Expression profiling reveals an ECM-podosome cross talk, and pharmacologic connectivity map analysis suggests several inhibitors that could prevent podosome formation and thus pulmonary fibrosis. Among them, inhibition of src kinase is shown to potentially attenuate podosome formation in LFs, ECM invasion, as well as BLM-induced pulmonary fibrosis.

Results

Increased *TKS5* expression in pulmonary fibrosis

Increased *TKS5* mRNA levels were detected in silico in the lung tissue of IPF patients as compared with control samples (Fig. 1a), in most publicly available IPF transcriptomic datasets (Supplementary Table 1) at Fibromine²¹, including three of the largest ones (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1a, c). Importantly, *TKS5* mRNA expression in fibrotic lungs correlated with the expression of *COL1A1* (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1b, d), a well-established marker of fibrotic gene expression. Confirming the in silico results, increased *TKS5* mRNA levels were detected with quantitative RNA RT-PCR (Q-RT-PCR) in lung tissue isolated from IPF patients ($n=20$), as compared with COPD patients ($n=19$) and healthy lung tissue ($n=9$) (Supplementary Table 2 and Fig. 1d). Moreover, positive TKS5 immunostaining was detected in the lungs of IPF/UIP patients ($n=3$), as opposed to control samples ($n=3$), mainly localized in the alveolar epithelium and fibrotic areas (Fig. 1e and Supplementary Fig. 2). Similar conclusions were derived from the analysis of a publicly available single cell RNA sequencing (scRNAseq) dataset of lung tissue from transplant recipients with pulmonary fibrosis ($n=4$) and healthy lung tissue from transplant donors ($n=8$)²². *TKS5* mRNA expression was mostly detected in subsets of epithelial cells, basal cells and especially fibroblasts (Supplementary Fig. 1e, f), where TKS5-expressing LFs were found to belong to a *COL1A1*-expressing subpopulation (Supplementary Fig. 1g, f).

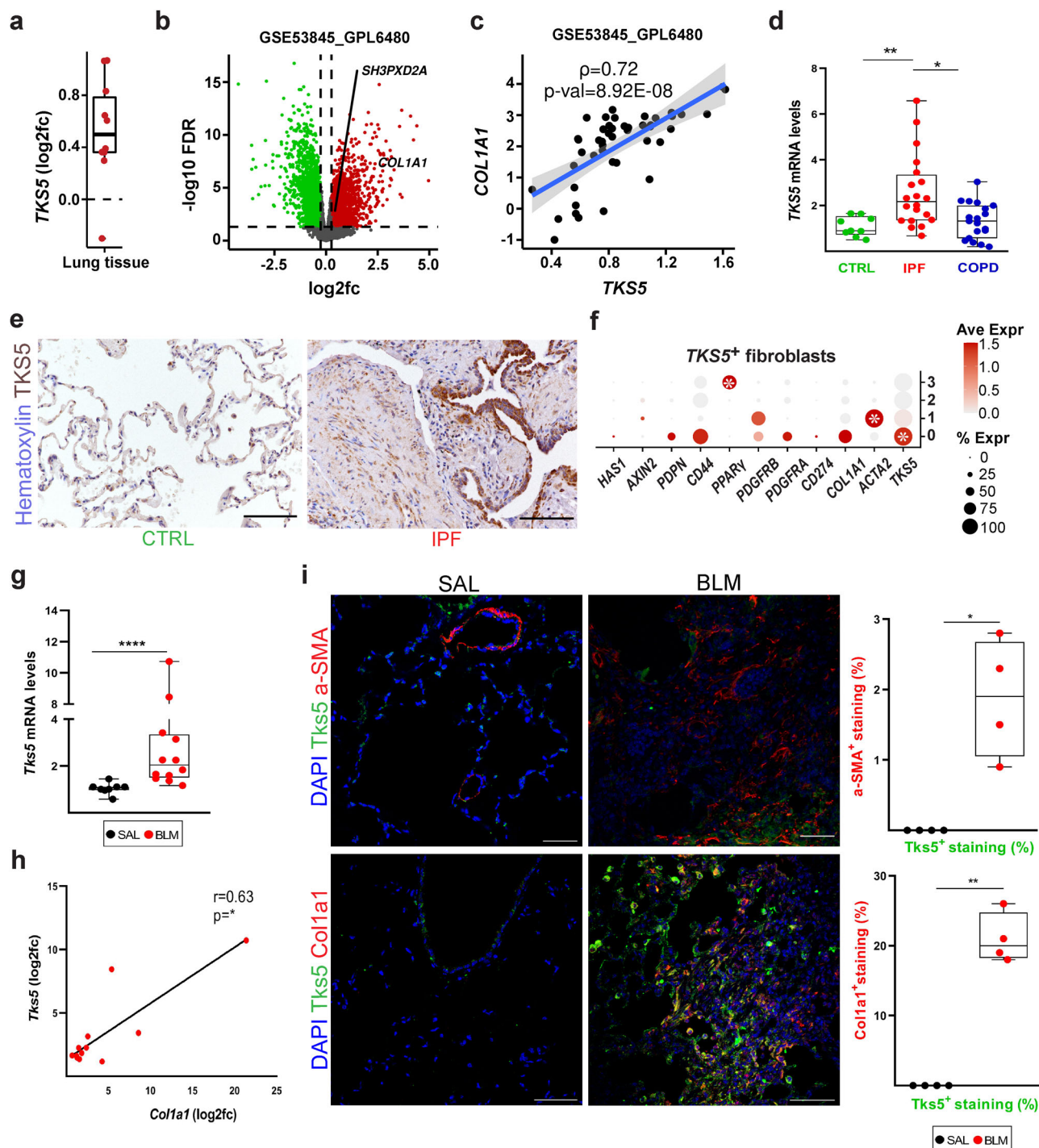
Increased *Tks5* mRNA levels, correlating with *Col1a1* mRNA levels, were also detected in the lung tissue of mice post bleomycin (BLM) administration (Fig. 1g, h), a widely used animal model of pulmonary fibrosis^{23–25}; immunostaining localized Tks5 in the alveolar epithelium and fibrotic areas (Fig. 1i), as in human patients. Moreover, double immunostaining for α SMA or Col1a1, prominent activation markers of fibroblasts in both mice and humans, indicated that Tks5 localized mainly to a Col1a1 expressing fibroblast subset, as Tks5 staining overlapped with 20% of Col1a1 staining, as opposed to a 2% with α SMA staining (Fig. 1i and Supplementary Fig. 3).

Therefore, pulmonary fibrosis in both humans and mice is associated with increased *TKS5* expression, consistently correlated with the expression of *Col1a1*, especially in LFs.

TGF β -induced podosome rosettes is an inherent property of fibrotic LFs

TGF β , among the main pro-fibrotic factors driving disease development in vivo, was found to stimulate *TKS5* mRNA expression in different primary normal human lung fibroblast (NHLF) clones (Fig. 2a), correlating with *COL1A1* mRNA expression (Fig. 2b); identical results were obtained from an independently derived NHLF cell line at a different lab/setting (Supplementary Fig. 4a, b), as well as from the human fibroblastic cell line MRC5 (Supplementary Fig. S4c, d). In agreement with the essential role of TKS5 on podosome formation (colocalization of F-actin with TKS5 or CTTN)²⁶, TGF β , playing a prominent role in proliferation and migration of fibroblasts (Supplementary Fig. 4e–g respectively), potentially stimulated the formation of podosomes in NHLFs in vitro, organized in distinctive rosettes (Fig. 2c–f and Supplementary Fig. 5a–f). Moreover, TGF β -induced podosomes in LFs were enriched in MMP9 (Fig. 2g, h and Supplementary Fig. 5g, h), likely contributing to the increased degradation of a fluorescein-conjugated gelatin substrate (Fig. 2i, j), a nominal podosome property.

To examine if the pro-fibrotic milieu in the lungs of IPF patients, which includes TGF β , also stimulate podosome formation in vivo, HLFs from IPF patients (Supplementary Table 3) were cultured in the absence of any stimulation and were stained for podosomes in comparison, under the same conditions (and 7–8 passages), with different NHLF lines derived from healthy tissue. Remarkably, IPF HLFs, irrespectively of cell density (Supplementary Fig. 6a), presented with



prominent podosome rosettes (Fig. 3a–d, Supplementary Fig. 6a, b, and Supplementary Movie 1), identical in structure as those stimulated *in vitro* by TGF β , that persist upon prolonged culture *ex vivo*. As shown for TGF β -stimulated NHLFs, IPF HLFs degraded more potently than NHLFs a fluorescein-conjugated gelatin substrate (Fig. 3e, f and Supplementary Fig. 6c).

Phenocopying the human experiments, exposure to TGF β of primary, normal mouse lung fibroblasts (NMLFs) stimulated *Tks5* mRNA expression (Supplementary Fig. 7a), correlating with *Col1a1* expression (Supplementary Fig. 7b), the formation of podosome rosettes (Supplementary Fig. 7c, d) and the degradation of a fluorescein-conjugated gelatin substrate (Supplementary Fig. 7e, f); similar results were obtained with 3T3 embryonic fibroblasts (Supplementary Fig. 7g–k).

Moreover, and as in the case of IPF LF, mouse primary LF isolated post-BLM administration presented with increased *Tks5*, *Col1a1* and *Mmp9* expression (Supplementary Fig. 7l–n respectively), exhibiting prominent podosome rosettes in the absence of any stimulation (Supplementary Fig. 7o–p).

Therefore, the pro-fibrotic milieu in the lungs of IPF patients and BLM-treated mice, as well as TGF β , induce *TKS5* expression and the formation of podosome rosettes, an inherent fibrotic LF property.

Creation of a series of obligatory and conditional knock out mice for *Tks5*

To enable functional studies on the likely role of *Tks5* in pulmonary fibrosis and pathophysiology in mice, we then created a series of

Fig. 1 | Increased *TKS5* expression in pulmonary fibrosis. **a** *TKS5* mRNA expression in lung tissue from Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) patients as compared (log2FC) to controls (CTRL) in different publicly available datasets ($n = 9$) (Supplementary Table 1) at Fibromine. **b** Volcano plot from a representative large dataset ($FC > 1.2$, $FDR < 0.05$). **c** Scatter plot of *TKS5* and *COL1A1* expression in the same dataset with a fitted linear model and 95% CI; correlation was assessed with two-tailed Spearman's test ($p > 0.6$; $p = 8.92E-08$). **d** Increased *TKS5* mRNA levels in the lung tissue of IPF (Usual Interstitial Pneumonitis; UIP) patients ($n = 20$) were detected with Q-RT-PCR ($r^2 = 0.98$, $E = 97\%$), as compared with lung tissue from COPD patients ($n = 19$) and control (CTRL) lung tissue isolated from lung cancer patients ($n = 9$) (Supplementary Table 2). Values were normalized to the expression values of the housekeeping gene *B2m* and presented as fold change to CTRL values. Statistical significance was assessed with two-tailed Kruskal-Wallis test ($^{***}p = 0.0076$, $^{**}p = 0.0129$). **e** Increased *TKS5* immunostaining in fibrotic lungs. Representative images from immunohistochemistry for *TKS5* (brown) in IPF and CTRL lung tissue ($n = 3$; Supplementary Fig. 2); scale bars = 50 μm . **f** *TKS5* is expressed mainly by the *COL1A1*-expressing cluster/LF subpopulation, in a publicly

available scRNAseq dataset (Reyffman, Walter et al. 2019). Statistical significance was assessed with Wilcoxon Rank Sum test ($FC > 1.2$, Bonferroni corrected $p = 8.9E-12$ / $1.1E-10$ / $2.1E-3$ from left to right). **g, h** *Tks5* and *Col1a1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR ($r^2 = 0.89/0.93$; $E = 103\%/96\%$); cumulative result from 3 different experiments. Values were normalized over the expression of *B2m* and presented as fold change (log2) over control ($n = 8/12$). Statistical significance was assessed with two-tailed Mann Whitney test ($^{***}p < 0.0001$). **i** Two tailed spearman correlation plot of *Col1a1* expression in the same samples ($p = 0.0323$; $r = 0.63$). **j** Double immunostaining against *Tks5* (green) and αSMA (Acta2) or *Col1a1* (red); representative images are shown, followed by their respective quantification ($n = 4$) with Image J; scale bars=50 μm ; a representative experiment out of 3 successful independent ones are shown. Statistical significance was assessed with two-tailed Welch's test ($p = 0.0211$, $^{**}p = 0.0013$). In all panels all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 * IQR from the respective hinge. Source data for all panels are provided as a Source Data file.

obligatory and conditional knock out mice for *Tks5* (*Sh3pxd2a*). The *Sh3pxd2a* locus has been already targeted by the European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM), aiming to knock out all mouse genes in a high throughput approach²⁷. In this context, the exon 11 of the *Sh3pxd2a* gene was loxP-flanked, while a LacZ/neomycin reporter/selection cassette was placed upstream, including two FRT sites; this allele is referred to as “targeted mutation 1a” (tm1a; Supplementary Fig. 8a)²⁷. The targeted ES cells were then microinjected into C57Bl/6N blastocysts by the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), that were transferred in pseudopregnant females to yield the *Sh3pxd2a*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/+} heterozygous mice (Supplementary Fig. 8a). Frozen sperm of these mice was obtained from WTSI, via the INFAFRONTIER [<https://www.infrafrontier.eu/>] consortium^{28,29} and the European Mutant Mouse Archive- EMMA [<https://www.infrafrontier.eu/emma/emma-services/?keyword=sh3pxd2a&category=strains>]], that was directly injected to mice in the transgenic facility of “BSRC Fleming” via IVF technology to yield the *Sh3pxd2a*^{tm1a(EUCOMM)WtsiFlmg/+} heterozygous mice. Mice were genotyped following the corresponding strategy from EUCOMM, that queries three different genomic fragments (lacZ, WT allele, tm1a allele) by performing three independent PCR reactions (Supplementary Fig. 8b, c). Moreover, the successful targeting was also verified with long range PCR for both the 5' and 3' arms flanking the floxed region with primers against inserted sequences (Supplementary Fig. 8d, e).

To obtain the tm1b reporter allele (Supplementary Fig. 8a) *Sh3pxd2a*^{tm1a/Flmg/+} mice were mated with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the Cytomegalovirus (CMV) promoter in all mouse tissues and cells (*Tg-CMV-Cre*)³⁰. Genetic recombination of the obtained *Sh3pxd2a*^{tm1b(EUCOMM)WtsiFlmg/+} mice was verified with genomic PCR (Fig. S7B, C). Q-RT-PCR in lung tissues indicated a 50% reduction of *Sh3pxd2a* mRNA levels indicating proper gene targeting (Supplementary Fig. 8g). X-gal staining, detecting LacZ expression from the promoter of *Tks5* (Supplementary Fig. 8a, Tm1b), localized transcriptional *Tks5* activation (throughout development, neonatal and adult life) mainly in arterial endothelium of the lung (Supplementary Fig. 8i). No obvious gross macroscopic abnormalities were observed, while heterozygous mice were healthy and fertile.

The haploinsufficient *Sh3pxd2a*^{tm1b(EUCOMM)WtsiFlmg/+} and *Sh3pxd2a*^{tm1d(EUCOMM)WtsiFlmg/+} (*Tks5*^{+/-}) mice, presented with a 50% reduction of *Tks5* mRNA levels in the lung (Supplementary Fig. 8g-h), while X-gal staining (in the reporter tm1b strain) localized transcriptional *Tks5* activation (throughout development, neonatal and adult life) mainly in endothelial and smooth muscle cells in healthy conditions (Supplementary Fig. 8i). No obvious gross macroscopic abnormalities were observed, while heterozygous mice were healthy and fertile.

Intercrossing of heterozygous mice *Tks5*^{+/-} mice yielded no homozygous knockout mice, indicating that *Tks5* has an essential role

in mouse development, as previously reported for an obligatory knock out strain¹⁹.

A similar genetic strain, *Sh3pxd2a*^{tm1b(EUCOMM)Wtsi/+} was created by WTSI from the *Sh3pxd2a*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/+} mice via a cell permeable HTN-Cre³¹. *Sh3pxd2a*^{tm1b(EUCOMM)Wtsi/+} heterozygous mice were systematically phenotyped from the INFAFRONTIER consortium^{28,29} on our behalf, following a relative competitive call. Results indicated that *Sh3pxd2a*^{tm1b(EUCOMM)Wtsi/+} mice present with no major pathophysiological abnormalities, apart from an increase of serum alkaline phosphatase in females (measurements.chart[<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1298393#phenotypes-section>]). Moreover, a viability primary screen phenotypic assay was performed on the novel mutant strain by WTSI (data[chart[[https://www.mousephenotype.org/data/charts?accession=MGI:1298393&allele_accession_id=MGI:5636944&zygosity=homozygote¶meter_stable_id=IMPC_VIA_001_001&pipeline_stable_id=MGP_001&procedure_stable_id=IMPC_VIA_001_001¶meter_stable_id=IMPC_VIA_001_001&phenotyping_center=WTSI](https://www.mousephenotype.org/data/charts?accession=MGI:1298393&allele_accession_id=MGI:5636944&zygosity=homozygote¶meter_stable_id=IMPC_VIA_001_001&pipeline_stable_id=MGP_001&procedure_stable_id=IMPC_VIA_001¶meter_stable_id=IMPC_VIA_001_001&phenotyping_center=WTSI)]]), confirming the requirement of *Tks5* for embryonic development.

Moreover, and to generate the conditional tm1c allele (Fig. S7A), *Sh3pxd2a*^{tm1a(EUCOMM)WtsiFlmg/+} mice were crossed with transgenic mice expressing the Flp recombinase under the control of the Cytomegalovirus (CMV) promoter in all mouse tissues and cells (*Tg-CMV-Flp*)³². Genetic recombination of the obtained *Sh3pxd2a*^{tm1c(EUCOMM)WtsiFlmg/+} mice was verified with genomic PCR (Supplementary Fig. 8c). To generate the conditional tm1d allele (Supplementary Fig. 8a), *Sh3pxd2a*^{tm1c(EUCOMM)WtsiFlmg/+} mice were crossed with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the Cytomegalovirus (CMV) promoter in all mouse tissues and cells (*Tg-CMV-Cre*)³⁰. Genetic recombination of the obtained *Sh3pxd2a*^{tm1d(EUCOMM)WtsiFlmg/+} mice was verified with genomic PCR (Supplementary Fig. 8c). Q-RT-PCR in lung tissue indicated a 50% reduction of *Sh3pxd2a* mRNA levels indicating proper gene targeting (Supplementary Fig. 8h).

***Tks5* haploinsufficiency in mice attenuates BLM-induced pulmonary fibrosis**

To genetically dissect the likely role of *Tks5* in pulmonary fibrosis, BLM was administered to 8-10-week-old C57Bl6/J *Tks5*^{+/-} mice and WT littermates (Fig. 4a, b), which were sacrificed 14 days post BLM (at the peak of the disease in the local settings), as previously described²⁴. No weight loss, an overall systemic health indicator, was observed in *Tks5*^{+/-} mice (Fig. 4c), as opposed to wt mice. Vascular leak and pulmonary edema were significantly reduced in *Tks5*^{+/-} mice, as indicated by the total protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), determined with the Bradford assay (Fig. 4d). Inflammatory cells in the BALF, as measured by hemacytometer, were found

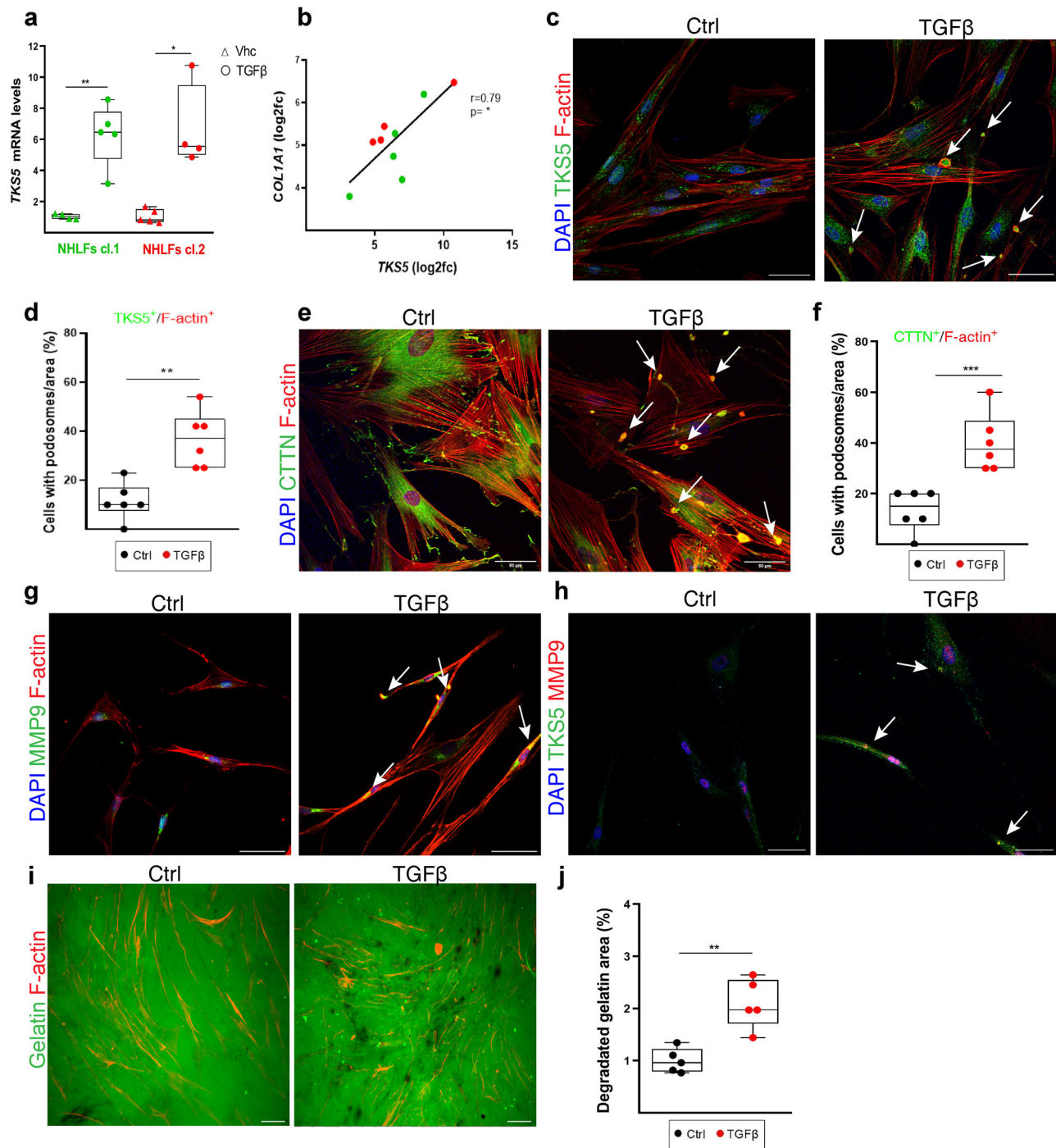


Fig. 2 | TGFβ induces the formation of podosome rosettes in normal human lung fibroblasts (NHLFs). Serum starved, sub-confluent (70–80%), primary NHLFs were stimulated with recombinant human TGFβ (10 ng/ml) for 24 h; a representative experiment out of 4 successful independent ones is shown. **a**, **b** *TKS5* and *COL1A1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR ($r^2 = 0.94/0.92$; $F = 98.3\%/93\%$ respectively) in two NHLF clones (cl.1, cl.2). Values were normalized to the expression values of the housekeeping gene *B2M* and presented as fold change over control; $n = 4/5/4/4$; statistical significance was assessed with two-tailed Welch's test (a/cl.1) and two-tailed Mann Whitney test (a/cl.2); $^*p = 0.0012$, $^*p = 0.0159$ respectively. **b** Two tailed Pearson correlation plot of *COL1A1* expression in the same samples ($p = 0.0116$; $r = 0.79$). **c–j** Representative composite images from double immunostaining, and respective quantifications, for: **c** F-actin/

TKS5 (red/green), **e** F-actin/Cortactin (CTTN; red/green), **g** F-actin/MMP9 (red/green), **h** *TKS5*/MMP9 (green/red). Cells are counterstained with DAPI; scale bars 50 μm; arrows indicate representative podosomes; separate images and proof of colocalization of signals can be found at Supplementary Fig. 5. **d**, **f**. Quantification of the number of podosome-containing cells per optical field ($n = 6$); statistical significance was assessed with two-tailed t-test; $^*p = 0.0011$, $^{***}p = 0.0009$.

i Representative images of the TGFβ-induced degradation (black holes) of a fluorescein-conjugated gelatin substrate. **j** Quantification of gelatin degradation area, normalized to control ($n = 5$); statistical significance was assessed with two-tailed t-test; $^*p = 0.0016$. Source data for all relative panels (a, b, d, f, j) are provided as a Source Data file.

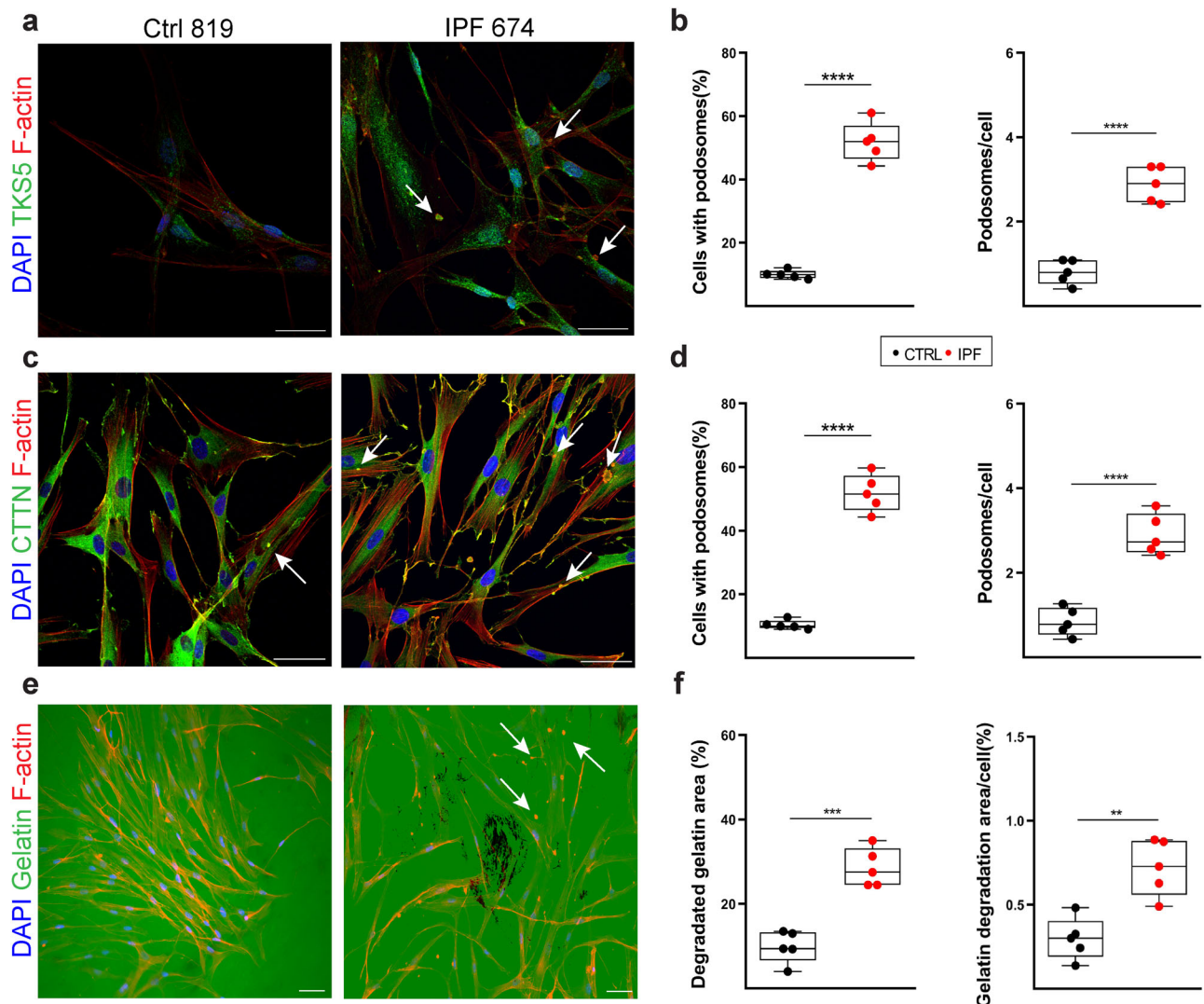


Fig. 3 | The formation of extracellular matrix (ECM) degrading podosome rosettes is an inherent property of IPF human lung fibroblasts (HLFs). Serum starved, sub-confluent (70–80%), primary IPF-HLFs and normal HLFs (NHLFs) were immunostained for F-actin (red) and (a) TKS5 (green) or (c) cortactin (CTTN; green) and counter stained with DAPI (blue); $n = 5$; scale bars = 50 μm . Representative images from representative clones are shown. **b, d** Cumulative quantification of the number of podosome-containing cells (%) and the number of podosomes per cell per optical field respectively. Statistical significance was assessed with two-tailed t -test (b) or two-tailed Welch's test (d) ($^{***}p < 0.0001$). **e** The same clones were cultured on a fluorescein-conjugated gelatin substrate (green) and were stained for

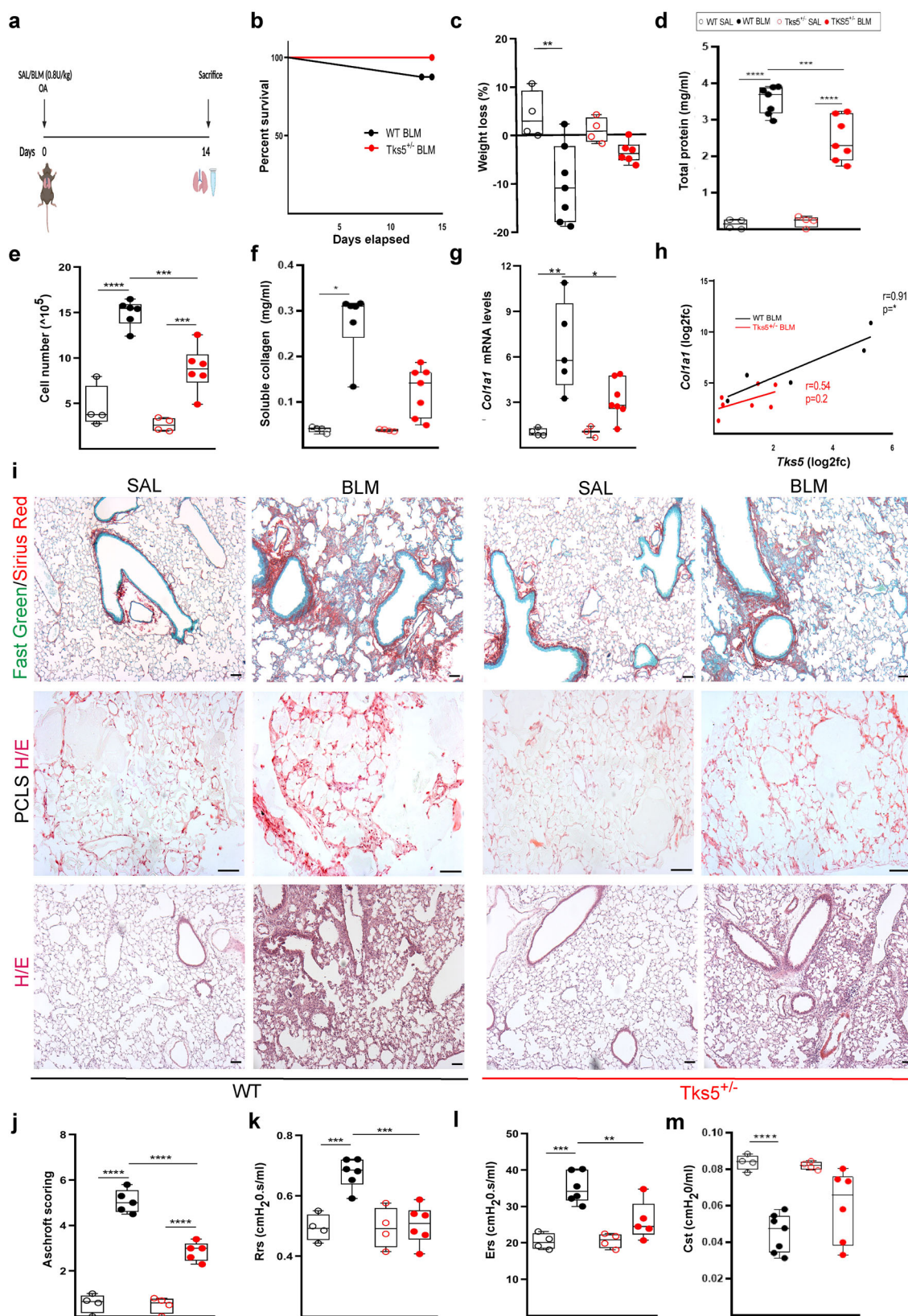
F-actin (red) and counter stained with DAPI (blue); representative images are shown. **f** Quantification of the percentage of the degraded gelatin for all clones cumulatively, and the quantification of gelatin degradation area per cell, as quantified with ImageJ; statistical significance was assessed with two-tailed t -test; $^{***}p = 0.0001$, $^{**}p = 0.0020$; additional clones and controls are shown at Supplementary Fig. 6. In all panels all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all relative panels (b, d, f) are provided as a Source Data file.

significantly reduced in *Tks5*^{-/-} mice (Fig. 4e); so were soluble collagen BALF levels, as determined by the Sirius red assay (Fig. 4f), in concordance with *Col1a1* mRNA expression in the lung tissue from the same mice, as determined with Q-RT-PCR (Fig. 4g, h). Histological analysis revealed decreased collagen deposition in *Tks5*^{-/-} mice post BLM, as quantified by Sirius red/Fast green staining (Fig. 4i), and fewer peribronchiolar and parenchymal fibrotic regions were detected (Fig. 4i), as reflected in the Ashcroft score (Fig. 4j); similar conclusions were drawn upon the histological evaluation of Precision Cut Lung Slices (PCLS) prepared from the same mice and cultured ex vivo (Fig. 4i). The relative protection from the BLM-induced tissue architecture distortion upon the genetic reduction of *Tks5* expression was also reflected in lung respiratory functions, as measured with FlexiVent (Fig. 4k–m). Therefore, *Tks5* expression, and likely the formation of podosomes, were shown to

have a major role in BLM-induced pulmonary fibrosis, and therefore likely IPF.

Tks5 haploinsufficiency in mouse LFs decreases ECM-regulated podosome formation and ECM invasion

To functionally dissect the relative protection of *Tks5*^{-/-} mice from BLM-induced pulmonary fibrosis, primary LFs were isolated from littermate wt and *Tks5*^{-/-} mice and were exposed to TGF β , as before. *Tks5*^{-/-} LFs, expressing ~50% of *Tks5* (Fig. 5a), presented with decreased numbers of podosomes in response to TGF β (Fig. 5b, c), reaffirming the seminal role of *Tks5* in podosome formation²⁶, as well as with decreased proliferation (24 h; Fig. 5d). As podosomes are known to promote ECM invasion, we then examined the ability of LFs to invade acellular ECM (aECM) prepared from the lungs of mice (Supplementary Fig. 9a, b), in a transwell invasion chamber (6 h; Fig. 5e). The reduction of podosomes



was associated with a decreased TGF β -induced invasion of *Tks5*^{+/-} LFs in aECM (Fig. 5f). Moreover, reaffirming mice the inherent character of podosome formation in LFs, post BLM *Tks5*^{+/-} LFs presented with reduced numbers of podosomes in comparison with wt LFs isolated from littermate mice (Fig. 5g, h), resulting in defective aECM invasion (Fig. 5i). Therefore, the in vivo demonstrated pathogenic role of *Tks5* in

pulmonary fibrosis includes the formation of podosomes in LFs and the promotion of their ECM invasion.

To obtain additional mechanistic insights, wt and *Tks5*^{+/-} LFs were exposed to TGF β , as above, and their global expression profile was interrogated with 3' UTR RNA sequencing (Quant-Seq LEXOGEN). Differential expression analysis between TGF β -induced *Tks5*^{+/-}

Fig. 4 | *Tks5* haploinsufficiency in mice attenuates bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis (PF). **a** Schematic presentation of the BLM-induced PF model. **b** Kaplan Meyer survival curve post BLM administration; $n = 4/7/4/6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p = 0.031$. **c** Weight change post BLM administration; $n = 4/7/4/6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p = 0.0001$. **d** Total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs), as determined with the Bradford assay; $n = 4/7/4/7$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p = 0.0009$. **e** Inflammatory cell numbers in BALFs, as counted with a hemacytometer; $n = 4/6/4/6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p < 0.0001$, $^{**}p = 0.0002/0.0008$. **f** Soluble collagen levels in the BALFs were detected with the direct red assay; $n = 4/6/4/7$. Statistical significance was assessed with two-tailed Kruskal Wallis; $^{*}p = 0.0124$. **g, h** *Tks5* and *Col1a1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR; $n = 4/5/3/7$; values were normalized over the expression of the housekeeping gene *B2m* and presented as fold change over control. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{*}p = 0.0012$, $^{*}p = 0.0207$. **h** Two tailed pearson correlation plot of *Col1a1* expression in the same samples; $^{*}p = 0.0342$; $r = 0.91/0.54$. **i** Representative images from lung

sections of murine lungs of the indicated genotypes, stained with Fast Green/Sirius Red (green/red; first row), from Hematoxylin & Eosin (H&E)-stained Precision cut lung slices (PCLS) (second row) and H&E-stained lung sections (third row); scale bars 50 μ m. **j** Quantification of fibrosis severity in H/E stained lung sections via Ashcroft scoring; $n = 4/5/4/5$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p < 0.0001$. **k** Rrs, mean respiratory system resistance as measured with Flexivent; $n = 4/6/4/6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p = 0.0008/0.0004$. **l** Ers, mean respiratory system elastance as measured with Flexivent; $n = 4/6/4/5$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{**}p = 0.0002$, $^{*}p = 0.0081$. **m** Cst, mean static lung compliance as measured with Flexivent; $n = 4/7/4/6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA followed by Welch's correction; $^{***}p < 0.0001$. In all panels cumulative results from 2 different experiments are shown; all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all relative panels (**a–h, j–m**) are provided as a Source Data file.

and wt LFs, revealed 3648 differentially expressed genes (DEGs; FC > 1.2, FDR corr. $p < 0.05$; Supplementary Data 1 and Supplementary Fig. 10a); among them 418 DEGs have been previously associated with pulmonary fibrosis, as detected with text mining of abstract co-occurrence of identified DEGs with fibrosis keywords (Supplementary Data 1). *Stat1*, *Cebpa*, and *Ar* transcription factors (TFs), where found downregulated in *Tks5*^{-/-} LFs along with several of their target genes (Supplementary Data 1 and Supplementary Fig 10b). Gene set enrichment analysis (GSEA) performed on DEGs revealed that the most affected cellular components (CC), molecular functions (MF) and biological processes (BP) all relate to the ECM (Fig. 6a and Supplementary Data 2). “Collagen containing ECM” (GO:0062023) was most prominent due to the down regulation of several ECM related genes such as collagens and MMPs/TIMPS/Adamts (Fig. 6b and Supplementary Fig. 10c). In this context and given the observed consistent correlation of *Tks5* and *Col1a1* expression, *Tks5*^{-/-} LFs post BLM, containing fewer podosomes and exhibiting defective aECM invasion (Fig. 5g–i), were found to produce significantly less *Col1a1* (Fig. 6c). Vice versa, culture of primary NMLFs on *Col1a1*-rich aECM prepared from the lungs of mice post BLM (Supplementary Fig. 9c), stimulated *Tks5* expression (Fig. 6d, e) and the formation of podosomes (Fig. 6f), and further stimulated *Col1a1* expression (Fig. 6g), indicating an ECM-podosome cross talk in the perpetuation of LF activation.

Src-inhibition potently reduces podosome formation and attenuate pulmonary fibrosis

To identify pharmaceutical compounds that can induce a similar transcriptional profile as that of the defective in ECM invasion *Tks5*^{-/-} LFs, the TGF β -induced *Tks5*^{-/-} LFs profile was queried against the connectivity map (CMap) LINCSL1000 database (Fig. 7a), a public resource that contains >10⁶ gene expression signatures of different cell types treated with a large variety of small molecule compounds³³. Among the identified compounds with similar expression signatures, several have already been shown to have a positive effect in disease pathogenesis in animal models (Fig. 7a and Supplementary Table 4). The identified possible therapeutic targets include the PDGF and VEGF receptors, which are pharmacologically targeted by the current IPF standard of care (SOC) compound nintedanib³⁴. More importantly, the list also includes an inhibitor of Src, a TGF β /PDGF-inducible, non-receptor tyrosine kinase essential for podosome formation³⁵. To verify the in silico findings in our experimental settings, TGF β -activated NHLFs were incubated with nontoxic, increasing concentrations of nintedanib and A-419259, a commercially available src inhibitor. Both nintedanib but especially A-419259 reduced both *TKSS* and *COL1A1* expression (Fig. 7b–e), as well as podosome formation (Fig. 7f, g) and aECM LF invasion (Fig. 7h).

To examine possible therapeutic effects of src inhibition in pulmonary fibrosis, we generated mouse precision cut lung slices (PCLS) post BLM (d11) administration, which were then incubated with A-419259 for 3 consecutive days, resulting in the attenuation of pulmonary fibrosis (Fig. 7i). Moreover, the same inhibitor was administered for 6 days by inhalation (4 ml of 0182 mg/ml for 5 mins/6 mice, corresponding to 2 mg/Kg per mouse) to conscious, softly re-strained mice, in a therapeutic mode (7d post BLM; Fig. 8a); no lethality was observed (Fig. 8b); minimal changes were observed in weight loss (Fig. 8c). Remarkably, src inhibition decreased, pulmonary edema (Fig. 8d) and inflammation (Fig. 8e), and attenuated Col production (Fig. 8f, g). Accordingly, src inhibition attenuated collagen deposition in the lung tissue, and prevented BLM-induced architectural distortion (Fig. 8h, i). Therefore, the *TKSS*-mediated podosome formation is a druggable pathologic process, which can be potently targeted by Src inhibition.

Discussion

Increased *TKSS* expression was detected, for the first time in a non-malignant disease¹⁵, in the lung tissue of IPF patients and BLM-treated mice (Fig. 1 and Supplementary Figs. 1–2). Increased *TKSS* expression has been previously reported, beyond cancer cell lines, in lung adenocarcinoma²⁰, further extending the similarities of IPF and lung cancer¹³. *TKSS* mRNA expression in the lung tissue, of both humans and mice, correlated with the mRNA expression of *COL1A1*, a hallmark of deregulated expression in IPF, while *TKSS* expression in fibrotic lungs was predominantly localized in the alveolar epithelium and *COL1A1*-expressing LFs (Fig. 1 and Supplementary Figs. 1–3), pending larger scale immunohistochemical studies.

TGF β , the prototypic pro-fibrotic factor, was found to be a very potent inducer of *TKSS* expression and podosome formation in fibroblasts (NHLFs, NMLFs, MRC5, 3T3)(Fig. 2, Supplementary Figs. 4–5), as previously reported only for THP-1 macrophages^{36,37} and primary aortic endothelial cells^{38,39}. Other well established pro-fibrotic growth factors in the lung have been reported to modulate podosome formation in different cell types: PDGF in synovial fibroblasts⁴⁰ and smooth muscle cells⁴¹, and VEGF in endothelial cells⁴², suggesting that they could exert similar stimulatory effects on LFs. Moreover, PGE₂, which suppresses pulmonary fibrosis⁴³, has been reported to promote the dissolution of podosomes in dendritic cells⁴⁴, suggesting that the diminished PGE₂ levels in IPF⁴³ also favor the formation of podosomes. Remarkably, the formation of podosomes in LFs was shown to be an inherent property of IPF and post BLM LFs that can be maintained in culture in the absence of any stimulation (Fig. 3, Supplementary Figs. 6–7). In agreement, increased invadosome formation was very recently reported in IPF LFs (3–7 passages), correlating with fibrosis severity⁴⁵. Therefore, podosome formation is an unappreciated central

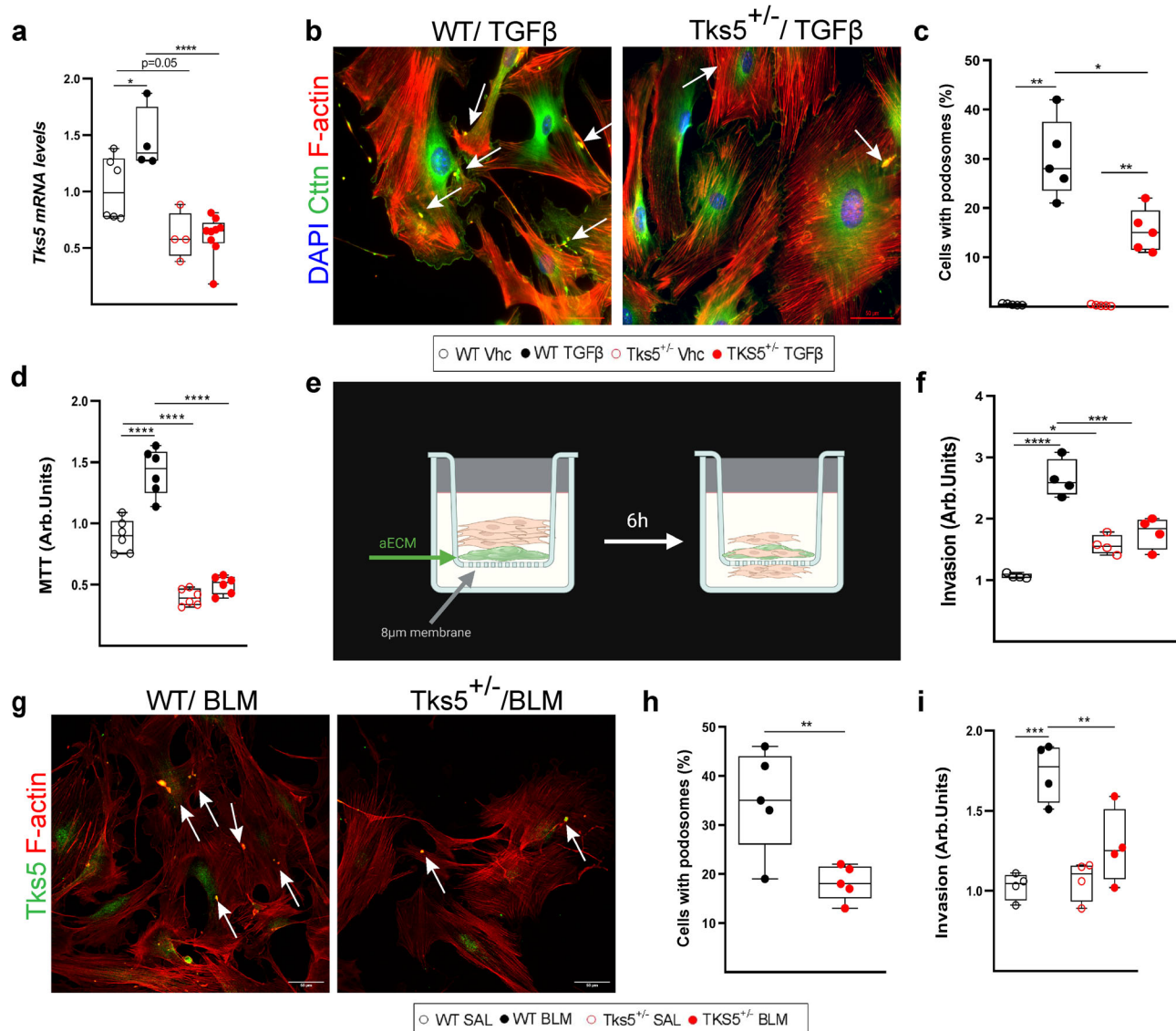


Fig. 5 | *Tks5* haploinsufficiency in mouse lung fibroblasts (LFs) decreases podosome formation and extracellular matrix (ECM) invasion. Serum starved primary normal mouse LFs (NMLFs) from WT and *Tks5*^{+/-} mice were stimulated with recombinant TGF-β1 (10 ng/ml for 24 h). **a** *Tks5* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR; $n = 6/4/4/9$. Values were normalized over the expression of the housekeeping gene *B2m* and presented as fold change over control. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; * $p = 0.0464$, **** $p < 0.0001$. **b** Representative composite images from double immunostaining for F-actin (red) and Cortactin (Ctn; green) counter stained with DAPI (blue); arrows indicate representative podosomes. **c** Quantification of the number of podosome-containing cells per optical field; $n = 5$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA followed by Welch's correction; **** $p = 0.004/0.0053$, * $p = 0.0411$. **d** TGFβ-induced NMLFs proliferation was assessed with the MTT assay; $n = 6$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p < 0.0001$. **e** Schematic presentation (biorender.com) of LFs invasion into aECM, upon TGFβ stimulation. After 6 h, cells that had invaded into the lower surface of

the upper chamber were stained, lysed and absorbance values were measured. **f** Invasion capacity of NMLFs, upon TGF-β stimulation ($n = 4$), as detected with the transwell invasion assay. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p < 0.0001$, * $p = 0.0266$, *** $p = 0.0005$. **g** Representative composite images from double immunostaining for F-actin (red) and Tks5 (green) in NMLFs isolated from WT and *Tks5*^{+/-} mice, post bleomycin (BLM) administration; arrows indicate representative podosomes; scale bars 50 μm. **h** Quantification of the number of podosome-containing cells per optical field ($n = 5$). Statistical significance was assessed with two-tailed t-test; ** $p = 0.009$. **i** Invasion capacity of LFs post BLM, as detected with the transwell invasion assay; $n = 4$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; *** $p = 0.0003$, ** $p = 0.0099$. In all panels, all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all panels are provided as a Source Data file.

response of LFs to pro-fibrotic factors and a major inherent characteristic of IPF LFs, likely contributing to their accumulation and the formation of foci, a hallmark of UIP/IPF.

Col1a1 mRNA levels were found to consistently correlate with *Tks5* mRNA levels in both humans and mouse lung tissue or LFs (Figs. 1–3 and 5, and Supplementary Figs. 1, 3, and 9). *Tks5*^{+/-} LFs were shown to produce less Col1a1 post BLM (Fig. 6c), as also reflected in the reduced overall collagen deposition in the lungs of *Tks5*^{+/-} mice (Fig. 4g). Culture

of LFs on Col1a1-rich aECM promoted *Tks5* expression and podosome formation (Fig. 6d–), as well as further *Col1a1* expression, emphasizing a TGFβ-induced Col1a1-podosomes interdependency in the context of the suggested crosstalk of ECM with podosomes⁴⁶. Accordingly, Col1 has been shown to stimulate *Tks5*-dependent growth, while the degree of collagen fibrilization has also been reported to have a decisive effect on podosome formation⁴⁷, likely through the Discoidin domain receptors (DDR) that mediate collagen binding⁴⁸. The expression of both

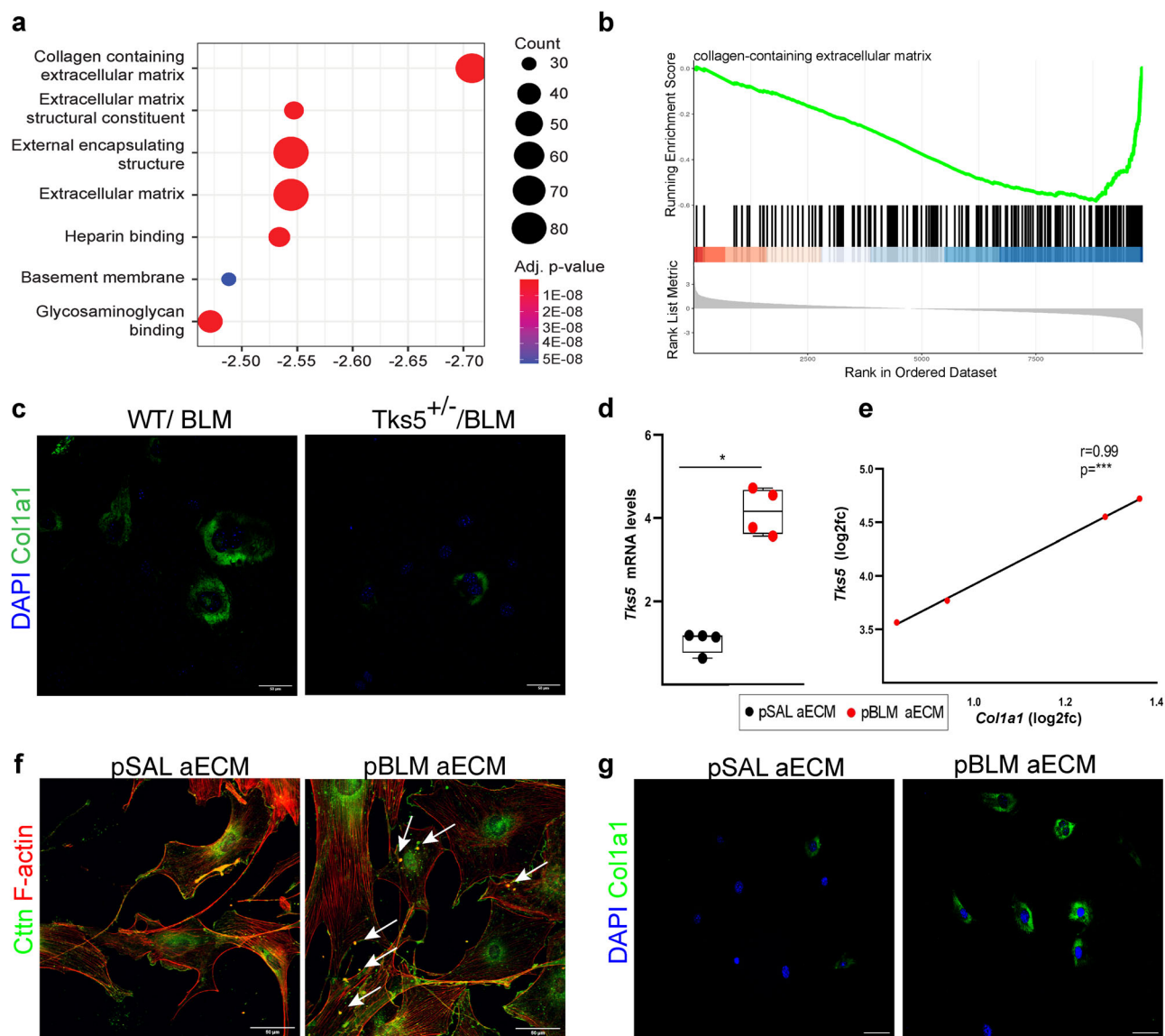


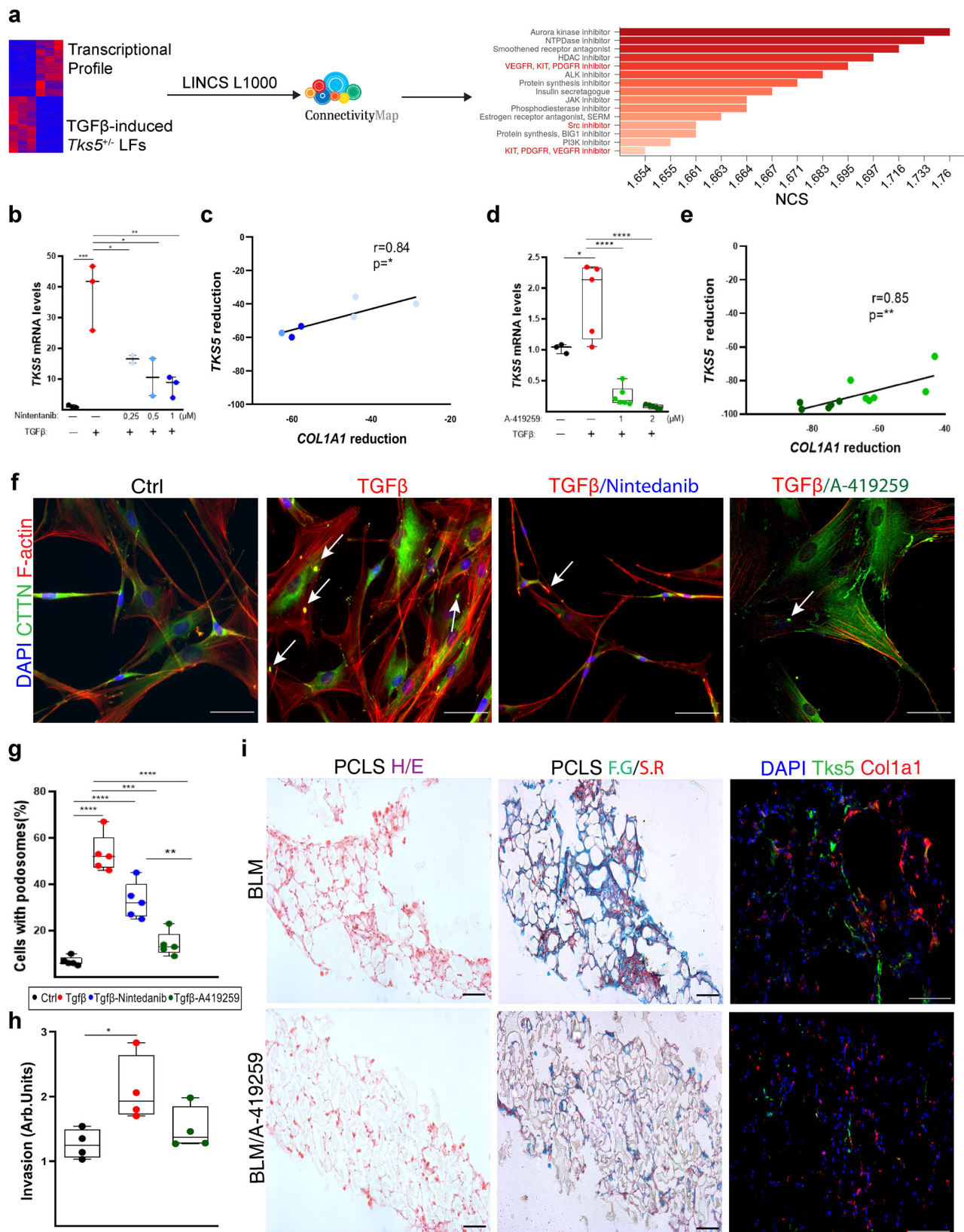
Fig. 6 | Tks5 haploinsufficiency in mouse lung fibroblasts (LFs) disrupts extracellular matrix (ECM) homeostasis, that critically controls podosome formation and ECM invasion. **a** ECM-related gene ontology components are enriched for genes down-regulated in TGF β stimulated Tks5^{+/-} LFs compared to their WT TGF β treated counterparts. Gene-set enrichment analysis (GSEA) on expression data pre-ranked according to their fold change values. **b** Collagen containing extracellular matrix is the term most enriched in down-regulated genes according to gene-set enrichment analysis (GSEA). **c** Serum starved WT and Tks5^{+/-} LFs were immunostained for Col1a1 (green) and counter stained with DAPI (blue). Representative images are shown; scale bars = 50 μ m. **d, e** Serum starved WT primary LFs were cultured in post saline (pSAL) and post bleomycin (pBLM) aECM. Tks5 and Col1a1 mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR; $n = 4$; values

were normalized over the expression of the housekeeping gene *B2m* and presented as fold change over control. Statistical significance was assessed with two-tailed Mann-Whitney test; $p = 0.0286$. **e** Two tailed pearson correlation plot of *Col1a1* expression in the same samples; $p = 0.0004$, $r = 0.99$. **f, g** Representative composite images from double immunostaining for F-actin (red) and Cortactin (Ctnn; green; **f**) or Col1a1 (**g**; green) counter stained with DAPI (blue); arrows indicate representative podosomes; scale bars = 50 μ m. In all panels, representative experiment out of 2 successful independent ones are shown; all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all panels are provided as a Source Data file.

DDR1 and 2 were found downregulated in TGF β -induced Tks5^{+/-} LFs (Supplementary Data 1), suggesting that DDR signaling, and consequent tyrosine kinase activation could mediate the observed TGF β -Col1a-induced podosome formation. While the reverse signaling from the overproduction of collagen and the regulation of DDR1/2 should be further researched in the context of IPF, the therapeutic potential of DDR inhibitors, currently explored for metastatic cancer⁴⁹, should be also investigated.

Another potent podosome inducer is tropoelastin⁴⁶, the soluble precursor of the cross-linked ECM protein elastin (Eln) whose expression was found accordingly downregulated in podosome deficient

Tks5^{+/-} LFs (Supplementary Data 1). Moreover, and beyond individual fibrosis-modulating factors, the stiff fibrotic post-BLM aECM was shown to stimulate Tks5 expression and podosome formation in LFs and to perpetuate the increased expression of Col1a1 (Fig. 6). In agreement, increased substrate rigidity, modeled with gelatin or polyacrylamide, has been previously shown to promote invadopodia activity⁵⁰. Therefore, the formation of podosomes in LFs upon mechanical cues from the stiff ECM of fibrotic lungs is a major component of the suggested crosstalk of ECM with fibroblasts^{51,52}, especially considering the age-related increase of ECM stiffness in the lungs⁷, and the suggested role of mechanosensitive signaling in LF activation and pulmonary fibrosis⁵³.



Given the necessity of TKS5 expression for embryonic development, the results presented here suggest that the formation of podosomes in LFs is a developmental program that gets aberrantly re-activated in IPF from pro-fibrotic factors, perpetuating LF activation and stimulating ECM invasion and LF accumulation. The reactivation of developmental pathways is a common theme in organ

fibrosis, e.g. wnt and ATX/LPA signaling in pulmonary fibrosis, providing increased plasticity and regeneration potential, as well as increased cell proliferation, migration and invasion.

Ubiquitous genetic *Tks5* haploinsufficiency was shown to attenuate BLM-induced pulmonary fibrosis with a plethora of readout assays (Fig. 4), and *Tks5*^{-/-} LFs were shown to form fewer podosomes,

Fig. 7 | Src-inhibition potently reduces podosome formation, extracellular matrix (ECM) invasion and attenuates pulmonary fibrosis. Serum starved, primary normal human lung fibroblasts (NHLFs) were pretreated for 1 h with A-419259 (SRC inhibitor) and Nintedanib, and then stimulated with recombinant human TGF β (10 ng/ml) for 24 h. **a** Graphical representation of connectivity (CMap) analysis using LINCS1000 resource of the TGF β -induced *TKS5*^{-/-} expression profile. **b, c** *TKS5* and *COL1A1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR. Values were normalized to the expression values of the housekeeping gene *B2M* and presented as fold change over control; $n = 3/3/3/3$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p = 0.0008$, $^{*}p = 0.0397/0.0107$ $^{*}p = 0.003$. **c** Two tailed Pearson correlation plot of *COL1A1* reduction in the same samples ($p = 0.0202$, $r = 0.84$). **d, e** *TKS5* and *COL1A1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-PCR. Values were normalized over the expression values of the housekeeping gene *B2M* and presented as fold change over control; $n = 3/5/6/5$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{*}p = 0.0202$, $^{***}p < 0.0001$. **e** Two tailed spearman correlation plot of *COL1A1* reduction in the same samples; $^{*}p = 0.0018$, $r = 0.85$. **f** Representative composite images from

double immunostaining for F-actin (red) and Cortactin (cttn; green) counter stained with DAPI (blue); arrows indicate representative podosomes; scale bars = 50 μ m. **g** Quantification of the number of podosome-containing cells per optical field; $n = 5$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{***}p < 0.0001$, $^{**}p = 0.0006$, $^{*}p = 0.0014$. **h** Invasion capacity of NHLFs ($n = 4$), upon A-419259 pretreatment and TGF- β stimulation, as detected with the transwell invasion assay; $n = 4$. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; $^{*}p = 0.0294$. **i** Src-inhibition attenuates pulmonary fibrosis in mouse precision cut lung slices (PCLS) generated post BLM (d11) administration. Treatment with A-419259, was administered in the first 24 h after slicing for 3 consecutive days. Representative images from PCLS stained with H&E, Fast green/Sirius red (F.G./S/R; green/red) and from double immunostaining for Tks5 and Col1a1 (green/red) are shown; scale bars=50 μ m. In all panels, representative experiment out of 2 successful independent ones are shown. In all panels, all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all panels are provided as a Source Data file.

resulting in diminished aECM invasion (Fig. 5), thus establishing a major pathogenetic role for Tks5-enabled podosomes and LF ECM invasion in pulmonary fibrosis. ECM invasion by non-leukocytes, a hallmark of cancer¹², is gaining increased attention in pulmonary fibrosis. IPF HLFs were shown to invade matrigel more efficiently than NHLFs or HLFs from other interstitial diseases^{8,10,11}. Enhanced invasion correlated with increased actin stress fibers¹⁰, and was suggested to be mediated, in part, by fibronectin and integrin α 4 β 1 signaling¹¹, or hyaluronan (HA) and CD44 signaling⁸. CD44 has been localized in invadopodia in breast cancer cells and has been shown to be required for invadopodia activity⁵⁴, while TKS5⁺ LFs were found to preferentially express CD44 (Fig. 1f), suggesting that HA/CD44 participate in the regulation of podosome formation in LFs. TKS5⁺ LFs were also found to express preferentially CD274/PD-L1 (Fig. 1f), a proposed marker of invasive IPF LFs⁵⁵, suggesting yet another potential signaling input for podosome formation. Moreover, BALFs from BLM-treated mice or IPF patients stimulated ECM invasion of LFs^{56,57}, shown to be attenuated upon silencing LPAR1, EGFR and FGFR2 receptors⁵⁶, or by interfering with Sdc4-CXCL10 interactions⁵⁷, suggesting additional signals that could modulate LF invasion. HER2/EGFR2, a therapeutic target in breast cancer, has been also proposed to drive invasion in LFs⁵⁸, suggesting again similarities with metastatic ADC, and further suggesting repurposing a-HER-2 agents for the treatment of IPF. Interestingly, several of the identified invasion-associated genes (Fstl3, Il11, Hbegf, Ccn2, Inhba, Podxl, Sema7a, Bcl2a1b, Bcl2a1d, Sh3rf1) were found down regulated in the *Tks5*^{-/-} invasion-defective LFs (Supplementary Data 1 and Supplementary Fig. 10d), further supporting the functional results on the role of TKS5 and podosomes in LF ECM invasion.

Given the expression of TKS5 in other cell types in IPF, like epithelial and basal cells (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1) that are both intricately linked with IPF pathogenesis, a role for TKS5 in these cell types cannot be excluded. Podosome-like structures have been reported in epithelial cells, suggested to regulate their basement membrane adhesion^{59,60}, and thus, likely, re-epithelization, an essential process in wound healing. Moreover, pharmacologic inhibition of src-kinase, a master regulator of podosomes, was shown to attenuate IPF-basal cells-induced pulmonary fibrosis in minimally BLM-injured immunodeficient mice⁶¹. However, conditional epithelial deletion of Tks5 in future studies will be further required to dissect a possible pro-fibrotic role for TKS5 and podosomes in these cell types.

MMP9, a podosome enriched MMP (Fig. 2), has been previously found to be expressed in IPF, localized on reactive alveolar epithelial cells, basal-like cells, clusters of alveolar macrophages, as well as sub-epithelial fibroblasts^{62,63}. Epithelial MMP9 has been suggested to partly mediate wound healing in keratinocytes via its proteolytic activity in podosomes, in association with CD44⁶⁰. Moreover, CD44-bound

MMP9 at the cell surface of cancer cells was shown to cleave latent TGF β , and thus promote its activation⁶⁴, and thus, possibly, the activation of subepithelial fibroblasts in IPF. On the other hand, profibrotic Thy1 fibroblasts with increased migration potential were also shown to express MMP9 following stimulation with TGF β ⁶⁵. As found here, post BLM LFs, that had increased Tks5/Col1a1 levels (Supplementary Fig. 7i, m) and increased podosomes (Supplementary Fig. 7o, p), also expressed higher MMP9 levels (Supplementary Fig. 7n). Although genetic deletion of MMP9 in mice (and/or MMP2) had minimal effects in Ad-TGF β -induced pulmonary fibrosis⁶⁶, antibody-mediated MMP9 targeting demonstrated antifibrotic efficacy in a humanized immunodeficient model of IPF induced by IPF lung extracts, but only when fibrosis was promoted by “responder” IPF cells that had been shown to have reduced phosphorylated SMAD levels in response to a-MMP9 treatment *in vitro*⁶³. Further studies will be required to appreciate the role of MMP9 in the pathogenesis of IPF and the possible therapeutic potential of targeting MMP9.

Connectivity MAP (CMap) analysis has emerged as an invaluable tool to connect gene expression, drugs and disease states³³. CMap analysis of scRNAseq of IPF bronchial brushings suggested that src inhibition can reverse the observed pro-fibrotic transcriptional changes in IPF bronchial airway basal cells⁶¹. Moreover, CMap analysis of IPF transcriptional profiles and the nintedanib and pirfenidone corresponding transcriptional signatures, indicated src inhibition as the strongest connection⁶⁷. As shown here, CMap analysis of the TGF β -induced *Tks5*^{-/-} LFs profile identified, among established and promising others, src inhibition as a possible treatment to limit LF invasion (Fig. 7) and therefore pulmonary fibrosis. In agreement, src inhibition was shown to reduce *Tks5* levels and podosome numbers, to decrease aECM invasion and to reverse fibrosis in PCLS (Fig. 7) and to attenuate BLM-induced pulmonary fibrosis *in vivo* when administered by inhalation (Fig. 8). The aerosolized delivery, infrequent in IPF and animal models, opens new possibilities in IPF treatment, localizing treatment and avoiding systemic toxicity, as well as possibly increasing efficacy. The Src inhibitor Saracatinib, that has been previously also shown to attenuate BLM-induced pulmonary fibrosis⁶⁷, has recently entered clinical trials (NCT04598919), and if therapeutic effects are as efficient as in mice, the inhibition of podosome formation in LFs qualifies as a major part of its mode of action. Moreover, targeting kinase-mediated podosome formation, an inherent pathogenic LF property as shown here, as well as structural (TKS5 and its protein-protein interactions) or effector (MMP 2/9/14) podosome components, are very promising therapeutic targets in pulmonary fibrosis.

Methods

All experimentation was performed according to the respective ethical regulations as outlined below.

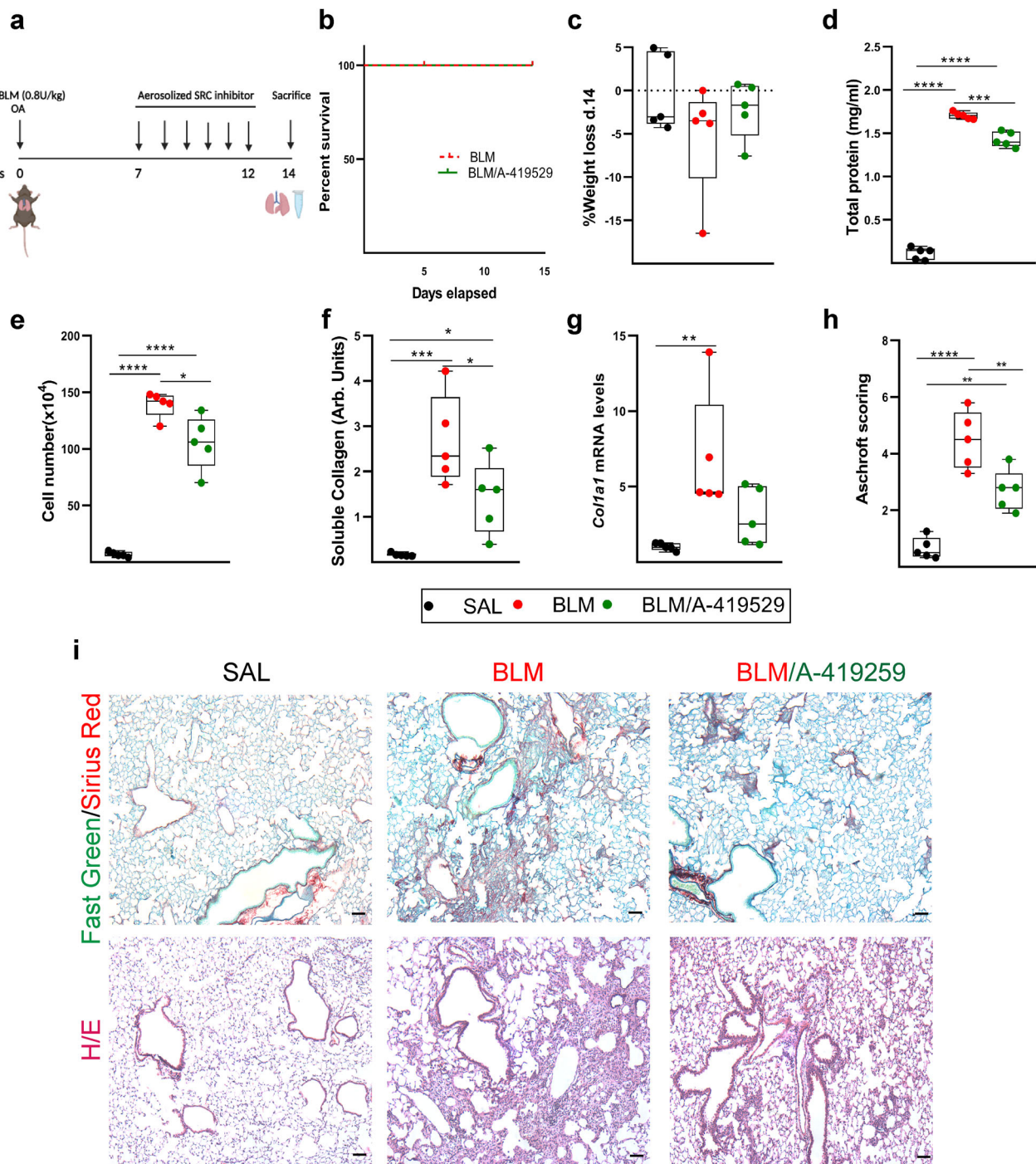


Fig. 8 | Src inhibition attenuates bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis.

a Schematic representation (biorender.com) of the BLM model and drug administration; $n = 5$. **b** Kaplan Meyer survival curve post BLM administration. **c** Weight change post BLM administration. **d** Total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs), as determined with the Bradford assay. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0001$.

e Inflammatory cell numbers in BALFs, as counted with a hemacytometer. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0115$. **f** Soluble collagen levels in the BALFs were detected with the direct red assay. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p = 0.0004$, *** $p = 0.0473$. **g** *Col1a1* mRNA expression was interrogated with Q-RT-

PCR. Values were normalized over the expression of the housekeeping gene *B2m* and presented as fold change over control. Statistical significance was assessed with two-tailed Kruskal Wallis; ** $p = 0.0094$. **h** Quantification of fibrosis severity in Hematoxylin & Eosin (H/E) stained lung sections via Ashcroft scoring. Statistical significance was assessed with two-tailed one-way ANOVA; **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0028/0.0074$. **i** Representative images from lung sections of murine lungs of the indicated genotypes, stained with Fast Green/Sirius Red (F.G/S.R; green/red) and H&E; scale bars = 50 μ m. In all panels, all samples are biologically independent; boxplots visualize the median of each distribution; upper/lower hinges represent 1st/3rd quartiles; whiskers extend no further than 1.5 IQR from the respective hinge. Source data for all panels are provided as a Source Data file.

Datasets

All analyzed, re-normalized datasets (Supplementary Table 1) were sourced from Fibromine;²¹ Differentially expressed genes (DEGs): FC > 1.2, FDR corr. $p < 0.05$.

Patients

All studies with human patient samples were performed in accordance with the Helsinki Declaration principles. Lung tissue samples (Supplementary Table 2) were obtained through the University of Pittsburgh Health Sciences Tissue Bank and Yale University Pathology Tissue service, a subset of previously well characterized and published samples;⁶⁸ studies had been approved by the Yale University Institutional Review Board (Yale IRB). LFs were isolated from the lung tissue of IPF patients and from the adjacent healthy tissue of patients undergoing open lung surgery for cancer (Supplementary Table 3) at the Department of Pulmonology, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris/France; studies were approved by the Committee for Personal Protection (CPP)—Ile de France 1 (#0911932). All patients consented in writing to the use of their samples for research purposes; no compensation was provided for their participation.

Mice

Mice were bred at the animal facilities of Biomedical Sciences Research Center ‘Alexander Fleming’, under SPF conditions, at 20–22 °C, 55 ± 5% humidity, and a 12 h light-dark cycle; food (Mucedola diet #4RF21: humidity 12%, protein 18.5%, fat 3%, carbohydrate 53.5%, crude fibers 6%) and water were provided ad libitum. Mice were bred and maintained in their respective genetic backgrounds for more than 10 generations. All randomly assigned experimental groups consisted of littermate age-matched mice. The health status of the mice was monitored once per day; no unexpected deaths were observed. Euthanasia was humanly performed in a CO₂ chamber with gradual filling at predetermined time-points. All experimentation was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming”, as well as by the Veterinary Service of the governmental prefecture of Attica, Greece (# 8441/2017).

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Pulmonary fibrosis was induced by a single oropharyngeal administration (OA) of 0.8 U/kg bleomycin hydrogen chloride (BLM) (Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) at day 0 into anesthetized (i.p.; xylazine, ketamine, and atropine, 10, 100, and 0.05 mg/kg, respectively) 8–10-week-old male and female mice; control groups received sodium chloride (SAL). Dose and route were selected upon prior extensive local testing to induce a solid fibrotic profile, while minimizing lethality. All randomly assigned experimental groups consisted of littermate mice. Disease development was assessed in comparison with WT littermates 14 days post-BLM, at the peak of the disease (which resolves at d21 post BLM in these settings).

The A-419259 pharmacologic src inhibitor was administered directly in the mouse lungs through inhalation, using the inExpose system (Scireq, Cat.Number IX-XN1-T6) to conscious, softly re-strained mice. The inhibitor was administered at a therapeutic mode, once daily for 6 consecutive days, starting from day 7 post BLM administration. A-419259 was diluted in saline at a concentration of 0.182 mg/ml and 4 ml was administered for 5 mins in a group of 6 mice, corresponding to a final dose of 2 mg/kg per mouse. Control groups received aerosolized saline.

Following weighing, respiratory functions were measured with FlexiVent (SCIREQ, Montreal, Canada), according to manufacturer instructions and as previously described^{24,43}. Briefly, a pressure-volume loop (PV) perturbation and a forced oscillation technique (FOT, single and low frequency) were applied in tracheotomized mice to produce the indicated measurements.

Bronchoalveolar Lavage fluid (BALF) was obtained by lavaging the lungs with 1 ml of 0.9% sterile sodium chloride three times. After the isolation, the samples were centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 °C, the first BALF supernatant was stored at -80 °C for protein and collagen measurements. To estimate pulmonary inflammation, BALF cell pellets were redissolved in 1 ml saline, stained with 0.4% Trypan Blue solution and were counted with the use of a Neubauer hemacytometer. Total protein levels in BALFs, an indication of pulmonary edema and vascular leak, were assessed with the Bradford assay according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In a 96-well plate 5 µl of every BALF sample is placed, followed by the addition of 245 µl of 1x Bradford reagent (Serva/39222.03) and incubation for 5 minutes in the dark. Absorbance values were then measured at 595 nm, using a spectrometer, and were converted in concentration values (mg/ml) using a bovine serum albumin standard curve (BSA 0–2 mg/mL). Total soluble collagen in BALFs was quantified using the Sirius Red assay. 50 µl of BALF samples, diluted in 350 µl of 0.5 M acetic acid, were incubated for 30 min with 400 µl of Direct (365548-5 G Sigma-Aldrich) at RT, in the dark. This was followed by centrifugation, at 12000 g for 10 min and isolation of 200 µl of the supernatants. Absorbance values were measured at 540 nm, using a spectrometer, and were converted in concentration values (µg/ml) using a rat tail collagen I (C7661-5mg Sigma Aldrich) standard curve (0–500 µg/mL).

Histology

The right lung was fixed overnight in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. 5 µm lung sections were cut using a Microtome and stained with Hematoxylin/eosin (H&E) (Papanicolaou's solution HX16967353 Sigma Aldrich/ Eosin G CI45380 ROTH) with standard protocols. Fibrosis development was quantified by two independent reviewers, in a blinded manner, based on a modified Ashcroft score (0, normal lung; 1, isolated alveolar septa with gentle fibrotic changes; 2, fibrotic changes of alveolar septa with knot-like formation; 3, contiguous fibrotic walls of alveolar septa; 4, single fibrotic masses; 5, confluent fibrotic masses; 6, large contiguous fibrotic masses; 7, air bubbles; 8, fibrous obliteration). For Fast green-Sirius red (F.G/S.R) collagen staining, lung sections were deparaffinized in xylene and ethanol and incubated in Bouin's solution (75% picric acid/ 25% formaldehyde/ 1% acetic acid), for 1 hour at 56 °C, followed by staining with Fast Green (Glenthams Life Sciences GT3407/100 g) 0.04% in picric acid for 15 minutes and Sirius Red 0.1%/Fast Green 0.04% dissolved in picric acid (197378-100 g Sigma-Aldrich) for 40 minutes. Stained sections were washed in acetic acid, then dehydrated and mounted with DPX (06522-500 ml Sigma-Aldrich). PCLS, isolated and cut as described below stained with H&E. For X-gal (Lac-Z), freshly isolated mouse lungs were inflated with 0.1 g/ml sucrose in 50% OCT/PBS, followed by the simultaneous embedding and freezing in OCT, using isopentane and dry ice. Sections of 6–10 µm were cut using a cryotome and fixed in 2% formaldehyde/ 0.2% glutaraldehyde for 15 minutes at 4 °C. Next, they were washed twice in cold PBS/ 2 mM MgCl₂ (PENTA) for 10 minutes and stained overnight with X-gal staining solution (2 mg/mL X-gal in 0.1 M Sodium phosphate buffer pH=7.3, 0.01% Sodium deoxycholate (30970 FLUKA), 5 mM K₃Fe(CN)₆ (60300 FLUKA), 5.7 mM K₄Fe(CN)₆ (12639 Riedel-de Haen), 2 mM MgCl₂, 0.02% NP-40 (UN3082 Applichem) at 37 °C in the dark. The sections were then rinsed twice with PBS/2 mM MgCl₂ and dH₂O for 5 minutes at room temperature, counterstained with eosin following by dehydration and mounting with DPX. Imaging was performed 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. For immunohistochemistry studies, lung sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in a gradient of ethanol, and briefly washed with water. The slides were kept in tap water until ready to

perform antigen retrieval with sodium citrate buffer with pH 6.0 by autoclave for 20 min. Then they were treated with blocking solution (10% normal goat serum/2% BSA; A9647 Sigma Aldrich) at room temperature for 1 h and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. After washing, they were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies diluted in the blocking solution. Following this, sections were washed 3 times with PBS-T and mounted with medium containing DAPI (F6057, Sigma Aldrich) for nuclear visualization. Imaging was performed using a TCS SP8X White Light Laser confocal system (Leica).

In vitro/ex vivo lung fibroblast cell model

Normal human lung fibroblasts (NHLFs) and IPF-HLFs were isolated from fresh tissue samples by plating several 2–3 mm pieces on 10 cm tissue culture plates in DMEM supplemented by penicillin/streptomycin solution, 10% FBS at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. 10–14 days following plating, proliferating fibroblasts surrounded the tissue pieces, which were then removed, and cells are detached with trypsin-EDTA solution and replated in F75 tissue culture flasks (P0) until confluent. Removed tissue pieces were replated in fresh 10 cm tissue culture plates for a second round of fibroblast outgrowth in the same conditions as above. Following 2–3 passages, homogeneous fibroblasts' colonies are observed that can be frozen down; upon thawing 3–4 passages are needed to obtain adequate numbers for experimentation; HLFs are used until passage 7–8. A similar procedure was independently used for an additional NHLF clone (Fig. S3A–B), as previously published⁶⁹.

Primary normal mouse lung fibroblasts (NMLFs) were isolated from 8–10-week-old C57Bl6/J mice and/or from BLM-challenged mice. Upon sacrifice, perfused lungs were excised in DMEM. Then lungs were minced and digested with 0.7 mg/ml collagenase type IV (C5138-Sigma), for 1 h at 37 °C. Digestion was followed by filtration and the suspension was centrifuged at 1200 g for 5 min. Finally, the pellet was resuspended in DMEM (GIBCO 41966-029) containing 10% FBS (GIBCO 10437-028/ origin Mexico. All experiments were performed at passage 2–3.

Murine and human embryonic LFs cell lines, 3T3 and MRC5 respectively, were purchased from ATCC (#CRL-1658 and #CCL-171 respectively).

NHLFs, IPF-HLFs, NMLFs, 3T3 and MRC5 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and streptomycin/penicillin (GIBCO 15140-122) and amphotericin (GIBCO 15290-018) and incubated at 37 °C and 5% CO₂. Cells were cultured to 60–80% confluency, were starved overnight with serum-free DMEM (+ 0.1% BSA) and were exposed to 10 ng/ml recombinant human TGF-β1 (240-B-002 R&D SYSTEMS) for 24 h in serum-free DMEM. In control samples the diluent of TGFβ (7.5% BSA in H₂O) was used. For pharmacologic studies, NHLFs were seeded at 6-well plates, were serum starved and pre-treated for 1 h with the indicated increasing concentrations of various agents and their diluents in controls. After one hour of pre-treatment, cells were incubated with TGFβ as usual.

The proliferation of all LF cultures was quantified with the MTT assay in 96-well plates, where a common solution of OPTI-MEM (GIBCO 11058-021) and MTT (0.7 mg/ml) (ACROS ORGANICS158990010) was added into each well. After incubation for 4 h and having confirmed the formation of purple crystals, the media was removed, and acidified isopropanol was added into each well to dissolve the formazan crystalline product. Absorbance values were determined at 570 nm and background subtracted at 660 nm using an OPTImax (Microplate Photometer (Molecular Devices).

The spreading and migration capabilities of LFs were assessed in a scratch wound assay. Cells were cultured into a 12-well plate as above and left to grow. Upon confluency, TGFβ was added, as described above. A wound was generated using a sterile pipette tip. The plate was

placed in a tissue culture incubator at 37 °C, and photos were taken under a reverse microscope at specific time intervals.

Migration and invasion were quantified also with Boyden chambers (Costar 20122024/REF3422) according to manufacturer's instructions, as shown schematically in Fig. 5E. Briefly, LFs were added to the upper chamber which was pre-coated with aECM substrate (or not for migration) and allowed for 6 hours to invade/migrate through the transwell membrane to the lower side which was in touch with the starvation medium. Then, the cells which remained in the upper chamber were removed, while invasive or migratory cells, after washes and fixation, were stained with crystal violet. Additionally, stained cells were lysed with Lysis Buffer for 20 minutes and absorbance was measured at 550 nm using the TECAN Sunrise Microplate Photometer.

The proteolytic capacity of LFs was assessed with the Fluorescein gelatin degradation assay. 12-mm glass coverslips were acid washed with 20% nitric acid, incubated with 50 µg/ml poly-L-lysine, crosslinked with 0.5% glutaraldehyde and then coated for 20 min with 0.2% fluorescein-conjugated gelatin (Invitrogen, Gelatin from Pig Skin, Fluorescein Conjugate: G13187) in 2% sucrose (131621.1211Panreac) -containing phosphate buffered saline (PBS). Then, the coverslips were treated with sodium borohydride (NaBH₄-Sigma 452882), washed with PBS, and transferred to a new 24-well-plate. Fibroblasts were seeded in gelatin-coated coverslips and treated with TGF-β1 as previously described. After 24 hours, medium was replaced with full medium and cells were processed for immunofluorescence, 24–48 hours later. The quantification of the degraded gelatin was analyzed using ImageJ, as previously described⁷⁰. Briefly, the measurements of the degraded area, are reflected from the measurement of the "area fraction", which has been followed from the threshold adjustment that represents the actual degradation. Following this process, the "area fraction" values were then normalized to the number of nuclei as measured from the Dapi channel of the correlated image.

For immunofluorescence staining, cells were seeded in coverslips (20,000 cells/well) and after starvation, incubated with TGF-β1 as usual. The cells were fixed with 4% PFA for 15 min and permeabilized with 0.1% Triton X (T8532, Sigma Aldrich) for 10 min. This was followed by blocking with 2% BSA in PBS for 1 h at RT. The cells were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. The next day, cells were washed, and incubated with a secondary antibody and conjugated phalloidin in 1% BSA/PBS for 60 min at RT. Finally, after washing, coverslips were mounted with a drop of mounting Fluoroshield medium (containing DAPI for nucleus labeling). Confocal microscope images were analyzed with ImageJ. Signal colocalization was performed via the orthogonal views and k-curves analysis with ImageJ tools showing the intensity per z-stacking or per distance of the maximal projection accordingly.

The decellularization and generation of acellular ECM (aECM) from mouse lungs was performed based on similar protocols for other tissues^{71,72}. Briefly, whole lungs were isolated and treated with increasing concentrations of SDS (Fisher Bioreagents BP166) (0.01, 0.1, 1%) in a PBS solution, with 24 h incubation for each SDS concentration. For the final step, decellularized lung tissues were washed with PBS for at least 3 days, cut into small pieces and stored at -80 °C. Frozen tissue was lyophilized using a lyophilizer and then milled in liquid nitrogen. To produce an ECM substrate, the milled form of the matrix was solubilized through enzymatic digestion. Pepsin (Sigma-Aldrich, P6887) was dissolved in 0.1 M HCl to make a concentration of 1 mg/ml. Approximately 10 mg of the ECM powder were digested in 1 mL of pepsin solution, in order to solubilize the ECM components. After approximately 48 hours, the matrix was diluted using 0.1 M acetic acid to make a 5 mg/ml concentration of lung ECM solution, which was used as a coating substrate for cells.

Precision cut lung slices

C57-Bl/6, 8-10-week-old mice, were administered with SAL/BLM as described above. On day 11, mice were sacrificed and lungs, after perfusion, were inflated with 1 ml of with 1.5% Low Melting Agarose (15517-014-Invitrogen) in saline. Lungs were then isolated and incubated at RPMI medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin for 30 min at 4 °C to allow agarose polymerization. The left lobe of the agarose filled lungs, was cut into 200 µm slices (PCLS) with Vibratome. PCLS were then cultured in 700 µL of RPMI (GIBCO-21875-034) medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in 24-well plates at standard conditions (37 °C and 5% CO₂) overnight. Next, PCLS were incubated to 2 µm of A-419259 (Src-family inhibitor) and H₂O for 3 consecutive days, changing the treatment daily. In day 14, PCLS were fixed overnight with PFA (Sigma-Aldrich P6148) at 4 °C, until slices embedded in paraffin. Finally, 5 µm sections of PCLS were cut using a Microtome and stained for H&E, F.G/S.R and antibodies accordingly.

Antibodies- reagents

Antibodies used in this study included anti-Tks5 (SH3 domain) rabbit monoclonal antibody (Merck, 3174822, 1:100), anti-SH3PXD2A mouse monoclonal antibody (Origene, clone OTIIF5-TA811757S, LOT F001, 1:250), col1a1 rabbit polyclonal antibody (Invitrogen, PA5-29569, LOT XK3738717 1:100), anti-A-actin (sma) mouse monoclonal antibody, (Origene, clone UM870129, LOT F001 1:250), recombinant Anti-Cortactin rabbit monoclonal (EP1922Y) antibody (Abcam, ab81208, 1:500), Alexa Fluor™ 633 Phalloidin (Invitrogen, A22284, LOT 2274768 1:50), MMP-9 XP Rabbit monoclonal (D6O3H) Antibody (Cell signaling #13667, LOT 3 1:100). Secondary antibodies included: Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Life technologies, A11008, LOT1470706), Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (Life technologies, A21428, LOT 1670185), Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Life technologies, A11029, LOT1705900) Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 555 (Life technologies, A22424, LOT1726548); all used in 1:500 dilution; all antibodies were selected from previous publication, while all antibodies were validated by the corresponding manufacturers for the specific employed methodologies (IHC/IF). For pharmacological studies A-419259 inhibitor SML0446 (Sigma-Aldrich), Nintedanib SML2848 (Sigma-Aldrich) and Pirferidone P2116 (Sigma-Aldrich) were used.

Real Time quantitative RNA RT-PCR

In human samples, RNA was extracted from 30 to 50 mg of frozen lung tissue in 700 µL of Qiazol (Lysis buffer, Qiagen, Valencia, CA) by tissue disruption and homogenization using an electric homogenizer (Poly-Tron homogenizer H3660-2A, Cardinal Health, Dublin, OH) at 15.000 g for 15 seconds, according to the manufacturer's instructions. RNA was purified using the miRNeasy Mini kit (217004, Qiagen, Valencia, CA) with the assistance of the Qiacube automated system (9001292, Qiagen, Valencia, CA). The purity of the RNA was verified using NanoDrop at 260 nm and the quality of the RNA was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA). Real-time PCR was performed with Taqman primers as described in the table below. Values were normalized to the expression of B2M.

In mouse samples RNA was extracted from the left lung lobe using the Tri Reagent (TR-118) obtained from Invitrogen and treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase) prior to RT-PCR according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using 2 µg of total RNA per sample in 20-µL reaction using M-MLV RT (Promega). Real-time PCR was performed on a BioRad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). Values were normalized to the expression of b-2 microglobulin (b2m). The annealing temperature for all primers was 58 °C. Primers

sequences for RT and genomic PCRs are depicted at Supplementary Table 5.

RNA sequencing

Six total RNA samples were prepared, and their concentration was measured with nanodrop (ND1000 Spectrophotometer-PEQLAB). The samples measured to a concentration of 400-500 ng/µL and therefore 1 µL of RNA, from each sample was used to proceed with the library preparation. The RNA quality of each sample was measured in bioanalyzer (Agilent Technologies) using the Agilent RNA 6000 Nano Kit reagents and protocol. For the preparation of per sample libraries, the 3' mRNA-Seq Library Prep Kit Protocol for Ion Torrent (QuantSeq-LEXOGEN™ Vienna, Austria) was used according to manufacturer's instruction. Briefly, library generation was initiated by oligodT priming which contains the Ion Torrent compatible linker sequences. 5 to 500 ng per 5 µL of RNA from each sample was used to perform the first strand synthesis. After first strand synthesis any remaining RNA was removed and second strand synthesis was initiated by a random primer, containing Ion Torrent compatible linker sequences at its 5' end, and a sequence polymerase. In line barcodes were introduced at this point. Second strand synthesis was followed by a magnetic bead-based purification step and the resulted purified library was amplified for 14 cycles and re-purified. Quality and quantity of each library was assessed in a bioanalyzer using the DNA High Sensitivity Kit reagents and protocol (Agilent Technologies). The quantified libraries were pooled together at a final concentration of 7 pM. The libraries pool was processed on the Ion Proton One Touch system where the libraries were templated and enriched using either the Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit (ThermoFisher Scientific) and sequenced, with the Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit on Ion Proton PI™ V2 chips (ThermoFisher Scientific) according to commercially available protocols. 3' RNA-sequencing was performed on an Ion Proton™ System⁷³, according to the manufacturer's instructions. Initial analysis took place in Ion Torrent server.

Single cell RNA-seq data re-analysis

Single cell RNA-seq data were downloaded from [GSE122960](#) and processed with the R package Seurat (v.3.1.2 & 4.0.5)^{74,75}. A similar to the original data analysis strategy was applied. Initially, each sample was processed on its own. After removing low-quality cells and genes, data were normalized using the LogNormalize method of Seurat and then top variable features were selected using the vst method. Data were scaled prior to principal component analysis (PCA) application and selection of the top principal components. The latter were used for a Shared Nearest Neighbor (SNN) graph-guided cell clustering and last, t-SNE dimensionality reduction was performed. Cell typing followed that of the original analysis as much as possible. Samples integration was performed with the standard Seurat v3 integration pipeline first for samples within each and then across phenotypes (donor and IPF). Integrated data were re-scaled, clustering and dimensionality reduction were repeated. Cell types inherited from single-sample analysis were validated and corrected whenever required according to the original publication of the dataset. Marker genes were identified using the Wilcoxon Rank Sum test applied on the "RNA" slot of the integrated samples object. Absolute fold change of at least 1.2 on natural scale and Bonferroni-corrected *p*-value < 0.05 were used as differential expression thresholds. Fibroblast sub-clusters were identified with a resolution of 0.1 after fibroblast cells were isolated from the rest of the dataset, re-scaled and new variable features were found as above.

Data processing

QuantSeq (Lexogen) FASTQ files obtained from the Ion Proton sequencing procedure were trimmed with Trim Galore (v.0.6.51) to remove low quality read ends using a Phred score of 20. Subsequently, a two steps alignment procedure was applied. Pre-processed reads

were aligned against the GRCm38 reference genome (Ensembl) with HISAT2 (v.2.2.1)⁷⁶ and then the reads left unmapped were subjected to a second alignment round using BOWTIE2 (v.2.3.5.1)⁷⁷ with the `-local` and `-very-sensitive` local switches turned on.

Computational analysis

Downstream analysis of the resulting BAM files was performed with metaseqR2 (v.1.9.2)⁷⁸. Briefly, the raw BAM files, one per sample, were summarized to a 3' UTR reads count table, using the package GenomicRanges (v1.44.0)⁷⁹ and Ensembl mouse genome mm10. For the UTR counting, the entire 3' UTR region, with a minimum length of 300 base pairs and 50 base pairs to flank the UTR end, was taken into consideration. In the resulting reads count table, each row represented one 3' UTR region and each column a Quant-Seq sample. Next, reads were summarized per gene and the returned gene count table was normalized using the package EDA-Seq (v.2.26.1)⁸⁰ after removing genes having zero reads across all samples. Post-normalization, gene counts were filtered for possible artifacts using default gene filtering options. The filtered gene counts table was subjected to differential expression analysis using sequentially all nine individual statistical analysis methods supported by metaseqR2. Their p-values were then combined by the PANDORA algorithm to account, among others, for the false positives reported. Benjamini-Hochberg corrected PANDORA p-values of less than 0.05 and absolute fold change of at least 1.2 were used as differential expression thresholds. Normalized expression values required for each heatmap were retrieved and standardized across samples. Hierarchical clustering of samples and genes based on calculated Euclidean distance.

Gene set enrichment analysis

Differential expression analysis results were sorted by decreasing fold change and used for Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) against Gene Ontology terms⁸¹ using the package clusterProfiler (v.4.0.5)⁸². Signed normalized enrichment score (NES) was used to isolate the top of the significantly enriched induced (NES > 0) and suppressed (NES < 0) terms (adjusted *p*-value < 0.05).

Text mining

PubMed 2022 baseline was downloaded from the respective FTP site. XML R package (v.3.99.0.8) was used to create an abstract-based corpus which was then queried with rentrez R package (v.1.2.3) for *IPF[All Fields] OR ("pulmonary fibrosis"[MeSH Terms] OR "pulmonary fibrosis"[All Fields]) OR ("lung diseases, interstitial"[MeSH Terms] OR "interstitial lung diseases"[All Fields] OR "interstitial lung disease"[All Fields])* containing elements. Subsequently, human HGNC gene symbols atomization was performed using pubmed.mineR package⁸³ (v.1.0.19) and recovered genes were intersected with the human homologs of the mouse Quant-seq differentially expressed genes. Homolog feature mapping was obtained via biomaRt R package⁸⁴ (v. 2.48.3).

Transcription factor analysis

Transcription factor analysis was performed using DoRothEA R package⁸⁵ (v.1.4.2). All mouse transcription factor-target regulons were queried for those high quality ones ("A" level of confidence) including as targets any of the Quant-seq differentially expressed genes. Subsequent filtering maintained those interaction pairs where both interactors were found significantly deregulated in the bulk sequencing experiment. Based on the mode of regulation (mor) as described in the DoRothEA database and the Quant-seq derived differential expression data, pairs with the same or opposite direction of deregulation were maintained in cases of an activator or repressor transcription factor, respectively.

CMap/LINCS analysis

CMap/LINCS database (<https://clue.io/query>) query was performed using the top 150 up and top 150 down regulated genes as sorted by fold change. 150 consisted of the maximum number of genes supported by the platform. L1000 gene expression data from the Expanded CMap LINCS Resource 2020 (last update 11/23/2021) were queried. Results were processed by the R package cmapR (v.1.4.0). FDR-corrected p-values less than 0.05 were used to isolate those signatures having a statistically important connection with the provided one and signed normalized connectivity score (NCS) was used to discern between similar and opposite signatures. Focus was given on compounds (trt_cp) and peptides (trt_lig) having an already known mechanism of action and known targets. Datasets comprising of only one replicate and/or of a treatment duration other than 24 hours were discarded.

Statistics

Statistical significance was assessed with the Prism (GraphPad) software according to its built-in recommendations, as detailed at each figure legend. Briefly, and unless otherwise stated, all datasets were tested for normal distributions via Shapiro-Wilk test, while all measurements were performed on distinct and independent samples. For the comparison of two normally distributed experimental groups, we employed the two-tailed unpaired t-test, for equal SDs or Welch's t-test for unequal ones. Not normally distributed data were analyzed with the two-sided Mann-Whitney test. Normally distributed multi parametric data with equal SDs were analyzed with the unpaired one-way ANOVA test and post hoc Tukey's test. Welch's ANOVA test coupled with post hoc Games-Howell test was used in cases of unequal SDs. For non-normally distributed multiparametric data, Kruskal-Wallis, followed by post hoc Dunn's test was utilized. For correlation analysis we used Pearson's, for normally distributed, or Spearman's correlation for non-normally distributed datasets. Most data are presented on box and whiskers graphs depicting the median as well as all experimental values (n).

Image creation

Third party images were created at bioRender.com (under the relative agreements; 31/08/2023): Fig. 4a (DH2SSQBJQT), Fig. 5e (XG2SSQC37G), Fig. 8a (UC2SSQ61BR), Sup Fig. 8a (VP2SSQ8NTX), Sup Fig. 8b (GM2SSQ96G1), Sup Fig. 8d (AV2SSQA9RX), Sup Fig. 8f (Z12SSQ9VL2), and Sup Fig. 9a (BQ2SSQ7828).

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All re-analyzed publicly available datasets are listed in Supplementary Table 1, including accession numbers and hyperlinks. Quant-Seq data have been deposited at the GEO database under the accession code [GSE220982](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE220982). Already published, re-analyzed single cell RNA-seq data used are available at GEO database: [GSE122960](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE122960). All other relevant experimental data are within the paper and its supplementary information files. Source data are provided with this paper.

Code availability

Data and code for the recreation of the computationally-created figures of the paper have been deposited at Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.8296510>)⁸⁶ and at https://github.com/dfanidis/TKS5_podosomes_IPF. Detailed scripts used are unrestrictedly available, within 10 days, upon request to Dionysios Fanidis (fanidis@fleming.gr; Institute for Fundamental Biomedical Research, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece).

References

- Rockey, D. C., Bell, P. D. & Hill, J. A. Fibrosis — a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1138–1149 (2015).
- Raghu, G. et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, e44–e68 (2018).
- Martinez, F. J. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17074 (2017).
- Plikus, M. V. et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell* **184**, 3852–3872 (2021).
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
- Penke, L. R. & Peters-Golden, M. Molecular determinants of mesenchymal cell activation in fibroproliferative diseases. *Cell Mol Life Sci* **76**, 4179–4201 (2019).
- Pardo, A. & Selman, M. Lung fibroblasts, aging, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **13**, S417–S421 (2016).
- Li, Y. et al. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *J. Exp. Med.* **208**, 1459–1471 (2011).
- Lovgren, A. K. et al. β -arrestin deficiency protects against pulmonary fibrosis in mice and prevents fibroblast invasion of extracellular matrix. *Sci. Transl. Med.* **3**, 74ra23 (2011).
- Karvonen, H. M. et al. Myofibroblasts in interstitial lung diseases show diverse electron microscopic and invasive features. *Lab. Invest.* **92**, 1270–1284 (2012).
- White, E. S. et al. Integrin α 4 β 1 regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 436–442 (2003).
- Hanahan, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
- Karamitsakos, T. et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **45**, 1–10 (2017).
- Murphy, D. A. & Courtneidge, S. A. The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 413–426 (2011).
- Paterson, E. K. & Courtneidge, S. A. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J.* **285**, 8–27 (2018).
- Hoshino, D., Branch, K. M. & Weaver, A. M. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *J. Cell. Sci.* **126**, 2979–2989 (2013).
- Di Martino, J. et al. The microenvironment controls invadosome plasticity. *J. Cell. Sci.* **129**, 1759–1768 (2016).
- Murphy, D. A. et al. A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. *PLoS ONE* **6**, e22499 (2011).
- Cejudo-Martin, P. et al. Genetic disruption of the sh3pxd2a gene reveals an essential role in mouse development and the existence of a novel isoform of tks5. *PLoS ONE* **9**, e107674 (2014).
- Li, C. M. et al. Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma. *Genes Dev.* **27**, 1557–1567 (2013).
- Fanidis, D., Moulos, P. & Aidinis, V. Fibromine is a multi-omics database and mining tool for target discovery in pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* **11**, 21712 (2021).
- Reyffman, P. A. et al. Single-cell transcriptomic analysis of human lung provides insights into the pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **199**, 1517–1536 (2019).
- Mouratis, M. A. & Aidinis, V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **17**, 355–361 (2011).
- Barbayianni, I., Ninou, I., Tzouvelekis, A. & Aidinis, V. Bleomycin revisited: a direct comparison of the intratracheal micro-spraying and the oropharyngeal aspiration routes of bleomycin administration in mice. *Front. Med.* **5**, 269 (2018).
- Tashiro, J. et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front. Med.* **4**, 118 (2017).
- Seals, D. F. et al. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* **7**, 155–165 (2005).
- Auwerx, J. et al. The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nat. Genet.* **36**, 925–927 (2004).
- Raess, M., de Castro, A. A., Gailus-Durner, V., Fessele, S. & Hrabě de Angelis, M. INFRAFRONTIER: a European resource for studying the functional basis of human disease. *Mamm. Genome* **27**, 445–450 (2016).
- Ehlich, H. et al. INFRAFRONTIER quality principles in systemic phenotyping. *Mamm. Genome* **33**, 120–122 (2022).
- 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 Res.* **23**, 5080–5081 (1995).
- Ryder, E. et al. Rapid conversion of EUCOMM/KOMP-CSD alleles in mouse embryos using a cell-permeable Cre recombinase. *Transgenic Res.* **23**, 177–185 (2014).
- Farley, F. W., Soriano, P., Steffen, L. S. & Dymecki, S. M. Widespread recombinase expression using FLP_{ER} (flipper) mice. *Genesis* **28**, 106–110 (2000).
- Subramanian, A. et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles. *Cell* **171**, 1437–1452.e1417 (2017).
- Wells, A. U. et al. Nintedanib in patients with progressive fibrosing interstitial lung diseases-subgroup analyses by interstitial lung disease diagnosis in the INBUILD trial: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Lancet Respir. Med.* **8**, 453–460 (2020).
- Li, H. et al. Src family kinases and pulmonary fibrosis: a review. *Biomed. Pharmacother.* **127**, 110183 (2020).
- Foxall, E. et al. PAK4 kinase activity plays a crucial role in the podosome ring of myeloid cells. *Cell Rep.* **29**, 3385–3393.e3386 (2019).
- Rafiq, N. B. M. et al. Podosome assembly is controlled by the GTPase ARF1 and its nucleotide exchange factor ARNO. *J. Cell Biol.* **216**, 181–197 (2016).
- Rottiers, P. et al. TGF β -induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J. Cell. Sci.* **122**, 4311–4318 (2009).
- Varon, C. et al. Transforming growth factor β induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* **26**, 3582–3594 (2006).
- Charbonneau, M. et al. Platelet-derived growth factor receptor activation promotes the prodestructive invadosome-forming phenotype of synovocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **196**, 3264–3275 (2016).
- Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G. & Courtneidge, S. A. Micro-RNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J. Cell. Biol.* **189**, 13–22 (2010).
- Spuul, P. et al. VEGF-A/notch-induced podosomes proteolyse basement membrane collagen-IV during retinal sprouting angiogenesis. *Cell Rep.* **17**, 484–500 (2016).
- Zannikou, M. et al. MAP3K8 regulates Cox-2-mediated prostaglandin E(2) production in the lung and suppresses pulmonary inflammation and fibrosis. *J. Immunol.* **206**, 607–620 (2021).
- van Helden, S. F. G. et al. A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J. Immunol.* **177**, 1567–1574 (2006).
- Lebel, M. et al. Invadosome formation by lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 499 (2022).

46. Iizuka, S. et al. Crosstalk between invadopodia and the extracellular matrix. *Eur. J. Cell. Biol.* **99**, 151122 (2020).
47. Artym, V. V. et al. Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network. *J. Cell. Biol.* **208**, 331–350 (2015).
48. Juin, A. et al. Discoidin domain receptor 1 controls linear invadopodia formation via a Cdc42-Tuba pathway. *J. Cell. Biol.* **207**, 517–533 (2014).
49. Denny, W. A. & Flanagan, J. U. Inhibitors of Discoidin Domain Receptor (DDR) kinases for cancer and inflammation. *Biomolecules* **11**, 1671 (2021).
50. Alexander, N. R. et al. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* **18**, 1295–1299 (2008).
51. White, E. S. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, S30–S33 (2015).
52. Burgstaller, G. et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur. Respir. J.* **50**, 1601805 (2017).
53. Zhou, Y. et al. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1096–1108 (2013).
54. Zhao, P. et al. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. *J. Cell. Sci.* **129**, 1355–1365 (2016).
55. Geng, Y. et al. PD-L1 on invasive fibroblasts drives fibrosis in a humanized model of idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* **4**, e125326 (2019).
56. Ahluwalia, N. et al. Fibrogenic lung injury induces non-cell-autonomous fibroblast invasion. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **54**, 831–842 (2016).
57. Jiang, D. et al. Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4. *J. Clin. Invest.* **120**, 2049–2057 (2010).
58. Liu, X. et al. HER2 drives lung fibrosis by activating a metastatic cancer signature in invasive lung fibroblasts. *J. Exp. Med.* **219**, e20220126 (2022).
59. Spinardi, L. et al. A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **295**, 360–374 (2004).
60. Michopoulou, A. et al. A novel mechanism in wound healing: Laminin 332 drives MMP9/14 activity by recruiting syndecan-1 and CD44. *Matrix Biol.* **94**, 1–17 (2020).
61. Jaeger, B. et al. Airway basal cells show a dedifferentiated KRT17(high) phenotype and promote fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Commun.* **13**, 5637 (2022).
62. Selman, M. et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L562–L574 (2000).
63. Espindola, M. S. et al. Differential responses to targeting matrix metalloproteinase 9 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 458–470 (2021).
64. Yu, Q. & Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14**, 163–176 (2000).
65. Ramírez, G. et al. Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab. Invest.* **91**, 1206–1218 (2011).
66. Bormann, T. et al. Role of matrix metalloprotease-2 and MMP-9 in experimental lung fibrosis in mice. *Respir. Res.* **23**, 180 (2022).
67. Ahangari, F. et al. Saracatinib, a selective src kinase inhibitor, blocks fibrotic responses in preclinical models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **206**, 1463–1479 (2022).
68. Tzouveleakis, A. et al. SH2 domain-containing phosphatase-2 is a novel antifibrotic regulator in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 500–514 (2017).
69. Papadopoulou, A. & Kleitsas, D. Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* **39**, 989–999 (2011).
70. Díaz, B. Invadopodia detection and gelatin degradation assay. *Bio. Protoc.* **3**, e997 (2013).
71. DeQuach, J. A. et al. Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PLoS ONE* **5**, e13039 (2010).
72. Kawai, N. et al. Induction of lung-like cells from mouse embryonic stem cells by decellularized lung matrix. *Biochem. Biophys. Rep.* **15**, 33–38 (2018).
73. Rothberg, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**, 348–352 (2011).
74. Stuart, T. et al. Comprehensive integration of single-cell data. *Cell* **177**, 1888–1902.e1821 (2019).
75. Hao, Y. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573–3587.e3529 (2021).
76. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**, 907–915 (2019).
77. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
78. Fanidis, D. & Moulos, P. Integrative, normalization-insusceptible statistical analysis of RNA-Seq data, with improved differential expression and unbiased downstream functional analysis. *Brief. Bioinform.* **22**, bbaa156 (2020).
79. Lawrence, M. et al. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003118 (2013).
80. Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G. & Dudoit, S. GC-content normalization for RNA-seq data. *BMC Bioinform.* **12**, 480–480 (2011).
81. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res.* **49**, D325–D334 (2021).
82. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q.-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS: J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).
83. Rani, J., Shah, A. R. & Ramachandran, S. pubmed.mineR: an R package with text-mining algorithms to analyse PubMed abstracts. *J. Biosci.* **40**, 671–682 (2015).
84. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–1191 (2009).
85. Garcia-Alonso, L., Holland, C. H., Ibrahim, M. M., Turei, D. & Saez-Rodriguez, J. Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities. *Genome Res.* **29**, 1363–1375 (2019).
86. Barbayanni, I. et al. Dataset. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8296510> (2023).

Acknowledgements

We would like to thank Vassia Papadaki (Kafasla lab, BSRC Fleming) for support on confocal imaging, and Dimitris Kleitsas (NCSR Demokritos) for NHLF clones and advice on optimal NHLF culture conditions.

This research was co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund—ESF) through the Operational Program «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (Fellowship to IB). Research was further partly supported through the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) under the “2nd Call for HFRI Research Projects to support Faculty Members & Researchers” (#3565 to VA). Human studies were supported by the NIH NHLBI grants R01HL127349, R01HL141852, U01HL145567, and UH2HL123886 to NK. The funders had no role in the design of the study, or in the collection, analyses, or

interpretation of data, or in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Author contributions

I.B. and P.K. performed most presented experiments and analyzed the relative data, assisted by E.-D.N., D.N., A.G., and E.T.; A.T. performed human studies supervised by R.H., N.K. and V.A.; D.F. performed in silico data re-analysis and supervised all statistical analyses. V.H. and P.H. performed RNAseq. K.A., B.C. and N.K. provided resources. V.A. conceived and coordinated the project. I.B., P.K., D.F. and V.A. wrote the paper, which was edited by V.A. and critically commented by all co-authors.

Competing interests

A.T. has received fees for speaking and/or organizing education from AstraZeneca, Menarini, Boehringer Ingelheim, Chiesi, Hoffmann-La Roche, Ltd., GlaxoSmithKline and Elpen, for consulting from Boehringer Ingelheim, Pfizer, Gilead, Hoffmann-La Roche, Ltd., GlaxoSmithKline, and has received research funding, including institutional funding, from Boehringer Ingelheim, Chiesi, Hoffmann-La Roche, Ltd., GlaxoSmithKline and Astra Zeneca, outside the submitted work. B.C. has received fees for speaking and/or organizing education from Apellis, Astra Zeneca, BMS, Boehringer Ingelheim, Novartis, Roche and Sanofi, for consulting fees from Apellis, BMS, Boehringer Ingelheim and Sanofi, and has received research funding from Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. N.K. is a scientific founder at Thyron, served as a consultant to Biogen Idec, Boehringer Ingelheim, Third Rock, Pliant, Samumed, NuMedii, Theravance, LifeMax, Three Lake Partners, Optikira, Astra Zeneca, RohBar, Veracyte, Augmanity, CSL Behring, Galapagos and Thyron over the last 3 years, reports Equity in Pliant and Thyron, and grants from Veracyte, Boehringer Ingelheim, BMS and non-financial support from MiRagen and Astra Zeneca, outside the submitted work. Other authors declare that they have no conflict of interest.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41614-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Vassilis Aidinis.

Peer review information *Nature Communications* thanks John Lewis, and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. A peer review file is available.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



Article

Autotaxin Has a Negative Role in Systemic Inflammation

Ioanna Nikitopoulou ^{1,†}, Aggeliki Katsifa ^{2,†}, Paraskevi Kanellopoulou ², Edison Jahaj ³ , Alice G. Vassiliou ¹ , Zafeiria Mastora ³, Ioanna Dimopoulou ³ , Stylianos E. Orfanos ^{1,3}, Vassilis Aidinis ² and Anastasia Kotanidou ^{1,3,*}

- ¹ 1st Department of Critical Care Medicine & Pulmonary Services, GP Livanos and M. Simou Laboratories, National and Kapodistrian University of Athens Medical School, Evangelismos Hospital, 10676 Athens, Greece; joannaniki@gmail.com (I.N.); alvass75@gmail.com (A.G.V.); sorfanos@med.uoa.gr (S.E.O.)
- ² Institute of Fundamental Biomedical Research, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, 16672 Vari, Greece; agkatsifa@yahoo.com (A.K.); kanellopoulou@fleming.gr (P.K.); aidinis@fleming.gr (V.A.)
- ³ 1st Department of Critical Care Medicine & Pulmonary Services, National and Kapodistrian University of Athens Medical School, Evangelismos Hospital, 11527 Athens, Greece; edison.jahaj@gmail.com (E.J.); zafimast@yahoo.gr (Z.M.); idimo@otenet.gr (I.D.)
- * Correspondence: akotanid@med.uoa.gr
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The pathogenesis of sepsis involves complex interactions and a systemic inflammatory response leading eventually to multiorgan failure. Autotaxin (ATX, ENPP2) is a secreted glycoprotein largely responsible for the extracellular production of lysophosphatidic acid (LPA), which exerts multiple effects in almost all cell types through its at least six G-protein-coupled LPA receptors (LPARs). Here, we investigated a possible role of the ATX/LPA axis in sepsis in an animal model of endotoxemia as well as in septic patients. Mice with 50% reduced serum ATX levels showed improved survival upon lipopolysaccharide (LPS) stimulation compared to their littermate controls. Similarly, mice bearing the inducible inactivation of ATX and presenting with >70% decreased ATX levels were even more protected against LPS-induced endotoxemia; however, no significant effects were observed upon the chronic and systemic transgenic overexpression of ATX. Moreover, the genetic deletion of LPA receptors 1 and 2 did not significantly affect the severity of the modelled disease, suggesting that alternative receptors may mediate LPA effects upon sepsis. In translation, ATX levels were found to be elevated in the sera of critically ill patients with sepsis in comparison with their baseline levels upon ICU admission. Therefore, the results indicate a role for ATX in LPS-induced sepsis and suggest possible therapeutic benefits of pharmacologically targeting ATX in severe, systemic inflammatory disorders.

Keywords: sepsis; inflammation; autotaxin; lysophosphatidic acid; endotoxemia; LPS



Citation: Nikitopoulou, I.; Katsifa, A.; Kanellopoulou, P.; Jahaj, E.; Vassiliou, A.G.; Mastora, Z.; Dimopoulou, I.; Orfanos, S.E.; Aidinis, V.; Kotanidou, A. Autotaxin Has a Negative Role in Systemic Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7920. <https://doi.org/10.3390/ijms23147920>

Academic Editor: Lukáš Kubala

Received: 26 May 2022

Accepted: 14 July 2022

Published: 18 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sepsis, the leading mortality cause in the intensive care unit (ICU) worldwide [1], is a systemic reaction to infection which can eventually lead to multiorgan failure. During the activation of inflammatory responses, multiple pathways are involved, and complicated cellular functions are affected. The management of sepsis is imperative due to the long-term consequences along with the significant burden for the healthcare system [2].

Autotaxin (ATX; ENPP2) is a secreted lysophospholipase D that is present in most biological fluids and is largely responsible for the extracellular production of lysophosphatidic acid (LPA) from the hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) [3]. LPA is a bioactive phospholipid that exerts multiple biological activities in most cell types through its G-protein-coupled receptors (GPCRs; LPAR1-6), which are involved in several signal transduction pathways [4]. A pathologic role for the ATX/LPA axis has been attributed in several chronic inflammatory diseases and cancers [5,6]. Increased ATX expression has been

demonstrated in asthma [7], idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [8,9] and COVID-19 [10], where it correlated with the components of the cytokine storm.

However, much less is known about the involvement of ATX/LPA in severe systemic inflammation. In sepsis patients, serum LPC, the substrate of ATX concentration, was found to be lower compared to that in healthy controls [11]. Additionally, serial LPC measurements were shown to be useful in predicting 28-day mortality in septic patients [12]. As proven recently, ATX is also upregulated in liver failure syndromes, and monocyte proinflammatory cytokine production is induced by LPA [13]. Therefore, in this study, we investigated a possible role for ATX in systemic inflammation. For that reason, the effect of ATX genetic deletion was studied upon lipopolysaccharide (LPS) administration in mice. Moreover, ATX levels were determined in samples from ICU patients who developed sepsis.

2. Results

2.1. ATX Haploinsufficiency Protects Mice from LPS-Induced Sepsis

In this study, we aimed to assess the role of ATX in systemic inflammation. Heterozygous knockout *Enpp2*^{+/-} mice were studied, since *Enpp2*^{-/-} mutant embryos show embryonic lethality due to abnormal vascular development and neural defects [14]. Heterozygous ATX knockout mice (*Enpp2*^{+/-} or ATX^{df/+}) were obtained upon intercrossing the ATX conditional knockout (*Enpp2*^{n/n}) mice with a transgenic mouse strain expressing the Cre recombinase driven by the CMV promoter [15]; no phenotypic malformations were observed. However, these mice produce 50% reduced serum ATX levels and ATX activity levels (Figure S1A, [14,16,17]), accompanied by a 50% decrease in plasma LPA levels.

In order to study whether ATX is involved in the pathogenesis of mouse endotoxemia, the mice were injected intraperitoneally with LPS (from *Escherichia coli* dissolved in normal saline), an endotoxin present in the outer membrane of Gram-negative bacteria that induces an acute phase inflammatory response mimicking several of the initial clinical features of sepsis [18]. As recently described, LPS administration in these settings results in the upregulation of the serum levels of TNF α and IL-6 [19]. The corresponding mRNA levels of TNF, IL-1b and IL-6 in the liver, spleen and lung tissues were also found to be increased (Figure S2), as previously shown [20]. Normal saline alone was administered to littermate mice; the survival and health status of mice were monitored every 4 h during the light period. Haploinsufficient ATX^{df/+} mice were found to have an increased survival rate compared to their littermate controls (Figure 1), indicating that ATX is involved in the pathogenesis of LPS-induced sepsis.

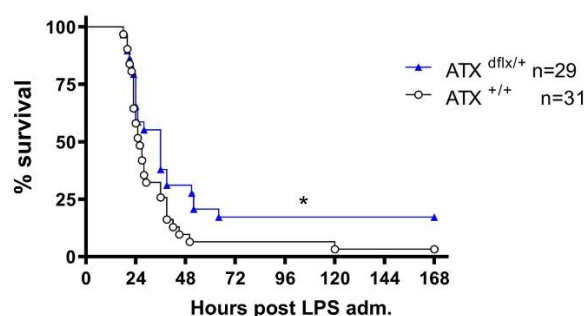


Figure 1. Increased survival rates in LPS-treated heterozygous transgenic ATX knockout mice. Kaplan–Meier survival curves of ATX^{df/+} mice and appropriate littermate controls. Presented results are cumulative from four independent experiments. Differences were tested with the Logrank test. * $p < 0.05$.

To avoid the potential developmental effects of the ATX genetic deletion and to obtain even lower ATX levels, *Enpp2*^{n/n} mice [14] were crossed with the *R26-Cre^{ERT2}* mice that carry a Cre recombinase-estrogen receptorT2 (Cre^{ERT2}) allele. Tamoxifen (Tmx), a synthetic estrogen antagonist, serves as a useful tool to study gene functions by enabling the nuclear translocation of Cre and the recombination of floxed DNA alleles. Tmx was administered to

R26-Cre^{ERT2}/Enpp2^{n/n} and control littermate mice, and the induced R26Cre-ERT2-mediated Enpp2 recombination resulted in >70% decreased ATX activity levels (Figure S1B, [21]). The mice bearing the inducible inactivation of ATX (R26-Cre^{ERT2}/Enpp2^{n/n} mice) exhibited greater protection against LPS-induced endotoxemia compared to the control mice (Figure 2), further supporting the ATX involvement in sepsis.

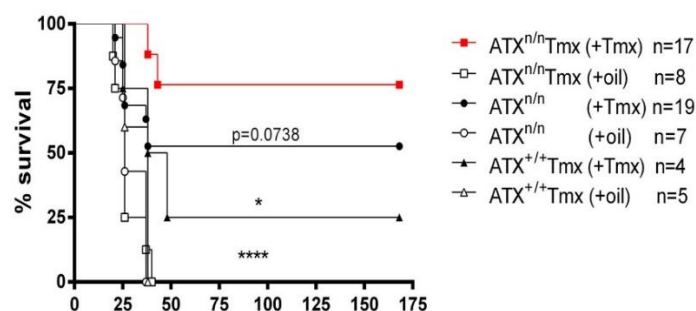


Figure 2. Increased survival rate upon the Tmx-induced genetic inactivation of ATX in mice. Kaplan–Meier survival curves of R26Cre-ERT2/Enpp2^{n/n} and control mice administered with Tmx. * denotes $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$.

2.2. Excess Circulating ATX Levels Have No Effect on LPS-Induced Sepsis

To investigate whether increases in serum ATX levels could exacerbate LPS-induced sepsis, transgenic mice overexpressing ATX in the liver under the control of the human $\alpha 1$ -antitrypsin promoter (a1t1), resulting in ~200% increased serum ATX/LPA levels [8,22–24], were used. LPS was administered to homozygous transgenic mice (Tga1t1Enpp2) and to their littermate controls, and the overall survival was studied. Chronically elevated serum ATX levels did not seem to alter LPS-induced mortality in comparison to the control mice (Figure 3), suggesting that long-term systemic increases in ATX levels do not significantly affect sepsis.

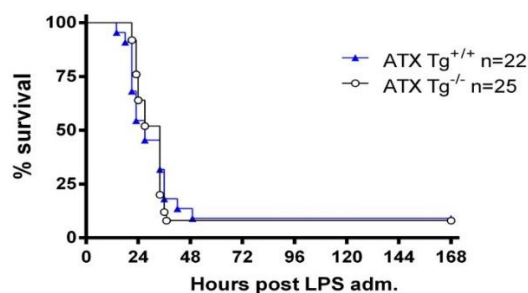


Figure 3. No difference in the survival rates of Enpp2-Tg mice overexpressing autotaxin. Kaplan–Meier survival curves of Enpp2-Tg mice and appropriate littermate controls. The presented results are cumulative from two independent experiments. No statistically significant differences were observed, as assessed with the Logrank test.

2.3. The Ubiquitous Genetic Deletion of Lpar1 and Lpar2 Has No Significant Effect on LPS-Induced Endotoxemia

The possible involvement of LPAR1 and LPAR2 in systemic inflammation was then examined through the administration of LPS to *Lpar1*^{−/−}, *Lpar2*^{−/−} mice and their WT littermates. Since C57BL/6J *Lpar1*^{−/−} mice are embryonically lethal, *Lpar1*^{−/−} mice were bred and maintained on a mixed C57BL/6J/129 genetic background [25]. The deletion of *Lpar1* tended to improve survival, albeit with no statistical significance (Figure 4A). No effect in survival was observed from the genetic deletion of *Lpar2*, ruling out its involvement in LPS-induced sepsis (Figure 4B).

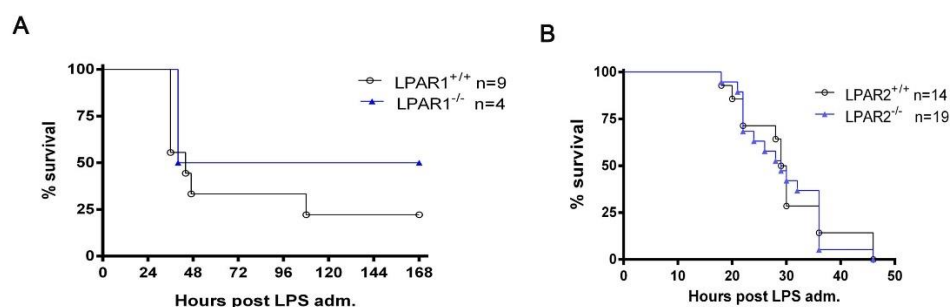


Figure 4. The ubiquitous genetic deletion of LPA receptor 1 or LPA receptor 2 does not significantly affect survival rates after LPS administration. Kaplan–Meier survival curves of LPAR1^{−/−} (A), LPAR2^{−/−} (B) and their appropriate littermate controls. Differences were tested with the Log-rank test.

2.4. Elevated ATX Levels in Critically Ill Patients with Sepsis

Having identified the importance of the ATX-LPA axis, we then focused on possible fluctuations in patients' systemic levels. The demographics and baseline characteristics of the patients included in the study are summarized in Table 1. Overall, 26 ICU patients aged 45 ± 20 years were recruited at Evangelismos Hospital.

Table 1. Clinical characteristics and laboratory data of the patients included in the study.

Patient Clinical Characteristics	
Number of patients (n)	26
Sex, n (%)	Male 22 (85%) Female 4 (15%)
Age (years, median, IQR)	46 (24–58)
Comorbidities, n (%)	Hypertension 13 (50%) Diabetes 4 (15%) COPD 9 (35%)
Hospital stay, days (median, IQR)	13 (7–30)
Hospital mortality (% n)	15%
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg (mean $\pm$ SD)	259 $\pm$ 88
APACHE II score (median, IQR)	11 (8–14)
SOFA score (median, IQR)	6 (4–7)
CRP (mg/dL) (median, IQR)	8 (3–24)
White blood cell count (per μ L) (median, IQR)	6000 (3800–7000)

CRP: C-reactive protein; APACHE: acute physiology and chronic health evaluation; SOFA: sequential organ failure assessment.

ATX levels were measured repetitively in the sera of ICU patients ≤ 24 h after admission as well as at sepsis development. As shown in Figure 5, the ATX peripheral concentrations in sepsis were found to be elevated compared to the baseline (i.e., non-sepsis) values. The increased levels of ATX during sepsis strongly support its role in disease pathophysiology.

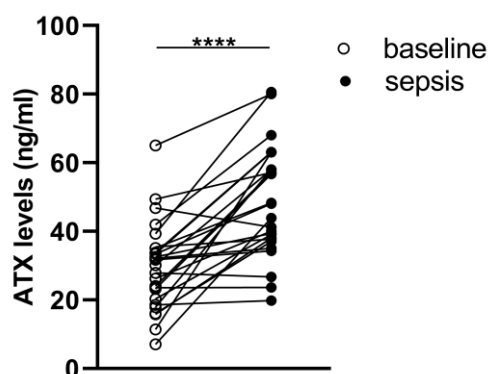


Figure 5. Increased ATX concentrations in patients with sepsis in comparison to their baseline levels ≤ 24 h after ICU admission. ATX levels were measured using a commercially available ELISA assay. Statistical significance was assessed with the Wilcoxon signed rank test for paired data analysis. **** denotes $p < 0.0001$.

3. Discussion

The pathophysiology of sepsis involves the deregulation of the immune system and the production of pro-inflammatory mediators. Lipid mediators have been recently proposed to mediate the immune response, thus playing a role in critical illness mechanisms [26]. In the present study, we genetically identified a role of the ATX-LPA axis in LPS-induced endotoxemia in mice. More specifically, we demonstrated that haploinsufficient ATX^{df/+} mice, producing 50% reduced serum ATX levels (Figure S1A, [14,16,17]), show increased survival compared to their littermate controls (Figure 1). Similarly, mice bearing the Tmx-inducible $>70\%$ inactivation of ATX (Figure S1B) [21] were even more protected against LPS-induced endotoxemia compared to their control littermate mice (Figure 2).

LPS administration in mice is a widely used animal model to study sepsis, which partially mimics some of the initial clinical features in humans, including the serum increases of pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL-6 and IL-1b [27–29]. The severity and timing of LPS-induced sepsis in mice vary depending on the source, amount and route of administered LPS, as well as the mouse strain, the local genetic drift and the health status and microbiome load of the local animal house [27–29]. In this context, the conditions used in this study were selected upon extensive local testing over the years, focusing on 48 h survival.

Therefore, the genetic deletion of ATX, both in an obligatory as well as in an inducible way, resulted in a reduction of LPS-induced lethality, indicating that ATX, and therefore LPA, play a pathogenic role in the development of LPS-induced experimental sepsis. In agreement, the pharmacologic inhibition of ATX in mice reduced systemic (IP) LPS-induced serum TNF α and IL-6 levels, as well as the mRNA levels of different proinflammatory mediators in the mouse brain, such as TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS and CXCL2 [30].

However, transgenic ATX overexpression from the liver and the ensuing serum 200% ATX increases [22] did not exacerbate LPS-induced sepsis and lethality (Figure 3). Of note, the increased systemic ATX levels in the same ATX transgenic mouse were previously shown not to significantly affect the development of modelled chronic inflammatory diseases, such as bleomycin-induced pulmonary fibrosis [8], transgenic TNF-driven inflammatory arthritis [23] or experimental autoimmune encephalomyelitis [24]. On the contrary, the transgenic ATX overexpression and the systemic serum ATX increases did exacerbate the development of CCl₄-induced hepatitis [31], suggesting that systemic ATX can affect metabolic active tissues, such as the liver [31,32] or the muscle [33], and not just inflamed tissues.

The genetic deletion of Lpar1 tended to improve survival after LPS administration, albeit in a non-statistically significant way (Figure 4A). This trend is consistent with previous findings revealing that LPAR1-deficient mice show attenuated lung vascular permeability induced by bleomycin [34]. Moreover, the pharmacologic inhibition of LPAR1 with ki16425

has been reported to reduce the severity of LPS-induced abdominal inflammation and organ damage [35]. LPAR1 antagonism reduced inflammatory markers, as well as mortality [35]. Lpar2 genetic deletion, on the other hand, did not seem to have an impact on survival upon LPS-induced endotoxemia (Figure 4B). Moreover, the pharmacologic inhibition of LPAR5 with AS2717638 has been recently reported to attenuate IP LPS-induced serum cytokine levels as well as inflammatory markers in the mouse brain [30]. Therefore, both LPAR5 and LPAR1, but not LPAR2, mediate to some extent the pathogenic effects of ATX/LPA in experimental sepsis.

To translate the animal model findings into the human disease, increased ATX levels were observed in septic patients in comparison with their levels upon ICU admission (Figure 5), suggesting a possible involvement of ATX in human sepsis too. However, in the present study, no statistical correlation between ATX levels and any clinical endpoints and/or scores was observed, possibly due to the relatively low number of patients. Additional clinical studies will be needed to delineate the exact role of ATX in the pathogenesis of sepsis in humans. In accordance, increased ATX activity has been reported in septic patients who did not survive up to 30 days following discharge, correlating with platelet count and the ratio of angiopoietin-2/1 (Ang-2/1) [36], indicating an association of ATX, platelets and endothelial dysfunction. Increased serum ATX levels have been recently reported in severe COVID-19 patients, also correlating with the markers of endothelial dysfunction (sP-sel, sICAM) [10], further enforcing the correlation between ATX/LPA and endothelial damage [37]. In addition, it has been recently shown that increased serum ATX levels are associated with severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) and an unfavorable outcome [38]. This study showed that increased ATX levels are correlated with inflammatory and fibrotic biomarkers, denoting the role of ATX as a predictor in ARDS. Of note, ATX was found to add value in predicting the outcome of ARDS, both alone and in combination with SOFA, APACHE II and PaO₂/FiO₂. Our observations also agree with reports on decreased LPC and increased ATX expression and LPA concentration in acute-on-chronic liver failure [13]. In particular, LPA production was assigned a pivotal role in the regulatory phenotype and function of monocytes [13]. The treatment of CD14⁺ cells with LPA increased monocyte TNF- α production, thus supporting the notion that LPA has a role in the reprogramming of monocytes and the modulation of immune functions.

Overall, a pathogenic role for ATX in LPS-induced experimental sepsis was indicated via the genetic, obligatory or inducible deletion of ATX. Moreover, the development of sepsis in human ICU patients was accompanied by serum increases of ATX, further suggesting a role for ATX/LPA in human sepsis. The establishment of ATX as a therapeutic target in pulmonary fibrosis has led to the development of numerous ATX inhibitors [39,40], which could also be proven to be useful for sepsis management.

4. Materials and Methods

4.1. Mice

The mice were bred at the animal facilities of the Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', under specific pathogen-free conditions, at 20–22 °C and under 55 ± 5% humidity and a 12 h light–dark cycle; food and water were provided ad libitum. The mice were bred and maintained in a C57BL/6 genetic background for more than 10 generations, except for Lpar1^{−/−} mice, which were bred in a mixed C57BL/6J/129 genetic background. All of the experimentation was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of the Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', as well as by the Veterinary Service of the governmental prefecture of Attica, Greece (approval protocol number 3765/2011). The study was conducted in compliance with the European Union Directive 2010/63/EU on animal experimentation. All efforts were made to minimize animal distress and suffering. The health status of the mice was monitored daily. The mice were euthanized at predetermined time-points under deep anesthesia by exsanguination. The generation and genotyping protocols for Enpp2^{n/n} [14],

R26Cre^{ERT2} [41], Tga1t1-hEnpp2 [22], Lpar1^{-/-} [25] and Lpar2^{-/-} [42] mice have been previously described.

4.2. Tamoxifen Treatment

Tamoxifen (Tmx; Sigma T5648, St. Louis, Missouri, USA) was dissolved in a corn oil/ethanol (9/1) mixture at 45 mg/mL. Tmx was administered by oral gavage (Per Os, PO; 180 mg/kg), as previously described [43]. The control groups received corn oil.

4.3. Survival Study

LPS (Escherichia coli O111:B4, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) was injected intraperitoneally (20 mg/kg), as previously described [19], in ATX^{df/+}, R26 Cre^{ERT2}/Enpp2^{n/n}, Enpp2-Tg, Lpar1^{-/-} and Lpar2^{-/-} mice. Kaplan–Meier survival analysis was performed.

4.4. ATX Activity Assay

ATX/LysoPLD activity was measured using the TOOS activity assay. Hydrogen peroxide serves as the oxidizing agent, and, in the presence of horseradish peroxidase, it reacts with TOOS (N-ethylN-(2-hydroxy-3-sulfofpropyl)-3-methylaniline) and 4-AAP (aminoantipyrene) to form a pink quinoneimine dye which absorbs at 555 nm. 1× 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 pre-incubated at 37 °C for 30 min. Plasma samples were incubated with 1× LysoPLD buffer at 37 °C for 4 h. At the end of the incubation, a color mix (0.5 mM 4-AAP, 7.95 U/mL HRP, 0.3 mM TOOS, 2U/mL choline oxidase in 5 mM MgCl₂/50 mM Tris-HCl pH8.0) was prepared and added to each well. Absorbance (A) was measured at 555 nm every 5 min for 20 min. For each sample, the absorbance was plotted against the time, and the slope (dA/min) was calculated for the linear portion of each reaction. ATX activity was calculated according to the following equation: Activity (U/mL) = (μmol/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: millimolar extinction coefficient of quinoneimine dye under the assay conditions (e = 32.8 μmol/cm²) and 0.5: the moles of the quinoneimine dye produced by 1 mol of H₂O₂.

4.5. Real Time RT-PCR

The total RNA was isolated from the tissues using the Tri Reagent in accordance with the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen 2334659, Waltham, MA, USA) at a final volume of 20 μL. PCR reaction mixtures were prepared using the SYBR select master mix (Applied Biosystems 01196818, Waltham, MA, USA), followed by quantitative PCR on a BioRad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, CA, USA). The following primer pairs were used: Beta2-microglobulin (b2m) Fwd: 5'-TTC TGG TGC TTG TCT CAC TGA-3'; Rev: 5'-CAGTAT GTT CCG CTT CCC ATTC-3'; Interleukin 6 (IL-6) Fwd: 5'-CAA AGC CAG AGT CCT TCA GAGA-3'; Rev: 5'-TGT GAC TCC AGC TTA TCT CTT GG-3'; Interleukin 1b (Il-1b) Fwd: 5'-GCA ACT GTT CCT GAA CTC AACT-3'; Rev: 5'-ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT-3'; TNF Fwd: 5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTAG-3'; Rev: 5'-GGG AGT AGA CAA GGT ACA ACCC-3'. B2m served as the internal control to normalize the amount of loaded cDNA.

4.6. Human Sample Collection and Atx Measurement

All of the studies were performed in accordance with the Helsinki Declaration principles. Informed consent was obtained from all of the individuals or the patients' next-of-kin for severe cases. The study was approved by the Evangelismos Hospital Research Ethics Committee (#80 1/2/10). The patients' epidemiological, clinical and experimental data are summarized in the corresponding table. Venous blood (3 mL) was collected within the first 24 h after ICU admission. Autotaxin serum concentrations were measured using an

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Systems Inc., Minneapolis, MN, USA, # DY5255-05).

4.7. Statistical Analysis

All data are expressed as the means $\pm$ SEMs. The normality and statistical analysis was conducted with Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA), as indicated in each figure legend, along with numbers (n) and statistical thresholds.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23147920/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, V.A. and A.K. (Anastasia Kotanidou); Data curation, I.N., A.K. (Aggeliki Katsifa), E.J., P.K. and Z.M.; Formal analysis, I.N., A.K. (Aggeliki Katsifa) and V.A.; Methodology, I.N. and A.K. (Aggeliki Katsifa); Project administration, V.A.; Resources, S.E.O., I.D. and A.K. (Anastasia Kotanidou); Supervision, S.E.O., I.D., A.K. (Anastasia Kotanidou) and V.A.; Writing—original draft, I.N. and P.K.; Writing—review and editing, V.A., S.E.O., A.G.V., I.D. and A.K. (Anastasia Kotanidou). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Evangelismos Hospital Research Ethics Committee (#80 1/2/10). The animal study protocol was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of the Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', as well as by the Veterinary Service of the governmental prefecture of Attica, Greece (approval protocol number 3765/2011).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the individuals or the patients' next-of-kin.

Acknowledgments: We are grateful to Jerold Chun and Gordon B. Mills for providing the *Lpar1*^{−/−} and *Lpar2*^{−/−} mice and the *Tg-Enpp2* mice, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Makic, M.B.F.; Bridges, E. CE: Managing Sepsis and Septic Shock: Current Guidelines and Definitions. *Am. J. Nurs.* **2018**, *118*, 34–39. [CrossRef] [PubMed]
2. Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.D.; Coopersmith, C.M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801–810. [CrossRef] [PubMed]
3. Umezū-Goto, M.; Kishi, Y.; Taira, A.; Hama, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Yamori, T.; Mills, G.B.; Inoue, K.; Aoki, J.; et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.* **2002**, *158*, 227–233. [CrossRef]
4. Yung, Y.C.; Stoddard, N.C.; Chun, J. LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1192–1214. [CrossRef] [PubMed]
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. [CrossRef]
6. Ninou, I.; Magkrioti, C.; Aidinis, V. Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* **2018**, *5*, 180. [CrossRef]
7. Park, G.Y.; Lee, Y.G.; Berdyshev, E.; Nyenhuis, S.; Du, J.; Fu, P.; Gorshkova, I.A.; Li, Y.; Chung, S.; Karpurapu, M.; et al. Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 928–940. [CrossRef]
8. Oikonomou, N.; Mouratis, M.A.; Tzouveleakis, A.; Kaffe, E.; Valavanis, C.; Vilaras, G.; Karameris, A.; Prestwich, G.D.; Bouros, D.; Aidinis, V. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2012**, *47*, 566–574. [CrossRef]
9. Magkrioti, C.; Galaris, A.; Kanellopoulou, P.; Stylianaki, E.A.; Kaffe, E.; Aidinis, V. Autotaxin and chronic inflammatory diseases. *J. Autoimmun.* **2019**, *104*, 102327. [CrossRef]
10. Nikitopoulou, I.; Fanidis, D.; Ntatsoulis, K.; Moulos, P.; Mpekoulis, G.; Evangelidou, M.; Vassiliou, A.G.; Dimakopoulou, V.; Jahaj, E.; Tsiplis, S.; et al. Increased Autotaxin Levels in Severe COVID-19, Correlating with IL-6 Levels, Endothelial Dysfunction Biomarkers, and Impaired Functions of Dendritic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6. [CrossRef]

11. Cho, W.H.; Park, T.; Park, Y.Y.; Huh, J.W.; Lim, C.M.; Koh, Y.; Song, D.K.; Hong, S.B. Clinical significance of enzymatic lysophosphatidylcholine (LPC) assay data in patients with sepsis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 1805–1810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Park, D.W.; Kwak, D.S.; Park, Y.Y.; Chang, Y.; Huh, J.W.; Lim, C.M.; Koh, Y.; Song, D.K.; Hong, S.B. 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. *J. Crit. Care* **2014**, *29*, 882.e5–882.e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Trovato, F.M.; Zia, R.; Napoli, S.; Wolfer, K.; Huang, X.; Morgan, P.E.; Husby, H.; Elgosbi, M.; Lucangeli, M.; Miquel, R.; et al. Dysregulation of the Lysophosphatidylcholine/Autotaxin/Lysophosphatidic Acid Axis in Acute-on-Chronic Liver Failure Is Associated With Mortality and Systemic Inflammation by Lysophosphatidic Acid-Dependent Monocyte Activation. *Hepatology* **2021**, *74*, 907–925. [[CrossRef](#)]
14. Fotopoulou, S.; Oikonomou, N.; Grigorieva, E.; Nikitopoulou, I.; Paparountas, T.; Thanassopoulou, A.; Zhao, Z.; Xu, Y.; Kontoyiannis, D.L.; Remboutsika, E.; et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev. Biol.* **2010**, *339*, 451–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. 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 Res.* **1995**, *23*, 5080–5081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. van Meeteren, L.A.; Ruurs, P.; Stortelers, C.; Bouwman, P.; van Rooijen, M.A.; Pradere, J.P.; Pettit, T.R.; Wakelam, M.J.; Saulnier-Blache, J.S.; Mummery, C.L.; et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 5015–5022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tanaka, M.; Okudaira, S.; Kishi, Y.; Ohkawa, R.; Iseki, S.; Ota, M.; Noji, S.; Yatomi, Y.; Aoki, J.; Arai, H. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25822–25830. [[CrossRef](#)]
18. Wichterman, K.A.; Baue, A.E.; Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* **1980**, *29*, 189–201. [[CrossRef](#)]
19. Nikitopoulou, I.; Kampisiouli, E.; Jahaj, E.; Vassiliou, A.G.; Dimopoulou, I.; Mastora, Z.; Tsakiris, S.; Perreas, K.; Tzanela, M.; Routsi, C.; et al. Ghrelin alterations during experimental and human sepsis. *Cytokine* **2020**, *127*, 154937. [[CrossRef](#)]
20. Rosier, F.; Nuñez, N.F.; Torres, M.; Lioriod, B.; Rihet, P.; Pradel, L.C. Transcriptional Response in a Sepsis Mouse Model Reflects Transcriptional Response in Sepsis Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 821. [[CrossRef](#)]
21. Katsifa, A.; Kaffe, E.; Nikolaidou-Katsaridou, N.; Economides, A.N.; Newbigging, S.; McKerlie, C.; Aidinis, V. The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pamuklar, Z.; Federico, L.; Liu, S.; Umezū-Goto, M.; Dong, A.; Panchatcharam, M.; Fulkerson, Z.; Berdyshev, E.; Natarajan, V.; Fang, X.; et al. Autotaxin/lysophospholipase D and lysophosphatidic acid regulate murine hemostasis and thrombosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 7385–7394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nikitopoulou, I.; Oikonomou, N.; Karouzakis, E.; Sevastou, I.; Nikolaidou-Katsaridou, N.; Zhao, Z.; Mersinias, V.; Armaka, M.; Xu, Y.; Masu, M.; et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 925–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ninou, I.; Sevastou, I.; Magkrioti, C.; Kaffe, E.; Stamatakis, G.; Thivaios, S.; Panayotou, G.; Aoki, J.; Kollias, G.; Aidinis, V. Genetic deletion of Autotaxin from CD11b+ cells decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0226050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Contos, J.J.; Fukushima, N.; Weiner, J.A.; Kaushal, D.; Chun, J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13384–13389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bulger, E.M.; Maier, R.V. Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit. Care Med.* **2000**, *28*, N27–N36. [[CrossRef](#)]
27. Nemzek, J.A.; Hugunin, K.M.; Opp, M.R. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. *Comp. Med.* **2008**, *58*, 120–128.
28. Korneev, K.V. Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. *Mol. Biol.* **2019**, *53*, 704–717. [[CrossRef](#)]
29. Doi, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, P.S.; Star, R.A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 2868–2878. [[CrossRef](#)]
30. Joshi, L.; Plastira, I.; Bernhart, E.; Reicher, H.; Triebl, A.; Köfeler, H.C.; Sattler, W. Inhibition of Autotaxin and Lysophosphatidic Acid Receptor 5 Attenuates Neuroinflammation in LPS-Activated BV-2 Microglia and a Mouse Endotoxemia Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8519. [[CrossRef](#)]
31. Kaffe, E.; Katsifa, A.; Xylourgidis, N.; Ninou, I.; Zannikou, M.; Harokopos, V.; Foka, P.; Dimitriadis, A.; Evangelou, K.; Moulas, A.N.; et al. Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology* **2017**, *65*, 1369–1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Brandon, J.A.; Kraemer, M.; Vandra, J.; Halder, S.; Ubele, M.; Morris, A.J.; Smyth, S.S. Adipose-derived autotaxin regulates inflammation and steatosis associated with diet-induced obesity. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0208099. [[CrossRef](#)]
33. D'Souza, K.; Nzirotera, C.; Cowie, A.M.; Varghese, G.P.; Trivedi, P.; Eichmann, T.O.; Biswas, D.; Touaibia, M.; Morris, A.J.; Aidinis, V.; et al. Autotaxin-LPA signaling contributes to obesity-induced insulin resistance in muscle and impairs mitochondrial metabolism. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 1805–1817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Zhao, J.; He, D.; Su, Y.; Berdyshev, E.; Chun, J.; Natarajan, V.; Zhao, Y. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2011**, *301*, L547–L556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhao, J.; Wei, J.; Weathington, N.; Jacko, A.M.; Huang, H.; Tsung, A.; Zhao, Y. Lysophosphatidic acid receptor 1 antagonist ki16425 blunts abdominal and systemic inflammation in a mouse model of peritoneal sepsis. *Transl. Res.* **2015**, *166*, 80–88. [[CrossRef](#)]
36. Sexton, T.; Chalhoub, G.; Ye, S.; Morris, W.; Annabathula, R.; Dugan, A.; Smyth, S. Autotaxin Activity Predicts 30-Day Mortality in Sepsis Patients and Correlates With Platelet Count and Vascular Dysfunction. *Shock* **2020**, *54*, 738–743. [[CrossRef](#)]
37. Morris, A.J.; Panchatcharam, M.; Cheng, H.Y.; Federico, L.; Fulkerson, Z.; Selim, S.; Miriyala, S.; Escalante-Alcalde, D.; Smyth, S.S. Regulation of blood and vascular cell function by bioactive lysophospholipids. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2009**, *7* (Suppl. S1), 38–43. [[CrossRef](#)]
38. Gao, L.; Li, X.; Wang, H.; Liao, Y.; Zhou, Y.; Wang, K.; Hu, J.; Cheng, M.; Zeng, Z.; Wang, T.; et al. Autotaxin levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid are associated with inflammatory and fibrotic biomarkers and the clinical outcome in patients with acute respiratory distress syndrome. *J. Intensive Care* **2021**, *9*, 44. [[CrossRef](#)]
39. Matralis, A.N.; Afantitis, A.; Aidinis, V. Development and therapeutic potential of autotaxin small molecule inhibitors: From bench to advanced clinical trials. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 976–1013. [[CrossRef](#)]
40. Ntatsoulis, K.; Karampitsakos, T.; Tsitoura, E.; Stylianaki, E.A.; Matralis, A.N.; Tzouveleakis, A.; Antoniou, K.; Aidinis, V. Commonalities Between ARDS, Pulmonary Fibrosis and COVID-19: The Potential of Autotaxin as a Therapeutic Target. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 687397. [[CrossRef](#)]
41. Ventura, A.; Kirsch, D.G.; McLaughlin, M.E.; Tuveson, D.A.; Grimm, J.; Lintault, L.; Newman, J.; Reczek, E.E.; Weissleder, R.; Jacks, T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **2007**, *445*, 661–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Contos, J.J.; Ishii, I.; Fukushima, N.; Kingsbury, M.A.; Ye, X.; Kawamura, S.; Brown, J.H.; Chun, J. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: Signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6921–6929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hayashi, S.; McMahon, A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* **2002**, *244*, 305–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]