

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ  
ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗΣ  
ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Μεταπτυχιακή Εργασία Εξειδίκευσης  
στη Μοριακή Ιατρική

Φράγκου Ελένη

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Ιατρική Σχολή,

Αθήνα, 2012

## **ΜΕΡΟΣ Ι**

# **Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ**

### **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ**

Η παρούσα μελέτη έγινε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) στο Εργαστήριο Ιστολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας Ι και στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας ΙΙ.

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Επιβλέπουσα της μελέτης ήταν η Δρ Σανούδου Δέσποινα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) και, μέλη της τριμελούς επιτροπής ο Δρ Χαρώνης Αριστείδης, Ερευνητής Β' Βαθμίδας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και η Δρ Βλάχου Αντωνία, Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Α' Βαθμίδας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες μου Δρ Σανούδου Δέσποινα, Δρ Βλάχου Αντωνία και, κυρίως, τον Δρ Χαρώνη Αριστείδα για την καθοδήγηση, την επίβλεψη και τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Θέλω να ευχαριστήσω την Νίκη Πράκουρα και το Μάκη Ζωιδάκη για την πολύτιμη βοήθεια και την εκπαίδευση που μου παρείχαν. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την υπομονή τους και την ευγένειά τους. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μάκη για τη συνεχή ενθάρρυνση και την υποστήριξη, που μου χάρισε απλόχερα, κατά τη διάρκεια όλου του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές του, η αξία των οποίων είναι, για μένα, μεγάλη.

Θέλω, επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ανδρέα και Αιμιλία. Χωρίς τη βοήθειά τους και χωρίς την υποστήριξή τους η ολοκλήρωση των σπουδών μου δε θα ήταν εφικτή. Θέλω να ευχαριστήσω τον αδελφό μου, Μιχάλη, για την συμπαράσταση, τη βοήθεια και την υποστήριξη σε πολλά θέματα της ζωής μου.

Τελευταίους, αλλά όχι λιγότερο σημαντικούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου, Μιχάλη και την κόρη μου, Αιμιλία για την απέραντη υπομονή, κατανόηση και αγάπη τους.

*Στην Αιμιλία μου*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ)** είναι ένα νόσημα που προσβάλλει σημαντικό ποσοστό του γενικού πληθυσμού και, στο τελικό της στάδιο, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, με εξωνεφρική κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρού, είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς. Στα επόμενα χρόνια αναμένεται αύξηση των ασθενών με ΧΝΝ των οποίων το κόστος θεραπείας είναι τεράστιο. Ακόμα πιο σημαντικό από το κόστος είναι το γεγονός ότι, στις αναπτυσσόμενες χώρες, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη και, επομένως, το τελικό στάδιο της ΧΝΝ ισοδυναμεί με το θάνατο. Βάσει αυτών των δεδομένων, στόχος της Διεθνούς Εταιρίας Νεφρολογίας είναι η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της ΧΝΝ.

Τα αίτια της ΧΝΝ είναι πολλά και, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκαλεί, η εξέλιξή της συσχετίζεται με τη **νεφρική ίνωση**. Η νεφρική ίνωση, που είναι το τελικό αποτέλεσμα και ο κοινός παρονομαστής πολλών νεφρικών νοσημάτων, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και, σαν πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί μοριακοί και κυτταρικοί μεσολαβητές, θα πρέπει να μελετηθεί με προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων.

Στα τρωκτικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα διαπιστώθηκε ότι, η **calreticulin**, μια πολυλειτουργική δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ινωτικής διεργασίας και, κυρίως, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα.

**Σκοπός της παρούσας μελέτης** ήταν η διερεύνηση του ρόλου της calreticulin στη νεφρική ίνωση και, πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση του πώς μεταβάλλονται οι ιδιότητες των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων κατά την υπερέκφρασή της.

**Χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές** ανθρώπινων κυττάρων εγγύς σωληναρίου (**HK-2 κύτταρα**) με διαφορετική έκφραση calreticulin. Η πρώτη κυτταρική σειρά αποτελούσε την ομάδα της φυσιολογικής έκφρασης calreticulin και, στις άλλες δύο υπερεκφράστηκε calreticulin σε αυξανόμενο βαθμό. Οι κυτταρικές σειρές αυτές δημιουργήθηκαν **στην προσπάθειά μας να μιμηθούμε** και να μελετήσουμε **την υπερέκφραση της calreticulin που διαπιστώθηκε** στο ινωτικό νεφρικό μοντέλο στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. Για την επίτευξη του σκοπού της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και, πιο συγκεκριμένα, **Πρωτεωμική Ανάλυση**. Αρχικά, **ταυτοποιήθηκαν οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες** των κυτταρικών σειρών. Στη συνέχεια, για να

μελετηθούν οι νέες ιδιότητες των κυττάρων, οι ταυτοποιημένες διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες **κατηγοριοποιήθηκαν**, χρησιμοποιώντας λογισμικό πρόγραμμα βάσει κυτταρικής λειτουργίας και οντολογίας των γονιδίων τους. Ακολούθησε, με τη χρήση λογισμικού προγράμματος, αναζήτηση πιθανής συμμετοχής των ταυτοποιημένων διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών σε **δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων**, όπου διαπιστώθηκε συμμετοχή τους σε 4 δίκτυα.

Στη συνέχεια, βάσει των αποτελεσμάτων της Πρωτεωμικής Ανάλυσης, βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης και βάσει των πρωτεϊνικών δικτύων που σχηματίστηκαν, **οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιλέγηκαν** ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. **Μέχρι την παρούσα μελέτη, η συμμετοχή και ο ρόλος των 14-3-3 πρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί.** Αρχικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα, διαπιστώθηκε, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού, ότι **οι 14-3-3 πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας.** Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης παρατηρείται **υπερέκφραση όλων των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών** που μελετήθηκαν.

Τα ευρήματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι, η οικογένεια των πρωτεϊνών 14-3-3 πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω στη νεφρική ίνωση με στόχο τη διερεύνηση της πιθανότητας να αποτελέσουν ένα από τους υποψήφιους μελλοντικούς προγνωστικούς και διαγνωστικούς δείκτες και, πιθανά, και θεραπευτικούς στόχους σε εξειδικευμένα θεραπευτικά σχήματα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΜΕΡΟΣ I:

1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ-ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ **Σελ. 2**
2. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ **Σελ. 3**
3. ΑΦΙΕΡΩΣΗ **Σελ. 4**
4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ **Σελ. 5**
5. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ **Σελ. 7**

### ΜΕΡΟΣ II: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΝΕΦΡΟΣ

1. Ανατομία-Ιστολογία νεφρού **Σελ.13**
2. Λειτουργία νεφρών **Σελ. 15**

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΧΝΝ)

1. Τι είναι Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ); **Σελ. 16**
  - 1.1 Ορισμός και ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου **Σελ. 16**
2. Επιδημιολογικά δεδομένα - Κόστος Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, Τελικού Σταδίου Χρόνιας Νεφρικής Νόσου **Σελ. 16**
3. Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου **Σελ. 17**

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

1. Τι είναι η νεφρική ίνωση; **Σελ. 19**
2. Κυτταρικοί μεσολαβητές σωληναριοδιάμεσης νεφρικής ίνωσης **Σελ. 20**
  - 2.1 Ινοβλάστες **Σελ. 20**
  - 2.2 Μυοϊνοβλάστες **Σελ. 21**
  - 2.3 Ινοκύτταρα **Σελ. 22**
  - 2.4 Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα **Σελ. 23**
  - 2.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα **Σελ. 25**
  - 2.6 Περικύτταρα **Σελ. 26**
  - 2.7 Δενδριτικά κύτταρα, Μακροφάγα, Λεμφοκύτταρα, Μαστοκύτταρα **Σελ. 27**
3. Εξωκυττάρια ουσία στη νεφρική ίνωση **Σελ. 27**

4. Μοριακοί μηχανισμοί της νεφρικής ίνωσης και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται **Σελ. 28**
  - 4.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β **Σελ. 30**
    - 4.1.1 TGF-β και φλεγμονή **Σελ. 31**
    - 4.1.2 TGF-β και ECM **Σελ. 32**
    - 4.1.3 TGF-β και απόπτωση **Σελ. 32**
    - 4.1.4 TGF-β και μυοϊνοβλάστες **Σελ. 32**
    - 4.1.5 TGF-β και EMT **Σελ. 33**
  - 4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin **Σελ. 34**
  - 4.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι ILK **Σελ. 36**
  - 4.4 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER stress) **Σελ. 36**
  - 4.5 Απόπτωση και παύση του κυτταρικού κύκλου **Σελ. 38**
5. Πειραματικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης-Μοντέλο UUO **Σελ. 38**
6. Βιολογία Συστημάτων στη Νεφρική Ίνωση **Σελ. 41**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ**

1. Τι είναι Πρωτεωμική; **Σελ. 42**
2. Τεχνική Πρωτεωμικής Ανάλυσης **Σελ. 43**
  - 2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος **Σελ. 44**
  - 2.2 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός **Σελ. 44**
    - 2.2.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση-1<sup>η</sup> διάσταση **Σελ. 45**
    - 2.2.2 Ηλεκτροφόρηση βάσει Μοριακού Βάρους-2<sup>η</sup> διάσταση **Σελ. 46**
    - 2.2.3 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης **Σελ. 46**
  - 2.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών **Σελ. 46**
3. Πρωτεωμική Ανάλυση στη Νεφρική Ίνωση-Ανασκόπηση βιβλιογραφίας **Σελ. 47**
  - 3.1 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης σε κυτταρικές σειρές **Σελ. 48**
  - 3.2 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης σε ζωικά μοντέλα **Σελ. 49**
  - 3.3 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης στον άνθρωπο **Σελ. 51**
4. «Η έκφραση της calreticulin τροποποιείται κατά τη δημιουργία της ίνωσης» **Σελ. 53**
  - 4.1 Τι είναι η calreticulin; **Σελ. 53**
    - 4.1.1 Calreticulin και επιθηλιακά κύτταρα **Σελ. 54**
    - 4.1.2 Calreticulin και ινοβλάστες-ECM **Σελ. 55**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ 14-3-3

1. Τι είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3; **Σελ. 57**
  - 1.1 Προέλευση ονομασίας **Σελ. 57**
  - 1.2 Γονίδια πρωτεϊνών 14-3-3, ισομορφές πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 57**
  - 1.3 Έκφραση πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 58**
  - 1.4 Δομή πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 58**
  - 1.5 Μοτίβα δέσμευσης των πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 59**
2. Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 60**
  - 2.1 Δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου **Σελ. 60**
  - 2.2 Παρεμπόδιση-επικάλυψη δομικών χαρακτηριστικών ή αλληλουχιών του πρωτεϊνικού στόχου **Σελ. 61**
    - 2.2.1 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη **Σελ. 61**
    - 2.2.2 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με DNA **Σελ. 61**
    - 2.2.3 Παρεμπόδιση αποφωσφορυλίωσης ή πρωτεόλυσης του πρωτεϊνικού στόχου **Σελ. 61**
  - 2.3 «Μοριακή πλατφόρμα» σύνδεσης πρωτεϊνών-στόχων **Σελ. 62**
3. Λειτουργίες πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 62**
  - 3.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταρικός κύκλος **Σελ. 63**
  - 3.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και επιβίωση ή απόπτωση του κυττάρου **Σελ. 63**
  - 3.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταρικός μεταβολισμός **Σελ. 65**
  - 3.4 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταροσκελετός **Σελ. 66**
  - 3.5 Πρωτεΐνες 14-3-3 και EMT **Σελ. 67**
    - 3.5.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β **Σελ. 67**
    - 3.5.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT **Σελ. 69**
    - 3.5.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και μεταγραφικός παράγοντας Snail **Σελ. 69**
    - 3.5.4 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin **Σελ. 71**
  - 3.6 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Νεφρός **Σελ. 72**
    - 3.6.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Νεφρονόφθιση **Σελ. 72**
    - 3.6.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Ποδοκύτταρα **Σελ. 73**

### 3.6.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και ENaC **Σελ. 74**

4. Πρωτεΐνες 14-3-3 ως θεραπευτικός στόχος **Σελ. 74**
  - 4.1 Ανταγωνιστές των 14-3-3 πρωτεϊνών **Σελ. 76**
  - 4.2 Μόρια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου (14-3-3 PPI inhibitors) **Σελ. 76**
  - 4.3 Μόρια που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου (14-3-3 PPI stabilizers) **Σελ. 76**

## **ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ **Σελ. 78****

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

1. Κυτταρική σειρά **Σελ. 79**
  - 1.1 Καλλιέργεια κυττάρων **Σελ. 79**
  - 1.2 Διαμόλυνση κυττάρων **Σελ. 79**
2. Πρωτεωμική Ανάλυση **Σελ. 80**
  - 2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος **Σελ. 80**
  - 2.2 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός **Σελ. 81**
    - 2.2.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση-1<sup>η</sup> διάσταση **Σελ. 81**
    - 2.2.2 Ηλεκτροφόρηση βάσει Μοριακού Βάρους-2<sup>η</sup> διάσταση **Σελ. 81**
  - 2.3 Ανάλυση 2D-πηκτωμάτων με λογισμικό πρόγραμμα **Σελ. 82**
  - 2.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών **Σελ. 83**
  - 2.5 Κατηγοριοποίηση Πρωτεϊνών- Δημιουργία Πρωτεϊνικών Δικτύων **Σελ. 84**
3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Q-RT-PCR) για τις πρωτεΐνες 14-3-3 στα κύτταρα HK-2 **Σελ. 85**
  - 3.1 Απομόνωση RNA **Σελ. 85**
  - 3.2 Παραγωγή cDNA **Σελ. 86**
  - 3.3 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για τα γονίδια των ισομορφών των πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 86**
  - 3.4 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA **Σελ. 87**
  - 3.5 qRT-PCR για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 στα κύτταρα HK-2 **Σελ. 87**
4. Ζωικό Μοντέλο Νεφρικής ίνωσης UUO (Unilateral Ureteral Obstruction) **Σελ. 88**
  - 4.1 Ζωικό μοντέλο Νεφρικής ίνωσης σε αρουραίο **Σελ. 88**

- 4.2 Ζωικό μοντέλο Νεφρικής ίνωσης σε ποντίκι **Σελ. 89**
- 5. Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 **Σελ. 89**
  - 5.1 Αντίσωμα για πρωτεΐνες 14-3-3 **Σελ. 89**
  - 5.2 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού από μοντέλο UUO σε αρουραίο **Σελ. 89**
  - 5.3 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού από μοντέλο UUO σε ποντίκι **Σελ. 90**
  - 5.4 Ποσοτικοποίηση αποτελέσματος με το λογισμικό πρόγραμμα Fiji ImageJ **Σελ. 91**
- 6. Ανοσοφθορισμός σε νεφρικό ιστό των πρωτεϊνών 14-3-3 **Σελ. 91**
  - 6.1 Αντίσωμα για πρωτεΐνες 14-3-3 **Σελ. 91**
  - 6.2 Ανοσοφθορισμός σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο **Σελ. 91**
- 7. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (q-RT-PCR) για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO **Σελ. 92**
  - 7.1 Απομόνωση RNA από νεφρικό ιστό **Σελ. 92**
  - 7.2 Παραγωγή cDNA **Σελ. 93**
  - 7.3 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 σε αρουραίο **Σελ. 93**
  - 7.4 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA **Σελ. 93**
  - 7.5 qRT-PCR για ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό **Σελ. 94**
- 8. Στατιστική Ανάλυση **Σελ. 94**

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1. Πρωτεωμική Ανάλυση **Σελ. 95**
  - 1.1 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός **Σελ. 95**
  - 1.2 Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες **Σελ. 96**
  - 1.3 Ταυτοποίηση διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών **Σελ. 96**
  - 1.4 Κατηγοριοποίηση διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών **Σελ. 112**
  - 1.5 Δίκτυα αλληλεπίδρασης ταυτοποιημένων πρωτεϊνών **Σελ. 117**
  - 1.6 Επιλογή 14-3-3 πρωτεϊνών ως πρωτεϊνών ενδιαφέροντος **Σελ. 120**
- 2. Επαλήθευση της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 *in vitro* **Σελ. 121**
- 3. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στη νεφρική ίνωση *in vivo* **Σελ. 122**
  - 3.1 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο **Σελ. 123**
  - 3.2 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι **Σελ. 128**

3.3 Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο **Σελ. 129**

4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (q RT-PCR) για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από UUO **Σελ. 131**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1. Συμπεράσματα Πρωτεωμικής Ανάλυσης - Σχολιασμός **Σελ. 138**
2. Υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στη νεφρική ίνωση *in vivo* - Σχολιασμός αποτελεσμάτων **Σελ. 146**
3. Υπερέκφραση όλων των mRNAs όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης. **Σελ. 154**
4. Πρωτεΐνες 14-3-3 ως θεραπευτικός στόχος **Σελ. 154**

#### **ΜΕΡΟΣ IV**

1. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Σελ. 158**

## ΜΕΡΟΣ II: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

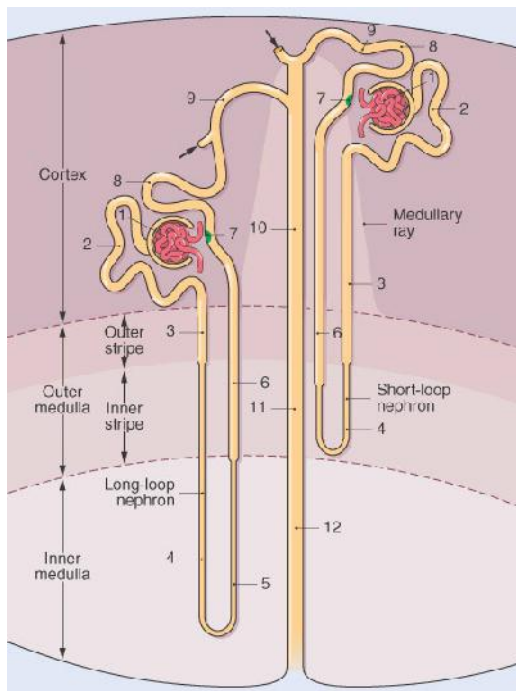
### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΝΕΦΡΟΣ

#### 1. Ανατομία-Ιστολογία Νεφρού

Οι νεφροί, δεξιός και αριστερός, είναι δύο όργανα που έχουν σχήμα φασολιού και βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, στα πλάγια της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Ο κάθε νεφρός ζυγίζει, στον άνθρωπο, περίπου 150 g, έχει μήκος 10-12 cm, καταλαμβάνει έκταση 2.5 σπονδύλων, με τη διαφορά ότι ο δεξιός βρίσκεται πιο χαμηλά από τον αριστερό [1].

Ο νεφρός είναι ένα ανατομικά πολύπλοκο όργανο, που αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη εξειδικευμένων κυττάρων, τα οποία είναι οργανωμένα σε ένα ιδιαίτερο τρισδιάστατο σχήμα. Η λειτουργική μονάδα του νεφρού λέγεται νεφρώνας και, αποτελείται από το σπείραμα και το σωληνάριο. Ο κάθε νεφρός έχει 1000000 περίπου νεφρώνες (εικόνα 1).

Το σπείραμα αποτελείται από ένα θύσανο τριχοειδών που περιβάλλεται από την κάψα του Bowman και, το σωληνάριο σχηματίζεται από ένα μονόστιβο επιθήλιο. Το σωληνάριο χωρίζεται σε διαφορετικά τμήματα: το εγγύς σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο, το οποίο εκβάλλει στη νεφρική θηλή.



Εικόνα 1: Νεφρώνες και αθροιστικό σωληνάριο.

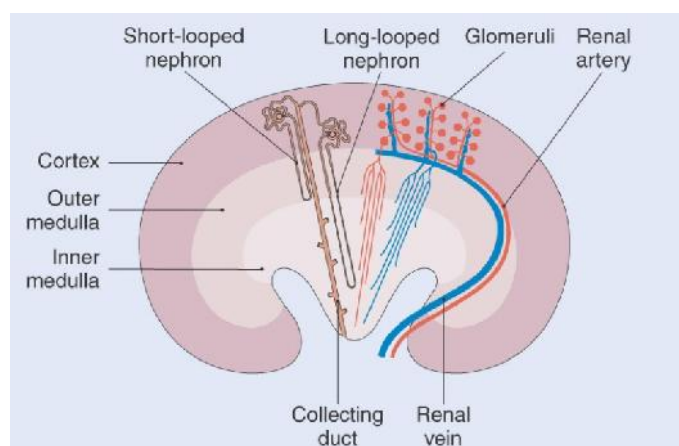
Cortex: φλοιός, Medulla: μυελός, Outer medulla: Έξω μυελώδης ουσία, Inner medulla: Έσω μυελώδης ουσία

1. Σπείραμα
2. Εγγύς σωληνάριο
3. Παχύ κατιόν σκέλος αγκύλης του Henle
4. Λεπτό κατιόν σκέλος αγκύλης του Henle
5. Λεπτό ανιόν σκέλος αγκύλης του Henle
6. Παχύ ανιόν σκέλος αγκύλης Henle
7. Παρασπειραματική συσκευή
8. Άπω εσπειραμένο σωληνάριο
9. Συνδετικό σωληνάριο
10. Φλοιώδες αθροιστικό σωληνάριο
11. Έξω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο
12. Έσω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο

Από βιβλιογραφική αναφορά [3].

Το νεφρικό παρέγχυμα, σε διατομή, εμφανίζει δύο μοίρες, τη φλοιώδη και τη μυελώδη. Η φλοιώδης ουσία περιβάλλει τη μυελώδη και, αποτελείται από σπειράματα, από το μεγαλύτερο τμήμα των εγγύς σωληναρίων και από τμήμα των άπω σωληναρίων. Η έσω μοίρα είναι η μυελώδης και περιλαμβάνει κυρίως τις αγκύλες του Henle και τα αθροιστικά σωληνάκια. Σχηματίζει κωνοειδείς προσεκβολές, τις πυραμίδες οι οποίες εκτείνονται μέχρι τη νεφρική πύελο (εικόνα 2).

Οι τριχοειδικές αγκύλες του σπειράματος σχηματίζονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, τη σπειραματική βασική μεμβράνη και τα ποδοκύτταρα που είναι, εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα. Τα μεσαγγειακά κύτταρα και η μεσαγγειακή ουσία παρεμβάλλονται μεταξύ των τριχοειδών. Το περίτονο πέταλο της κάψας του Bowman αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα. Τα σωληναριακά κύτταρα διαφέρουν από τμήμα σε τμήμα του σωληναρίου και εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες. Μεταξύ των σπειραμάτων και των σωληναρίων βρίσκεται ο διάμεσος ιστός, ο οποίος αποτελείται από κολλαγόνο, κυρίως τύπου I και III, ινοβλάστες και δενδριτικά κύτταρα [2,3].



**Εικόνα 2: Ο νεφρός σε διατομή.** Απεικονίζεται ο φλοιός (cortex), η έσω μυελώδης μοίρα (outer medulla), η έσω μυελώδης μοίρα (inner medulla), νεφρώνας με κοντή αγκύλη Henle (Short-looped nephron), νεφρώνας με μακριά αγκύλη του Henle, σπειράματα (glomeruli), η νεφρική αρτηρία (renal artery) και η νεφρική φλέβα (renal vein).

Από βιβλιογραφική αναφορά [3].

Η παραγωγή των ούρων ξεκινά στο σπείραμα, όπου το αίμα διηθείται στις τριχοειδικές αγκύλες. Το διήθημα συσσωρεύεται στην κάψα του Bowman και εισέρχεται στο σωληνάριο, όπου θα εκτεθεί διαδοχικά σε όλα τα εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα του κάθε τμήματος του σωληναρίου. Εκεί, η περίσσεια του διηθήματος θα επαναρροφηθεί αλλά, επίσης, και αρκετές ουσίες θα εκκριθούν σε αυτό. Το τελικό προϊόν, τα ούρα, εισέρχονται στη νεφρική πύελο, στη συνέχεια, στον ουρητήρα, στην ουροδόχο κύστη μέχρι να αποβληθούν από το σώμα [2,3].

Οι νεφροί λαμβάνουν το 25% του κατά λεπτού όγκου αίματος. Αιματώνονται από τις νεφρικές αρτηρίες οι οποίες, διακλαδίζονται κατά μήκος των νεφρικών πυραμίδων. Στο φλοιομυελικό όριο, δίνουν τις τοξοειδείς αρτηρίες, οι οποίες τελικά θα σχηματίσουν το

προσαγωγό αρτηρίδιο που θα εισέλθει στο σπείραμα. Το αίμα φεύγει από το σπείραμα με το απαγωγό αρτηρίδιο, το οποίο σχηματίζει τα περιωληναριακά τριχοειδή αγγεία. Τελικά, τα περιωληναριακά τριχοειδή αγγεία θα σχηματίσουν φλεβίδια τα οποία, θα εκβάλουν στη νεφρική φλέβα [2,3].

## **2. Λειτουργία Νεφρών**

Οι νεφροί είναι τα όργανα που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της οσμωτικότητας του οργανισμού, της οξεοβασικής και της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας. Είναι υπεύθυνοι για την αποβολή των τελικών άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και των ξένων ουσιών. Οι νεφροί παράγουν και εκκρίνουν ένζυμα και ορμόνες (ερυθροποιητίνη, ρενίνη, 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D), οπότε διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της αρτηριακής πίεσης, στη ρύθμιση της ερυθροποίησης και, στη ρύθμιση της ισορροπίας ασβεστίου και φωσφόρου [2].

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΧΝΝ)**

**1. Τι είναι Χρόνια Νεφρική Νόσος;**

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί νόσημα που προσβάλλει σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού. Συνήθως, προσβάλλει άτομα με καρδιαγγειακά νοσήματα, με σακχαρώδη διαβήτη και άτομα συγκεκριμένων εθνικοτήτων και, συσχετίζεται με τη διαδικασία της γήρανσης. Ο στόχος του «Εθνικού Ιδρύματος Νεφρών» (National Kidney Foundation, NKF) και της Διεθνούς Εταιρίας Νεφρολογίας (International Society of Nephrology) είναι η κατανόηση της παθογένειας, η θεραπεία και η αντιμετώπιση της νεφρικής νόσου.

**1.1 Ορισμός και ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου**

Σύμφωνα με το NKF και την ομάδα «Νεφρική Νόσος: Βελτίωση της ολικής έκβασης» (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO), Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) ορίζεται ως η κάθε **δομική ή λειτουργική διαταραχή** των νεφρών η οποία διαρκεί **τρεις ή περισσότερους μήνες** και εκδηλώνεται είτε με:

- Νεφρική βλάβη (ιστολογική αλλοίωση, διαταραχή στον απεικονιστικό έλεγχο, διαταραχή στην εξέταση αίματος ή ούρων)
- Ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration rate, GFR) λιγότερο από 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> με ή χωρίς νεφρική βλάβη

Σύμφωνα με τις ομάδες «Πρωτοβουλία για την έκβαση και την ποιότητα της νεφρικής νόσου» (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, KDOQI) και KDIGO, η ΧΝΝ ταξινομείται σε πέντε στάδια, με το πέμπτο να αποτελεί το τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής νόσου (ΤΣΧΝΝ) στο οποίο, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρού είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς [4,5].

**2. Επιδημιολογικά δεδομένα - Κόστος Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, Τελικού σταδίου Χρόνιας Νεφρικής Νόσου**

Η πραγματική συχνότητα της ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια αφού, τα αρχικά στάδια της νόσου είναι ασυμπτωματικά. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι το 11% του πληθυσμού παρουσιάζει κάποιο στάδιο ΧΝΝ, στην Ιαπωνία το ποσοστό αυτό είναι 10% ενώ 2% αυτών καταλήγουν στο τελικό στάδιο ΧΝΝ (ΤΣΧΝΝ) σε 10 χρόνια. Στο



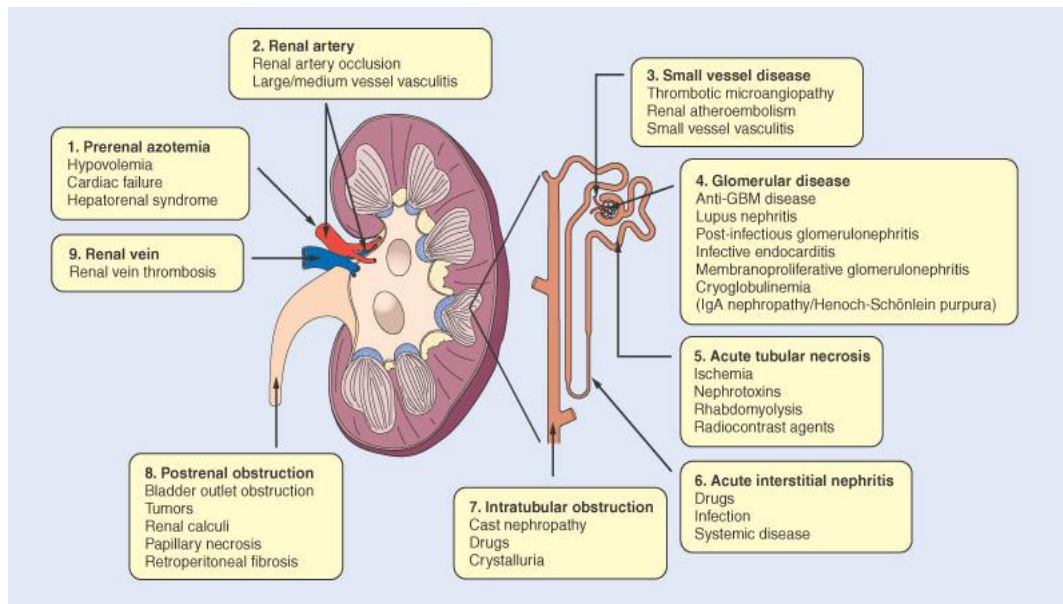
Ηνωμένο Βασίλειο, στην Ολλανδία και στην Αυστραλία το ποσοστό αυτό είναι 11.8%, 7% και 16% αντίστοιχα. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η συχνότητα ΤΣΧΝΝ που αντιμετωπίζεται με θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας είναι περίπου 100 νέοι ασθενείς ανά 1 εκατομμύριο πληθυσμού το χρόνο (pmr), συχνότητα που διπλασιάστηκε την τελευταία δεκαετία και αναμένεται να αυξηθεί κατά περίπου 5% το χρόνο ενώ, στις ΗΠΑ η συχνότητα αυτή είναι 333 pmr το χρόνο. Η παγκόσμια αύξηση των ασθενών με ΤΣΧΝΝ αντικατοπτρίζει την αύξηση της ηλικίας του πληθυσμού, την αύξηση της Αρτηριακής Υπέρτασης και του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 και, με δεδομένο ότι αναμένεται διπλασιασμός των διαβητικών ασθενών στα επόμενα 20 χρόνια, η ΧΝΝ λαμβάνει διαστάσεις επιδημίας [6].

Το κόστος θεραπείας των ασθενών με ΤΣΧΝΝ είναι τεράστιο αφού, παγκόσμια, το 2010 περισσότεροι από 2 εκατομμύρια ασθενείς αντιμετωπίστηκαν με θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με κόστος 1 τρισεκατομμύριο δολάρια. Ακόμα πιο σημαντικό από το κόστος είναι το γεγονός ότι, στις αναπτυσσόμενες χώρες η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη και, άρα, το ΤΣΧΝΝ ισοδυναμεί με το θάνατο. Περισσότερες από 100 χώρες δεν έχουν δυνατότητα παροχής αιμοκάθαρσης ή περιτοναϊκής κάθαρσης και, επομένως, περισσότεροι από 1 εκατομμύριο ασθενείς θα πεθάνουν το χρόνο λόγω ΤΣΧΝΝ. Επομένως, προτεραιότητα-στόχος της Διεθνούς Εταιρίας Νεφρολογίας (International Society of Nephrology) είναι η πρόληψη αλλά και η έγκαιρη διάγνωση της ΧΝΝ [6].

### **3. Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου**

Βάσει του ορισμού της National Kidney Foundation (NKF) και της Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), όπως προαναφέρθηκε, Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) είναι η κάθε **δομική ή λειτουργική διαταραχή** των νεφρών η οποία διαρκεί **τρεις ή περισσότερους μήνες**. Επομένως, τα αίτια που μπορούν να προκαλέσουν έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας είναι πολλά και, παραδοσιακά, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: προνεφρικά αίτια, νεφρικά αίτια και μετανεφρικά αίτια.

Η περιγραφή και η εξήγηση των αιτιών της νεφρικής νόσου, τα οποία αναφέρονται στην εικόνα 3 [7], δεν αποτελούν σκοπό της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο και πολύ σημαντικό να τονιστεί πως, τελικό αποτέλεσμα πολλών νεφρικών νοσημάτων είναι η νεφρική ίνωση, η οποία, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκάλεσε, θα οδηγήσει σε έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και σε νεφρική ανεπάρκεια.



Εικόνα 3: Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (ΧΝΝ). Από βιβλιογραφική αναφορά [7]

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

#### 1. Τι είναι η νεφρική ίνωση;

Η **ιστική ίνωση** είναι η συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας στον ιστό, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας επούλωσης μετά από ένα βλαπτικό ερέθισμα. Ένα παροδικό ερέθισμα, για παράδειγμα μια λοίμωξη ή ένα έμφρακτο, ενεργοποιεί τη διαδικασία επούλωσης, κατά την οποία κύτταρα διηθούν το διάμεσο χώρο του οργάνου ώστε να διορθώσουν τη βλάβη και να επαναφέρουν το όργανο σε κατάσταση ομοιοστασίας, φυσιολογικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας. Τα κύτταρα αυτά είναι ποικίλα και, χαρακτηριστικά, οδηγούν στην παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας στο διάμεσο ιστό. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας βρίσκεται σε ισορροπία με την αποδόμησή της. Σε παθολογικές, όμως, καταστάσεις, το συνεχές ερέθισμα οδηγεί σε διαταραχή του μηχανισμού επιδιόρθωσης, με αποτέλεσμα τη συνεχή εναπόθεση και συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας [8, 9], δηλαδή τη δημιουργία ίνωσης. Η ίνωση έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του οργάνου και την έκπτωση της λειτουργίας του [10] και, έχει υπολογιστεί ότι, περίπου το 45% των θανάτων προκαλείται από κάποιας μορφής νουόπερπλαστική διαταραχή [11].

Όπως κάθε ιστική ίνωση, έτσι και η **νεφρική ίνωση** ξεκινά ως διαδικασία απάντησης στα βλαπτικά ερεθίσματα. Εάν ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της βλάβης λειτουργήσει σωστά, τότε παρατηρείται επούλωση. Εάν, όμως, τα βλαπτικά ερεθίσματα παραμείνουν, τότε η εξωκυττάρια ουσία συσσωρεύεται, αντικαθιστά το υγιές νεφρικό παρέγχυμα με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η λειτουργική μονάδα του νεφρού που είναι ο νεφρώνας, να παρατηρείται έκπτωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και προοδευτικά επιδεινούμενη χρόνια νεφρική νόσος που θα οδηγήσει σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Η νεφρική ίνωση, σαν τελικό αποτέλεσμα πολλών νεφρικών νοσημάτων, αποτελείται από την σπειραματοσκλήρυνση, την ίνωση του σωληναριοδιάμεσου χώρου με ατροφία των σωληναρίων και τη διαταραχή των περισωληναριακών τριχοειδών αγγείων. **Παρά το ότι η φλεγμονώδης διήθηση του σπειράματος, η μεσαγγειακή υπερπλασία και η σπειραματοσκλήρυνση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο** στην ανάπτυξη της χρόνιας νεφρικής νόσου, **η ίνωση του σωληναριοδιάμεσου χώρου και η ατροφία των σωληναρίων**, (δηλαδή η απώλεια της ικανότητας μεταφοράς ουσιών και η απώλεια μεταβολικής δραστηριότητας του σωληναρίου), ανεξάρτητα από το αίτιο που τις προκαλεί, **είναι αυτές**

**που, αποδεδειγμένα, συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη νεφρική λειτουργία και τη νεφρική επιβίωση [12-16].**

Από το 1978, ο Brenner και οι συνεργάτες του [17] διαπίστωσαν ότι, ανεξάρτητα από το αίτιο που τις προκαλεί, η σπειραματική υπέρταση και η σπειραματική υπερδιήθηση συνεισφέρουν σημαντικά στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου. Η αυξημένη ενδοτριχοειδική πίεση προκαλεί υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων και έκπτωση της μεσαγγειακής ουσίας, διαταραχή στην αλληλεπίδραση ποδοκυττάρου-σπειραματικής βασικής μεμβράνης, υπερτροφία των ποδοκυττάρων και απόπτωσή τους και, τελικά σπειραματοσκλήρυνση. Η μερική ή ολική σύμπτωση των τοιχωμάτων των σπειραματικών τριχοειδικών αγκύλων μειώνει την αιματική ροή στα περισωληναριακά τριχοειδή με αποτέλεσμα την ισχαιμία και την υποξία των σωληναρίων. Επίσης, οι προφλεγμονώδεις και προϊνωτικοί μεσολαβητές που δημιουργούνται στο παθολογικό σπείραμα, φτάνουν στο περισωληναριακό τριχοειδές όπου ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά του κύτταρα και δημιουργούν, έμμεσα, φλεγμονώδη αντίδραση στο σωληναριοδιάμεσο χώρο. Από την άλλη, το υπερδιήθημα, από την κάψα του Bowman εισέρχεται στο σωληνάριο, είναι κορεσμένο σε πρωτεΐνες, σε προφλεγμονώδεις μεσολαβητές και σε τοξικά μόρια. Επομένως, ενεργοποιεί φλεγμονώδη αντίδραση στο επίπεδο του σωληναριακού επιθηλιακού κυττάρου που θα οδηγήσει σε απόπτωσή του και, στη συνέχεια, σε σωληναριοδιάμεση ίνωση [18]. Η σωληναριοδιάμεση ίνωση, στην οποία η συσσωρευμένη εξωκυττάρια ουσία αποτελείται από πολλά συστατικά πέραν του κολλαγόνου, είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης κυτταρικής και μοριακής διεργασίας. Στο φυσιολογικό νεφρικό διάμεσο ιστό υπάρχει κολλαγόνο, κυρίως τύπου I και III, το οποίο λειτουργεί ως δομικό στηρικτικό υλικό, ινοβλάστες και δενδριτικά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ένα δίκτυο. Στον υγιή διάμεσο χώρο του νεφρού, σπάνια απαντώνται άλλα είδη κυττάρων [19, 20].

## **2. Κυτταρικοί μεσολαβητές σωληναριοδιάμεσης νεφρικής ίνωσης**

### **2.1 Ινοβλάστες**

Οι ινοβλάστες είναι κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, με αστεροειδές σχήμα, έχουν άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο, κοκκία που εκκρίνουν κολλαγόνο, ινίδια ακτίνης κάτω από την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη και πολλαπλές προσεκβολές μέσω των οποίων συνδέονται στα δενδριτικά κύτταρα, στη βασική μεμβράνη των σωληναριακών κυττάρων, στη βασική μεμβράνη των τριχοειδών αγγείων αλλά και μεταξύ τους. Είναι τα κύτταρα τα οποία γεφυρώνουν το χώρο μεταξύ σωληναρίου και τριχοειδούς, υποδεικνύοντας ότι η επικοινωνία μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών εξαρτάται όχι μόνο από

χυμοκίνες αλλά και από μηχανικές δυνάμεις. Οι ινοβλάστες συνθέτουν ινίδια κολλαγόνου τύπου I, III και VI τα οποία βρίσκονται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη [19]. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί κάποιος δείκτης ειδικός για τους ινοβλάστες όμως, οι ινοβλάστες είναι θετικοί στη **βιμεντίνη (vimentin)**, είναι αρνητικοί στη δεσμίνη (desmin) και ασθενώς θετικοί στην α-ακτίνη των λείων μυϊκών ινών (α-SMA). Οι ινοβλάστες θεωρούνται ως ο κυτταρικός σκελετός του νεφρού, αφού είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, **ένας πληθυσμός κυττάρων του διάμεσου χώρου** του φλοιού και της έξω μυελώδους μοίρας, **μοιάζει με ινοβλάστες και είναι η πηγή της ερυθροποιητίνης**, της ορμόνης που είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων [16].

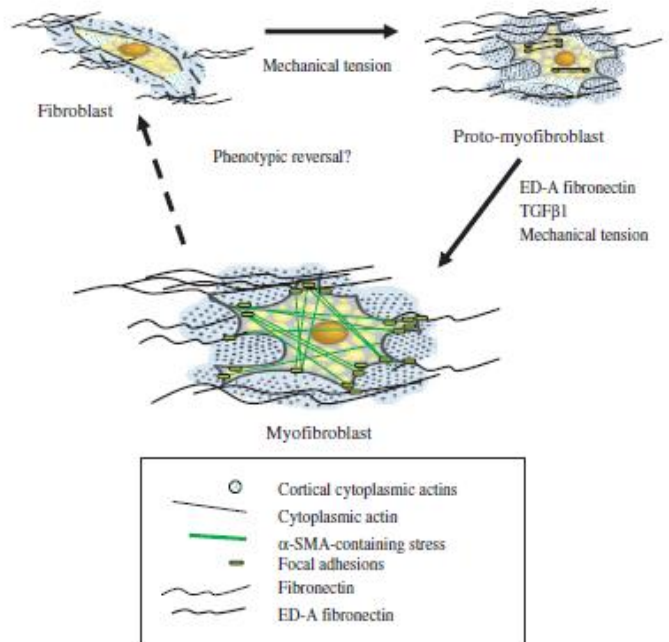
## 2.2 Μυοϊνοβλάστες

Οι μυοϊνοβλάστες είναι τα κύτταρα τελεστές στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης αφού, είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και εναπόθεση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας [13], απαντώνται σπάνια στον υγιή ιστό και η ύπαρξή τους αποτελεί προγνωστικό δείκτη ίνωσης του διάμεσου χώρου και ατροφίας των σωληναρίων [16]. Διαφέρουν από τους ινοβλάστες στο ότι περιέχουν μικροϊνίδια με πυκνές περιοχές (stress fibers), αραιά μυοϊνίδια στην περιφέρεια του κυττάρου και παρουσιάζουν διαμεμβρανικές συνδέσεις μεταξύ εξωκυττάριας ινωδονεκτίνης (fibronectin) και των ενδοκυττάριας μικροϊνιδίων ακτίνης [14]. **Ο μυοϊνοβλάστης χαρακτηρίζεται από την έκφραση της α-SMA**, η οποία παρέχει στο κύτταρο ικανότητα σύσπασης. Η έκφραση α-SMA είναι χαρακτηριστική της ιστικής αναδόμησης. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί ένας δείκτης ειδικός για τους μυοϊνοβλάστες είναι, όμως, θετικοί στη vimentin, στο ectodomain A της fibronectin και στην πρωτεΐνη S100A4 (Fibroblast Specific Protein-1, FSP-1), η οποία εκφράζεται και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

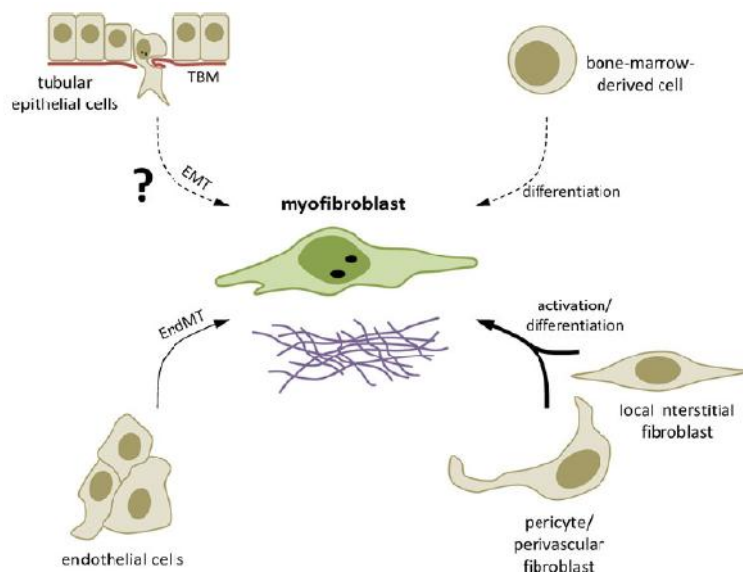
Μετά από μηχανικό (π.χ. υδροδυναμικές δυνάμεις, σωληναριακή τάση) ή χυμικό ερέθισμα (π.χ. TGF-β), ο κυτταροσκελετός ακτίνης των ινοβλαστών ανακατανέμεται, τα μικροϊνίδια μετακινούνται στην περιφέρεια του κυττάρου, σχηματίζονται εστίες προσκόλλησης (focal adhesions) και η α-SMA ενσωματώνεται στα μικροϊνίδια. Επομένως, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε ενεργούς μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι παράγουν και εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία (εικόνα 4).

Οι πειραματικοί μυοϊνοβλάστες προέρχονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα, η προέλευση, όμως, των μυοϊνοβλαστών του διάμεσου ιστού δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί πλήρως. Πιθανές πηγές προέλευσής τους είναι οι ινοβλάστες του διάμεσου ιστού, τα

περιαγγειακά περικύτταρα, τα ινοκύτταρα, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα (εικόνα 5).



Εικόνα 4: Ενεργοποίηση ινοβλάστη σε μυοίνοβλάστη. Από βιβλιογραφική αναφορά [16].



Εικόνα 5: Πιθανές πηγές μυοίνοβλαστών διάμεσου ιστού. Από βιβλιογραφική αναφορά [13].

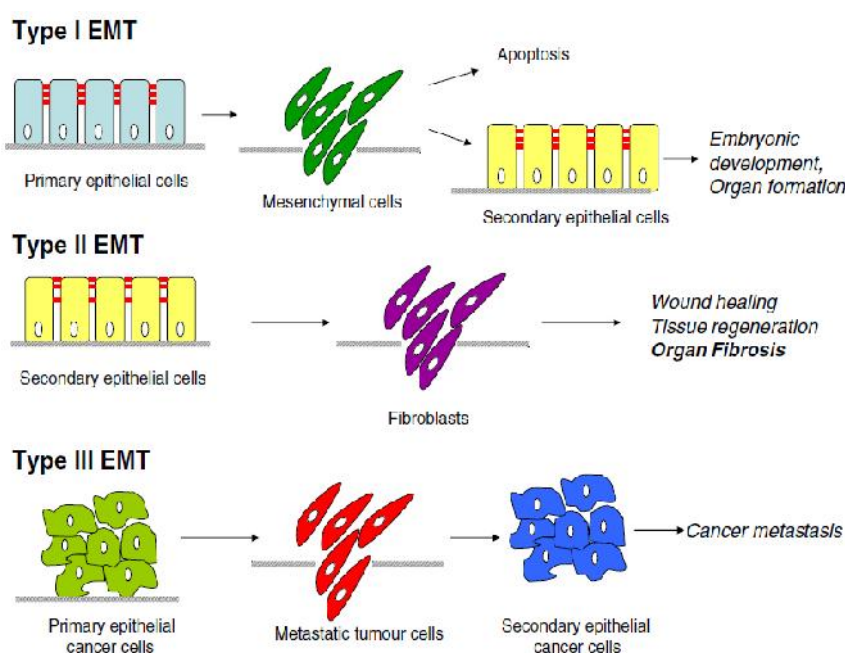
### 2.3 Ινοκύτταρα

Άλλη πιθανή πηγή προέλευσης των μυοίνοβλαστών είναι τα ινοκύτταρα. Τα ινοκύτταρα είναι κυκλοφορούντα κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών, είναι προγονικά κύτταρα των ινοβλαστών και μεταναστεύουν στο διάμεσο χώρο στη θέση της βλάβης. Είναι ατρακτόμορφα κύτταρα που μοιάζουν με τους ινοβλάστες, παράγουν εξωκυττάρια ουσία

και, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί ειδικός δείκτης για τα ινοκύτταρα, εκφράζουν δείκτες αιμοποιητικού κυττάρου (π.χ. το δείκτη επιφανείας CD34), δείκτες κυττάρου στρώματος (π.χ. κολλαγόνο τύπου I) και δείκτες υποδοχέων χυμοκινών. Παρά το ότι η συμμετοχή τους στην παθολογία της ίνωσης στην καρδιά, στους πνεύμονες και στο δέρμα είναι αποδεδειγμένη, η συμμετοχή τους στην παθολογία της νεφρικής ίνωσης ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί [12, 14, 16].

## 2.4 Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα

Σημαντικό στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης θεωρείται από πολλούς ερευνητές το φαινόμενο της **επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπής** των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT). Μέσω του φαινομένου αυτού, πιθανολογείται ότι, τα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνεισφέρουν στη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας. Η EMT έχει τρεις κατηγορίες (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Κατηγορίες Επιθηλιακής προς Μεσεγχυματική Μετατροπής (EMT). Από βιβλιογραφική αναφορά [21].

Η **EMT τύπου I** παρατηρείται κατά την εμβρυογένεση και συσχετίζεται με την εμφύτευση, τη γαστριδίωση και τη δημιουργία κυττάρων του συνδετικού ιστού. Κάποια από τα κύτταρα που δημιουργήθηκαν μέσω της EMT επάγονται ξανά ως δευτερογενή επιθηλιακά κύτταρα μέσω του αντίστροφου φαινομένου της μεσεγχυματικής προς επιθηλιακής μετατροπής (Mesenchymal to Endothelial Transition, MET). Η **EMT τύπου II** παρατηρείται μετεμβρυϊκά, όταν τα δευτερογενή επιθηλιακά κύτταρα ή ενδοθηλιακά

κύτταρα, σε απάντηση σε βλαπτικό ερέθισμα, μετατρέπονται σε κύτταρα του ιστού που τα φιλοξενεί ή σε ινοβλάστες ώστε να επουλωθεί ο ιστός. Αν το ερέθισμα που την προκαλεί δεν ανασταλεί, τότε η διεργασία αυτή πιθανά έχει βλαπτικές συνέπειες στον ιστό στον οποίο συμβαίνει. Η **EMT τύπου III** παρατηρείται στα δευτερογενή επιθηλιακά κύτταρα καρκινικών ιστών τα οποία μετατρέπονται σε μεταστατικά κύτταρα [21].

Τα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού είναι πολωμένα κύτταρα, δηλαδή η αυλική τους επιφάνεια έχει διαφορετικές ιδιότητες από ότι έχει η βασική τους επιφάνεια. Ενώνονται με τα παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα μέσω χασματικών συνδέσεων, δεσμοσωμάτων και συνδέσεων προσκόλλησης (που αποτελούνται μεταξύ άλλων και από τις πρωτεΐνες **E-Cadherin**, **Zonula Occludens-1**, **ZO-1**) και, σχηματίζουν ένα μονόστιβο επιθήλιο πάνω σε μια βασική μεμβράνη. Περιβάλλονται από διάμεση ουσία μέσα στην οποία υπάρχουν αραιοί ινοβλάστες [15, 22].

Ως απάντηση σε μηχανικό (για παράδειγμα υδροδυναμικές δυνάμεις, σωληναριακή τάση) ή χημικό ερέθισμα (για παράδειγμα αυξημένη γλυκόζη, υπερφόρτωση με πρωτεΐνες, υποξία, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, λοίμωξη, τοξική ουσία κλπ), θεωρείται ότι τα σωληναριακά νεφρικά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπική αλλαγή, χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά δηλαδή, την πολικότητα, τις διακυττάρειες συνδέσεις και τους επιθηλιακούς τους δείκτες (για παράδειγμα την **E-Cadherin** και τη  $\beta$ -Catenin), εμφανίζουν *de novo* δείκτες μεσεγχυματικού κυττάρου (για παράδειγμα τη **vimentin**, τη **nestin**, την  $\alpha$ -SMA, την **FSP-1** και το κολλαγόνο I και III), τροποποιούν τον κυτταροσκελετό τους, εκφράζουν μικροϊνίδια, αποκτούν κινητικότητα, διασχίζουν τη βασική μεμβράνη του σωληναρίου και φτάνουν στο διάμεσο ιστό, όπου παράγουν και εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία [8, 12-16, 21-27]. Δείκτες σύνθεσης κολλαγόνου είναι πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη σύνθεσή του, για παράδειγμα η κολλαγονοειδική συνοδός πρωτεΐνη **HSP 47** και η **προλυλ-4-υδροξυλάση** [15].

Η ύπαρξη του φαινομένου της EMT (τύπου II) στη νεφρική ίνωση είναι αμφιλεγόμενη. Υπάρχουν πολλές μελέτες που αφορούν στο φαινόμενο της EMT στη νεφρική ίνωση, κάποιες υποστηρίζουν την ύπαρξή της και κάποιες αδυνατούν να την αποδείξουν. Στην πλειοψηφία τους οι μελέτες, για να αποδείξουν και να μελετήσουν την EMT, αξιολόγησαν την έκφραση δεικτών. Με δεδομένο, όμως, ότι δεν υπάρχει δείκτης ειδικός για τους μυοϊνοβλάστες, τα δεδομένα δεν είναι επαρκή για να τεκμηριώσουν την ύπαρξη EMT στη νεφρική ίνωση.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* υφίστανται φαινοτυπική μετατροπή μετά την έκθεσή τους σε προϊνωτικούς παράγοντες, κυρίως στον transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Τα κύτταρα χάνουν τους επιθηλιακούς τους δείκτες (για παράδειγμα την E-cadherin και την ZO-1), αποκτούν μεσεγχυματικούς



δείκτες (για παράδειγμα vimentin,  $\alpha$ -SMA και FSP-1) και αποκτούν ατρακτόμορφη μορφολογία [28]. Αυτές οι *in vitro* μελέτες υποθέτουν ότι, αφού η EMT αποδεικνύεται στην κυτταρική καλλιέργεια, τότε θα συμβαίνει και *in vivo*. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη EMT κατά τη νεφρική ίνωση *in vivo* δεν έχει τεκμηριωθεί και, η απόδειξη της ύπαρξής της αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές. Χρησιμοποιώντας γενετικά σεσημασμένα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου σε ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης, φαίνεται ότι 36% των ινοβλαστών του διάμεσου χώρου είναι θετικοί στον δείκτη FSP-1 και υποθέτουν ότι τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα μέσω EMT [29]. Μέχρι σήμερα, χρησιμοποιώντας είτε τεχνικές ιχνηθέτησης κυττάρων και παρακολούθησης της πορείας τους, είτε χρησιμοποιώντας απλή και ηλεκτρονική μικροσκοπηση, είτε ανοσοϊστοχημεία για διαπίστωση συνεντοπισμού δεικτών, δεν υπάρχει επιβεβαιωμένη απόδειξη για την ύπαρξη EMT στη νεφρική ίνωση αφού, δεν αποδείχθηκε φαινοτυπική αλλαγή του επιθηλιακού κυττάρου σε πλήρη ινοβλαστικό φαινότυπο, ούτε διαπιστώθηκε κύτταρο με πλήρη χαρακτηριστικά ινοβλάστη στη σωληναριακή βασική μεμβράνη αλλά ούτε και να τη διασχίζει. Κλινικές μελέτες σε βιοψίες νεφρού στον άνθρωπο υποδεικνύουν ότι η EMT πιθανά διαδραματίζει ρόλο στην παθογένεια της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου αφού, παρατηρείται έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών σε αρκετές προοδευτικές νεφρικές νόσους και μάλιστα η έκφραση αυτή συσχετίζεται με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Δεν υπάρχει αμφισβήτηση της ύπαρξης της EMT *in vitro* όμως τα δεδομένα από τις *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι πιθανά τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα κάτω από συγκεκριμένες περιστάσεις υφίστανται **μερική EMT ή *in situ* EMT** κατά την οποία τα κύτταρα τροποποιούν τους φαινοτυπικούς τους δείκτες αλλά δεν εγκαταλείπουν το μικροπεριβάλλον τους [13-15, 22, 24, 30].

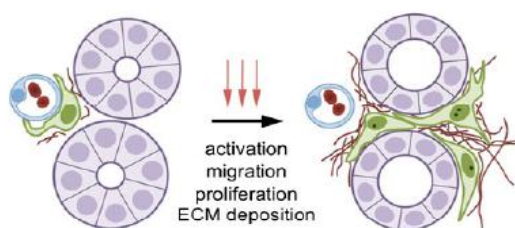
## 2.5 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Σχετικά πρόσφατα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναφέρθηκαν ως πιθανή πηγή προέλευσης των μυοϊνοβλαστών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα μονόστιβο εξειδικευμένο επιθήλιο που καλύπτει τον έσω χιτώνα των αγγείων. Σε ζωικά μοντέλα νεφρικής ίνωσης, διαπιστώθηκε ότι 30-50% των μυοϊνοβλαστών εξέφραζαν ταυτόχρονα ενδοθηλιακούς δείκτες (για παράδειγμα τον CD31) και δείκτες μυοϊνοβλαστών (για παράδειγμα  $\alpha$ -SMA και FSP-1) [31] ενώ, σε ζωικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας το 10-23% των μυοϊνοβλαστών στο διάμεσο χώρο ήταν ενδοθηλιακής προέλευσης [32]. Η ύπαρξη της **ενδοθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπής** (Endothelial to Mesenchymal Transition, EndoMT) είναι αποδεδειγμένη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και στην εξέλιξη της

καρδιακής ίνωσης, της ηπατικής ίνωσης, της ίνωσης των πνευμόνων και του κερατοειδούς. Αποτελεί είδος της EMT και, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι σημαντικός αριθμός μυοϊνοβλαστών του νεφρικού σωληναριοδιάμεσου χώρου προέρχεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των περιωληναριακών τριχοειδών αγγείων μέσω του φαινομένου αυτού. Στην EndoMT, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, πιθανά, χάνουν τους ενδοθηλιακούς τους δείκτες και σταδιακά αποκτούν μεσεγχυματικούς δείκτες [13, 14, 23, 24, 27, 31, 32].

## 2.6 Περικύτταρα

Τα περικύτταρα ή τοιχωματικά κύτταρα ή κύτταρα Rouget είναι τα κύτταρα που περιβάλλουν τα τριχοειδή αγγεία και φλεβίδια. Επικαλύπτονται μερικώς ή ολικώς από τη βασική μεμβράνη του τριχοειδούς αγγείου και έρχονται σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τριχοειδούς. Στο νεφρό, κάποια περικύτταρα εκτείνονται από τα περιωληναριακά τριχοειδή στα σωληνάρια μέσω εκτεταμένων αναστομών που εφάπτονται της σωληναριακής βασικής μεμβράνης. Επομένως, τα περικύτταρα διαδραματίζουν ρόλο διπλής σηματοδότησης, τόσο σε σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τριχοειδούς όσο και με τα σωληναριακά επιθηλιακά. Ο FoxD1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας σημαντικός στη νεφρογένεση και, εκφράζεται στα περικύτταρα αλλά και στα περιαγγειακά κύτταρα, στις αγγειακές λείες μυϊκές ίνες και στα μεσαγγειακά κύτταρα. Τα περικύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGFR) αλλά, δεν εκφράζουν τον μεσεγχυματικό δείκτη  $\alpha$ -SMA. Σε ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης, τα περικύτταρα, όπως προσδιορίστηκαν βάσει των δεικτών που εξέφραζαν, μετατράπηκαν σε μυοϊνοβλάστες με έκφραση της  $\alpha$ -SMA. Πιθανολογείται ότι, ένα συνεχές βλαπτικό ερέθισμα οδηγεί στην ενεργοποίηση και στη μετατροπή του περικυττάρου σε μυοϊνοβλάστη, με αποτέλεσμα τη μετανάστευσή του και, την παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας στο σωληναριοδιάμεσο χώρο (εικόνα 7). Πιθανολογείται επίσης ότι, η μείωση του αριθμού των περικυττάρων, που ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι θρεπτικός και στηρικτικός στα τριχοειδή, οδηγεί στην σύμπτωση των περιωληναριακών τριχοειδών, στην υποξία και στην περαιτέρω επιδείνωση της σωληναριοδιάμεσης ίνωσης [8, 12-14].



Εικόνα 7: Περικύτταρα Από βιβλιογραφική αναφορά [13]

## **2.7 Δενδριτικά κύτταρα, Μακροφάγα, Λεμφοκύτταρα, Μαστοκύτταρα**

Κάθε ιστική βλάβη ακολουθείται πάντα από φλεγμονώδη αντίδραση. Η βλάβη ενεργοποιεί διαδικασίες παραγωγής διαλυτών παραγόντων, αυξάνεται η τοπική αγγειακή διαπερατότητα, ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και, λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν στην εστία της βλάβης ώστε να την επιδιορθώσουν.

Έτσι και στο νεφρό, όταν τα σωληναριακά κύτταρα εκτεθούν σε ένα βλαπτικό ερέθισμα (για παράδειγμα σε αυξημένη πρωτεΐνη, αυξημένη γλυκόζη, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, εμμένουσα λοίμωξη, τοξική ουσία, υδροδυναμικό ερέθισμα), σε απάντηση στο βλαπτικό ερέθισμα, παράγουν κυτταροκίνες και χυμοκίνες. Η κλίση πυκνότητας χυμοκινών που δημιουργείται γύρω από τα σωληνάκια και τα περισωληναριακά τριχοειδή προσελκύει φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία διηθούν τον σωληναριοδιάμεσο χώρο. Στα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται τα μονοπύρρηνα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούν μηχανισμούς παραγωγής διαλυτών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, προϋνωτικές κυτταροκίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, οι οποίες δημιουργούν ένα εχθρικό μικροπεριβάλλον για τα σωληναριακά επιθηλιακά και τα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και, επίσης, ενεργοποιούν τους ινοβλάστες προς παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας. Στα φλεγμονώδη κύτταρα ανήκουν και τα δενδριτικά κύτταρα του νεφρού, που υπάρχουν φυσιολογικά στο σωληναριοδιάμεσο χώρο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ενώ η φλεγμονή στο σύνολό της επάγει τη δημιουργία ίνωσης, οι μελέτες των τελευταίων ετών υποδεικνύουν ότι υποκατηγορίες λεμφοκυττάρων και μακροφάγων εμφανίζουν αντιϊνωτικές δραστηριότητες [14, 18, 20, 24, 33].

### **3. Εξωκυττάρια ουσία στη νεφρική ίνωση**

Όπως προαναφέρθηκε, στο φυσιολογικό νεφρικό διάμεσο ιστό υπάρχει κολλαγόνο, κυρίως τύπου I και III, το οποίο λειτουργεί ως δομικό στηρικτικό υλικό, ινοβλάστες και δενδριτικά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ένα δίκτυο. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix, ECM) βρίσκεται σε ισορροπία με την αποδόμησή της. Η ίνωση συσχετίζεται τόσο με ποσοτική όσο και με ποιοτική τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας. Στον ινωτικό νεφρό, ο διάμεσος χώρος είναι γεμάτος ινδοειδές υλικό που περιέχει κυρίως κολλαγόνο τύπου I, τύπου III, ινωδονεκτίνη αλλά και κατάλοιπα θραυσμάτων κολλαγόνου τύπου IV, παραλλαγές της ινωδονεκτίνης και πολλά άλλα μακρομόρια. Η ινωδογένεση εμφανίζεται, αρχικά, σε μικρές εστίες της φλεγμονώδους

περιοχής όπου, πυρήνες κολλαγόνου χρησιμοποιούνται ως γέφυρες με το κολλαγόνο των μυοϊνοβλαστών και, στη συνέχεια, επεκτείνονται και η ίνωση γίνεται διάχυτη.

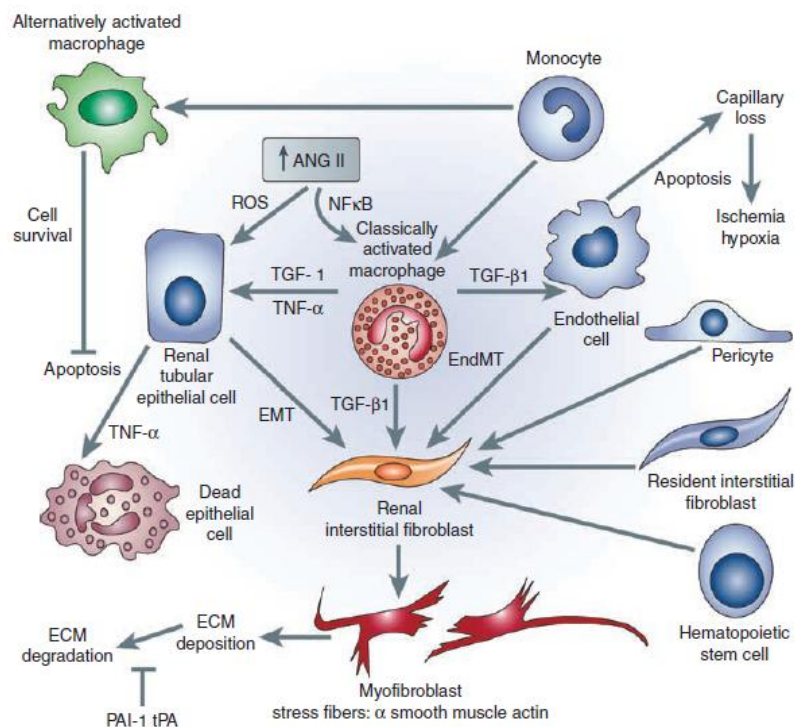
Η αποδόμηση της ECM βασίζεται στη δράση πρωτεασών και, οι πιο μελετημένες από αυτές είναι η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) και η οικογένεια του σηματοδοτικού μονοπατιού της πλασμίνης. Και οι δύο οικογένειες πρωτεασών διασπούν την ECM ώστε να αφαιρεθεί, όμως, ταυτόχρονα, διασπούν και άλλες πρωτεΐνες, ανεξάρτητες της θεμέλιας ουσίας, απελευθερώνοντας προϊνώτικους αυξητικούς παράγοντες που, παράδοξα, ενεργοποιούν την ίνωση. Πέραν των πρωτεασών που αναφέρθηκαν, φαίνεται ότι στη διαδικασία της ίνωσης συμμετέχει και η λυσοσωματική οικογένεια των **καθειψινών (cathepsins)** [12, 14, 20].

Δείκτες σύνθεσης κολλαγόνου είναι πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη σύνθεσή του, για παράδειγμα η κολλαγονοειδική συνοδός πρωτεΐνη **HSP 47** και η **προλυλ-4-υδροξυλάση** [15].

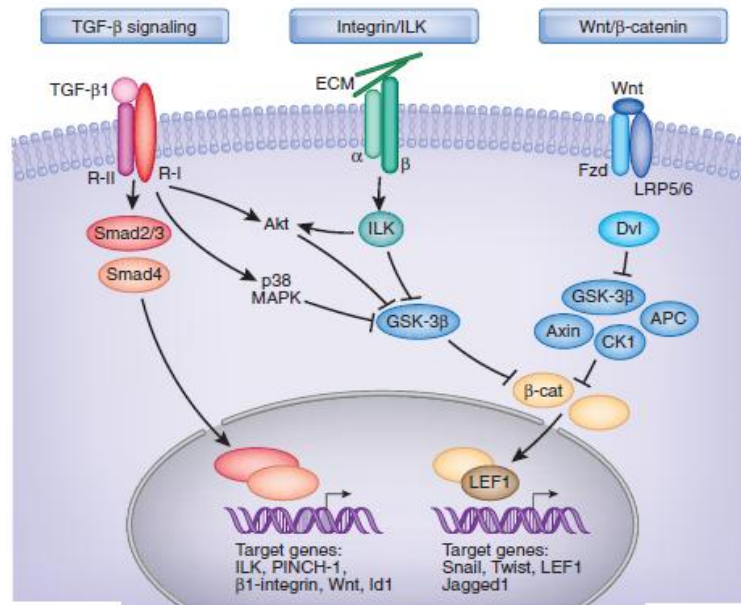
#### **4. Μοριακοί μηχανισμοί της νεφρικής ίνωσης και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται**

Κάθε βλάβη στο νεφρό (αιμοδυναμική ή βιοχημική ή υδροδυναμική) είτε στο σπείραμα, είτε στο σωληναριοδιάμεσο χώρο, είτε στα μικρά και μεγάλα αγγεία ενεργοποιεί μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Σε μοριακό επίπεδο, η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (η αγγειοτενσίνη II με προφλεγμονώδη δράση μέσω των υποδοχέων της τύπου I και, με αντιϊνωτική δράση μέσω των υποδοχέων της τύπου II), η φλεγμονώδης αντίδραση (με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες τις TNF- $\alpha$ , IL-1, NF- $\kappa$ B και, αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη τον TGF- $\beta$ ) και το οξειδωτικό στρες είναι κάποιες από τις διεργασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα την άμεση φλεγμονώδη διήθηση του διάμεσου χώρου ή την έμμεση, μέσω ενεργοποίησης των παρακείμενων κυττάρων. Στην προσπάθειά του το σωληναριακό κύτταρο να αμυνθεί των βλαπτικών ερεθισμάτων και να επιβιώσει, ενεργοποιείται. Παράγονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες, παρατηρείται παύση του κυτταρικού κύκλου και παραμονή του στη φάση G2/M, ενεργοποιείται το στρες του ενδοπλασματικού του δικτύου (ER stress), η EMT, η απόπτωση και παρατηρείται νέκρωση. Τα δενδριτικά κύτταρα προσλαμβάνουν τους νέους αντιγονικούς στόχους που δημιουργούνται και, τους παρουσιάζουν στα λεμφοκύτταρα των γειτονικών λεμφαδένων. Η κλίση πυκνότητας χυμοκινών που δημιουργείται προσελκύει τα μονοκύτταρα που γίνονται μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, τα οποία διηθούν τον σωληναριοδιάμεσο χώρο και

ενεργοποιούν, ξανά, φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Οι προφλεγμονώδεις και προϊνωτικές κυτταροκίνες που παράγονται και το εχθρικό μικροπεριβάλλον που δημιουργείται, τελικά, οδηγούν στην ενεργοποίηση των ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι θα παράγουν ECM. Η ενδοθηλιακή βλάβη των περισοληναριακών τριχοειδών αγγείων, η EndoMT και η ένδεια περικυττάρων των περισοληναριακών τριχοειδών αγγείων οδηγεί σε σύμπτωση των περισοληναριακών τριχοειδών, σε υποξία, σε φλεγμονώδη διήθηση του σοληναριοδιάμεσου χώρου και, επομένως, σε ένα φαύλο κύκλο. Εάν δεν διακοπεί το αρχικό ερέθισμα που τον προκάλεσε ή εάν οι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί δεν επαναφέρουν την ισορροπία, τότε έχουμε τη δημιουργία της ίνωσης (εικόνα 8). Στη διαδικασία αυτή, συμμετέχουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία αλληλεπιδρούν και, τα κυριότερα είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- $\beta$  και της BMP-7, το σηματοδοτικό μονοπάτι της ILK, το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt/ $\beta$ -Catenin, το σηματοδοτικό μονοπάτι της JNK, το σηματοδοτικό μονοπάτι του PDGFR, το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF, το σηματοδοτικό μονοπάτι του JAK/STAT, το σηματοδοτικό μονοπάτι του HIF-1 $\alpha$  και, τα φαινόμενα της EMT (που έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 3, ενότητα 2. 4 του Μέρους II), η διαδικασία της απόπτωσης και το ER stress [14, 20, 24, 34-36] (εικόνα 9). Θα περιγραφούν περιληπτικά αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο στη νεφρική ίνωση.



**Εικόνα 8:** Κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στο νεφρό κατά την εκτέλεση μοντέλου νεφρικής ίνωσης με **UUO**. Από βιβλιογραφική αναφορά [34].

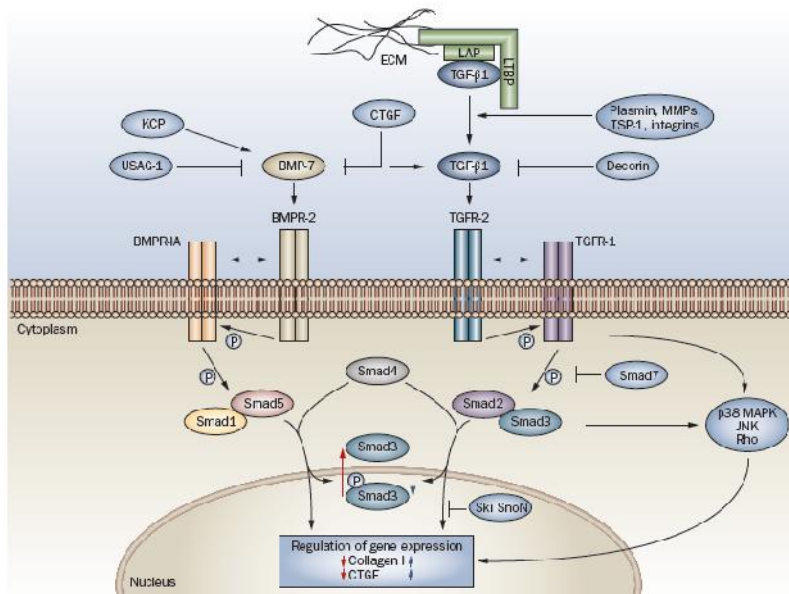


Εικόνα 9: Κύρια ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην EMT στον ινωτικό νεφρό. Από βιβλιογραφική αναφορά [24].

#### 4.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β

Ο transforming growth factor-β (TGF-β) είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη, μέλος της υπερικογένειας των TGF-β, η οποία περιλαμβάνει ακτιβίνες, ανασταλτίνες, αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες διαφοροποίησης και οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenic proteins, BMP). Υπάρχουν τρεις ισομορφές αλλά, αυτή που κυρίως εμπλέκεται στη νεφρική ίνωση είναι η ισομορφή TGF-β1. Συντίθεται σαν αδρανές προπεπτίδιο το οποίο αλληλεπιδρά με το LAP (latency associated peptide) δημιουργώντας ένα σύμπλοκο, το μικρό λανθάνον σύμπλοκο (small latent complex, SLC). Το SLC δεσμεύεται με την λανθάνουσα δεσμεύουσα τον TGF-β1 πρωτεΐνη (Latent TGF-β-binding protein, LTBP), φτιάχνεται το μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο (large latent complex, LLC) το οποίο εκκρίνεται από το κύτταρο και δεσμεύεται στην ECM (εικόνα 10). Η πλασμίνη, οι MMPs, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η θρομβοσπονδίνη-1 και η ιντεγκρίνη αV διασπούν το SLC και το LLC και, απελευθερώνεται ο δραστήσιμος TGF-β.

Ο δραστήσιμος TGF-β ενώνεται στους υποδοχείς του που είναι ο τύπου I, ο τύπου II και ο τύπου III. Οι τύπου I και II υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές κινάσες που επάγουν σήματα για την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων. Ο υποδοχέας τύπου III (βηταγλυκάνη) είναι μια πρωτεογλυκάνη που δεσμεύει τον TGF-β και τον παρουσιάζει στους υποδοχείς τύπου I και II. Αυτοκρινικά και παρακρινικά, ο TGF-β ασκεί τις βιολογικές δράσεις του μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών που εξαρτώνται από τα Smads αλλά και μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών ανεξάρτητων των Smads.



Εικόνα 10: Σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β. Από βιβλιογραφική αναφορά [14].

Η σύνδεση του TGF-β στον υποδοχέα του οδηγεί στην ενεργοποίηση κινασών και, στην κινητοποίηση και φωσφορυλίωση των Smad2 και Smad3. Τα φωσφορυλιωμένα Smads δημιουργούν ετερομερή με τον Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Ο BMP-7 είναι ένας φυσικός ανταγωνιστής του TGF-β που παρουσιάζει ισχυρές νεφροπροστατευτικές ιδιότητες. Η σύνδεσή του στον υποδοχέα του, ενεργοποιεί κινάσες που θα φωσφορυλιώσουν τα Smad1 και Smad5 τα οποία, μετά τον ετεροπολυμερισμό τους με το Smad4, μεταφέρονται στον πυρήνα όπου, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων αντίθετα από ότι ο TGF-β. Για παράδειγμα, ο TGF-β αυξάνει την έκφραση του κολλαγόνου τύπου I και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (connective tissue growth factor, CTGF), ενώ η BMP-7 έχει αντίθετες δράσεις.

Τα ανεξάρτητα του Smad σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του TGF-β στον υποδοχέα του είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια p38/MAPK, RhoA, Ras, PI3K/AKT, Snail, ILK και β-catenin [9, 14, 16, 21, 35-37].

#### 4.1.1 TGF-β και φλεγμονή

Μετά από βλαπτικό ερέθισμα, ο TGF-β απελευθερώνεται από τα νεφρικά κύτταρα και από τα φλεγμονώδη κύτταρα που διήθησαν το νεφρό, ώστε να ρυθμίσει τη φλεγμονώδη αντίδραση και να συμμετάσχει στην επιδιόρθωση της βλάβης. Έχει **προφλεγμονώδεις ιδιότητες** και προκαλεί χημειοταξία των λευκών αιμοσφαιρίων. Μέσω του Smad4, ρυθμίζει

τη διήθηση από λευκά αιμοσφαίρια και μακροφάγα και, συμμετέχει στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χυμοκινών και μορίων προσκόλλησης. Μέσω του Smad7 εμφανίζει **αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες** αφού επάγει την έκφραση του ανασταλτή του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ και, επομένως αναστέλλει την ενεργοποίησή του. Ο TGF-β ανταγωνίζεται τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-2 και TNF-α και απενεργοποιεί τα μακροφάγα. Ο ρόλος του TGF-β στη φλεγμονή χρήζει περαιτέρω μελέτης [35-37].

#### **4.1.2 TGF-β και ECM**

Ο TGF-β είναι ισχυρός προϊνωτικός μεσολαβητής που οδηγεί στην **αύξηση της εναπόθεσης ECM** αφού αυξάνει, άμεσα και μέσω του CTGF, την έκφραση ινωδονεκτίνης, του κολλαγόνου I, III και IV. Επίσης, υπερεκφράζει διάφορες MMPs και αναστολείς MMPs στα επιθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες και, υπερεκφράζει τις α- και β- υποομάδες ιντεγκρινών που αλληλεπιδρούν με τη θεμέλια ουσία. Σαν αποτέλεσμα, παρατηρείται παθολογική αναδόμηση της θεμέλιας ουσίας και ίνωση. Καθοδικοί στόχοι του TGF-β μέσω του Smad3 είναι τα γονίδια που επάγουν ίνωση Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col4a2, Col6a1, Col6a3 και ο αναστολέας της MMP-1 (TIMP-1). Σε αντίθεση με το Smad3, το Smad2 έχει νεφροπροστατευτικές ιδιότητες αφού έχει δράσεις αντίθετες από αυτές του Smad3 [9, 21, 35-37].

#### **4.1.3 TGF-β και απόπτωση**

Ο TGF-β οδηγεί έμμεσα σε απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων μετά από απάντηση σε σημάδια «θανάτου». Καθοδικά της ενεργοποίησης του υποδοχέα του TGF-β είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK που αλληλεπιδρά με το μονοπάτι των Smads. Ο TGF-β αυξάνει την ευαισθησία σε απόπτωση του ανασταλτή της πρωτεϊνικής κινάσης C, επιταχύνει τη διάσπαση και ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9 και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [36, 37].

#### **4.1.4 TGF-β και μυοϊνοβλάστες**

Ο TGF-β στους **ινοβλάστες** οδηγεί στην ανάπτυξή τους και στη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες. Στα **ινοκύτταρα** μειώνει την έκφραση του CD34 και συμμετέχει στην αλληλεπίδρασή τους με τα υπόλοιπα κύτταρα του διάμεσου χώρου, έχει κεντρικό ρόλο στην EMT και συμμετέχει στην EndoMT [14, 16].



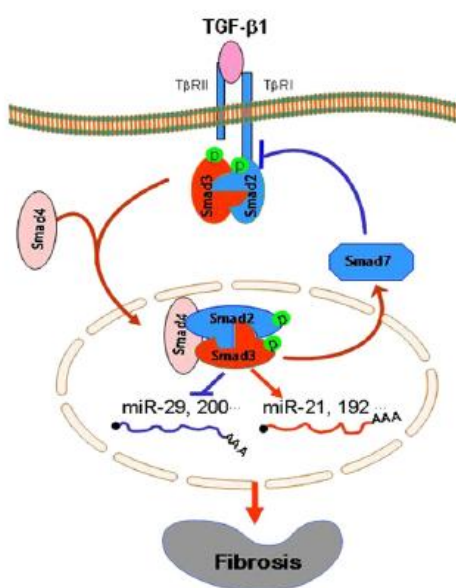
#### 4.1.5 TGF-β και EMT

Κεντρικό ρόλο στο φαινόμενο της EMT κατέχει ο TGF-β. Στον ινωτικό νεφρό, ο TGF-β υπερεκφράζεται καθολικά και, η επαγωγή της EMT που προκαλεί, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β οδηγεί, τελικά, στον μεταγραφικό έλεγχο διαφόρων γονιδίων που συσχετίζονται με την EMT, για παράδειγμα των Snail, Slug, Twist, Par6, Smurf1, SARA, CTGF, ILK, β1-ιντεγκρίνης, WNT, α-SMA, collagen IA2 και MMP-2.

Στον παθολογικό νεφρό, η **σηματοδότηση μέσω Smad** είναι αυξημένη εξαιτίας της υπερέκφρασης του TGF-β και εξαιτίας της διαταραχής των γονιδίων των ανασταλτών των Smad και των ρυθμιστών τους. Η διαταραχή της διακυττάριας σύνδεσης των επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί ερέθισμα για την έκκριση του TGF-β αλλά, και από μόνη της, αποτελεί ερέθισμα για την έναρξη της EMT μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα που συσχετίζεται με την μυοκαρδίνη (Myocardin-related transcription factor, MRTF) [38]. Σύμφωνα με τους Masszi A et al [39], πιθανά, υπάρχουν δύο φάσεις της EMT, η μία είναι εξαρτώμενη από το Smad3 και λέγεται πρώιμη ή μεσεγχυματική και, η άλλη είναι ανεξάρτητη του Smad3 και λέγεται όψιμη ή μυογενής. Το Smad3 συμμετέχει στην απώλεια των επιθηλιακών δεικτών, είναι σημαντικός παράγοντας στην έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών και πρωτεϊνών της ECM και, προετοιμάζει την είσοδο του κυττάρου στη δεύτερη φάση της EMT αφού, οδηγεί στη συσσώρευση του MRTF στον πυρήνα και στη σύνθεση πρωτεϊνών που αυξάνουν την έκφραση της α-SMA [16, 39]. Το Smad7 έχει ανασταλτική δράση και προστατεύει από τη νεφρική ίνωση. Με αρνητική ανατροφοδότηση, αναστέλλει τη δραστηριότητα των Smad2 και Smad3 αφού, μέσω πρωτεασώματος, οδηγεί σε αποδόμηση των υποδοχέων τύπου I του TGF-β (TGF-βRI) και των Smad2 και 3. Το Smad7 αλληλεπιδρά με τις λιγκάσες ουμπικουΐτινης Smurf2 και Arkadia που τις οδηγεί στον TGF-βRI για να τον διασπάσουν. Σε ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης, η υπερέκφραση της Smurf2 επάγει την EMT μέσω διάσπασης του μεταγραφικού ανασταλτή των Smad, SnoN. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι διάφορα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι των Smads (εικόνα 11) [36]. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι, ο TGF-β διατηρεί τα γονίδια, που προσδίδουν επιθηλιακό φαινότυπο στα κύτταρα, σε σιωπηλή κατάσταση μέσω υπερμεθυλίωσης των υποκινητών τους (για παράδειγμα του γονιδίου της E-Cadherin). Η διακοπή της σηματοδότησης των Smads στα κύτταρα που υφίστανται EMT επανεκφράζει τα υπερμεθυλιωμένα γονίδια [40].

Η EMT επάγεται και μέσω των **ανεξάρτητων του Smad σηματοδοτικών μονοπατιών** του TGF-β. Η μικρή **GTPase, RhoA** είναι σημαντική στην εμφάνιση μορφολογικών αλλαγών, στην

ενεργοποίηση του υποκινητή της  $\alpha$ -SMA και στις κυτταροσκελετικές ανακατανομές μετά την ενεργοποίησή της από τον TGF- $\beta$ . Ο TGF- $\beta$  ενεργοποιεί το **σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK** του οποίου η λειτουργία στην EMT εξαρτάται από την ύπαρξη λειτουργικής  $\beta$ 1-ιντεγκρίνης. Το ενεργοποιημένο σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK απενεργοποιεί την 3 $\beta$ -κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK-3 $\beta$ ), οδηγώντας στη συσσώρευση της  $\beta$ -Catenin. Επίσης, η ενεργοποίηση του **σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K-AKT** συμμετέχει στην EMT, πιθανά μέσω αύξησης της επιβίωσης του κυττάρου και της συσσώρευσης της  $\beta$ -Catenin εξαιτίας της αναστολής της GSK-3 $\beta$  [24, 35].

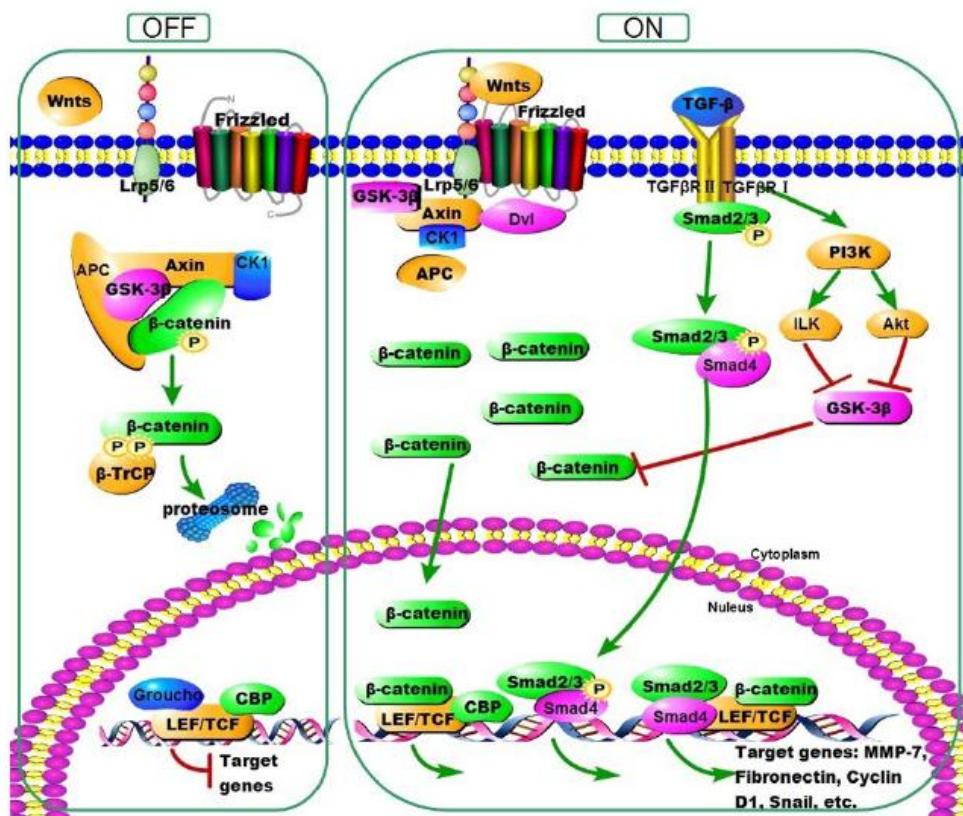


Εικόνα 11: miRNAs εξαρτώμενα από το Smad3 κατά τη νεφρική ίνωση. Από βιβλιογραφική αναφορά [36].

#### 4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες, για παράδειγμα στην οργανογένεση, στην ομοιοστασία των ιστών αλλά και στην παθογένεια πολλών νοσημάτων. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin είναι σημαντικό στην ανάπτυξη ίνωσης.

Οι πρωτεΐνες Wnt είναι γλυκοπρωτεΐνες που ασκούν τις δράσεις τους κυρίως μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -Catenin. Σε κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή χωρίς την ύπαρξη των Wnt, η κυτταροπλασματική  $\beta$ -Catenin φωσφορυλιώνεται από το σύμπλεγμα axin-adenomatous polyposis coli protein (APC)-glucogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), στη συνέχεια ουμπικουτίνιώνεται και αποδομείται στο πρωτεάσωμα (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin. Από βιβλιογραφική αναφορά [44].

Όταν οι πρωτεΐνες Wnt προσδεθούν στο μεμβρανικό υποδοχέα frizzled FZD και στην πρωτεΐνη που συσχετίζεται με τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας LRP, τότε το σύμπλοκο διασπάται, η β-Catenin αποφωσφορυλιώνεται, δε διασπάται στο πρωτεάσωμα, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα. Στον πυρήνα, η β-Catenin, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα του παράγοντα των T-λεμφοκυττάρων (T-cell factor, TCF) και του λεμφοειδούς ενισχυτικού παράγοντα (Lymphoid enhancer factor, LEF), ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων όπως της **ινωδονεκτίνης**, της **MMP-7**, του ανασταλτή του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (Plasmin activator inhibitor-1, **PAI-1**), του **Twist** και του **Snail**. Το αποτέλεσμα της σηματοδότησης Wnt/β-Catenin εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου στο οποίο συμβαίνει και, ρυθμίζει την κυτταρική μείρα κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο [41-44].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η αλληλεπίδρασή του με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β είναι γνωστή. Όπως προαναφέρθηκε, ο TGF-β ενεργοποιεί το **σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK**, που απενεργοποιεί την GSK-3β, οδηγώντας στη συσσώρευση της β-Catenin και το ίδιο

αποτέλεσμα προκαλεί και η ενεργοποίηση του **σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K-AKT** αλλά και η ενεργοποίηση του **σηματοδοτικού μονοπατιού της ILK** [24].

Η  $\beta$ -Catenin, στα επιθηλιακά κύτταρα, σχηματίζει σύμπλοκο με την E-Cadherin διατηρώντας την ακεραιότητα του επιθηλίου και τη σταθερότητα της επαφής των κυττάρων μεταξύ τους. Η διάσπαση της κυτταρικής επαφής, επηρεάζει την ενδοκυττάρωση της E-Cadherin και, η  $\beta$ -Catenin είναι πλέον διαθέσιμη για ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -Catenin. Ο **TGF- $\beta$**  αποσπά τη  $\beta$ -Catenin από τις επιθηλιακές συνδέσεις και τη σταθεροποιεί στο κυτταρόπλασμα. Η μετακίνησή της στον πυρήνα οδηγεί σε ενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην EMT, για παράδειγμα του Snail, Twist, LEF-1, Jagged1. Διαταραχή των επιθηλιακών συνδέσεων προκαλούν επίσης η **MMP-9** και το **Slug**. Ο Snail είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας του οποίου η υπερέκφραση καταστέλλει την έκφραση της E-Cadherin στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα και επάγει *in vivo* την EMT ενώ, ο Twist είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που όχι μόνο καταστέλλει την έκφραση της E-Cadherin αλλά και επάγει την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών [24, 45-47]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin ρυθμίζεται, επίσης από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Το **οξειδωτικό στρες** ενεργοποιεί το Ras, καταστέλλει την GSK-3 $\beta$ , συσσωρεύεται η  $\beta$ -Catenin στο κυτταρόπλασμα και αυξάνεται η **απόπτωση** [42]. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η  $\beta$ -Catenin, στο νεφρό, μέσω της υπερέκφρασης της κινάσης που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (serum and glucocorticoid inducible kinase, **SGK1**) **ρυθμίζει μηχανισμούς μεταφοράς ουσιών στα σωληνάρια** [42].

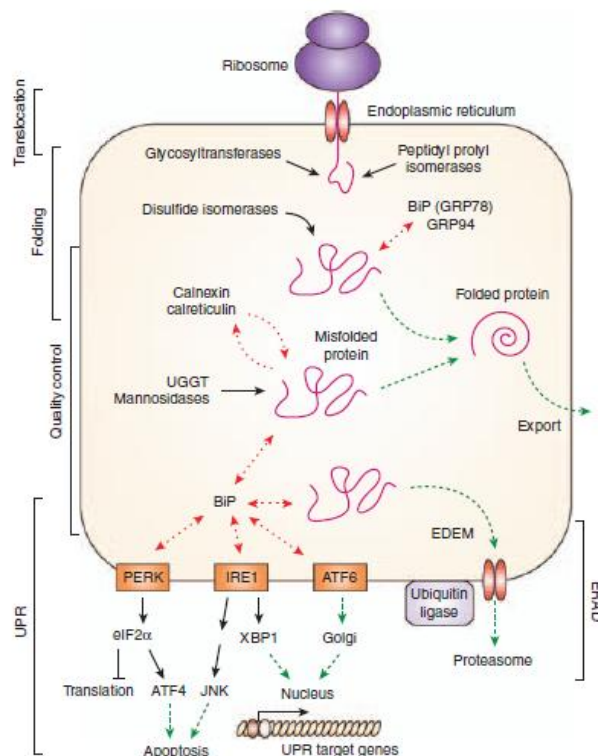
#### **4.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι ιντεγκρίνης/ILK**

Η ILK είναι μια πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr που αλληλεπιδρά με τα κυτταροπλασματικά τμήματα της  $\beta$ -ιντεγκρίνης. Παρουσιάζει δύο ιδιότητες, λειτουργεί σαν «όχημα, πλατφόρμα, πρωτεΐνη πρόσδεσης» (scaffold) αλληλεπιδρώντας με αρκετές ενδοκυττάριες πρωτεΐνες αλλά και σαν πρωτεϊνική κινάση, οπότε, άμεσα, φωσφορυλιώνει σημαντικές κινάσες τελεστές, για παράδειγμα την AKT και την GSK-3 $\beta$ , σταθεροποιώντας τη  $\beta$ -Catenin στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην EMT. Η σηματοδότηση ILK επάγεται ταυτόχρονα με τον TGF- $\beta$  μέσω Smads και σε πειραματικά μοντέλα χρόνιας νεφρικής νόσου αποδεικνύεται αυξημένη [24].

#### **4.4 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER stress)**

Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER) είναι η θέση σύνθεσης, αναδίπλωσης και συνάθροισης των περισσοτέρων πρωτεϊνών, είναι η θέση σύνθεσης

στεροειδών ορμονών, χοληστερόλης και λιπιδίων και, είναι η κύρια θέση αποθήκευσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Μετά τη σύνθεσή τους, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στον αυλό του ER όπου αναδιπλώνονται, γλυκοζυλιώνονται και αποκτούν τη δομή τους (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Αναδίπλωση πρωτεϊνών, έλεγχος ποιότητας και σηματοδότηση Ενδοπλασματικού Δικτύου. Από βιβλιογραφική αναφορά [49].

Οι κλασικές συνοδοί πρωτεΐνες (chaperons), για παράδειγμα η GRP94 και η GRP78 (BiP) και, οι συνοδοί πρωτεΐνες που προσομοιάζουν με λεκτίνη, για παράδειγμα η καλνεξίνη (calnexin) και η **καλρετικουλίνη (calreticulin)** είναι υπεύθυνες για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Το Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER stress) αναφέρεται σε κάθε φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση που θα αυξήσει τις απαιτήσεις για αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή θα διακόψει τις διαδικασίες αναδίπλωσης, οδηγώντας σε συσσώρευση των παθολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ER. Για να αποφύγει τις παθολογικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, το ER ενεργοποιεί δύο μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας, την απάντηση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (unfolded protein response, UPR) και την αποδόμηση που συσχετίζεται με το ER (ER-associated degradation, ERAD). Η ενεργοποίηση του UPR είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου αφού επιτρέπει στο κύτταρο να ανακάμψει από το στρες. Αντίθετα, η παρατεταμένη ενεργοποίησή του, μπορεί

να γίνει κυτταροτοξική αφού, μέσω **JNK** ή **eIF2a/ATF4** ή ενεργοποίησης της **κασπάσης-12** οδηγεί σε απόπτωση [14, 48, 49].

Η έκθεση των εγγύς σωληναριακών κυττάρων σε βλαπτικό ερέθισμα (για παράδειγμα σε αλβουμίνη) ενεργοποιεί προϊνωτικούς μηχανισμούς και υπερέκφραση δεικτών ER stress, η οποία συσχετίζεται με αύξηση της απόπτωσης [50]. Σε ζωικά μοντέλα με ER stress παρατηρείται, στην προχωρημένη ηλικία των ζώων, εκτεταμένη σωληναριοδιάμεση ίνωση και σωληναριακή ατροφία με διάταση, ακόμα και χωρίς την ύπαρξη βλαπτικού παράγοντα. Στα ζώα αυτά, η απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων είναι αυξημένη, όπως είναι και η κασπάση-12 [51]. Σε πειραματικό ζωικό μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1, η υπερέκφραση δεικτών ER stress συσχετίστηκε με αυξημένη απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων [52] και, ο έλεγχος με μικροσυστοιχίες σε βιοψίες ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια έδειξε ότι τα γονίδια που συσχετίζονται με το UPR είναι αυξημένα στα σωληνάκια σαν προσπάθεια προστασίας των κυττάρων [53].

#### **4.5 Απόπτωση και παύση του κυτταρικού κύκλου**

Ένας βλαπτικός παράγοντας (μηχανικό στρες, οξειδωτικό στρες, υποξία κλπ) στο επιθηλιακό σωληναριακό κύτταρο θα ενεργοποιήσει σήματα «θανάτου», οπότε το κύτταρο θα υποστεί παύση του κυτταρικού κύκλου για να διορθωθεί το DNA του, αλλιώς, θα υποστεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση μέσω των μεσολαβητών που παράγονται. Το ποσοστό των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται σε παύση του κυτταρικού κύκλου (δηλαδή στη φάση G2/M) συσχετίζεται με την έκβαση της ίνωσης και τα κύτταρα αυτά, μέσω του **σηματοδοτικού μονοπατιού JNK**, εμφανίζουν προϊνωτικό φαινότυπο. Κάποιοι από τους μεσολαβητές που θα προκαλέσουν απόπτωση είναι η αγγειοτενσίνη II, το Fas και ο TGF-β. Κύριοι τελεστές της απόπτωσης είναι οι κασπάσες. Όπως προαναφέρθηκε, καθοδικά της ενεργοποίησης του υποδοχέα του TGF-β είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK που αλληλεπιδρά με το μονοπάτι των Smads. Ο TGF-β αυξάνει την ευαισθησία σε απόπτωση του ανασταλτή της πρωτεϊνικής κινάσης C, επιταχύνει τη διάσπαση και ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9 και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [14, 36, 37, 54].

#### **5. Πειραματικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης - Μοντέλο Ετερόπλευρης Απόφραξης Ουρητήρα (UUO).**

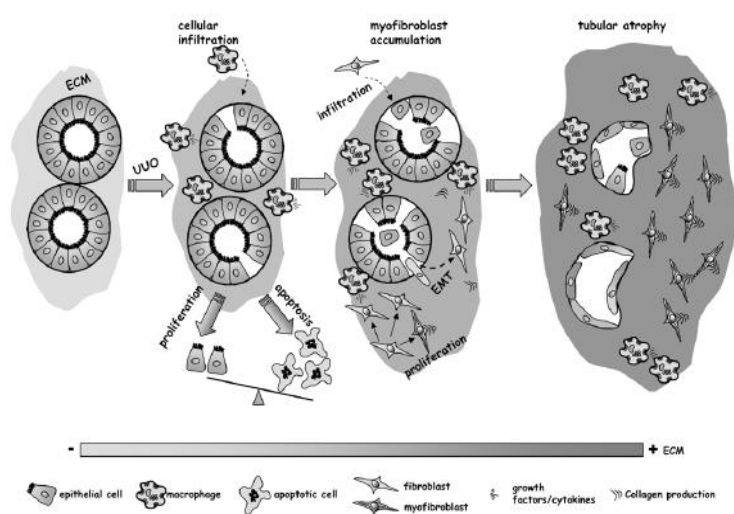
Ένα βήμα πριν την εφαρμογή κλινικών μελετών είναι η εφαρμογή προκλινικών μελετών σε πειραματικά μοντέλα. Αρχικά, η έρευνα γίνεται *in vitro* και, στη συνέχεια, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται σε πειραματικά ζωικά μοντέλα.

Τα ζωικά μοντέλα της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (ΧΝΝ) αποδεικνύονται χρήσιμα πειραματικά εργαλεία για τη διαπίστωση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της ΧΝΝ αλλά και για την ανεύρεση εξατομικευμένης και στοχευμένης θεραπείας. Για περισσότερο από 50 χρόνια, σε διαφορετικά είδη ζώων, ο χειρουργικός χειρισμός στους νεφρούς χρησιμοποιήθηκε σαν μοντέλο προσοδευτικής νεφρικής διαταραχής. Για πολλά χρόνια, στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος παρέμενε η μελέτη του σπειράματος. Όταν, όμως, οι κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η έκβαση του νεφρικού νοσήματος και η εξέλιξή του σε νεφρική ανεπάρκεια συσχετίζεται κυρίως με τη σωληναριοδιάμεση ίνωση, οι μελετητές επέκτειναν το ενδιαφέρον τους στη βλάβη του νεφρικού διάμεσου ιστού και στη σωληναριακή βλάβη. Τη δεκαετία του 1970, η **ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)** στο κουνέλι έδειξε ότι προκαλεί ανάπτυξη των ινοβλαστών του νεφρικού διάμεσου χώρου και μετατροπή τους σε μυοϊνοβλάστες. Επόμενα πειράματα στα κουνέλια, έδειξαν ότι στο διάμεσο χώρο παρατηρείται αύξηση του κολλαγόνου I, III και IV, της ινωδονεκτίνης και της θειικής ηπαραινικής πρωτεογλυκάνης. Από τότε, τα ζωικά μοντέλα UUO χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη της αποφρακτικής ουροπάθειας και της διάμεσης νεφρικής ίνωσης [34, 54, 55]. Οι πρώτες μελέτες σε μοντέλο UUO έγιναν σε κουνέλια και σε σκύλους, όμως οι πρόσφατες μελέτες γίνονται σε τρωκτικά (αρουραίο και ποντίκι). Το **μοντέλο UUO είναι πλήρες** όταν ο ουρητήρας απολινώνεται ολικώς, ενώ είναι **μερικό** όταν ο ουρητήρας απολινώνεται μερικώς. Η μερική απολίνωση γίνεται, συνήθως, για να μελετηθεί η παθογένεια της συγγενούς κυστεοουρητηρικής παλινδρόμησης [34].

Το χειρουργείο γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες από ειδικά εκπαιδευμένο χειρουργό κτηνίατρο [34]. Τα τρωκτικά αναισθητοποιούνται με έγχυση αναισθητικών ουσιών, συνήθως, ενδοπεριτοναϊκά. Στο πλήρες UUO, μετά από μέση κοιλιακή τομή, ο ένας από τους δύο ουρητήρες παρασκευάζεται και απολινώνεται ολικώς, 1 cm κάτω από την νεφρική πύελο. Στα ζώα της ομάδας ελέγχου γίνεται μόνο παρασκευή του ουρητήρα. Ακολουθεί κλείσιμο της μέσης κοιλιακής τομής και σε διαφορετικές ημέρες-χρόνους (για παράδειγμα στις 2, 7, 8, 14 ημέρες μετά το χειρουργείο), τα ζώα αναισθητοποιούνται ξανά, συλλέγονται και οι δύο νεφροί και, το ζώο θυσιάζεται [56].

Στο πλήρες UUO, μια γρήγορη ακολουθία γεγονότων στον αποφραγμένο νεφρό οδηγεί, μέσα σε 24 ώρες, στη μείωση του πειραματικού ρυθμού διήθησης. Μέσα σε λίγες ημέρες,

παρατηρείται υδρονέφρωση. Ο σωληναριοδιάμεσος χώρος διηθείται από φλεγμονώδη κύτταρα, τα μακροφάγα εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, παρατηρείται διαταραχή της ισορροπίας ανάπτυξη-απόπτωση υπέρ της απόπτωσης των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται και οι μυοϊνοβλάστες παράγουν ECM, η οποία συσσωρεύεται. Αφού το ερέθισμα της απόφραξης παραμένει, η συσσώρευση της ECM οδηγεί σε αύξηση του διάμεσου χώρου και η ανεξέλεγκτη απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε ατροφία των σωληναρίων (εικόνα 14). Η εκσεσημασμένη απώλεια του νεφρικού παρεγχύματος παρατηρείται στη μία με δύο εβδομάδες [34, 54].



Εικόνα 14: Στάδια αποφρακτικής ουροπάθειας κατά το μοντέλο UUO. Από βιβλιογραφική αναφορά [54].

Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης του μοντέλου UUO για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης είναι πολλά. Είναι ένα εύκολα επαναλήψιμο ζωικό μοντέλο, κυρίως στα τρωκτικά. Δε χορηγείται τοξική ουσία και δεν εκτίθεται το ζώο σε ουραιμικό περιβάλλον, αφού ο άλλος νεφρός λειτουργεί κανονικά και αντισταθμίζει την έκπτωση λειτουργίας του απολινωμένου. Ο μη απολινωμένος νεφρός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως νεφρός της ομάδας ελέγχου. Το μοντέλο αυτό επιτρέπει τη δημιουργία διαφορετικής διάρκειας και διαφορετικού βαθμού απόφραξης, ακόμα και τη λύση της απόφραξης ώστε να μελετηθεί η περίοδος «ανάκαμψης» (recovery). Το μοντέλο της ετερόπλευρης απόφραξης ουρητήρα με νεφρεκτομή στον άλλο νεφρό επιτρέπει τη μέτρηση του ρυθμού πειραματικής διήθησης, τη μέτρηση ουρίας και κρεατινίνης και, την αξιολόγηση της πρωτεϊνουρίας του ζώου. Το μοντέλο UUO μπορεί να εφαρμοστεί και σε γενετικά τροποποιημένα ζώα [34].



Υπάρχουν κάποια θέματα τα οποία θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν χρησιμοποιείται το μοντέλο UUO στη μελέτη της νεφρικής ίνωσης. Η μελέτη της νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο αυτό πρέπει να γίνει σε πολλαπλούς χρόνους. **Πιθανά, τα ευρήματα που θα παρουσιαστούν στο νεφρό κατά την πρώτη βδομάδα απολίνωσης του ουρητήρα, θα εξαφανιστούν ή θα μειωθούν στη συνέχεια.** Είναι πολύ σημαντικό για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, το ότι υπάρχουν πολλές περιπτώσεις UUO στις οποίες παρατηρήθηκαν θεαματικές αλλαγές την 7<sup>η</sup> ημέρα και οι αλλαγές αυτές δεν παρατηρούνταν αργότερα ή υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν υπήρχαν θεαματικές αλλαγές την 7<sup>η</sup> ημέρα αλλά τροποποιούνταν τη 14<sup>η</sup> ή την 21<sup>η</sup> [55]. Επίσης, όταν χρησιμοποιείται ο νεφρός που δεν απολινώθηκε ως νεφρός της ομάδας ελέγχου θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι κυτταρικές, οι μεταβολικές και οι λειτουργικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν ως απάντηση στην ετερόπλευρη απόφραξη [34].

Μειονεκτήματα της χρησιμοποίησης του μοντέλου UUO είναι ότι το ζώο πρέπει να επιβιώσει του χειρουργείου, η μέθοδος πρόκλησης νεφρικής ίνωσης είναι επιθετική, η αντιρρόπηση της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας από τον αντίθετο νεφρό αποκλείει τη δυνατότητα αξιολόγησης δεικτών νεφρικής λειτουργίας (για παράδειγμα μέτρηση ουρίας και κρεατινίνης ορού) και, δεν μπορεί να γίνει εύκολα συλλογή ούρων από τον απολινωμένο νεφρό. Λόγω της μειωμένης νεφρικής αιματικής ροής που προκαλεί η ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα, πειράματα βάσει χρήσης θεραπευτικών σκευασμάτων θα πρέπει να αξιολογήσουν τους διαφορετικούς νεφρικούς ρυθμούς κατανομής [55].

## **6. Βιολογία Συστημάτων στη Νεφρική Ίνωση**

Βιολογία συστημάτων (Systems Biology) είναι η επιστήμη με την οποία η βιοϊατρική έρευνα γίνεται με καινούργιες προσεγγίσεις. Είναι μια διεπιστημονική μελέτη, βασισμένη στη βιολογία, που εστιάζει στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των βιολογικών συστημάτων, χρησιμοποιώντας ολιστικούς και όχι παραδοσιακούς τρόπους προσέγγισης. Ένας από τους κύριους στόχους της είναι να μοντελοποιήσει και να ανακαλύψει νέες ιδιότητες κυττάρων, ιστών και οργάνων που λειτουργούν σαν ένα σύστημα. Στις αρμοδιότητες της Βιολογίας Συστημάτων εμπίπτουν τα μεταβολικά δίκτυα και τα σηματοδοτικά μονοπάτια. Επομένως, με τη Βιολογία Συστημάτων έχεις την ικανότητα να λαμβάνεις και να αναλύεις σύνθετα σύνολα δεδομένων από πολλαπλές πειραματικές πηγές χρησιμοποιώντας διεπιστημονικά εργαλεία. Παραδείγματα προσεγγίσεων Βιολογίας Συστημάτων είναι η Γονιδιωματική (Genomics), η Πρωτεωμική (Proteomics), η Μεταγραφωμική (Transcriptomics), η Μεταβολωμική (Metabolomics), η Λιπιδωμική (Lipidomics), η Αλληλεπιδραστική

(Interactomics) και άλλα, τα οποία αποτελούν τεχνικές υψηλής απόδοσης (high throughput) με τις οποίες συλλέγονται δεδομένα ώστε να δημιουργηθεί ένα πιθανό μοντέλο.

Τα αίτια της Νεφρικής Νόσου είναι πολλά και ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκάλεσε, η εξέλιξή της συσχετίζεται με τη νεφρική ίνωση. Η συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας, που χαρακτηρίζει τη νεφρική ίνωση, αντικαθιστά το νεφρικό παρέγχυμα και οδηγεί σε προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας μέχρι την εμφάνιση τελικού σταδίου ΧΝΝ. Η νεφρική ίνωση είναι το τελικό αποτέλεσμα και ο κοινός παρονομαστής πολλών νεφρικών νοσημάτων και, όπως διαπιστώσαμε στα προηγούμενα κεφάλαια, είναι μια σημαντική, πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί κυτταρικοί μεσολαβητές, πολλοί μοριακοί μεσολαβητές και πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, που πολλές φορές αλληλεπιδρούν. Σαν πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία, η νεφρική ίνωση θα πρέπει να μελετηθεί με προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και, επομένως, η Πρωτεωμική Ανάλυση είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για το σκοπό αυτό ώστε, μέσω τεχνικής υψηλής απόδοσης (high throughput) μελέτης του πρωτεώματος, να συλλεχθούν δεδομένα για να ανακαλυφθούν και να μοντελοποιηθούν νέες ιδιότητες αλλά και, για να δημιουργηθούν πιθανά δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

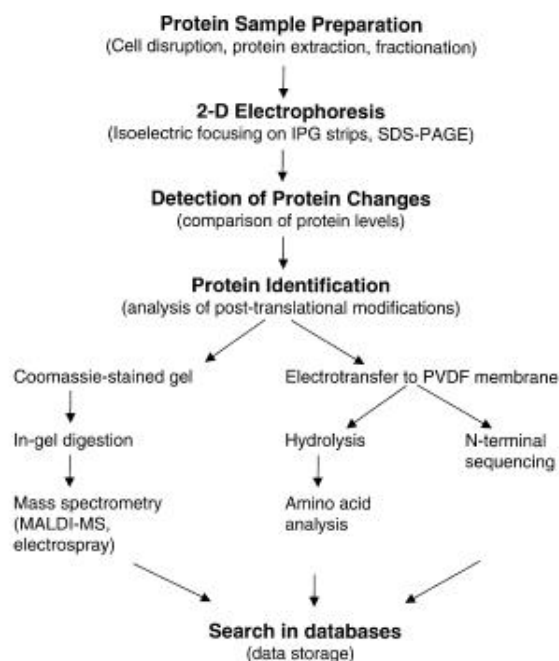
**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ**

**1. Τι είναι η Πρωτεωμική;**

**Πρωτέωμα** είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα οργανισμό, σε ένα όργανο, σε μια κυτταρική σειρά, σε ένα βιολογικό υλικό σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. **Πρωτεωμική** είναι μια επιστήμη που βασίζεται στην τεχνολογία και μελετά το πρωτέωμα, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, τις αλληλεπιδράσεις τους και κυρίως τις ποσοτικές τροποποιήσεις τους που είναι αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων ή εξωτερικών παραγόντων. Η διαφορά της από τις προηγούμενες τεχνικές μελέτης των πρωτεϊνών είναι ότι δεν αναλύει τις πρωτεΐνες μία προς μία αλλά, με ένα αυτοματοποιημένο τρόπο, τις αναλύει σε μεγάλη κλίμακα. Στόχος της Πρωτεωμικής είναι η υψηλής απόδοσης μελέτη του πρωτεώματος (high throughput), η διερεύνηση βιολογικών γεγονότων, η διαπίστωση βιολογικών δεικτών και η ανεύρεση νέων θεραπευτικών στόχων [57, 58].

**2. Τεχνική Πρωτεωμικής Ανάλυσης**

Αρχικά, γίνεται **απομόνωση και προετοιμασία του πρωτεϊνικού δείγματος**. Η Πρωτεωμική Ανάλυση αποτελείται κυρίως από δύο βήματα, το πρώτο είναι ο **διαχωρισμός των πρωτεϊνών**, κυρίως με ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις (2 Dimensional gel electrophoresis, 2D-E) και, το δεύτερο είναι η **ανάλυση των πρωτεϊνών και η ταυτοποίησή τους**, κυρίως με φασματομετρία μάζας αλλά και με ανάλυση αμινοξέων και αλληλούχιση αμινοτελικών άκρων. Η όλη διαδικασία στηρίζεται σε αναλυτικές τεχνικές και υποστηρίζεται από **λογισμικά προγράμματα** ταυτοποίησης πρωτεϊνών, προγράμματα ανάλυσης εικόνας, προγράμματα σύγκρισης και ποσοτικοποίησης και προγράμματα αποθήκευσης δεδομένων (εικόνα 15). Με τις νέες τεχνολογίες Πρωτεωμικής μπορούν να μελετηθούν η παραγωγή των πρωτεϊνών, οι πρωτεϊνικές αλλαγές, οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και η πρωτεϊνική δομή. Στις νέες τεχνολογίες περιλαμβάνονται το σύστημα διπλού υβριδίου στη ζύμη, οι μικροσυστοιχίες και η κρυσταλλογραφία υψηλής κλίμακας [57, 59, 60]. Για μεγαλύτερη ανάλυση, οι πρωτεΐνες μπορούν να εμπλουτιστούν πριν την 2D-E με διάφορες τεχνικές, για παράδειγμα με χρωματογραφία [57, 61].



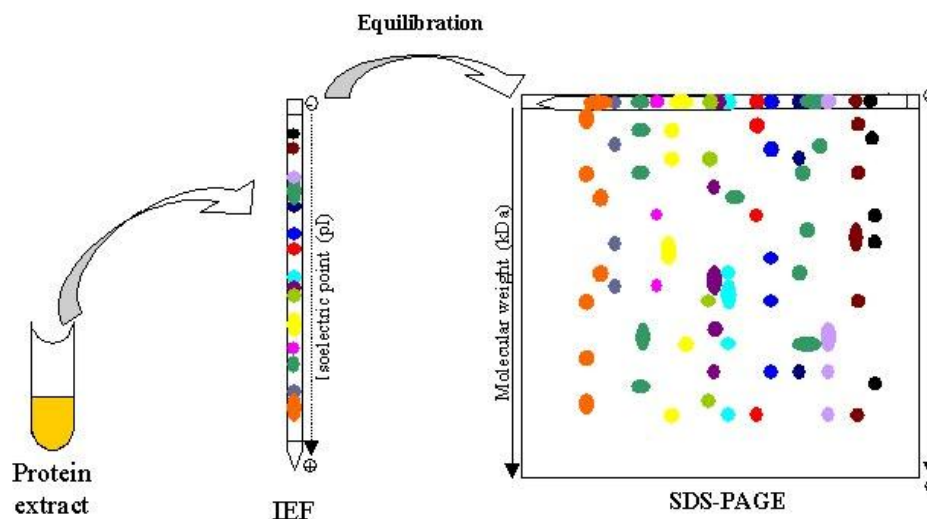
Εικόνα 35: Πρωτεωμική Ανάλυση. Από βιβλιογραφική αναφορά [57].

## 2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος

Η προσεκτική προετοιμασία του πρωτεϊνικού δείγματος που πρόκειται να αναλυθεί είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία της μεθόδου. Όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να γίνει εμπλουτισμός του δείγματος. Για να απεικονιστεί και να αναλυθεί μια πρωτεΐνη, πρέπει να είναι σε διάλυμα κατά τη διάρκεια όλης της δισδιάστατης διαδικασίας διαχωρισμού. Κατά το πρώτο βήμα εκχύλισης των πρωτεϊνών, για να γίνει διάλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ουσίες συμβατές με ισοηλεκτρική εστίαση, όπως η ουρία και το CHAPS. Κατά τη διαδικασία διαχωρισμού της πρώτης διάστασης, οι υδρόφοβες πρωτεΐνες ίσως καθιζάνουν οπότε, κατά την ισοηλεκτρική εστίαση πέραν της ουρίας και του CHAP, προστίθονται θειουρία [62] και νεότερες ουσίες [63].

## 2.2 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων γίνεται με 2D-E η οποία περιλαμβάνει την ισοηλεκτρική εστίαση, δηλαδή το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει των διαφορών τους στο φορτίο και, την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε ένα πορώδες πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου βάσει των διαφορών τους στη μοριακή μάζα (εικόνα 16) [57, 58].



Εικόνα 16: Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός. Από [http://www.seedproteome.com/index.php?rub= 2D\\_electrophoresis](http://www.seedproteome.com/index.php?rub= 2D_electrophoresis)

### 2.2.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση - 1<sup>η</sup> διάσταση

Η ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric focusing, IEF) είναι μια διαδικασία εξισορρόπησης κατά την οποία, υπό την επίδραση υψηλών ηλεκτρικών πεδίων, οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος μιας σταθερής κλίσης pH και εστιάζονται στη θέση όπου δεν έχουν φορτίο. Η IEF γίνεται με τη χρήση φορέων αμφολυτών ή με τη χρήση ακινητοποιημένης κλίσης pH (immobilized pH gradient, IPG).

Οι αμφολύτες είναι αμφοτερικές ενώσεις χαμηλής μοριακής μάζας, οι οποίες υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μετακινούνται και ευθυγραμμίζονται μεταξύ των ηλεκτροδίων. Με το σύστημα αυτό, μετακινείται τόσο το pH όσο και οι πρωτεΐνες. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει μεγάλη επαναληψιμότητα και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών είναι αξιόπιστη. Επειδή, όμως, η κλίση pH επηρεάζεται από το συνολικό ποσό των πρωτεϊνών που φορτώθηκαν, μόνο μικρή ποσότητα πρωτεϊνών μπορεί να εφαρμοστεί. Το εύρος pH που εφαρμόζεται είναι συνήθως μεταξύ 3 και 10 [57].

Η IPG δημιουργείται από παράγωγα ακρυλαμιδίου που λέγονται «ακινητοποιήνες» (immobilines). Είναι ασθενή οξέα και ασθενείς βάσεις, με ικανότητα ρυθμιστικού διαλύματος, συμπολυμερίζονται με την ακρυλαμίδα και σταθεροποιούνται σε πλαστική επιφάνεια. Με αυτό το σύστημα, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, η κλίση pH δε μετακινείται αλλά μετακινούνται μόνο οι φορτισμένες πρωτεΐνες, οι οποίες εστιάζονται κατά μήκος της IPG. Οι ταινίες IPG είναι εμπορικά διαθέσιμες, έχουν είτε μικρό είτε μεγάλο εύρος pH, αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην κατάψυξη ακόμα και μετά την πρώτη διάσταση και μπορεί να εφαρμοστεί μια σχετικά μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών σε αυτές [57, 64]

### 2.2.2 Ηλεκτροφόρηση βάσει Μοριακού Βάρους - 2<sup>η</sup> διάσταση

Η δεύτερη διάσταση είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους, πάνω σε πορώδη πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης διάστασης προστίθεται το ανιονικό διάλυμα SDS (sodium dodecyl sulfate) ώστε οι πρωτεΐνες να φορτιστούν αρνητικά. Χρησιμοποιούνται πηκτώματα σταθερής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης ή πηκτώματα κλίσης. Απεικονίζονται πρωτεΐνες με μοριακή μάζα από 5 μέχρι 200 kDa. Η χρήση μεγάλων πηκτωμάτων διευκολύνει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό χιλιάδων πρωτεϊνικών κηλίδων. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες χρωματίζονται με τη χρωστική Coomassie όταν τα πηκτώματα θα χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματογράφο μάζας, είτε με τη χρωστική Silver όταν τα πηκτώματα πρόκειται μόνο να συγκριθούν [57, 58].

### 2.2.3 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης

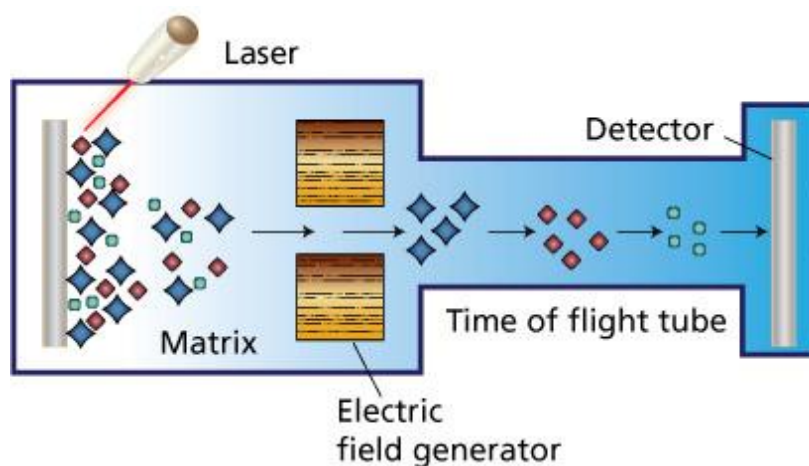
Το κυριότερο πλεονέκτημα της 2D-E είναι ότι είναι η μόνη μέθοδος που, μέχρι σήμερα, έχει την ικανότητα για ταυτόχρονο διαχωρισμό και απεικόνιση χιλιάδων άγνωστων πρωτεϊνών σε ακέραιη μορφή και όχι σε μορφή πεπτιδίων. Η καλή προετοιμασία του πρωτεϊνικού δείγματος θα οδηγήσει στην επιτυχία της μεθόδου. Οι περιορισμοί της είναι ότι μόνο τα κύρια τμήματα του πρωτεϊνικού μείγματος μπορούν να απεικονιστούν. Για να ανιχνευτούν οι πρωτεΐνες που είναι στο μείγμα σε χαμηλή συγκέντρωση (low-abundance proteins) θα πρέπει να γίνει εμπλουτισμός πριν τη 2D-E. Η ανίχνευση πρωτεϊνών πολύ χαμηλού ή πολύ υψηλού μοριακού βάρους ή βασικών και υδρόφοβων πρωτεϊνών δεν είναι ικανοποιητική [57].

## 2.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Το δεύτερο βήμα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών και η ταυτοποίησή τους και, συνήθως, γίνεται με τεχνικές φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS) (Εικόνα 17). Η φασματομετρία μάζας γίνεται σε αέρια φάση σε ιονισμένους αναλύτες (analytes). Ένας φασματογράφος μάζας περιλαμβάνει την **πηγή ιονισμού**, τον **αναλυτή μάζας** που μετρά το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ) των ιονισμένων αναλυτών και τον **ανιχνευτή** που καταγράφει τον αριθμό των ιόντων σε κάθε τιμή  $m/z$ . Οι πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια ιονίζονται με **Electrospray ionization (ESI)** ή με **Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)**. Αναλυτές μάζας είναι η παγίδα ιόντων, ο **αναλυτής**

που μετρά το χρόνο πτήσης των ιόντων (time-of-flight, TOF), το τετράπολο (quadrupole) και ο αναλυτής Fourier transform ion cyclotron (FT-MS) [65].

Οι πρωτεϊνικές κηλίδες από το πήκτωμα αφαιρούνται είτε με το χέρι είτε αυτοματοποιημένα. Για τη δημιουργία πεπτιδίων, η πρωτεϊνική κηλίδα υποβάλλεται σε πέψη, συνήθως με θρυψίνη. Το πρωτεϊνικό δείγμα αναμειγνύεται πάνω σε ειδική επιφάνεια (plate, chip) με ένα μικρό οργανικό μόριο (matrix), το οποίο απορροφά ενέργεια στο μήκος κύματος που εκπέμπει το λέιζερ, ξηραίνεται και σχηματίζονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια, (εικόνα 17) γίνεται ιονισμός των κρυστάλλων και συνηθέστερα, χρησιμοποιείται το MALDI-TOF-MS ώστε η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών να γίνει βάσει αποτύπωσης πεπτιδικής μάζας (Peptide mass fingerprinting, PMF). Οι μάζες των πεπτιδίων που δημιουργήθηκαν μετρώνται αυτόματα από το μηχάνημα. Οι πεπτιδικές μάζες συγκρίνονται με τις θεωρητικές μάζες όλων των γνωστών πρωτεϊνών από όλες τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε διακομιστές (servers) και είναι διαθέσιμα στον ερευνητή [57, 65].



Εικόνα 17: Φασματογράφος Μάζας. Από <http://www.sigmaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/qc-qa/qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>

### 3. Πρωτεωμική Ανάλυση στη Νεφρική Ίνωση-Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Παρά την αλματώδη πρόοδο της επιστήμης, η κατανόηση της παθογένειας πολλών νοσημάτων και η ικανότητα έγκαιρης διάγνωσης και αποτελεσματικής θεραπείας τους παραμένει ελλιπής.

Η νεφρική ίνωση είναι το τελικό αποτέλεσμα, ο κοινός παρονομαστής πολλών νεφρικών νοσημάτων και οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια. Η διαπίστωση της αιτίας που προκάλεσε τη νεφρική νόσο, ο σχεδιασμός της θεραπευτικής προσέγγισης και η αναγνώριση του ρυθμού εξέλιξης του νοσήματος γίνεται, συνήθως, έμμεσα με αξιολόγηση του συνδυασμού των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων. Όμως, η ακριβής διάγνωση της αιτίας και ο αξιόπιστος

τρόπος αναγνώρισης του ρυθμού εξέλιξης γίνεται μόνο με τη βιοψία νεφρού. Η **βιοψία νεφρού**, παρά τη μεγάλη διαγνωστική αξία που διαθέτει, είναι μια μέθοδος επεμβατική, παρουσιάζει αντενδείξεις για τη διενέργειά της (επομένως, δε μπορεί να διενεργηθεί σε όλους τους ασθενείς) και, παρουσιάζει επιπλοκές, η συχνότητα των οποίων μπορεί να είναι μικρή (μικρότερη του 1%), η σημαντικότητά τους, όμως, είναι μεγάλη, αφού, μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία, ακόμα και σε θάνατο [66]. Διαπιστώνουμε, λοιπόν, ότι η ανάγκη τόσο για την κατανόηση του μηχανισμού της νεφρικής ίνωσης όσο και η ανάγκη για ανεύρεση μη επεμβατικών βιοδεικτών, οι οποίοι θα μπορούν να κάνουν έγκαιρη διάγνωση, θα μπορούν να προβλέπουν την εξέλιξη του νοσήματος αλλά και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, είναι επείγουσες [67, 68]. **Ιδανικός νεφρικός βιοδείκτης** είναι αυτός ο οποίος μπορεί να μετρηθεί εύκολα, με ακρίβεια και επαναληψιμότητα και δεν είναι επεμβατικός. Πρέπει με ευαισθησία να εντοπίζει τη νεφρική βλάβη ή την απάντηση στη θεραπεία, πρέπει να παρέχει χρήσιμες και χωρίς μεγάλο κόστος κλινικές πληροφορίες οι οποίες θα είναι εύκολο να αξιολογηθούν, πρέπει να δίνει πληροφορίες ικανές να αθροιστούν στους συμβατικούς κλινικούς παράγοντες, πρέπει να αναγνωρίζει και να διαχωρίζει τους τύπους νεφρικής βλάβης και πρέπει να μπορεί να εφαρμοστεί στον γενικό πληθυσμό ανεξάρτητα φύλου, φυλής και ηλικίας [69, 70].

Η μελέτη της νεφρικής ίνωσης με Πρωτεωμική εφαρμόστηκε, μέχρι σήμερα, σε κυτταρικές καλλιέργειες, σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό. Με την Πρωτεωμική, η ανεύρεση νέων εργαλείων ανίχνευσης νοσήματος πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων (screening) και ταυτοποίησης πρωτεϊνών στα υγρά του σώματος, γίνεται εφικτή. Βάσει της υπόθεσης ότι οι παθοφυσιολογικές αλλαγές στο νεφρό οδηγούν σε τροποποιήσεις των πρωτεϊνών των ούρων, η Πρωτεωμική Ανάλυση των ούρων αποδεικνύεται νέο εργαλείο για την ανεύρεση νεφρικών βιοδεικτών μέσω της σύγκρισης του πρωτεώματος των ούρων φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων [71, 72].

### **3.1 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης σε κυτταρικές σειρές**

Για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης με Πρωτεωμική Ανάλυση, οι ερευνητές μελέτησαν ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστών (HLF-1), διάμεσους ινοβλάστες αρουραίου (NRK-49F), ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου (HK-2) και μεσαγγειακά κύτταρα ζώων και ανθρώπου.

Οι Malmstrom J και συνεργάτες χρησιμοποιώντας 2D-E και MS απέδειξαν σε σεσημασμένα με [ $S^{35}$ ]-Μεθειονίνη ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστών (HLF-1 κύτταρα) ότι ο



TGF-β επάγει τροποποίηση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών προς μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο [73].

Στη συνέχεια, ο Kang JH και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν Πρωτεωμική Ανάλυση (2D-E και ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MALDI-TOF/MS) σε επαγόμενους από τον TGF-β νεφρικούς διάμεσους ινοβλάστες αρουραίου (NRK-49F κύτταρα) στους οποίους χορήγησαν ασκοφουρανόνη, ένα αντιβιοτικό με αντινεοπλασματική δραστηριότητα και πιθανή αντι-ινωτική δράση. Διαπίστωσαν 74 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης και, επίσης, έδειξαν ότι η ασκοφουρανόνη καταστέλλει προϊνωτικούς παράγοντες, κάνοντάς την, έτσι, υποψήφιο αντιϊνωτικό θεραπευτικό σκεύασμα [74]. Στην ίδια κυτταρική σειρά, οι Shakib K και συνεργάτες μελέτησαν το πυρηνικό πρωτέωμα μετά από έκθεση σε συνθήκες υποξίας [75].

Οι Chen YX και συνεργάτες χορήγησαν TGF-β1 σε ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου (HK-2 κύτταρα) για να προκαλέσουν EMT, απομόνωσαν φωσφοπρωτεΐνες και, στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την τεχνική iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) τις επεξεργάστηκαν με 2D-nano-HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography). Διαπίστωσαν 38 διαφορεικά εκφραζόμενες φωσφοπρωτεΐνες και απέδειξαν την μετα-μεταφραστική ρύθμιση του TGF-β στην EMT στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα. Στη μελέτη αυτή, η φωσφορυλιωμένη calreticulin εμφανίστηκε μειωμένη [76]. Στην ίδια κυτταρική σειρά, οι So EJ και συνεργάτες εφάρμοσαν Πρωτεωμική Ανάλυση με 2D-E και ESI-Q-TOF MS/MS (Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight) αφού καλλιέργησαν τα κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης [77].

Πρωτεωμική Ανάλυση εφαρμόστηκε και σε μεσαγγειακά κύτταρα ζώων και ανθρώπου. Μελετήθηκαν με 2D-E και MALDI-TOF-MS μεμβρανικά και πυρηνικά υποπρωτεώματα μεμονωμένων μεσαγγειακών κυττάρων αρουραίου σε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, μελετήθηκαν με 2D-E με ανάλυση με το λογισμικό πρόγραμμα DeCyder ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα σε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης και, επίσης, μελετήθηκε με 2D-E και MALDI-TOF-MS η επίδραση των υπολιπιδαιμικών στατινών στη συσπαστικότητα των μεσαγγειακών κυττάρων ποντικού σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης [78-80].

### **3.2 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης σε ζωικά μοντέλα**

Για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης με Πρωτεωμική Ανάλυση, οι ερευνητές μελέτησαν ζωικά μοντέλα σακχαρώδους διαβήτη, μοντέλο προοδευτικής νεφρικής ανεπάρκειας με 5/6 νεφρεκτομή, μοντέλα διάμεσης ίνωσης και ατροφίας σωληναρίων (interstitial fibrosis tubular atrophy, IFTA) και μοντέλα UUO.

Οι Barati MT και συνεργάτες μελέτησαν με 2D-E και MALDI-TOF-MS το πρωτέωμα των σπειραμάτων db/db διαβητικών ποντικών και το συνέκριναν με το πρωτέωμα των σπειραμάτων db/m μη διαβητικών ποντικών. Με τα αποτελέσματά τους, προτείνουν την ύπαρξη αντιδραστικής απόκρισης στο οξειδωτικό στρες [81]. Οι Thongboonkerd V και συνεργάτες μελέτησαν το νεφρικό πρωτέωμα διαβητικών τύπου 1 OVE26 ποντικών με 2D-E και MALDI-TOF-MS. Με τα αποτελέσματά τους προτείνουν ότι, η ελαστίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ίνωσης που προκαλείται από τον Σακχαρώδη Διαβήτη και, επίσης, διαπιστώνουν αυξημένη έκφραση δεικτών μυοϊνοβλαστών, προτείνοντας, έτσι, ότι οι μυοϊνοβλάστες συμμετέχουν στη συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας [82]. Οι Gong D και συνεργάτες ανέλυσαν το νεφρικό πρωτέωμα διαβητικών τύπου 1 ποντικών από στρεπτοζοκίνη (STZ) με iTRAQ σε συνδυασμό με MudPIT (Multidimensional Protein Identification) και διαπίστωσαν 330 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες σε σχέση με το πρωτέωμα των ζώων της ομάδας ελέγχου [83].

Η υφολική (5/6) νεφρεκτομή, εξαιτίας της αναπροσαρμογής του νεφρού με υπερδιήθηση, προκαλεί Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκήρυνση (Focal Segmental Glomerulosclerosis, FSGS). Χρησιμοποιώντας το μοντέλο αυτό (sNPX) στους αρουραίους, οι Xu BJ και συνεργάτες μελέτησαν το πρωτεϊνικό προφίλ της FSGS. Χρησιμοποιώντας την τεχνική Laser Capture Microdissection απομόνωσαν σκληρυντικά και μη σκληρυντικά σπειράματα από τους αρουραίους και με MALDI-TOF MS ανάλυση έκαναν σύγκριση των πρωτεωμάτων αυτών με το πρωτέωμα φυσιολογικών σπειραμάτων από τα ζώα ελέγχου. Προτείνουν ότι, στα μη σκληρυντικά σπειράματα, παρατηρείται ενεργοποίηση προσκληρυντικών μηχανισμών και επιπρόσθετα, η θυμοσίνη β4 αναγνωρίστηκε ως σημαντική πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μηχανισμό της σπειραματοσκήρυνσης [84]. Στην προσπάθειά τους να ανιχνεύσουν βιοδείκτες της FSGS, οι Shui HA και συνεργάτες μελέτησαν με 2D-E και MALDI-TOF-MS το πρωτέωμα των ούρων από Balb/c ποντίκια στα οποία ενέθηκε η νεφροτοξική αδριαμυκίνη και διαπιστώθηκαν 37 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες [85].

Χρησιμοποιώντας το μοντέλο IFTA σε αρουραίους, ο Reuter S και συνεργάτες με DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) και MS έκαναν σύγκριση στο πρωτέωμα νεφρικών μοσχευμάτων με και χωρίς σωληναριοδιάμεση ίνωση και ατροφία σωληναρίων διαπιστώνοντας, έτσι, διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια [86]. Στο μοντέλο UUO, οι Giannakis E και συνεργάτες σε αρσενικά ποντίκια C57B6J-129SV εφάρμοσαν 2D-E και ανάλυση με SELDI-TOF MS (Surface-enhanced Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight). Διαπίστωσαν 21 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες αποδεικνύοντας ότι, μόρια γνωστά για τη συμμετοχή τους σε ανοσολογικά νεφρικά

νοσήματα, για παράδειγμα η **α-ενολάση**, παρουσιάζουν και επιπρόσθετους ρόλους στην παθογένεια των νοσημάτων και πιο συγκεκριμένα της νεφρικής ίνωσης [87].

Τέλος, στο μοντέλο UUO, **οι Kypreou KP και συνεργάτες** εφάρμοσαν Πρωτεωμική Ανάλυση με 2D-E και MALDI-TOF-MS στο νεφρικό φλοιό αρουραίων. Η περιγραφή της μελέτης αυτής, στα ευρήματα της οποίας βασίστηκε αυτή η Διπλωματική Μελέτη, θα ακολουθήσει στην ξεχωριστή ενότητα 4 στη συνέχεια. Περιληπτικά, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η **calreticulin**, μια πολυλειτουργική, δεσμεύουσα-το-ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ίνωσης και μάλιστα στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα [56].

### **3.3 Πρωτεωμική Ανάλυση Νεφρικής Ίνωσης στον άνθρωπο**

Η Πρωτεωμική Ανάλυση των νεφρικών νοσημάτων στον άνθρωπο μπορεί να εφαρμοστεί είτε στο νεφρικό ιστό είτε στα ούρα. Οι περισσότερες μελέτες Πρωτεωμικής εστιάζονται στα υγρά του σώματος εξαιτίας της εύκολης συλλογής τους. Επομένως, το **πρωτέωμα των ούρων** μελετάται, πλέον, σχεδόν σε όλα τα νεφρικά νοσήματα με στόχο την ανεύρεση ιδανικού νεφρικού βιοδείκτη. Παρά την ευκολία στη λήψη και συλλογή τους, τα ούρα παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Στα ούρα εμφανίζονται μόρια που δε συσχετίζονται αποκλειστικά με τη νεφρική βλάβη, αφού στα ούρα απαντώνται μόρια και κύτταρα από όλο το ουροποιητικό σύστημα αλλά και προερχόμενα εξαιτίας συστηματικών νοσημάτων. Επιπρόσθετα, ο νεφρός είναι ένα πολύπλοκο όργανο με πολλά τμήματα και η παθολογία στα ούρα δεν αντικατοπτρίζει συγκεκριμένη ανατομική θέση βλάβης. Παρά την ύπαρξη των μειονεκτημάτων αυτών, η Πρωτεωμική Ανάλυση στα ούρα είναι διαδεδομένη [88].

Στον αντίποδα, η **Πρωτεωμική Ανάλυση στο νεφρικό ιστό** δε θεωρείται απλή αφού ο νεφρικός ιστός παραλαμβάνεται με βιοψία νεφρού, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, είναι επεμβατική και με πιθανότητα επιπλοκών. Επίσης, η Πρωτεωμική Ανάλυση σε όλο το νεφρικό ιστό (whole kidney proteomic analysis) δεν παρέχει πληροφορίες αναφορικά με την εντόπιση της βλάβης. Το μελλοντικό βήμα στην μελέτη του νεφρικού πρωτεώματος είναι η μελέτη συγκεκριμένων νεφρικών τμημάτων ή ακόμα και συγκεκριμένων νεφρικών κυττάρων (για παράδειγμα κυττάρων της παρασπειραματικής συσκευής) μετά από Laser Microdissection. Με την τεχνική αυτή, μπορείς να κάνεις σύγκριση του ίδιου κυτταρικού υλικού αλλά και, με επαναληψιμότητα, μπορείς να αφαιρέσεις συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων ώστε να ανιχνεύσεις εκατοντάδες έως χιλιάδες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας υψηλής ευκρίνειας MS (high-resolution MS). Τμήματα νεφρού μπορούν να απομονωθούν

με διάφορες τεχνικές, για παράδειγμα η απομόνωση των σπειραμάτων μπορεί να γίνει με τεχνικές μηχανικής διήθησης, με εμβολισμό μαγνητικών σφαιριδίων στα τριχοειδή του σπειράματος και στη συνέχεια με μαγνητική ταξινόμηση ή με χειροκίνητη διατομή κάτω από μικροσκόπιο [88].

Οι Sharma K και συνεργάτες εφάρμοσαν σε ούρα από ασθενείς με κλινική διαβητική νεφροπάθεια 2D-DIGE και ανάλυση με το λογισμικό DeCyder. Διαπίστωσαν 99 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες. Με SELDI-TOF MS αναγνώρισαν την α1-αντιθρυψίνη από μία πρωτεϊνική κηλίδα ενδιαφέροντος και με ανοσοφθορισμό απέδειξαν την υπερέκφραση της α1-αντιθρυψίνης σε περιοχές νεφρικής ίνωσης [71].

Οι Park MR και συνεργάτες δημιούργησαν ένα πρωτεωμικό χάρτη της IgA Νεφροπάθειας στον οποίο υπάρχουν 59 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [89], ενώ μια άλλη πρωτεωμική μελέτη ούρων προτείνει ότι μπορεί να γίνει διαφορετική διάγνωση της ενεργούς από την ανενεργή νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου με 92% ειδικότητα [69].

Οι Wittke S και συνεργάτες ανέλυσαν με CE-MS (Capillary Electrophoresis coupled to Mass Spectrometry) ούρα ασθενών με οξεία απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος και το πεπτιδικό προφίλ που προέκυψε, προτείνουν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα μη επεμβατικό εργαλείο παρακολούθησης μεταμοσχευμένων ασθενών [90]. Οι Quintana LF και συνεργάτες εφάρμοσαν Πρωτεωμική Ανάλυση σε ούρα από ασθενείς με χρόνια απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος και συνέκριναν το πρωτέωμα αυτό με το πρωτέωμα ούρων της ομάδας ελέγχου. Προτείνουν ότι η Πρωτεωμική ούρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μη επεμβατικό διαγνωστικό εργαλείο μελέτης της χρόνιας δυσλειτουργίας του νεφρικού μοσχεύματος [91]. Οι Banon-Maneus E και συνεργάτες δημιούργησαν ένα πρωτεωμικό χάρτη από ούρα μεταμοσχευμένων σταθεροποιημένων ασθενών και επιπρόσθετα χρησιμοποίησαν την 2D-DIGE και ταυτοποίησαν 19 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την παρακολούθηση της διάμεσης ίνωσης και της σωληναριακής ατροφίας των μεταμοσχευμένων ασθενών [72].

Οι Sethi S και συνεργάτες απομόνωσαν από νεφρικό βιοπτικό υλικό με την τεχνική της Laser Microdissection σπειράματα από ασθενείς με Μεμβρανοϋπερπλαστική Σπειραματονεφρίτιδα τύπου I, II και III και χρησιμοποίησαν LC-MS για να μελετήσουν το πρωτέωμα των σπειραμάτων και ταυτοποίησαν 45 πρωτεΐνες [92].

#### 4. «Η έκφραση της calreticulin τροποποιείται κατά τη δημιουργία της ίνωσης»

Το 2008, στο τεύχος 8 του *Proteomics* δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα της έρευνας των Κυργεου PK και συνεργατών, η οποία έγινε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Σκοπός της μελέτης ήταν να κατανοηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της ίνωσης.

Μελέτησαν τις αλλαγές του πρωτεωμικού προφίλ νεφρικού φλοιού σε μοντέλο UUO από αρουραίο στις 2 ημέρες και στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα. Η Πρωτεωμική Ανάλυση έγινε με 2D-E και MALDI-TOF/TOF-MS. Επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της υπερέκφρασης της calreticulin βιοχημικά και μορφολογικά, μελέτησαν τα ευρήματα αυτά σε άλλα ζωικά μοντέλα ίνωσης αλλά και σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων εγγύς σωληναρίου υπό την επίδραση αλλαγών της συγκέντρωσης του TGF-β.

Διαπίστωσαν ότι, η υπερέκφραση της calreticulin συσχετίζεται με την πρόοδο της ινωτικής διεργασίας. Επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση της calreticulin στο νεφρικό ιστό τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης με Western Blot, όσο και σε επίπεδο mRNA, με RT-PCR. Η ανοσοϊστοχημεία στο νεφρικό ιστό των αρουραίων έδειξε ότι η υπερέκφραση της calreticulin συμβαίνει από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας και κυρίως στα επιθηλιακά σωληναρικά κύτταρα. Επίσης, έδειξαν ότι ο TGF-β προκαλεί υπερέκφραση της calreticulin σε καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου.

Οι Κυργεου PK και συνεργάτες είναι οι πρώτοι που μελέτησαν το πρωτεωμικό προφίλ του νεφρικού φλοιού στο μοντέλο UUO και, είναι οι πρώτοι που συσχετίζουν την calreticulin με την ίνωση. Τονίζουν ότι ο μηχανισμός με τον οποίο η calreticulin συμμετέχει στην παθογένεια της ίνωσης παραμένει να διευκρινιστεί [56].

##### 4.1 Τι είναι η calreticulin;

Η calreticulin, με μοριακό βάρος 46 kDa, είναι μια δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ER που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, στις οποίες περιλαμβάνεται και η λειτουργία της σαν πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone) [93].

Σαν **πρωτεΐνη-συνοδός**, δεσμεύεται στις πρωτεΐνες που μόλις συνετέθησαν, προλαμβάνοντας τη συσσώρευσή τους και συμμετέχοντας στη σωστή αναδίπλωσή τους. Σαν **ρυθμιστής της ομοιοστασίας του ασβεστίου**, η calreticulin δεσμεύει μεγάλες ποσότητες ασβεστίου και επιδρά στην ικανότητα του ER, αφού το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του ER στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, στην απόπτωση, στη σύνθεση λιπιδίων και στεροειδών και σε άλλες

λειτουργίες. Η υπερέκφραση της calreticulin αυξάνει το περιεχόμενο του ER σε ασβέστιο [93, 94].

Η calreticulin είναι **διαφορικά εκφραζόμενη κάτω από φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες**. Χαμηλά επίπεδα calreticulin απαντώνται σε κάποιους ιστούς, για παράδειγμα στην καρδιά, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο, ενώ, υψηλά επίπεδα calreticulin απαντώνται σε άλλους, για παράδειγμα στο πάγκρεας και στο ήπαρ, ή μετά από ER stress. Το γονίδιο της calreticulin βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο **πολλών μεταγραφικών παραγόντων**, οι οποίοι αποδεικνύονται σημαντικοί κατά την εμβρυογένεση. Η έλλειψη λειτουργίας της calreticulin κατά την εμβρυογένεση είναι θνησιγενής αφού διαταράσσει την μυοϊνογένεση και τα έμβρυα εμφανίζουν διαταραχές στα καρδιακά τοιχώματα. Η υπερέκφραση της calreticulin στην καρδιά προκαλεί λεπτά και διατεταμένα καρδιακά τοιχώματα, πλήρη κολποκοιλιακό αποκλεισμό και αιφνίδιο θάνατο [93-96].

Τα τελευταία χρόνια, διαπιστώθηκε ότι εκτός από το **ER**, η calreticulin εκφράζεται στην **κυτταρική επιφάνεια**, στο **κυτταρόπλασμα** και **μέσα στον πυρήνα**. Η calreticulin στην κυτταρική επιφάνεια συμμετέχει στον αντιγονοπαρουσιασμό, στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων και στην επούλωση των τραυμάτων. Στο κυτταρόπλασμα, η calreticulin δεσμεύεται στο κυτταροπλασματικό άκρο των α-ιντεγκρινών και λειτουργεί ως ενεργοποιητής τους και ως σηματοδότης μεταξύ ιντεγκρινών και καναλίων ασβεστίου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αλληλεπιδρά άμεσα με υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και αλατοκορτικοειδών και στον πυρήνα, αποτελεί συστατικό της πυρηνικής μήτρας των κυττάρων σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα και δεσμεύεται σε ιστόνες [93, 94-97].

Η calreticulin συμμετέχει σε μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών και βιολογικών διεργασιών, και παρά τη δυσκολία στην ερμηνεία του μηχανισμού δράσης της, θεωρείται πολυλειτουργική πρωτεΐνη που επηρεάζει πολλές διεργασίες σε επίπεδο κυττάρου, οργάνου και οργανισμού. Συμμετέχει σε ανοσολογικά και νευροεκφυλιστικά νοσήματα, στον καρκίνο, στην απόπτωση, στην αγγειογένεση, στην επούλωση τραυμάτων, στην καρδιογένεση, στη εμβρυική ανάπτυξη, στη δημιουργία του λιπώδους ιστού, στη δημιουργία του σκελετικού συστήματος, στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος [93-95] και στην ίνωση [56].

#### **4.1.1 Calreticulin και επιθηλιακά κύτταρα**

Για να διερευνηθούν την επίδραση της υπερέκφρασης της calreticulin στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα, οι Hayashida Y και συνεργάτες χρησιμοποίησαν νεφρικά κύτταρα MDCK (Madin-Darby canine kidney) στα οποία υπερέκφρασαν calreticulin με διαμόλυνση.

Έδειξαν ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin τροποποιούν τη μορφολογία τους, καταστρέφεται ο επιθηλιακός τους φαινότυπος, **καταστέλλεται η έκφραση της E-Cadherin** τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA και, αυξάνεται η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών. Πιθανολογούν, έτσι, ότι η calreticulin συμμετέχει στο φαινόμενο της EMT. Στη συνέχεια, δείχνουν ότι ο **μεταγραφικός παράγοντας Slug υπερεκφράζεται** στα κύτταρα αυτά, δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου της E-Cadherin και καταστέλλει την έκφρασή της [96].

Για να μελετήσουν τη σχέση της calreticulin με το κανάλι Νατρίου (Epithelial Sodium Channel, ENaC), οι Sugahara T και συνεργάτες χρησιμοποίησαν καλλιεργημένα CHO-K1 κύτταρα τα οποία διαμόλυναν με την α-υπομονάδα του ENaC, ή με τη β-υπομονάδα, ή με τη γ-υπομονάδα ή και με τις 3 υπομονάδες. Το ENaC στο νεφρό βρίσκεται **στην αυλική επιφάνεια των σωληναριακών κυττάρων του άπω νεφρώνα**, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της ορμόνης αλδοστερόνης και συμμετέχει στην επαναρρόφηση νατρίου. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση της calreticulin, πιθανά μέσω της δράσης της σαν λεκτίνη, αυξάνει την ενδοκυττάρια έκφραση και των τριών υπομονάδων του ENaC, με αποτέλεσμα να **αυξάνει την έκφραση του ENaC στην επιφάνεια του κυττάρου**. Με ανοσοκατακρήμιση, έδειξαν ότι η calreticulin αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες του ENaC και, στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την ποντικίσια κυτταρική σειρά φλοιώδους αθροιστικού σωληναρίου M-1 την οποία διαμόλυναν με calreticulin, έδειξαν ότι η calreticulin **αυξάνει τη δραστηριότητα του ENaC** [97].

#### 4.1.2 Calreticulin και ινοβλάστες-ECM

Για να διερευνήσουν την επίδραση της calreticulin στη ρύθμιση της κυτταρικής ικανότητας για προσκόλληση (adhesiveness), οι Fadel MP και συνεργάτες [98] χρησιμοποίησαν ποντικίσιους L ινοβλάστες που εξέφραζαν διαφορετικά calreticulin. Διαπίστωσαν ότι η calreticulin αύξησε την ικανότητα για προσκόλληση των κυττάρων και αύξησε την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών. Στους ινοβλάστες που υπερέκφραζαν calreticulin, τα επίπεδα της **φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών στην τυροσίνη** ήταν μειωμένα. Όπως προαναφέρθηκε, στις διακυττάρια συνδέσεις οι Cadherins συνδέονται με τον κυτταροσκελετό μέσω των πρωτεϊνών της οικογένειας των Catenins και, η εντόπιση και η λειτουργία της β-Catenin εξαρτάται από το βαθμό της φωσφορυλίωσής της. Στη μελέτη αυτή, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδευόταν με μειωμένη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη της β-Catenin. Η αποφωσφορυλιωμένη β-Catenin δε διασπάται στο πρωτεάσωμα,

συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, εισέρχεται στον πυρήνα όπου μέσω μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων [41, 44, 98].

Ινοβλάστες που υπερεκφράζουν calreticulin παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα mRNA ινωδονεκτίνης και **αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση ECM**. Στο ER, η calreticulin ρυθμίζει τη μήτρα ινωδονεκτίνης μέσω ρύθμισης της ενδοκυττάριας σηματοδότησης ασβεστίου. Η έκφραση των MMPs σε ζωικά μοντέλα εξαρτάται από την calreticulin μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών της ERK και της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Η κυτταροπλασματική calreticulin σταθεροποιεί την προσκόλληση στο κολλαγόνο μέσω σύνδεσής της με την κυτταροπλασματική ουρά των α-ιντεγκρινών και, πιθανά, **ρυθμίζει την αναδόμηση της ECM** μέσω της άμεσης σύνδεσής της με τα μόρια της ECM (κολλαγόνο τύπου I, III και V) και με τους κυτταρικούς υποδοχείς προσκόλλησης [99]. Οι Van Duyne Graham L και συνεργάτες, για να μελετήσουν το ρόλο της calreticulin στη ρύθμιση της έκφρασης των ινιδίων κολλαγόνου, στην έκκρισή του, στην επεξεργασία του και στην εναπόθεσή του στην ECM, χρησιμοποίησαν ινοβλάστες με διαφορετική έκφραση calreticulin. Διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση calreticulin οδηγεί σε **αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου I** τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η υποέκφραση της calreticulin συσχετίζεται με συσσώρευση του κολλαγόνου τύπου I στο ER, με μειωμένη εναπόθεσή του στην ECM και με μειωμένη παραγωγή ινωδονεκτίνης. Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι η ενδοκυττάρια calreticulin ρυθμίζει σε πολλαπλά επίπεδα την επεξεργασία του κολλαγόνου τύπου I, δηλαδή την έκφρασή του, τη μετακίνησή του και την **εναπόθεσή του στην ECM** [99].



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ 14-3-3**

**1. Τι είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3;**

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι μία οικογένεια, συντηρημένων κατά την εξέλιξη, όξινων πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 28-33 kDa που εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα πρωτεϊνικών στόχων, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και να δημιουργούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Εξαιτίας της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών, για παράδειγμα στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στην απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA και σε πολλές άλλες [100].

**1.1 Προέλευση ονομασίας**

Το ασυνήθιστο όνομά τους προέρχεται από το πρότυπο μετανάστευσής τους στη δισδιάστατη DEAE (Διαιθυλαιθανολαμίνη) - χρωματογραφία κυτταρίνης και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αμύλου. Εκλούνται από το 14<sup>ο</sup> κλάσμα ομογενοποιημένου βόειου εγκεφάλου και βρίσκονται στις θέσεις 3.3 στην ηλεκτροφόρηση [101].

**1.2 Γονίδια πρωτεϊνών 14-3-3, ισομορφές πρωτεϊνών 14-3-3**

Οι κατώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν μόνο δύο 14-3-3 γονίδια, ενώ οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί έχουν μέχρι και δεκαπέντε 14-3-3 γονίδια. Μέχρι σήμερα, στα θηλαστικά αναγνωρίστηκαν επτά ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών από επτά διαφορετικά γονίδια. Οι ισομορφές συμβολίζονται με ελληνικά γράμματα και είναι οι β ή α, ε, γ, η, τ, ζ ή δ και η σ ή stratifin [100, 102-104]. Τα αντίστοιχα γονίδια που κωδικοποιούν την κάθε ισομορφή είναι τα YWHAB στο χρωμόσωμα 20q13.1, το YWHAΕ στο χρωμόσωμα 17p13.3, το YWHAG στο χρωμόσωμα 7q11.23, το YWHAH στο χρωμόσωμα 22q12.1-q13.1, το YWHAQ στο χρωμόσωμα 2p25.2-p25.1, το YWHAZ στο χρωμόσωμα 8q22.3 και το YWHAS στο χρωμόσωμα 1p36.11 [105]. Τα πρώτα ένζυμα που αποδείχτηκαν πρωτεϊνικοί στόχοι των πρωτεϊνών 14-3-3 είναι οι υδροξυλάσες της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης, δίνοντας το όνομά τους, δηλαδή το YWHA (Tyrosin and Tryptophan Hydroxylase Activators), στα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών [106]. Πρόσφατα, αναφέρθηκε, στον άνθρωπο, η ύπαρξη μιας

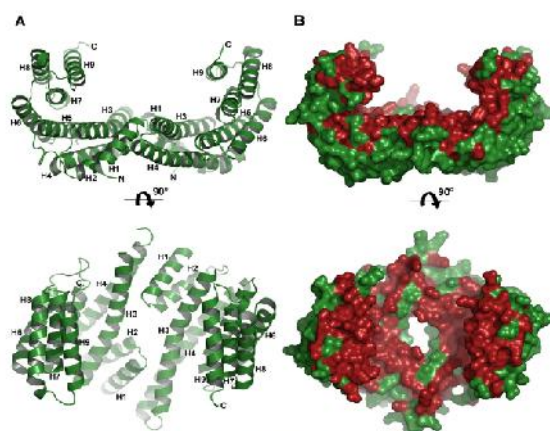
παραλλαγής της 14-3-3 ε μέσω εναλλακτικού ματίσματος, που ονομάστηκε πρωτεΐνη 14-3-3 ε sv [107].

### 1.3 Έκφραση πρωτεϊνών 14-3-3

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, απαντώνται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο νευρικό σύστημα [102, 106]. Η έκφραση των ισομορφών στα κύτταρα, στους ιστούς και στα όργανα διαφέρει και, ο υποκείμενος μηχανισμός μέσω του οποίου εκφράζονται διαφορετικά οι ισομορφές δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Τα σημερινά δεδομένα δείχνουν ότι, η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 σε διαφορετικές καταστάσεις (για παράδειγμα στον καρκίνο) εξαρτάται από την επιγενετική ρύθμιση, από τη μεταφραστική ρύθμιση και από τη ρύθμιση από micro-RNAs [106].

### 1.4 Δομή πρωτεϊνών 14-3-3

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι διμερείς και ιδιαίτερα ελικοειδείς πρωτεΐνες. Το κάθε μονομερές αποτελείται από μια δεσμίδα από 9 αντιπαράλληλες α-έλικες (H1-H9) που είναι οργανωμένες σε ένα καρβοξυτελικό και ένα αμινοτελικό άκρο. Η κοίλη επιφάνεια του μονομερούς, που σχηματίζεται από τις α-έλικες H3, H5, H7 και H9, εμφανίζει μία αύλακα μέσα στην οποία δεσμεύεται ο προσδέτης ή, διαφορετικά, ο πρωτεϊνικός στόχος. Το καρβοξυτελικό άκρο εμφανίζει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ισομορφών και λειτουργεί ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης με ακατάλληλο πρωτεϊνικό στόχο. Το αμινοτελικό άκρο είναι επίσης μεταβλητό και, τα κατάλοιπά του είναι απαραίτητα για τη δημιουργία διμερών [100, 102]. Το διμερές μόριο έχει κυπελλοειδές σχήμα με ένα μεγάλο κεντρικό κανάλι (εικόνα 18).



Εικόνα 48: Δομή 14-3-3 πρωτεϊνών. Από βιβλιογραφική αναφορά [100].

Οι 14-3-3 πρωτεΐνες σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή, με εξαίρεση τη σ ισομορφή που σχηματίζει μόνο ομοδιμερή [100]. Η ύπαρξη της παραλλαγής 14-3-3 ε σν μέσω εναλλακτικού ματίσματος, το οποίο αφαιρεί μια απαραίτητη για το διμερισμό αμινοτελική α-έλικα, υποδεικνύει ότι, πιθανά, η διμερής φύση των πρωτεϊνών 14-3-3 δεν είναι απαραίτητη για την επίτευξη των βιολογικών τους δράσεων [102, 107]. Η κάθε ισομορφή παρουσιάζει διαφορετική λειτουργία. Στα θηλαστικά, η δημιουργία knock-out κάποιων ισομορφών δεν υποδεικνύει κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο, δείχνοντας ότι οι λειτουργίες των ισομορφών, με εξαίρεση της ισομορφής σ που σχηματίζει μόνο ομοδιμερή, αλληλεπικαλύπτονται [102]. Μέχρι σήμερα, δεν έχει μελετηθεί στα θηλαστικά η συνολική απάλειψη όλων των μελών της οικογένειας. Στη ζύμη, όπου υπάρχουν μόνο δύο ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3, το διπλό knock-out έχει θνησιγενές αποτέλεσμα [106].

Εξαιτίας της δομής τους, συμπεραίνουμε ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες συμπεριφέρονται ως **μοριακή πλατφόρμα** πάνω στην οποία μόνο ο πρωτεϊνικός στόχος αλλάζει σχήμα ενώ, οι ίδιες παραμένουν αμετάβλητες. Το διμερές, έχοντας δύο αντιπαράλληλες αύλακες, μπορεί να προσδέσει ταυτόχρονα δύο πρωτεϊνικούς στόχους [100].

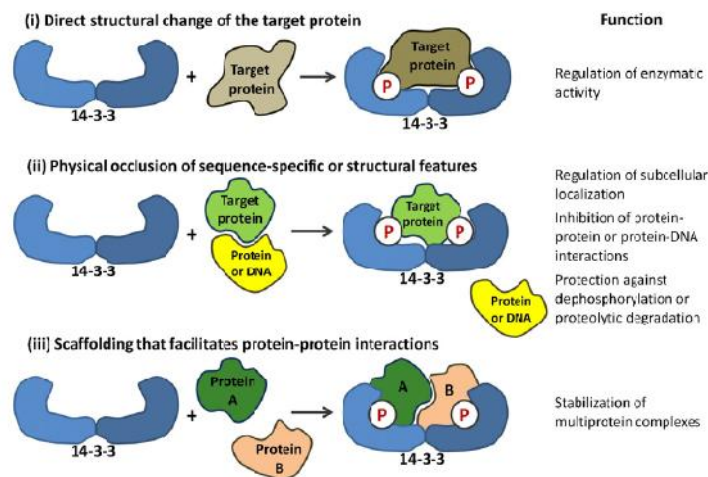
### 1.5 Μοτίβα δέσμευσης των πρωτεϊνών 14-3-3

Για την επίτευξη των βιολογικών τους δράσεων, οι πρωτεΐνες 14-3-3 αναγνωρίζουν μοτίβα του πρωτεϊνικού στόχου πάνω στα οποία δεσμεύονται. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί τρία μοτίβα δέσμευσης, το **R[S/Φ][+]pSXP (mode I)**, το **RX[Φ/S][+]pSXP (mode II)** και το **pS/pT-X<sub>1,2</sub>-COOH (mode III)**. Το pS αντιστοιχεί σε φωσφοσερίνη, το Φ σε ένα αρωματικό κατάλοιπο, + είναι ένα βασικό κατάλοιπο και το X αντιστοιχεί σε κάθε τύπο καταλοίπου (τυπικά Leu, Glu, Ala και Met). Στο mode III όπου X δεν είναι Pro και οι προσδέτες με αυτή την αλληλουχία δεσμεύονται ασθενέστερα από ότι οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στα μοτίβα I ή II. Υπάρχουν πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις 14-3-3 πρωτεΐνες στις οποίες το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο **αντί να είναι σερίνη είναι θρεονίνη** και, επίσης, υπάρχουν πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις 14-3-3 πρωτεΐνες μέσω **μη φωσφορυλιωμένων αλληλουχιών διαφορετικών από τα προαναφερθέντα μοτίβα** [100-102].

Τα πεπτίδια που εμφανίζουν δύο μοτίβα δέσμευσης, είτε μακριά είτε κοντά το ένα στο άλλο, αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι τα πεπτίδια που εμφανίζουν ένα μοτίβο δέσμευσης. Στην περίπτωση αυτή, το ένα μοτίβο λειτουργεί ως επικρατούσα θέση ρύθμισης που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση στις πρωτεΐνες 14-3-3 και, το άλλο λειτουργεί ως δευτερογενής θέση, μικρότερης συγγένειας που είναι απαραίτητη για την πλήρη βιολογική δραστηριότητα [100].

## 2. Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνών 14-3-3

Τα τελευταία 20 χρόνια, αποδείχτηκε ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών. Τα δεδομένα από τις βιοχημικές και δομικές μελέτες επέτρεψαν την ταξινόμηση των λειτουργικών ρόλων των πρωτεϊνών 14-3-3 επομένως, βάσει του μηχανισμού δράσης τους, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι αυτή στην οποία οι πρωτεΐνες 14-3-3 προκαλούν άμεση δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου. Η δεύτερη κατηγορία είναι αυτή στην οποία, με τη φυσική τους παρουσία, οι πρωτεΐνες 14-3-3 παρεμποδίζουν, επικαλύπτουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά ή συγκεκριμένες αλληλουχίες του πρωτεϊνικού στόχου. Η τρίτη κατηγορία είναι αυτή στην οποία οι πρωτεΐνες 14-3-3 λειτουργούν ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες οι πρωτεϊνικοί στόχοι έρχονται σε επαφή ο ένας με τον άλλο [100] (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης 14-3-3 πρωτεϊνών. Από βιβλιογραφική αναφορά [100].

Η συσχέτιση των πρωτεϊνών 14-3-3 με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνήθως εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση του πρωτεϊνικού στόχου. Επίσης, με τα πιο πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι, η φωσφορυλίωση αλλά και οι άλλες τροποποιήσεις των ίδιων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών ρυθμίζουν τόσο την αλληλεπίδραση όσο και το διμερισμό τους. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών 14-3-3 που καθορίζουν τη δράση τους είναι η ακετυλίωση, η πολυγλυκοζυλίωση, η οξειδωση, η πρωτεόλυση και άλλες.

### 2.1 Δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου

Στην περίπτωση αυτή, η δέσμευση του πρωτεϊνικού στόχου από τις 14-3-3 πρωτεΐνες ακολουθείται από τη δομική τροποποίησή τους. Η αναδιοργάνωση του πρωτεϊνικού στόχου επιτρέπει την ιδανική δέσμευσή του με τρίτες πρωτεΐνες, αυξάνοντας τη συγγένειά του με

αυτές. Παραδείγματα πρωτεϊνικών στόχων της περίπτωσης αυτής είναι το ένζυμο AANAT, οι υδροξυλάσες της τρυπτοφάνης και τυροσίνης, οι κινάσες Raf, η κινάση ASK1 και άλλοι [100].

## **2.2 Παρεμπόδιση-επικάλυψη δομικών χαρακτηριστικών ή αλληλουχιών του πρωτεϊνικού στόχου**

Με τη φυσική τους παρουσία, οι 14-3-3 πρωτεΐνες παρεμποδίζουν τροποποιήσεις του πρωτεϊνικού στόχου ή επικαλύπτουν αλληλουχίες μέσω των οποίων ο πρωτεϊνικός στόχος θα αλληλεπιδρούσε είτε με άλλη πρωτεΐνη είτε με το DNA.

### **2.2.1 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη**

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 τροποποιούν, σε αρκετές περιπτώσεις, την υποκυττάρια κατανομή των πρωτεϊνικών τους στόχων. Εάν ο πρωτεϊνικός στόχος εμφανίζει είτε αλληλουχία πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Sequence, NLS) είτε αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Sequence, NES) κοντά σε μοτίβο δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών τότε, η 14-3-3 πρωτεΐνη μπορεί να παρέμβει στη λειτουργία των αλληλουχιών αυτών. Η επικάλυψη των αλληλουχιών αυτών τροποποιεί την κινητική της μετακίνησης της πρωτεΐνης-στόχου και, επομένως, τροποποιεί την εντόπιση του πρωτεϊνικού στόχου είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς τον πυρήνα. Πρωτεϊνικοί στόχοι αυτής της περίπτωσης είναι οι πρωτεΐνες FOXO, οι πρωτεΐνες RGS και άλλοι. Ανάλογος μηχανισμός παρατηρείται και στη ρύθμιση της εντόπισης μιας πρωτεΐνης στόχου είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς το ER [100].

### **2.2.2 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με DNA**

Υπάρχουν μεταγραφικοί παράγοντες που παρουσιάζουν μοτίβα δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών τα οποία συνορεύουν με την περιοχή πρόσδεσής τους στο DNA και, επομένως, η δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα στις 14-3-3 πρωτεΐνες επιδρά στις ιδιότητες δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA. Πρωτεϊνικοί στόχοι αυτής της περίπτωσης είναι ο FOXO4, ο DAF-16 και άλλοι [100].

### **2.2.3 Παρεμπόδιση αποφωσφορυλίωσης ή πρωτεόλυσης του πρωτεϊνικού στόχου**

Μια άλλη ιδιότητα των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να προστατεύουν τον πρωτεϊνικό τους στόχο από την αποφωσφορυλίωση ή την πρωτεολυτική του αποδόμηση. Η αποφωσφορυλίωση κάποιων πρωτεϊνών μπορεί να τις οδηγήσει προς την

αποδόμησή τους. Επομένως, η ύπαρξη των 14-3-3 πρωτεϊνών θα καθορίσει τη μοίρα των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών είτε προς την αποδόμηση είτε προς την ανακύκλωσή τους. Παραδείγματα πρωτεϊνικών στόχων αυτής της κατηγορίας είναι ο FOXO3, η **υδροξυλάση της τυροσίνης** και άλλοι [100].

### **2.3 «Μοριακή πλατφόρμα» για γεινίαση πρωτεϊνών**

Οι διμερείς 14-3-3 πρωτεΐνες λειτουργούν ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες οι δύο πρωτεϊνικοί στόχοι πλησιάζουν ο ένας τον άλλο. Το διμερές, που εμφανίζει δύο αντιπαράλληλες αύλακες πρόσδεσης, μπορεί ταυτόχρονα να δεσμεύσει δύο πρωτεΐνες στόχους μέσα στο κεντρικό του κανάλι, δημιουργώντας μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Παράδειγμα της περίπτωσης αυτής είναι η δέσμευση του διμερούς των 14-3-3 πρωτεϊνών σε δύο μόρια  $H^+$ -ATPase ώστε να ενεργοποιηθούν, αλλά και η δέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών στον μεταγραφικό παράγοντα p53 ώστε να γίνει τετραμερής. Επίσης, οι 14-3-3 πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες γίνεται αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών στόχων. Παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι η αλληλεπίδραση, μέσω των 14-3-3 πρωτεϊνών, της **β-Catenin** με τον ανταγωνιστή της Cby. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 σταθεροποιούν το σύμπλοκο β-Catenin – Cby, με αποτέλεσμα την έξοδο της β-Catenin από τον πυρήνα και τον τερματισμό της σηματοδότησής της [100].

### **3. Λειτουργίες πρωτεϊνών 14-3-3**

Η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες και περισσότερο μελετημένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών. Η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης τροποποιεί τις πρωτεϊνικές λειτουργίες είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω δημιουργίας πρωτεϊνικών συμπλόκων. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ήταν τα πρώτα μόρια που αναγνωρίστηκαν ως μόρια που δεσμεύουν μοτίβα που περιέχουν φωσφοσερίνη/φωσφοθρεονίνη (pSer/pThr) και, το γεγονός αυτό συνέβαλε στην αναγνώριση του ρόλου τους στην κυτταρική σηματοδότηση. Η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών αλληλεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών στο οποίο περιλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες, βιοσυνθετικά ένζυμα, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, σηματοδοτικά μόρια, αποπτωτικοί παράγοντες και ογκοκατασταλτικά μόρια. Εξαιτίας, επομένως, της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 διαπιστώθηκε ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών, για παράδειγμα στην κυτταρική ανάπτυξη, στην κυτταρική μετανάστευση, στην απόπτωση, στον κυτταρικό

μεταβολισμό, στη μετακίνηση πρωτεϊνών στο κύτταρο, στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στην απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA και σε πολλές άλλες [100, 108]. Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενεργοποιούν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [109].

### **3.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταρικός κύκλος**

Ένας από τους περισσότερο αποδεδειγμένους ρόλους των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από την ενεργοποίηση ή την αναστολή των κυκλινών, των ενεργοποιητών τους και των ανασταλτών τους. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύουν τα φωσφορυλιωμένα αυτά μόρια και είτε αναστέλλουν τη δράση τους είτε οδηγούν στην τροποποίηση της κινητικής τους από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα.

Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ο διπλασιασμός του DNA προκαλεί βλάβη στο DNA και, η μετάβαση στη φάση της μίτωσης M προϋποθέτει τη διόρθωση της βλάβης. Η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 είναι σημαντική ώστε να αποφευχθεί η γενομική αστάθεια. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 διατηρούν το κύτταρο στη φάση G2 μέχρι να διορθωθεί το DNA, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου με βλάβη στο DNA.

Από τη στιγμή που το κύτταρο εισέρχεται στη φάση M τότε, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επάγουν την εξέλιξή της, ενεργοποιώντας διαδικασίες κυτταροκίνησης. Επίσης, οι 14-3-3 πρωτεΐνες, ανάλογα με τον προσδέτη τους και ανάλογα με τη φωσφορυλίωσή του, ρυθμίζουν είτε αναστέλλοντας είτε επάγοντας, τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [110].

### **3.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και επιβίωση ή απόπτωση του κυττάρου**

Η **ισορροπία μεταξύ των σημάτων επιβίωσης και σημάτων «θανάτου»** είναι καθοριστική για την κυτταρική μοίρα. Τα σήματα επιβίωσης του κυττάρου αυξάνουν το όριο πάνω από το οποίο τα αποπτωτικά σήματα θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, η μείωση των σημάτων επιβίωσης μειώνει το όριο ενεργοποίησης των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στα αποπτωτικά σήματα. Για να κατανοήσουμε τη ρύθμιση του κυτταρικού

θανάτου, θα πρέπει να αναγνωρίζουμε τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα σήματα επιβίωσης και τα σήματα απόπτωσης αλληλεπιδρούν. **Οι πρωτεΐνες 14-3-3, πιθανά, αντιπροσωπεύουν το κοινό σημείο αλληλεπίδρασης των σημάτων αυτών** [111].

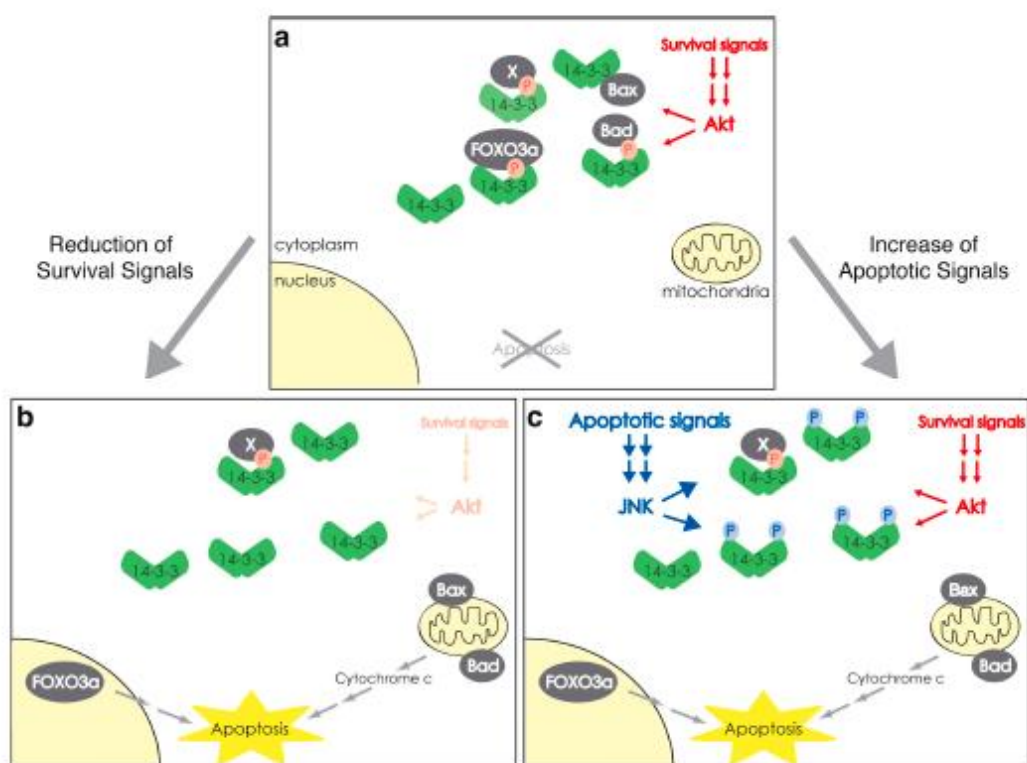
Θα περιγραφεί το παράδειγμα του προαποπτωτικού μορίου BAD (Bcl-2/Bcl<sub>XL</sub> antagonist of cell death) το οποίο όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένο κατευθύνεται στο μιτοχόνδριο όπου προκαλεί απόπτωση μέσω δέσμησης και απενεργοποίησης του Bcl-2/Bcl<sub>XL</sub>. Όταν το κύτταρο δέχεται σήματα επιβίωσης, οι κινάσες που επάγονται από τα σήματα επιβίωσης ενεργοποιούνται. Κινάσες επιβίωσης είναι οι κινάσες AKT (Protein Kinase B), Pak-1, Pak-5, p70S6, Rsk, Pim-1 και άλλες. Η φωσφορυλίωση του BAD σε συγκεκριμένες σερίνες δημιουργεί μοτίβο δέσμησης των πρωτεϊνών 14-3-3. Η επακόλουθη δέσμηση του φωσφορυλιωμένου BAD στις 14-3-3 πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του στο κυτταρόπλασμα και την απενεργοποίησή του. Όταν, όμως, τα σήματα επιβίωσης μειωθούν ή όταν τα σήματα θανάτου αυξηθούν, τα μόρια που επάγονται από το στρες, για παράδειγμα η κινάση JNK (Jun-N-terminal kinase) ή το σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK ενεργοποιούνται. Η κινάση JNK φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες 14-3-3, με αποτέλεσμα, ο προσδέτης τους BAD να απελευθερώνεται και να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια όπου θα ξεκινήσει τους μηχανισμούς απόπτωσης. Το ίδιο συμβαίνει και με το προαποπτωτικό μόριο BAX (Bcl-2 associated x protein).

Ένα άλλο παράδειγμα συμμετοχής των 14-3-3 πρωτεϊνών στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ σημάτων επιβίωσης και θανάτου είναι η δέσμηση τους στους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO, οι οποίοι ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην απόπτωση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO εμφανίζουν αλληλουχίες NLS και NES. Η δέσμηση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO στις 14-3-3 πρωτεΐνες αφήνει, αρχικά, εκτεθειμένες τις NES αλληλουχίες με αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και, στη συνέχεια, επικαλύπτει τις NLS αλληλουχίες με αποτέλεσμα την καθήλωσή τους στο κυτταρόπλασμα [110-113].

Επομένως, η έκθεση του κυττάρου σε σήματα επιβίωσης αναστέλλει την απόπτωση αφού, οι πρωτεΐνες 14-3-3 καθιλώνουν στο κυτταρόπλασμα τις φωσφορυλιωμένες προαποπτωτικές πρωτεΐνες. Η μείωση των σημάτων επιβίωσης επάγει την αποφωσφορυλίωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αποδέσμηση τους από τις 14-3-3 πρωτεΐνες. Οι αποδεσμευμένες πλέον προαποπτωτικές πρωτεΐνες κατευθύνονται στη θέση δράσης τους, όπου ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο. Από την άλλη, όταν τα αποπτωτικά σήματα είναι συνεχή, οδηγούν στη φωσφορυλίωση των ίδιων των 14-3-3 πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών



από αυτές, ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση (εικόνα 20). Οι πρωτεΐνες 14-3-3, πιθανά, είναι τα μόρια τα οποία αυξάνουν το όριο πάνω από το οποίο τα αποπτωτικά σήματα θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και, έτσι, η αύξηση ή η μείωση των επιπέδων τους τροποποιεί την ισορροπία μεταξύ επιβίωσης και απόπτωσης [111].



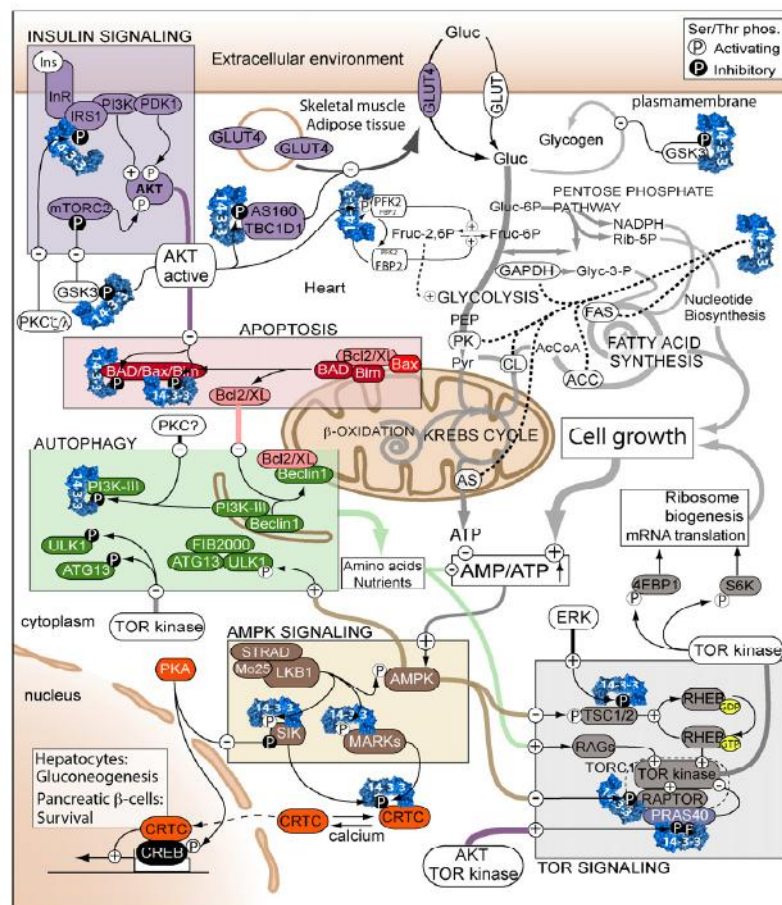
Εικόνα 50: Ανταγωνισμός μεταξύ σημάτων επιβίωσης και σημάτων απόπτωσης μέσω 14-3-3 πρωτεϊνών. Από βιβλιογραφική αναφορά [111].

### 3.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταρικός μεταβολισμός

Στον οργανισμό, ο μεταβολισμός πρέπει να είναι ρυθμισμένος ανάλογα με τις απαιτήσεις των κυτταρικών διεργασιών. Οι διαφορετικοί ιστοί ανταποκρίνονται στις λειτουργίες τους διατηρώντας την απαραίτητη για την επιβίωση ενέργεια. Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια συνεισφέρουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού τόσο στο επίπεδο του κυττάρου όσο και στο επίπεδο των ιστών και, τα τελευταία χρόνια, τα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν στη ρύθμιση αυτή [106].

Όπως προαναφέρθηκε, τα πρώτα μόρια που αποδείχτηκαν πρωτεϊνικοί στόχοι των πρωτεϊνών 14-3-3 είναι οι υδροξυλάσες της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης, με αποτέλεσμα να διαπιστωθεί η αξία των πρωτεϊνών 14-3-3 ως ρυθμιστές της βιοσύνθεσης κατεχολαμίνης και σεροτονίνης. Από τότε, οι πρωτεΐνες 14-3-3 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό. Σε αυτά περιλαμβάνονται ένζυμα που

συμμετέχουν στη γλυκόλυση, στο μονοπάτι των φωσφοπεντοζών, στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και των νουκλεοτιδίων, στο μεταβολισμό της μεθειονίνης και στις αναγωγικές αντιδράσεις. Κάποια από αυτά τα ένζυμα είναι η **πυρουβική κινάση M (PK)**, η **συνθετάση του ATP (ATP-synthase)**, η **αφυδρογονάση της τριφωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH)**, η **συνθετάση των λιπαρών οξέων (FAS)** και άλλα. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τις μεταβολικές διεργασίες και στα οποία εμπλέκονται οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι των AMPK, το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR, το σηματοδοτικό μονοπάτι της αυτοφαγίας, το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και άλλα (εικόνα 21) [106].



Εικόνα 21: Συμμετοχή 14-3-3 πρωτεϊνών στον κυτταρικό μεταβολισμό. Από βιβλιογραφική αναφορά [106].

### 3.4 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κυτταροσκελετός

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού αποδεικνύεται σημαντική διεργασία αφού εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, για παράδειγμα στον καρκίνο. Έχει αποδειχθεί ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με την **α- και β- τουμπουλίνη**, την **ακτίνη**, με τις δεσμεύουσες στην ακτίνη πρωτεΐνες και με τις πρωτεΐνες της ομάδας του

παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης (Actin depolymerizing-factor group, ADF). Στην ομάδα ADF ανήκει και η **cofilin**.

Η cofilin είναι μία μικρή πρωτεΐνη η οποία δεσμεύεται στην ινδοειδή F-actin αποσταθεροποιώντας το ινίδιο ακτίνης. Η φωσφορυλιωμένη cofilin δε μπορεί να δεσμευτεί στην F-actin, οπότε δε μπορεί να τη διασπάσει. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύονται στη φωσφορυλιωμένη cofilin, παρεμποδίζουν την αποφωσφορυλίωσή της διατηρώντας αδιάσπαστα τα ινίδια ακτίνης. Πιθανολογείται ότι, οι πρωτεϊνικοί στόχοι που δημιουργούν ισχυρά συμπλέγματα με τις 14-3-3 πρωτεΐνες και που υπάρχουν σε αυξημένες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα μπορούν να εκτοπίσουν την cofilin από τις 14-3-3 πρωτεΐνες και, έμμεσα, να οδηγήσουν σε κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Τέτοιο μόριο είναι η φωσφορυλιωμένη heat shock protein B6 (HspB6, Hsp20). Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι, η φωσφορυλιωμένη **heat shock protein B1 (HspB1, Hsp27)** επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία **ινιδίων στρες (stress fibers)**. Η αλληλεπίδραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν τη HspB1 αναστέλλει τη λειτουργία τους και τον πολυμερισμό της ακτίνης [108, 114, 115].

### 3.5 Πρωτεΐνες 14-3-3 και EMT

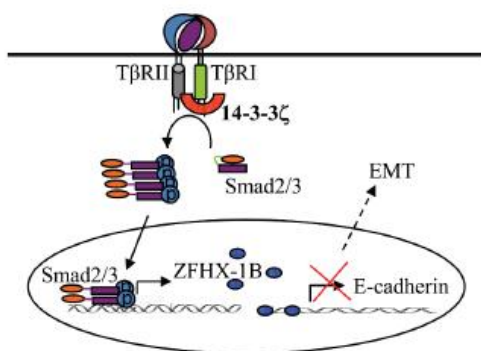
Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, EMT είναι το φαινόμενο κατά το οποίο, υπό την επίδραση βλαπτικού παράγοντα, τα επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπική αλλαγή, χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά και αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγγυματικού κυττάρου. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 διαπιστώνεται ότι αλληλεπιδρούν με μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην EMT. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα του TGF- $\beta$  τύπου I, με την υπομονάδα p85 της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (p85-PI3K), με την εξαρτώμενη από το τριφωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση-1 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1, PDK1), με τον Snail και τη  $\beta$ -Catenin.

#### 3.5.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι TGF- $\beta$

Κεντρικό ρόλο στο φαινόμενο της EMT κατέχει ο TGF- $\beta$ , ο οποίος, μετά τη σύνδεσή του στον υποδοχέα του, οδηγεί στην ενεργοποίηση κινασών που θα φωσφορυλιώσουν τα μόρια Smad. Ο ετεροπολυμερισμός των μορίων Smad θα τα οδηγήσει στον πυρήνα, όπου θα ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων κάποια από τα οποία είναι το Snail, το Slug, το Twist και άλλα. Ο TGF- $\beta$ , ανεξάρτητα των Smad, ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια p38/MAPK, PI3K/AKT και άλλα.

Στο *Schistosoma mansoni*, ο υποδοχέας της κινάσης-1 (*Schistosoma mansoni* receptor kinase-1, SmRK1) αποτελεί τύπο του υποδοχέα τύπου I του TGF-β και βρίσκεται στην επιφάνεια των παρασίτων. Χρησιμοποιώντας σύστημα διπλού υβριδίου στη ζύμη, ώστε να αναγνωρίσουν τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το ενδοκυττάριο τμήμα του SmRK1, οι McGonigle S και συνεργάτες το 2001 διαπίστωσαν ότι, η SmRK1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 14-3-3ε. Επίσης, η **πρωτεΐνη 14-3-3ε** βρέθηκε ότι **αλληλεπιδρά**, με φωσφορυλιοεξαρτώμενο τρόπο, και με τον ανθρώπινο **υποδοχέα τύπου I του TGF-β**. Η διαπίστωση ότι, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης 14-3-3ε με τον υποδοχέα τύπου I του TGF-β **αυξάνει τη σηματοδότηση του TGF-β**, δίνει στις πρωτεΐνες 14-3-3 ρόλο σημαντικό στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β [116].

Όπως προαναφέρθηκε, σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [109]. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3, κυρίως της πρωτεΐνης 14-3-3ζ, έχει διαπιστωθεί σε καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του στομάχου, σε ουροθηλιακούς καρκίνους, σε *in situ* καρκινώματα μαστού και σε άλλα και, η υπερέκφρασή της συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση [117-121]. Οι Lu J και συνεργάτες, μελετώντας κυτταρικές τροποποιήσεις σε καρκινικά κύτταρα, διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης 14-3-3ζ μείωνε την επαφή των κυττάρων μεταξύ τους, μέσω του φαινομένου της EMT [117]. Πιο συγκεκριμένα, **η πρωτεΐνη 14-3-3ζ δεσμεύεται στον υποδοχέα τύπου I του TGF-β**, παρεμποδίζει την ομπικουϊτινίνωσή του και, άρα, την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Τα αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα **αυξάνουν τη σηματοδότηση του TGF-β/Smad**. Τα φωσφορυλιωμένα Smad2 και Smad3 μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου δεσμεύονται στον υποκινητή του γονιδίου του ZFHXB, αυξάνοντας τη μεταγραφή του.



Εικόνα 22: Μοντέλο καταστολής E-Cadherin μέσω 14-3-3 πρωτεϊνών. Από βιβλιογραφική αναφορά [116].

Στη συνέχεια, ο ZFHXB δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου της E-Cadherin καταστέλλοντας τη μεταγραφή της, **με αποτέλεσμα την EMT** (εικόνα 22) [117].

Στην προσπάθειά τους να αναγνωρίσουν μόρια που αλληλεπιδρούν με τα Smad ώστε να κατανοηθεί η σηματοδότησή τους, οι Seong HA και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι οι πρωτεΐνες Smad2, Smad3, Smad4 και Smad7 αλληλεπιδρούν με την εξαρτώμενη από το τριφωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση-1 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1, PDK1) [122]. Η PDK1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών A, G, C στις οποίες περιλαμβάνεται η κινάση επιβίωσης AKT, την οποία φωσφορυλιώνει [123, 124]. Η δραστηριότητα της PDK1 ρυθμίζεται από αρκετές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά και, σε αυτές ανήκουν και οι πρωτεΐνες 14-3-3. Στη μελέτη αυτή, βρέθηκε ότι **οι πρωτεΐνες Smad** αυξάνουν τη δραστηριότητα της PDK1 επειδή ενεργοποιούν την **αποδέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών από το σύμπλοκο PDK1/14-3-3** [122].

Οι Hong HY και συνεργάτες, στην προσπάθειά τους να διερευνήσουν τη σημασία του Smad3 στην δράση του TGF-β να διατηρεί το κύτταρο στη φάση G1, διαπίστωσαν ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3ζ είναι αρνητικοί ρυθμιστές του Smad3 ως προς την αντιυπερπλαστική δραστηριότητα του TGF-β. Οι **πρωτεΐνες 14-3-3ζ** ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών (cyclin-dependent kinases, CDK), οι οποίες φωσφορυλιώνουν σε συγκεκριμένη θέση το **Smad3 καταστέλλοντας τη μεταφραστική του δραστηριότητα**, επιτρέποντας, έτσι, το κύτταρο να εισέλθει από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [121].

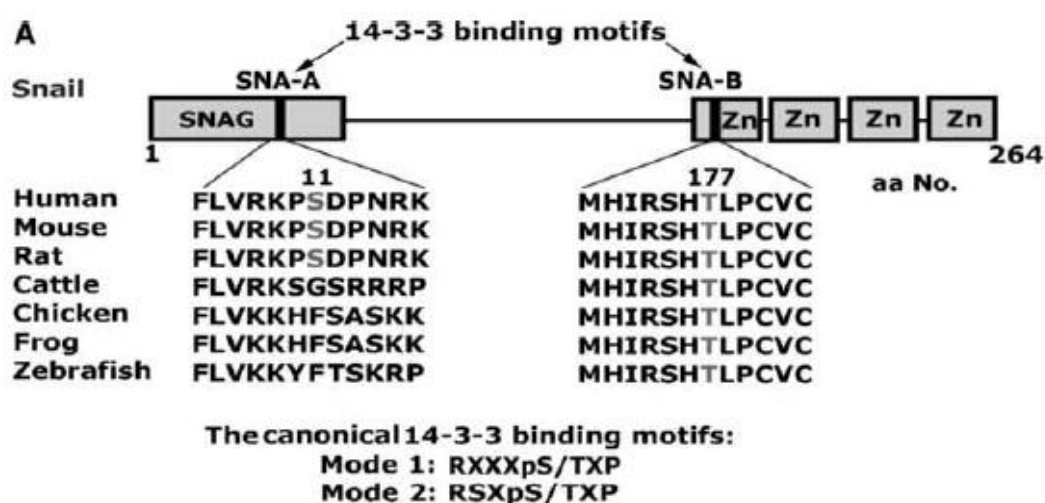
### 3.5.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT

Η ίδια ομάδα ερευνητών που ανακάλυψε ότι η πρωτεΐνη 14-3-3ζ δεσμεύεται στον υποδοχέα τύπου I του TGF-β αυξάνοντας τη σηματοδότηση του TGF-β/Smad, διαπίστωσε επίσης ότι, στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, η υψηλή έκφραση των 14-3-3ζ συσχετίζεται με αυξημένη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης AKT μέσω της ενεργοποίησης της PI3K. **Οι 14-3-3ζ δεσμεύονται στη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K, με αποτέλεσμα η PI3K να μετακινείται στην κυτταρική μεμβράνη και να ενεργοποιείται** [120].

### 3.5.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και μεταγραφικός παράγοντας Snail

Ο μεταγραφικός παράγοντας Snail αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της EMT αφού, καταστέλλει τη μετάφραση της E-Cadherin με τη σύνδεσή του στο E-Box του υποκινητή του γονιδίου της [125]. Η πρωτεΐνη Snail αποτελείται από μια αμινοτελική SNAG κατασταλτική περιοχή και από 4 καρβοξυτελικά μοτίβα Ψευδαργύρου (Zinc finger motifs).

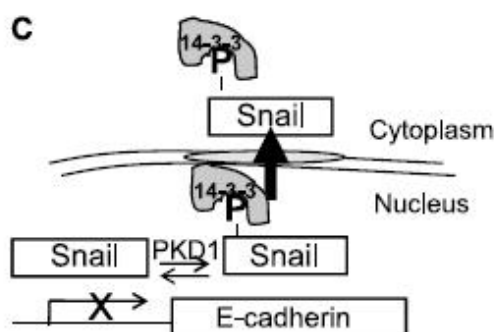
Στην προσπάθειά τους να διαπιστώσουν τα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του Snail, οι Hou Z και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη Snail εμφανίζει δύο μοτίβα δέσμησης των 14-3-3 πρωτεϊνών, που τα συμβόλισαν ως SNA-A και SNA-B (εικόνα 23) και, έδειξαν ότι, η πρωτεΐνη Snail αλληλεπιδρά με τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών άμεσα. Στη συνέχεια, διαπίστωσαν ότι η αλληλεπίδραση του Snail με τις 14-3-3 πρωτεΐνες είναι απαραίτητη ώστε να κατασταλεί η μεταγραφή της E-Cadherin και να συμβεί EMT. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 πιθανά λειτουργούν ως συμπαραγόντες του Snail, ρυθμίζοντας άμεσα τη δράση του [126].



Εικόνα 23: Μοτίβα δέσμησης των 14-3-3 πρωτεϊνών στον μεταγραφικό παράγοντα Snail. Από βιβλιογραφική αναφορά [126].

Η πρωτεϊνική κινάση D1 (Protein Kinase D1, PKD1) ρυθμίζει, με τη δράση της, αρκετές κυτταρικές διεργασίες στις οποίες περιλαμβάνονται η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η κινητικότητα [127]. Σε καρκίνο προστάτη, σε καρκίνο στομάχου και σε καρκίνο μαστού, η PKD1 εμφανίζεται κατεσταλμένη [128]. Μία από τις λειτουργίες της PKD1 είναι η φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής ουράς της E-Cadherin, σταθεροποιώντας, έτσι, την αλληλεπίδραση της E-Cadherin με τη β-Catenin [129, 130]. Οι Hu C και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι, η PKD1 αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο Ser<sup>11</sup> τον μεταγραφικό παράγοντα Snail, επηρεάζοντας την πυρηνική του εντόπιση αλλά και την σταθερότητά του. Η φωσφορυλίωση του Snail από την PKD1 δημιουργεί μοτίβο δέσμησης των 14-3-3 πρωτεϊνών, οπότε η δέσμηση του φωσφορυλιωμένου Snail στις 14-3-3 πρωτεΐνες οδηγεί στη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Το κατάλοιπο Ser<sup>11</sup> βρίσκεται στο τέλος της περιοχής SNAG η οποία κινητοποιεί το σύμπλεγμα 1/2 της αποακετυλάσης της ιστόνης Sin3A (Sin3A histone deacetylase 1/2 complex) ώστε να καταστείλει την E-Cadherin. Επίσης, η μετακίνηση του

φωσφορυλιωμένου Snail στο κυτταρόπλασμα έχει σαν αποτέλεσμα την **πρωτεολυτική του διάσπαση** (εικόνα 24) [128].

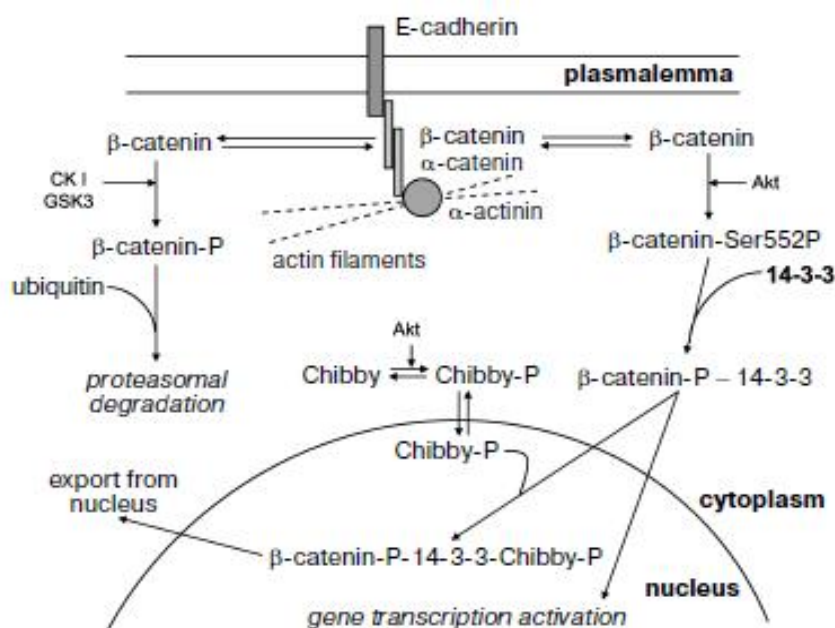


Εικόνα 24: Υποκυτάρια εντόπιση Snail. Από βιβλιογραφική αναφορά [128].

### 3.5.4 Πρωτεΐνες 14-3-3 και σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin

Η  $\beta$ -Catenin αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της E-Cadherin ώστε, η E-Cadherin να αλληλεπιδράσει έμμεσα με τα ινίδια ακτίνης. Το ελεύθερο ποσό της  $\beta$ -Catenin κατανέμεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ανάλογα με τη φωσφορυλίωσή του. Όταν η κυτταροπλασματική  $\beta$ -Catenin φωσφορυλιώνεται από το σύμπλεγμα axin/APC/GSK-3 $\beta$  τότε συμπικουϊτινώνεται και αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Η αποφωσφορυλιωμένη  $\beta$ -Catenin δε διασπάται στο πρωτεάσωμα, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων.

Για να αναλύσουν το σύμπλεγμα πρωτεϊνών της  $\beta$ -Catenin, χρησιμοποιώντας Πρωτεωμική Ανάλυση, οι Tian Q και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η  $\beta$ -Catenin αλληλεπιδρά με την 14-3-3ζ πρωτεΐνη μετά τη φωσφορυλίωσή της από την κινάση επιβίωσης AKT [131]. Η δέσμευση της  $\beta$ -Catenin στις 14-3-3ζ πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα τη δομική τροποποίηση της  $\beta$ -Catenin και τη σταθεροποίησή της στο κυτταρόπλασμα [131, 132]. Από την άλλη, η φωσφορυλίωση της  $\beta$ -Catenin από την AKT στη Ser<sup>552</sup> έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπασή της από τις ενδοκυττάρειες συνδέσεις, τη δέσμευσή της στις 14-3-3ζ πρωτεΐνες και, τελικά, τη μετακίνησή της στον πυρήνα όπου θα ενεργοποιήσει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (εικόνα 25) [133]. Το Chibby είναι ένας ανταγωνιστής της  $\beta$ -Catenin αφού, με τη δέσμευσή του σε αυτή, αναστέλλει τη μεταφραστική της ικανότητα. Η φωσφορυλίωση του Chibby από την κινάση AKT οδηγεί στη δέσμευσή του με τις πρωτεΐνες 14-3-3 και η δημιουργία του συμπλόκου  $\beta$ -Catenin/14-3-3ζ/Chibby επάγει την έξοδο της  $\beta$ -Catenin από τον πυρήνα και την καταστολή της μεταγραφικής της δραστηριότητας [114, 134, 135].



Εικόνα 25: Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin και 14-3-3 πρωτεΐνες. Από βιβλιογραφική αναφορά [114].

### 3.6 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Νεφρός

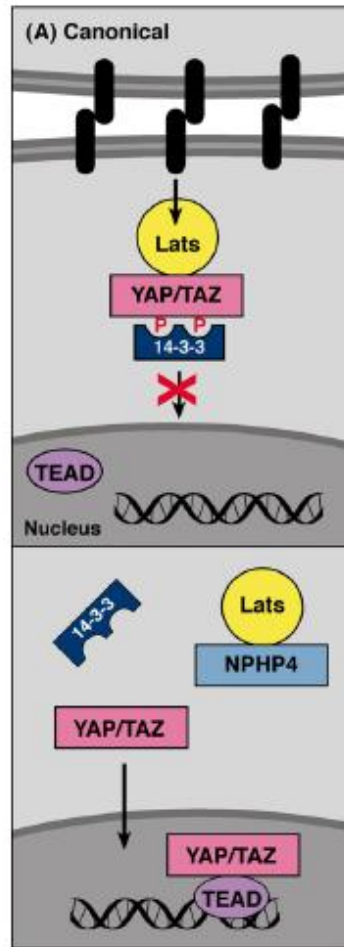
Η μελέτη της λειτουργίας των πρωτεϊνών 14-3-3 στο νεφρό είναι ακόμα σε αρχικά στάδια. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στην παθογένεια της Νεφρονόφθισης, στη διατήρηση της κυτταροσκελετικής αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων και στη ρύθμιση του καναλιού νατρίου στα επιθηλιακά κύτταρα του άπυ νεφρώνα.

#### 3.6.1 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Νεφρονόφθιση

Η Νεφρονόφθιση είναι μια προοδευτική σωληναριοδιάμεση νεφρική νόσος που προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών της νεφρονόφθισης (Nephronophthisis protein, NPHP). Η NPHP4 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή των 14-3-3 πρωτεϊνών στις αλληλεπιδράσεις τους με το σηματοδοτικό μονοπάτι Hippo, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Στο μονοπάτι αυτό, η ενεργοποίηση της κινάσης Lats οδηγεί στη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών YAP και TAZ σε τέτοιες θέσεις ώστε να δημιουργούνται μοτίβα δέσμησης με τις πρωτεΐνες 14-3-3. Η δέσμηση των πρωτεϊνών 14-3-3 στους φωσφορυλιωμένους YAP και TAZ τους καθηλώνει στο κυτταρόπλασμα παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τους μεταγραφικούς παράγοντες TEAD. Η NPHP4 αλληλεπιδρά με την Lats αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση των YAP και TAZ και, επομένως τη δέσμευσή τους με τις 14-3-3 πρωτεΐνες (εικόνα 26). Οι



μεταλλάξεις στο γονίδιο της NPHP4 έχουν σαν αποτέλεσμα την ανεπαρκή σηματοδότηση μέσω YAP και TAZ και την εμφάνιση φαινοτύπου με μικρούς νεφρούς [108].



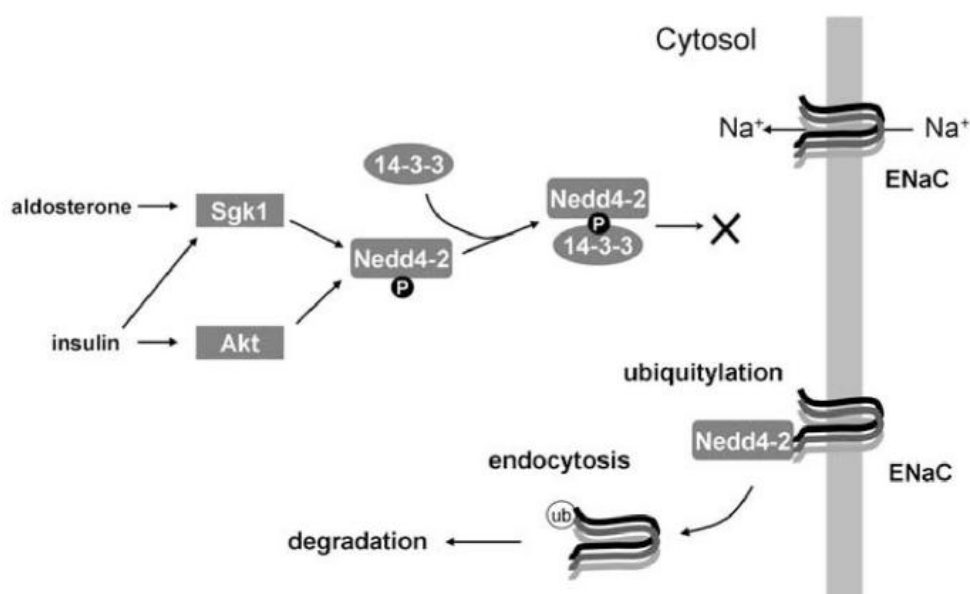
Εικόνα 26: Σηματοδοτικό μονοπάτι Hippo. Από βιβλιογραφική αναφορά [108].

### 3.6.2 Πρωτεΐνες 14-3-3 και Ποδοκύτταρα

Τα ποδοκύτταρα έχουν ένα ιδιαίτερα εξειδικευμένο κυτταροσκελετό και εξειδικευμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες για παράδειγμα την ποδοσίνη, τη νεφρίνη, την P-Cadherin και ρυθμιστικές πρωτεΐνες για παράδειγμα τη συναπτοποδίνη. Η συναπτοποδίνη, άμεσα ή έμμεσα μέσω της α-ακτινίνης, προσκολλά τα ινίδια ακτίνης στις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η φωσφορυλίωση της συναπτοποδίνης έχει σαν αποτέλεσμα την ισχυρή αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες 14-3-3 με αποτέλεσμα τα ινίδια ακτίνης να δεσμεύονται ορθά με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η αποφωσφορυλίωση της συναπτοποδίνης από την καλσινευρίνη διαταράσσει τον κυτταροσκελετό των ποδοκυττάρων και παρατηρείται πρωτεϊνουρία. Η χορήγηση κυκλοσπορίνης, που είναι αναστολέας της καλσινευρίνης, διατηρεί την αλληλεπίδραση συναπτοποδίνης και 14-3-3 πρωτεϊνών και εμποδίζει τη διάσπασή της από την cathepsin [136].

### 3.6.3 Πρωτεΐνες 14-3-3 και κανάλι νατρίου ENaC

Η αλδοστερόνη είναι μια αλατοκορτικοειδής ορμόνη που αυξάνει την επαναρρόφηση του νατρίου κυρίως εξαιτίας της **αύξης της έκφρασης του καναλιού νατρίου που βρίσκεται στην αυλική επιφάνεια του άπω νεφρώνα**. Ο Nedd4-2 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated) είναι μια λιγκάση, η οποία προσθέτει ουμπικουϊτίνη στο ENaC ώστε το ENaC να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα για αποδόμηση. Η επαγόμενη από την αλδοστερόνη κινάση SGK1, η κινάση AKT και άλλες φωσφορυλιώνουν τον Nedd4-2 σε τέτοιες θέσεις ώστε να δημιουργείται μοτίβο δέσμευσης των πρωτεϊνών 14-3-3. Η δέσμευση του Nedd4-2 στις πρωτεΐνες 14-3-3 παρεμποδίζει τη δέσμευση του Nedd4-2 στο ENaC το οποίο, παραμένει στην αυλική επιφάνεια, δεν αποδομείται στο πρωτεάσωμα και, επομένως, η επαναρρόφηση νατρίου κατά μήκος του αυξάνεται (εικόνα 27) [137-141].

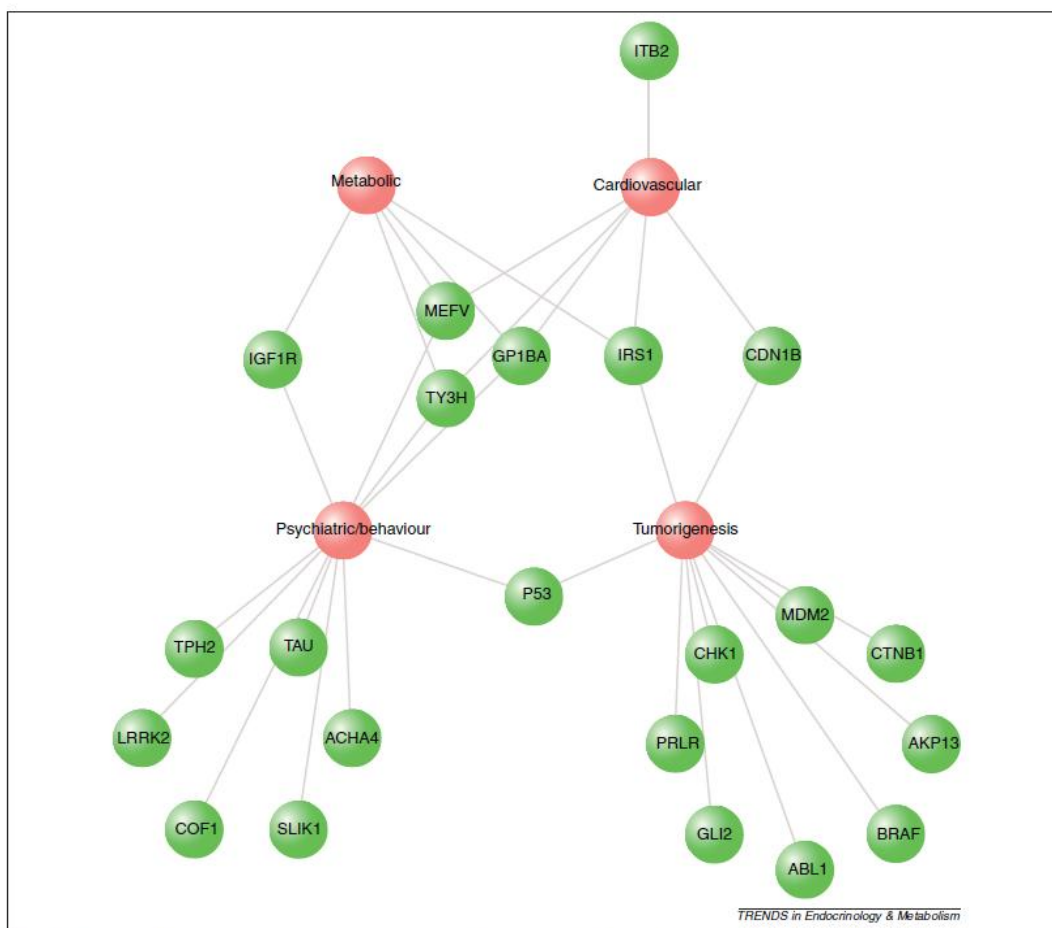


Εικόνα 27: Κανάλι Νατρίου και πρωτεΐνες 14-3-3. Από βιβλιογραφική αναφορά [140].

## 4. Πρωτεΐνες 14-3-3 ως θεραπευτικός στόχος

Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [109]. Η διαταραχή των 14-3-3 πρωτεϊνών έχει περιγραφεί και έχει μελετηθεί κυρίως στον καρκίνο. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, της κεφαλής και τραχήλου και η

υπερέκφρασή τους συσχετίζεται με κακή έκβαση. Επίσης, αρκετά νευρολογικά νοσήματα συσχετίζονται με διαταραχή των 14-3-3 πρωτεϊνών και κάποια από αυτά είναι η εγκεφαλοπάθεια Creutzfeldt-Jakob, η Νόσος Parkinson και η Νόσος Alzheimer. Διαταραχή στις 14-3-3 πρωτεΐνες έχει διαπιστωθεί στη διαβητική μυοκαρδιοπάθεια, στη σκλήρυνση κατά πλάκας, στην ενδομητρίωση, στις αρθρίτιδες, στο γλαύκωμα, στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και σε άλλες [142, 143]. Το τρέχον “14-3-3 diseasome” αποτελείται από 4 τάξεις νοσημάτων, την ογκογένεση, μεταβολικά νοσήματα, καρδιαγγειακά νοσήματα και νοσήματα νευροψυχιατρικά και, αναμένεται να επεκταθεί (εικόνα 28) [104]. Η συσχέτιση των 14-3-3 πρωτεϊνών με την πληθώρα αυτών των νοσημάτων αλλά κυρίως με τον καρκίνο, τις έθεσε ως νέους υποψήφιους μοριακούς θεραπευτικούς στόχους.



Εικόνα 28: 14-3-3 “Diseasome”. Από βιβλιογραφική αναφορά [104].

Ο χειρισμός των 14-3-3 πρωτεϊνών ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν θεραπευτικά σκευάσματα προϋποθέτει την ακριβή κατανόηση της ρύθμισής τους. Η έκφραση των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών τροποποιείται στο επίπεδο του γονιδίου όπου, για παράδειγμα οι πρωτεΐνες 14-3-3 υπερεκφράζονται εξαιτίας γονιδιακού πολλαπλασιασμού

(gene amplification). Η σταθερότητα του mRNA των 14-3-3 πρωτεϊνών, η ρύθμισή του μέσω microRNAs ακόμα και η αποδόμηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφρασή τους. Επίσης, η λειτουργία των πρωτεϊνών 14-3-3 εξαρτάται τόσο από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ίδιων των 14-3-3 πρωτεϊνών όσο και από τις τροποποιήσεις των πρωτεϊνικών τους στόχων [143].

Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που θα «χειρίζονται» τις 14-3-3 πρωτεΐνες θα μπορούσαν να δημιουργηθούν με στόχο να ρυθμίζουν είτε την έκφραση και τη σταθερότητά τους, είτε το διμερισμό τους, είτε την αλληλεπίδρασή τους με τον πρωτεϊνικό τους στόχο. Η τρέχουσες προσπάθειες γίνονται στην ανεύρεση σκευασμάτων τα οποία θα στοχεύουν την αλληλεπίδραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τον πρωτεϊνικό τους στόχο [143].

#### **4.1 Ανταγωνιστές των 14-3-3 πρωτεϊνών**

Το **R18** είναι ένα πεπτίδιο που μιμείται τη θέση δέσμησης των πρωτεϊνικών στόχων στην αύλακα των πρωτεϊνών 14-3-3, επομένως, το R18 ανταγωνίζεται τον πρωτεϊνικό στόχο στη δέσμευσή του στις 14-3-3 πρωτεΐνες. Το **difopein** (**d**imeric **f**ourteen-three-three **p**eptide **i**nhibitor) είναι μια διμερής αλληλουχία R18 που ενισχύει τη δραστικότητα του R18 και οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο. Τόσο το R18 όσο και το difopein χρησιμοποιούνται ως εργαλεία μελέτης της λειτουργίας των 14-3-3 πρωτεϊνών και μελετώνται ως πιθανά χημειοθεραπευτικά σκευάσματα (εικόνα 29) [143].

#### **4.2 Μόρια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου (14-3-3 PPI inhibitors)**

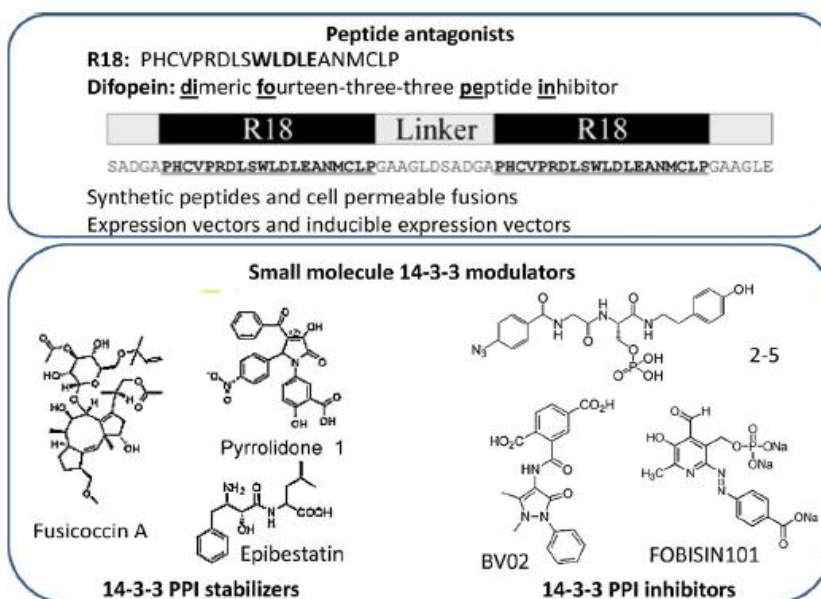
Το **BV02** είναι ένα μικρό μόριο το οποίο διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει την αλληλεπίδραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους. Το BV02 ίσως αποδειχθεί σημαντικό στην αντιμετώπιση ανθεκτικών λευχαιμιών.

Το **FOBISIN** (**F**ourteen-three-three **B**inding **S**mall molecule **I**nhibitor) είναι ένα μόριο που δεσμεύεται άμεσα σε όλες τις 14-3-3 πρωτεΐνες, ασκεί ανασταλτική δράση και διαπιστώθηκε ότι καταστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων πνεύμονα [143].

#### **4.3 Μόρια που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου (14-3-3 PPI stabilizers)**

Η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ 14-3-3 πρωτεϊνών και πρωτεϊνικού στόχου οδηγεί, επίσης, σε καταστολή των 14-3-3 πρωτεϊνών αφού τις διατηρεί δεσμευμένες. Η **Fusicoccin A**,

η **Pyrrolidone** και η **Epibestatin** σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους [143].



Εικόνα 29: Ρυθμιστές αλληλεπιδράσεων 14-3-3 πρωτεϊνών με πρωτεΐνες. Από βιβλιογραφική αναφορά [143].

## ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) είναι ένα νόσημα που εμφανίζεται σε ποσοστό 10-12% του γενικού πληθυσμού και, στο τελικό της στάδιο, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, με εξωνεφρική κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρού, είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς. Στα επόμενα χρόνια αναμένεται αύξηση των ασθενών με ΧΝΝ των οποίων το κόστος θεραπείας είναι τεράστιο. Ακόμα πιο σημαντικό από το κόστος είναι το ότι, στις αναπτυσσόμενες χώρες, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη και, επομένως, το τελικό στάδιο της ΧΝΝ ισοδυναμεί με το θάνατο [4-6].

Τα αίτια της ΧΝΝ είναι πολλά και, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκαλεί, η εξέλιξή της συσχετίζεται με τη νεφρική ίνωση. Η συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας στο σωληναριοδιάμεσο χώρο, που χαρακτηρίζει τη νεφρική ίνωση, αντικαθιστά το νεφρικό παρέγχυμα και οδηγεί σε προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας μέχρι την εμφάνιση τελικού σταδίου ΧΝΝ. Η νεφρική ίνωση, που είναι το τελικό αποτέλεσμα και ο κοινός παρονομαστής πολλών νεφρικών νοσημάτων, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και, σαν πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί κυτταρικοί και μοριακοί μεσολαβητές, θα πρέπει να μελετηθεί με προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και, η Πρωτεωμική Ανάλυση είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για το σκοπό αυτό [1-9].

Οι Kypreou KP et al, στην προσπάθειά τους να διερευνήσουν τα μόρια που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της ίνωσης, μελέτησαν τις αλλαγές του πρωτεωμικού προφίλ νεφρικού φλοιού σε μοντέλο ετερόπλευρης απόφραξης του ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) και, διαπίστωσαν ότι, η calreticulin, μια πολυλειτουργική δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου, υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ινωτικής διεργασίας και, κυρίως, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα [49].

**Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου της calreticulin στη νεφρική ίνωση και, πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση του πώς μεταβάλλονται οι ιδιότητες των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων κατά την υπερέκφρασή της.**

## ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1. Κυτταρική Σειρά

Χρησιμοποιήθηκαν τα HK-2 (Human Kidney 2, HK-2) από την American Type Culture Collection (ATCC). Η HK-2 είναι μια σειρά ανθρώπινων κυττάρων εγγύς σωληναρίου που προέρχεται από φυσιολογικό νεφρό. Τα κύτταρα αυτά είναι αθανатоποιημένα, διατηρούν το φαινότυπο και τα περισσότερα λειτουργικά χαρακτηριστικά καλά διαφοροποιημένων εγγύς σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων.

##### 1.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Η κυτταρική σειρά HK-2 καλλιεργήθηκε στο ειδικό θρεπτικό υλικό, σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Το ειδικό θρεπτικό υλικό αποτελείται από DMEM περιεκτικότητας 4.5% σε γλυκόζη, αναμειγμένο με ίση ποσότητα F12 και, συμπληρωμένο με 10% βόειο εμβρυικό ορό (fetal bovine serum, FBS), 2mM L-glutamine και 100 mg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρούνταν σε φλάσκες καλλιέργειας των 25 cm<sup>2</sup>, σε συνολικό όγκο 5 ml, ενώ ανακαλλιεργούνταν κάθε 3-4 ημέρες σε αναλογία 1:4, με μεταφορά σε νέες φλάσκες με φρέσκο θρεπτικό υλικό.

Η ανακαλλιέργεια γινόταν όταν ο κυτταρικός πληθυσμός κάλυπτε την επιφάνεια της φλάσκας σε ποσοστό περίπου 80%, ώστε τα κύτταρα να συνεχίζουν να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Μετά την αφαίρεση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα, τα κύτταρα επάζονταν με 1-2 ml διαλύματος θρυψίνης στους 37°C για χρονικό διάστημα 5-10 λεπτών, ώστε να ξεκολλήσουν από την επιφάνειά της. Ακολουθούσε προσθήκη διπλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού με ορό για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε 15 ml πλαστικά σωληνάρια (falcon) και φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και μεταφερόταν σε νέες φλάσκες.

##### 1.2 Διαμόλυνση κυττάρων

Για να δημιουργηθούν κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, έγινε σταθερή διαμόλυνση με πλασμίδιο pcDNA3.1/Hygro το οποίο μετέφερε cDNA calreticulin ποντικού, το οποίο ήταν εμπορικά διαθέσιμο και με μεγάλη ομολογία με το ανθρώπινο cDNA. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε σε δίσκο 6 κυψελίδων (6-well plates) με pcDNA3.1-hygro-

mCRT με τη χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamin 2000 (Invitrogen). Στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου έγινε διαμόλυνση με κενό φορέα. Δύο ημέρες μετά, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε δίσκους καλλιέργειας (culture dishes) και αναπτύχθηκαν στο ειδικό θρεπτικό υλικό στο οποίο προστέθηκαν 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hygromycin B (Merck) και το οποίο ανανεωνόταν κάθε 2 με 3 ημέρες. 10-12 ημέρες μετά, οι σταθεροί κλώνοι αφαιρέθηκαν και καλλιεργήθηκαν για να αναπτυχθούν ξεχωριστά. Οι επιλεγμένοι κλώνοι, δηλαδή αυτοί που υπερέκφραζαν calreticulin 1.5 ( $p < 0.05$ ) και 3 ( $p < 0.001$ ) φορές περισσότερο από την ομάδα ελέγχου, καλλιεργήθηκαν στο ειδικό θρεπτικό υλικό στο οποίο προστέθηκαν 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hygromycin. Οι επιλεγμένοι κλώνοι ονομάστηκαν mCRT-16 και mCRT-17 και, **ο κλώνος της ομάδας ελέγχου pcDNA-7. Ο κλώνος mCRT-16 αντιστοιχεί στη μέτρια υπερέκφραση calreticulin και, ο κλώνος mCRT-17 στην υψηλή.**

Για να αποθηκευτούν τα κύτταρα, το κυτταρικό ίζημα από την ανακαλλιέργεια ξεπλενόταν επί 3 φορές με PBS (Gibco) ώστε να απομακρυνθεί το FBS. Τα κυτταρικά ιζήματα αποθηκεύονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πλαστικά σωληνάρια (falcon).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στην παρούσα μελέτη οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν προϋπήρχαν στο εργαστήριο και δημιουργήθηκαν από την Πράκουρα Νίκη, MSc.

## 2. Πρωτεωμική Ανάλυση

Η απομόνωση πρωτεϊνών για την Πρωτεωμική Ανάλυση έγινε από: δύο ξεχωριστές καλλιέργειες pcDNA-7, δύο ξεχωριστές καλλιέργειες mCRT-16 και δύο ξεχωριστές καλλιέργειες mCRT-17 και, η 2D-E των πρωτεϊνών έγινε δύο φορές ώστε, να έχουμε αποτελέσματα από δύο βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις.

### 2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος

Τα κύτταρα, αφού ελήφθησαν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ , ομογενοποιήθηκαν με προσθήκη διαλύματος λύσης (sample buffer, SB). Το διάλυμα λύσης περιλαμβάνει 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 1%DTE, 2% Bio-Lyte 3/10 Ampholytes και διπλά απιονισμένο νερό. Σε κάθε κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 250  $\mu\text{L}$  διαλύματος λύσης μαζί με μείγμα αναστολέων πρωτεασών σε αναλογία προς το διάλυμα λύσης 1:25. Με διαδοχικές αναρροφήσεις της πιπέτας και με έντονη ανατάραξη, έγινε διαλυτοποίηση. Η όλη διαδικασία επιτελέστηκε σε πάγο. Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων με υπέρηχους για 15 λεπτά και, στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 rpm, στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης (βόειος ορός



αλβουμίνης) γνωστών συγκεντρώσεων, από τα οποία 10  $\mu$ L αναμείχθηκαν με 1mL αντιδραστηρίου Bradford σε κυβέττα. Από κάθε εκχύλισμα, λήφθηκαν 2 $\mu$ L δείγματος και τοποθετήθηκαν σε κυβέττα που περιείχε 1 mL διαλύματος Bradford. Στη συνέχεια, οι κυβέττες τοποθετήθηκαν σε φωτόμετρο SmartSpec Plus (BioRad) και, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων. Για τον πρωτεϊνικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν 100  $\mu$ g πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα.

## **2.2. Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός**

Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός έγινε με 2D-E, η οποία περιελάμβανε στην πρώτη διάσταση την ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) και, στη δεύτερη την ηλεκτροφόρηση βάσει Μοριακού Βάρους.

### **2.2.1. Ισοηλεκτρική Εστίαση-1<sup>η</sup> διάσταση**

Η IEF έγινε με τη χρήση ταινιών ακινητοποιημένης κλίσης pH 3-10, 7cm (Immobilized pH gradient, IPG), οι οποίες διατηρούνταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Σε ειδικό σκαφίδιο, σε κάθε ταινία φορτώθηκε ολικός όγκος διαλύματος 125  $\mu$ L. Το διάλυμα αυτό περιείχε τον όγκο στον οποίο το κάθε δείγμα είχε 100  $\mu$ g πρωτεΐνης και το υπόλοιπο συμπληρώθηκε με διάλυμα λύσης (SB). Η ταινία τοποθετήθηκε στο ειδικό σκαφίδιο με τέτοιο τρόπο ώστε η θετική άκρη της να βρίσκεται στο θετικό πόλο του σκαφιδίου. Στη συνέχεια, το σκαφίδιο τοποθετήθηκε στο μηχάνημα BIORAD PROTEAN IEF cell και εφαρμόστηκε το πιο κάτω πρόγραμμα: χωρίς ενυδάτωση (Rehydration), θερμοκρασία εστίασης  $20^{\circ}\text{C}$ , βήμα 1/5: 50V-rapid-12 ώρες, βήμα 2/5: 300V-rapid-3 ώρες, βήμα 3/5: 4000V-linear-5 ώρες, βήμα 4/5: 4000V-rapid-12500Vhr, βήμα 5/5: 100V-rapid-48 ώρες,  $\mu\text{A}$  όριο/gel: 99. Στα τριάντα λεπτά από την έναρξη της IEF, τα δείγματα καλύφθηκαν με λάδι παραφίνης ώστε να μην εξατμιστούν. Στις 12 ώρες, κάτω από τα σημεία επαφής της κάθε ταινίας με τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν υγρά χαρτάκια για να αποφευχθεί η συσσώρευση αλάτων και κρυστάλλων ουρίας στα ηλεκτρόδια. Οι ταινίες παρέμειναν στο IEF μηχάνημα για 20045 Vhr με μέγιστο  $V=2600\text{V}$ .

### **2.2.2. Ηλεκτροφόρηση βάσει Μοριακού Βάρους-2<sup>η</sup> διάσταση**

Της ηλεκτροφόρησης, προηγήθηκε η διαδικασία της εξισορρόπησης των ταινιών. Κατά τη διαδικασία αυτή, γίνεται στις πρωτεΐνες αναγωγή με το πρώτο διάλυμα εξισορρόπησης και, αλκυλίωση με το δεύτερο. Το πρώτο διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από 6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, Γλυκερόλη 30%(v/v), SDS 2%(v/v) και DTE 0,5%(w/v) (30mM). Το δεύτερο διάλυμα εξισορρόπησης, που είναι φωτοευαίσθητο και για αυτό ετοιμάζεται και

χρησιμοποιείται στο σκοτάδι, αποτελείται από 6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, Γλυκερόλη 30%(v/v), SDS 2%(v/v) και ιωδοακεταμίδιο IOA 4,32%(w/v) (230mM). Η επώαση των ταινιών στα διαλύματα εξισορρόπησης έγινε με 10 ml από το κάθε διάλυμα εξισορρόπησης, για 10 λεπτά, υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση.

Ετοιμάστηκαν 12 πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, περιεκτικότητας 12% σε πολυακρυλαμίδιο, 10 ml το κάθε ένα, διαστάσεων 7.5cm × 10cm × 1.5mm. Το διάλυμα για το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου περιείχε 30% Acrylamide/PDA 37.5/1, 1.5M Tris-HCl pH 8.8, διπλά απιονισμένο νερό, 20% SDS, APS 10% και TEMED. Τοποθετήθηκε η κάθε ταινία πάνω από το κάθε πήκτωμα και, στην κορυφή εφαρμόστηκε αγαρόζη 0.5% σε 1x TGS, η οποία περιείχε κυανό της βρωμοφαινόλης, ώστε να παρακολουθείται το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης κατά την πορεία της.

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBS, το οποίο είναι το εμπορικά διαθέσιμο TBS 10x αραιωμένο σε τελική συγκέντρωση 1x. Έγινε ηλεκτροφόρηση στα 80V για 10 λεπτά και στη συνέχεια στα 180V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα αφαιρέθηκαν και επώαστηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης κατά τη διάρκεια όλης της νύχτας υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση. Το διάλυμα μονιμοποίησης αποτελείται από 30% methanol, 10% acetic acid και 60% διπλά απιονισμένο νερό.

Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε από τα πηκτώματα το διάλυμα μονιμοποίησης και, τα πηκτώματα ξεπλύθηκαν 4 φορές με διπλά απιονισμένο νερό, για 10 λεπτά την κάθε φορά. Τα πηκτώματα εμβαπτίστηκαν το κάθε ένα σε 50 ml χρωστικής Coomassie Colloidal Blue για 2-3 ώρες. Ακολούθησε αποχρωματισμός με διπλά απιονισμένο νερό.

Τα δισδιάστατα πηκτώματα σαρώθηκαν με τον σαρωτή BioRad GS800 Calibrated Densitometer, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PDQuest 7.1.1 και, οι εικόνες που λήφθηκαν αποθηκεύτηκαν στο σκληρό δίσκο του ηλεκτρονικού υπολογιστή για να είναι διαθέσιμες για επεξεργασία με το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα. Τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν το κάθε ένα σε ξεχωριστή πλαστική σακούλα με διπλά απιονισμένο νερό και διατηρήθηκαν στους 4°C.

### **2.3 Ανάλυση 2D-πηκτωμάτων με λογισμικό πρόγραμμα**

Τα πηκτώματα αναλύθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα PDQuest 8 Image Processing Software. Είναι ένα πρόγραμμα το οποίο, σύμφωνα με τα δεδομένα που του δίνονται, συγκρίνει τις ψηφιακές εικόνες των δισδιάστατων πηκτωμάτων και διαπιστώνει τις στατιστικά σημαντικές διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες. Όλα τα πηκτώματα

συγκρίθηκαν μεταξύ τους, έγινε αντιστοίχιση όλων των πρωτεϊνικών κηλίδων και, αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσίαζαν ποσοτική διαφορά 2 φορές, 5 φορές και 10 φορές.

#### **2.4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών**

Οι διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες αφαιρέθηκαν από τα πηκτώματα με το χέρι, με τη χρήση ειδικής σύριγγας γεμάτης διπλά απιονισμένο νερό. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες τοποθετήθηκαν σε δίσκο 96 κυψελίδων (96-well plate) και, σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 200  $\mu$ L διαλύματος αποχρωματισμού (destain). Το διάλυμα αποχρωματισμού αποτελείται από 30% ACN και 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Έγιναν τόσα ξεπλύματα με το διάλυμα αποχρωματισμού όσα χρειάστηκαν μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό της χρωστικής Coomassie Colloidal Blue ώστε να απομακρυνθεί από τις αργινίνες για να μπορέσει, στη συνέχεια, η θρυψίνη να τις αναγνωρίσει. Το διάλυμα αποχρωματισμού αφαιρέθηκε και οι κηλίδες ξεπλύθηκαν με 200  $\mu$ L διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά, επί δύο φορές, σε ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε αναγωγή με 200  $\mu$ L DTE (15ml ammonium bicarbonate 10mM, 0.023g DTE) για 10 λεπτά, σε ελαφρά ανάδευση και, αλκυλίωση με 200  $\mu$ L IOA (15ml ammonium bicarbonate 10mM, 0.150g IOA) στο σκοτάδι, σε ελαφρά ανάδευση, για 10 λεπτά. Τα πηκτώματα ξεπλύθηκαν με 200 $\mu$ L διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για αφυδάτωση στο μηχάνημα MAXI DRY PLUS στους 45°C για 20 λεπτά. Στην κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 3 $\mu$ L θρυψίνης 10 ng/ $\mu$ L και ο δίσκος 96 κυψελίδων, αφού πρώτα καλύφθηκε με ταινία παραφίνης (parafilm), τοποθετήθηκε σε υγρό πλαστικό δοχείο για τη διάρκεια της νύκτας, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να προετοιμαστούν οι πρωτεϊνικές κηλίδες για το φασματογράφο μάζας, μετά την ολονύκτια θρυψινοποίηση, προστέθηκαν στην κάθε μια 10  $\mu$ L διαλύματος εκχύλισης (extraction solution), το οποίο αποτελείται από 50% ακετυλονιτρίλιο και 0.1% TFA για τουλάχιστον 30 λεπτά, σε ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η τεχνική της «ξηράς σταγόνας» (dry droplet technique) κατά την οποία, 1  $\mu$ L πεπτιδίου από το την κάθε κηλίδα αναμείχθηκε πάνω σε ειδική επιφάνεια (plate, chip) με 1  $\mu$ L διάλυμα μήτρας (matrix solution) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Το matrix solution περιέχει διάλυμα εκχύλισης, 0.8%  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid 0.025% (v/v) και, για ρύθμιση (calibration) του φασματογράφου, θραύσμα βραδυκινίνης (904 Da) και θραύσμα φλοιοεπινεφριδιοκορτικοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH) (2465 Da). Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας MALDI-TOF/TOF.

Στο φασματογράφο μάζας, τα πεπτίδια ιονίστηκαν με Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) και για αναλυτής μάζας χρησιμοποιήθηκε αναλυτής που μετρά το χρόνο πτήσης των ιόντων (time-of-flight, TOF). Οι μάζες των πεπτιδίων μετρήθηκαν αυτόματα, συγκρίθηκαν με τις θεωρητικές μάζες όλων των πρωτεϊνών από όλες τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων και για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος MASCOT όπου, στατιστικά, αξιολογήθηκαν οι τιμές  $p < 0.05$ . Τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν σε διακομιστή (server) ώστε να είναι διαθέσιμα για μελέτη και επεξεργασία.

## **2.5 Κατηγοριοποίηση Πρωτεϊνών - Δημιουργία Πρωτεϊνικών Δικτύων**

Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε κατηγορίες με τη χρήση της βάσης δεδομένων **UniProt (Universal Protein Resource)** <http://www.uniprot.org/>. Έγινε αναζήτηση της κάθε πρωτεΐνης βάσει του κωδικού πρόσβασης (accession) που δόθηκε από το MALDI-TOF/TOF και, αξιολογήθηκαν, κυρίως, οι λειτουργίες της κάθε πρωτεΐνης και η οντολογία των γονιδίων τους (Gene Ontology).

Για τη δημιουργία πρωτεϊνικών δικτύων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα **Ingenuity Pathway Analysis (IPA)** (<http://www.ingenuity.com/>) στο οποίο καταχωρήθηκαν ταυτόχρονα όλες οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τον κωδικό πρόσβασής τους.

## **3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τις πρωτεΐνες 14-3-3 στα κύτταρα HK-2**

Έγινε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ των 14-3-3 πρωτεϊνών από RNA που απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές pcDNA-7, mCRT-16 και mCRT-17. Η qRT-PCR έγινε τρεις φορές για την κάθε κυτταρική σειρά από ξεχωριστές καλλιέργειες.

### **3.1 Απομόνωση RNA από κύτταρα**

Απομονώθηκε RNA από τις κυτταρικές σειρές pcDNA-7, mCRT-16 και mCRT-17. Για την απομόνωσή του, η οποία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα υπό άσηπτες συνθήκες, χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Trizol.

Η λύση των κυττάρων έγινε με την προσθήκη στις φλάσκες 1 ml διαλύματος Trizol και ακολούθησαν συνεχείς πολλαπλές αναρροφήσεις της πιπέτας. Το δείγμα συλλέχθηκε, αφέθηκε για επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια,

προστέθηκαν σε αυτό 0.1 ml 1-Bromo-3-Chloropropan (BCP). Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα μέχρι, το δείγμα να αποκτήσει ένα αδιαφανές ροζ χρώμα, οπότε και αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12000 rpm, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια στα οποία προστέθηκαν 0.5 ml isopropanol ώστε να καθιζάνει το RNA. Μετά από δεκάλεπτη παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 12000 rpm, στους 4°C ώστε να γίνει το RNA ίζημα. Στο ίζημα, προστέθηκε 1ml 75% ethanol, ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και, το βήμα αυτό επαναλήφθηκε. Το ίζημα αφέθηκε στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα να στεγνώσει και, στη συνέχεια, διαλύθηκε με 40 μl νερό ελεύθερου RNase, οπότε και θερμάνθηκε για 10 λεπτά στους 55-60°C. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA, από το διαλυμένο στο νερό RNA ελήφθησαν 3 μl τα οποία αραιώθηκαν σε 297 μl νερού ελεύθερου RNase ώστε να προσδιοριστεί η απορρόφησή τους στα 260nm και στα 280 nm. Στο φωτόμετρο ThermoSpectronic (Biomate) προσδιορίστηκε, αρχικά, η απορρόφηση του ελεύθερου RNase νερού για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας και, στη συνέχεια προσδιορίστηκε η απορρόφηση των δειγμάτων. Για να υπολογιστεί η αρχική συγκέντρωση RNA χρησιμοποιήθηκε ο τύπος  $[RNA \mu g/\mu l] = A_{260} \times 40 \times \text{αραιώση διαλύματος} / 1000$ . Για να αξιολογηθεί η καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκε ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280nm. Η τιμή του λόγου 1.7-2 αντιπροσώπευε επιθυμητό RNA.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι αποικοδόμησης του RNA. Ετοιμάστηκαν πηκτώματα αγαρόζης περιεκτικότητας σε αγαρόζη 1/100 σε TBE, με 5% βρωμιούχο αιθίδιο. Το διάλυμα TBE 5x αποτελείται από 27.5 g Boric acid, 20 ml 0.5M EDTA pH 8 και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί όγκος 1l. Στην κάθε θέση του πηκτώματος φορτώθηκαν 6μl τα οποία αποτελούνταν από 1 μl RNA, 1 μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρωμένος με νερό ελεύθερου RNase. Το διάλυμα φόρτωσης 6x αποτελείται από 1.25% bromophenol blue και 40% (w/v) sucrose σε διπλά απιονισμένο νερό. Σαν δείκτης για την εντόπιση του αριθμού των βάσεων φορτώθηκαν 3 μl DNA ladder 1 kb. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100 V και διεκόπη ανάλογα με το μέτωπο πορείας της. Το πήκτωμα σαρώθηκε σε σύστημα οπτικοποίησης για πήκτωμα αγαρόζης Dolphin DOC (Wealtec). Ιδανικό για qRT-PCR θεωρήθηκε το RNA στο οποίο οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στο 18S rRNA (750 bp) και στο 28S rRNA (1500 bp) ήταν ξεκάθαρες.

Για να καταστραφούν πιθανές προσμείξεις του απομονωμένου RNA με DNA, ακολούθησε η διαδικασία της θεραπείας με DNAase. Κατά τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε η RQ1 DNAase (Promega). Η αντίδραση έγινε σε συνολικό όγκο των 20 μl και σε αυτή αναμείχθηκαν 3-4μl DNAase, 2 μl DNAase buffer 10x, 5-8μl RNA και το υπόλοιπο συμπληρωμένο με διπλά απιονισμένο νερό. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα και, στη συνέχεια, απενεργοποιήθηκε η DNAase με θέρμανση στους 65°C για 10 λεπτά. Μετρήθηκε, εκ νέου, η συγκέντρωση του RNA.

### **3.2 Παραγωγή cDNA**

Η διαδικασία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα υπό άσηπτες συνθήκες. Για την παραγωγή cDNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση Reverse Transcriptase ImProm II (Promega) και το μηχάνημα PCR PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Η κάθε αντίδραση έγινε σε ειδικό σωληνάριο για εκτέλεση PCR και, για αυτή αναμείχθηκαν 1 μl RNA, 1 μl τυχαίοι εκκινητές (random primers) 500 ng/μl και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί όγκος 20 μl. Στο μηχάνημα της PCR εφαρμόστηκε το πιο κάτω πρόγραμμα: βήμα 1/6: 70°C για 5 λεπτά, βήμα 2/6: 4°C για 5 λεπτά, βήμα 3/6: 25°C για 5 λεπτά, βήμα 4/6: 42°C για 1 ώρα, βήμα 5/6: 70°C για 15 λεπτά και βήμα 6/6: 14°C μέχρι τη λήψη των δειγμάτων. Μετά την ολοκλήρωση του βήματος 2/6, διεκόπη το πρόγραμμα στο μηχάνημα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 0°C και σε αυτά προστέθηκαν 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 2.4 μl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 μl δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10 mM και 1 μl ImProm II. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν και πάλι στο μηχάνημα της PCR μέχρι την ολοκλήρωση του προγράμματος. Η διακοπή της αντίδρασης και η ανάμειξη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων έγινε με αυτό τον τρόπο ώστε η αντίστροφη μεταγραφάση να μην καταστραφεί από την υψηλή θερμοκρασία.

### **3.3 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για τα γονίδια των ισομορφών των πρωτεϊνών**

#### **14-3-3**

Για την εκτέλεση της q-RT-PCR σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) για τις ανθρώπινες ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 β, ε, γ, η, τ και ζ. Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος αναζητήθηκαν μέσω Wikipedia, οπότε, από το γονίδιο της κάθε μίας αναζητήθηκε η αλληλουχία αναφοράς mRNA στον άνθρωπο (RefSeq mRNA human) και η κωδικοποιητική αλληλουχία (coding sequence, CDS). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε μέσω του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Σαν όριο σχεδιασμού των εκκινητών ετέθη η αρχή της κωδικοποιητικής αλληλουχίας για τον πρόσθιο εκκινητή (forward primer,

Fw) και, το τέλος της κωδικοποιητικής αλληλουχίας για τον αντίστροφο εκκινητή (Reverse primer, Rv). Σαν όριο μεγέθους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ετέθη σαν ελάχιστο το 70 και σαν μέγιστο το 150 και, είτε ζητήθηκε ο εκκινητής να καλύπτει σύνδεση εξωνίου με εξώνιο είτε, το ελάχιστο μήκος του ιντρονίου να είναι 100 και το μέγιστο 1000000. Στα αποτελέσματα της αναζήτησης αξιολογήθηκαν η ειδικότητα, η λήξη σε GC, το μήκος να είναι περίπου 20 bp και ίδιο μεταξύ προσθιοκίνητου και αντίστροφου, να έχουν παρόμοια Tm και χαμηλή συμπληρωματικότητα με τον εαυτό τους.

Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που επιλέγηκαν ήταν για το γονίδιο της 14-3-3β YWHAB ο Fw AGCCTGGCAAAAACGGCATTGTA και Rv GCGTCTCCTTCGTCTCCCTGGT, για το γονίδιο της 14-3-3ε YWHAΕ ο Fw GCCGAGCAGGCTGAGCGATA και Rv CAGCTCCACATCCATCCCTGCT, για το γονίδιο της 14-3-3γ YWHAG ο Fw GCGGCCATGAAGAACGTGACAGAG και Rv ATGACCCTCCAGGAAGAGCGGC, για την 14-3-3η YWHAN ο Fw CGACGACATGGCCTCCGCTA και Rv CGCCTGGCACCAACCACATT, για την 14-3-3τ YWHAQ ο Fw ACCTTGCTGAAGTTGCGTGTGGT και Rv CCCAGGCGGATTGGGTGTG και για την 14-3-3ζ ο Fw CCGCTGGTGATGACAAGAAAGGGAT και Rv AGGGCCAGACCCAGTCTGATAGGA.

#### **3.4 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA**

Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA ήταν για τον Fw AACTTTCGATGGTAGTCGCCG και για τον Rv CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT.

#### **3.5 qRT-PCR για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 στα κύτταρα HK-2**

Η διαδικασία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα υπό άσηπτες συνθήκες. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) εκτελέστηκε σε κατάλληλο για qRT-PCR δίσκο 96 κυψελίδων (96 well plate). Η κάθε αντίδραση εκτελέστηκε με ανάμειξη 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 10x, 0.4 μl dNTPs 10 mM, 0.6 μl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.6 μl SYBR Green 1:2000, 0.1 μl Plat-Taq, 0.3 μl Fw εκκινητή 20μM, 0.3 μl Rv εκκινητή 20 μM, 9 μl cDNA από αραιωμένο cDNA 1/20 και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί συνολικός όγκος 20 μl για την κάθε αντίδραση. Για τις αντιδράσεις για τα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το 18S rRNA και, η κάθε αντίδραση έγινε με ανάμειξη 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 10x, 0.4 μl dNTPs 10 mM, 0.6 μl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.6 μl SYBR Green 1:2000, 0.1 μl Plat-Taq, 0.3 μl Fw εκκινητή 20μM, 0.3 μl Rv εκκινητή 20 μM, 1.5 μl cDNA από αραιωμένο cDNA 1/20 και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί συνολικός όγκος 20 μl. Στη συνέχεια, ο δίσκος 96

κυψελίδων τοποθετήθηκε στο μηχάνημα της qRT-PCR το οποίο χρησιμοποιεί το λογισμικό πρόγραμμα ABI Prism 7000 Software. Οι συνθήκες ήταν οι συνηθισμένες των τριών κύκλων χρησιμοποιώντας τους ειδικούς για την αλληλουχία εκκινητές. Ακολούθησε σχεδιασμός ειδικής καμπύλης ανάλυσης ώστε να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός μόνο ενός προϊόντος. Για την ποσοτική ανάλυση, τα γονίδια του πειράματός μας ομαλοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου του 18S rRNA με τη μέθοδο ΔΔCT.

Η qRT-PCR εκτελέστηκε 3 φορές για την κάθε κυτταρική σειρά.

#### **4. Ζωικό Μοντέλο Νεφρικής ίνωσης UUO (Unilateral Ureteral Obstruction)**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO). Το μοντέλο UUO έγινε συνολικά σε 18 αρουραίους και σε 9 ποντίκια. Οι αρουραίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα των χειρουργημένων ζώων της ομάδας ελέγχου, η δεύτερη την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για δύο (2) ημέρες και, η τρίτη αποτελούσε την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για οκτώ (8) ημέρες. Τα ποντίκια χωρίστηκαν και αυτά στις ίδιες τρεις κατηγορίες και στις ίδιες ομάδες.

##### **4.1 Ζωικό μοντέλο Νεφρικής ίνωσης σε αρουραίο**

Το μοντέλο UUO διενεργήθηκε βάσει της βιβλιογραφικής αναφοράς [49]. Διενεργήθηκε σε αρουραίους Wistar, σωματικού βάρους 200 με 250g ο κάθε ένας, οι οποίοι προμηθεύτηκαν από τη Μονάδα Ζώων του Πειραματικού Χειρουργείου του Ιδρύματος. Οι αρουραίοι παρέμεναν στη φυσιολογική τους δίαιτα και, η πρόσληψη ύδατος ήταν ελεύθερη. Κατά τη διάρκεια της διενέργειας του UUO, τα ζώα παρέμεναν σε κλωβούς με τεχνητό φωτισμό δωδεκάωρης εναλλαγής φωτός και σκότους και, βρίσκονταν υπό τη συνεχή παρακολούθηση του προσωπικού του Τμήματος Ζώων. Η χειρουργική επέμβαση έγινε υπό άσηπτες συνθήκες, από ειδικά εκπαιδευμένο κτηνίατρο στο Πειραματικό Χειρουργείο του Ιδρύματος. Οι έξι αρουραίοι αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων της ομάδας ελέγχου, οι άλλοι έξι αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων των δύο (2) ημερών και, οι επόμενοι έξι αρουραίοι αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων των οκτώ (8) ημερών. Η αναισθησία όλων των ζώων έγινε με χορήγηση εισπνεόμενου ισοφλουορένιου. Η πρόσβαση στο δεξιό ουροποιητικό σύστημα των ζώων έγινε με μέση κοιλιακή τομή. Ο δεξιός ουρητήρας των ζώων της ομάδας ελέγχου παρασκευάστηκε και αφέθηκε ελεύθερος. Στα ζώα της ομάδας των δύο και οκτώ ημερών, έγινε παρασκευή του



δεξιού ουρητήρα και ακολούθησε απολίνωσή του με ράμμα από μετάξι σε απόσταση 1 cm από τη νεφρική πύελο. Ακολούθησε ράψιμο της μέσης κοιλιακής τομής και, μετά την ανάνηψή τους, τα ζώα τοποθετήθηκαν στους κλωβούς τους. Τη δεύτερη μετεγχειρητική ημέρα θυσιάστηκαν τα ζώα της ομάδας ελέγχου και τα ζώα της ομάδας των δύο ημερών. Την όγδοη μετεγχειρητική ημέρα, θυσιάστηκαν τα ζώα της ομάδας των οκτώ ημερών. Της θυσίας προηγήθηκε αναισθησία με ισοφλουορένιο. Και οι δύο νεφροί από το κάθε ζώο συλλέχτηκαν και, αφού ξεπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό, τεμαχίστηκαν σε πέντε τεμάχια ο κάθε ένας οπότε, διατηρήθηκαν είτε σε 10% φορμαλδεΐδη, είτε σε υγρό άζωτο είτε εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Τα τεμάχια που εγκλείστηκαν σε παραφίνη έγιναν τομές των 5 μm στο τμήμα Ιστοχημείας του Ιδρύματος.

#### **4.2 Ζωικό μοντέλο Νεφρικής ίνωσης σε ποντίκι**

Το μοντέλο UUO διενεργήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα συνολικά σε 9 ενήλικα ποντίκια C57BL/6, 20-30 g το κάθε ένα. Τα ποντίκια προμηθεύτηκαν από τη Μονάδα Ζώων του Πειραματικού Χειρουργείου του Ιδρύματος, παρέμειναν στη φυσιολογική τους δίαιτα και, η πρόσληψη ύδατος ήταν ελεύθερη.

#### **5. Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3**

Η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία στις νεφρικές τομές που εγκλείστηκαν στην παραφίνη, με την τεχνική χρώσης με ανοσοϋπεροξειδάση. Τα πειράματα έγιναν επί τρεις φορές.

##### **5.1 Αντίσωμα κατά των πρωτεϊνών 14-3-3**

Για την ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε για πρωτογενές αντίσωμα το ran 14-3-3 (K-19): sc-629 της Santa Cruz Biotechnology.

##### **5.2 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού από μοντέλο UUO σε αρουραίο**

Αρχικά, από τις τομές αφαιρέθηκε η παραφίνη. Στη συνέχεια, η πλειοψηφία της διαδικασίας έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Τα πλακάκια με τις ιστικές τομές ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε xylene για 15 λεπτά επί 2 φορές, σε 100% ethanol για 5 λεπτά επί 2 φορές, σε 90% ethanol για 5 λεπτά, σε 75% ethanol για 5 λεπτά, σε διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά και, τελικά, σε PBS για 5 λεπτά. Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά την οποία τα πλακάκια εμβαπτίστηκαν για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου σε 50 ml methanol με 2.5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% ώστε να κατασταλεί η ενδογενής

δραστικότητα της υπεροξειδάσης. Τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 15 λεπτά επί 2 φορές. Ακολούθησε η διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνων με κιτρικό κατά την οποία, τα πλακάκια θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 10 λεπτά, εμβαπτισμένα σε κιτρικό οξύ 10 mM, pH 6. Τα πλακάκια αφέθηκαν να κρυώσουν για 30 λεπτά και, ξεπλύθηκαν 2 φορές σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησε αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων της κάθε ιστικής τομής (blocking) για 2 ώρες με 50 μl από 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) και 0.1% Triton. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν η κάθε μία με 45 μl πρωτογενούς αντισώματος (primary antibody) για τη διάρκεια της νύκτας, σε υγρό σκοτεινό θάλαμο στους 4°C. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο, σαν πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν 45 μl IgG από κουνέλι, σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml ενώ, στις υπόλοιπες τομές τοποθετήθηκαν 45 μl από το αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών σε αραιώσεις 1/50, 1/100, 1/200 και 1/500. Την επόμενη μέρα, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) με 50 μl αραιώσεως 1/500 η κάθε τομή για 50 λεπτά, σε υγρό θάλαμο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν αντίσωμα κατά IgG συζευγμένο με ιχνηθέτη το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (Horse Radish Peroxide) από κουνέλι. Στη συνέχεια, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν με PBS για 10 λεπτά υπό ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε επώαση της κάθε τομής με 50 μl διαλύματος 3',3'-Diaminobenzidine (DAB) (Vectror Laboratories) για 3-5 λεπτά. Το διάλυμα DAB αποτελείται από 2,5 ml διπλά απιονισμένο νερό, 2 σταγόνες DAB, 1 σταγόνα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και μία σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.5. Η αντίδραση σταμάτησε με εμβάπτιση σε διπλά απιονισμένο νερό και, στη συνέχεια τα πλακάκια εμβαπτίστηκαν σε φιλτραρισμένη αιματοξυλίνη. Ακολούθησε ξέπλυμα με διπλά απιονισμένο νερό και, στη συνέχεια, αφυδάτωση των ιστών. Τα πλακάκια για την αφυδάτωση εμβαπτίστηκαν σε 75% ethanol για 3 λεπτά, σε 90% ethanol για 3 λεπτά, σε 100% ethanol για 3 λεπτά επί 2 φορές και σε xylene για 3 λεπτά επί 2 φορές. Τοποθετήθηκαν 2 σταγόνες διαλύματος DPX, ως βάση (mounting), στο κάθε πλακάκι και στην κορυφή καλυπτρίδα και, αφέθηκαν να στεγνώσουν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα.

### **5.3 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού από μοντέλο UUO σε ποντίκι**

Επαναλήφθηκε η διαδικασία της προηγούμενης ενότητας σε τομές νεφρών από μοντέλο UUO σε ποντίκι. Τα πειράματα έγιναν επί τρεις φορές.

#### **5.4 Ποσοτικοποίηση αποτελέσματος ανοσοϊστοχημείας με το λογισμικό πρόγραμμα**

##### **Fiji ImageJ**

Η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της ανοσοϊστοχημείας έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ της Fiji. Οι ψηφιακές εικόνες της ανοσοϊστοχημείας φορτώθηκαν ξεχωριστά η κάθε μία στο λογισμικό πρόγραμμα. Αρχικά, μετρήθηκε, από ξεχωριστά πολλαπλά πεδία στην κάθε εικόνα, η ένταση χρώματος του κυτταροπλάσματος των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων από τις νεφρικές τομές της ομάδας ελέγχου (IgG από κουνέλι). Στη συνέχεια, μετρήθηκε και πάλι από ξεχωριστά πολλαπλά πεδία, η ένταση χρώματος του κυτταροπλάσματος των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων από τις νεφρικές τομές οι οποίες επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της ανοσοϊστοχημείας με τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης, έγινε γράφημα στο οποίο, η κάθε στήλη αντιστοιχούσε στην αφαίρεση του μέσου όρου των μετρήσεων της έντασης χρώματος των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα από το μέσο όρο των μετρήσεων της έντασης του χρώματος των τομών με IgG. Οι μετρήσεις έγιναν σε εικόνες ίδιας μεγέθυνσης και ίδιων ρυθμίσεων κατά την επεξεργασία τους.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο αυτή είναι ενδεικτική αφού, η τεχνική χρώσης με ανοσοϋπεροξειδάση φτάνει μέχρι ενός ορίου κατά το οποίο το ένζυμο υφίσταται κορεσμό.

#### **6. Ανοσοφθορισμός σε νεφρικό ιστό των πρωτεϊνών 14-3-3**

Η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό σε νεφρικές τομές που εγκλείστηκαν στην παραφίνη. Το πείραμα έγινε επί τρεις φορές.

##### **6.1 Αντίσωμα κατά των πρωτεϊνών 14-3-3**

Για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε το ίδιο αντίσωμα, δηλαδή το ran 14-3-3 (K-19): sc-629 της Santa Cruz Biotechnology.

##### **6.2 Ανοσοφθορισμός σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο**

Αρχικά, από τις τομές αφαιρέθηκε η παραφίνη. Στη συνέχεια, η πλειοψηφία της διαδικασίας έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Τα πλακάκια με τις ιστικές τομές ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε xylene για 15 λεπτά επί 2 φορές, σε 100% ethanol για 3 λεπτά επί 2 φορές, σε 90% ethanol για 3 λεπτά, σε 75% ethanol για 3 λεπτά και, τελικά, σε PBS για 3 λεπτά. Ακολούθησε η διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνων με κιτρικό, κατά την οποία, τα πλακάκια τοποθετήθηκαν σε λουτρό 10mM κιτρικού οξέος pH 6, στους 80°C, για

20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 3 φορές. Ακολούθησε αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων της κάθε ιστικής τομής (blocking) για 1.5 ώρα, με 50 μl από 10% ορό FBS σε PBS-0.1%Triton σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές επώαστηκαν η κάθε μία με 40 μl πρωτογενούς αντισώματος για τη διάρκεια της νύχτας, σε υγρό σκοτεινό θάλαμο στους 4°C. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο, αντί για πρωτογενές αντίσωμα ετέθησαν 40 μl PBS ενώ στις υπόλοιπες τομές ετέθησαν 40 μl από το αντίσωμα κατά των πρωτεϊνών 14-3-3 σε αραιώση 1/200 και 1/100. Την επόμενη ημέρα, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν αντίσωμα κατά IgG κουνελίου (antirabbit) συζευγμένο με κόκκινη χρωστική 568 και χρησιμοποιήθηκε υπό αραιώση 1/1000. Μετά από δύο ξεπλύματα υπό ελαφρά ανάδευση σε PBS για 10 λεπτά η κάθε μία, ακολούθησε επώαση των τομών με 50 μl 4'6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) 1/2000 σε PBS στην κάθε μία, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακάκια ξεπλύθηκαν ξανά υπό ελαφρά ανάδευση σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, τελικά, στις τομές ετέθη βάση Mowiol (mounting) και καλυπτρίδα και, αφέθηκαν να στεγνώσουν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα στο σκοτάδι.

## **7. Ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO**

Έγινε ποσοτική (qRT-PCR) για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ των 14-3-3 πρωτεϊνών από RNA που απομονώθηκε από νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο. Ο νεφρικός ιστός ήταν από τρεις ομάδες, την ομάδα ελέγχου, την ομάδα των 2 ημερών και την ομάδα των 8 ημερών (βλ. ενότητα 4.1, Κεφάλαιο 2, Μέρος III). Η qRT-PCR έγινε σε δύο ζώα από την κάθε ομάδα.

### **7.1 Απομόνωση RNA από νεφρικό ιστό**

Απομονώθηκε RNA από νεφρικούς ιστούς της ομάδας ελέγχου, της ομάδας των 2 ημερών και της ομάδας των 8 ημερών του μοντέλου UUO που έγινε σε αρουραίο. Για την απομόνωσή του, η οποία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην απομόνωση RNA από τις κυτταρικές σειρές, δηλαδή το πρωτόκολλο στο οποίο χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Trizol.

Για κάθε 50-100 mg ιστού προστέθηκε 1ml Trizol και ο ιστός ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια γουδιού και γουδοχειριού. Το δείγμα συλλέχθηκε και ακολούθησε η διαδικασία η οποία περιγράφηκε στην ενότητα 3.1, Κεφάλαιο 2, Μέρος III.

## **7.2 Παραγωγή cDNA**

Επαναλήφθηκε η διαδικασία της ενότητας 3.2, Κεφάλαιο 2, Μέρος III.

## **7.3 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 σε αρουραίο**

Για την εκτέλεση της qRT-PCR σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 β, ε, γ, η, τ και ζ στον αρουραίο. Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος αναζητήθηκαν μέσω NCBI οπότε, από το γονίδιο της κάθε μίας αναζητήθηκε η αλληλουχία αναφοράς mRNA στον αρουραίο (RefSeq mRNA αρουραίου) και η κωδικοποιητική αλληλουχία (coding sequence, CDS). Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε μέσω του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Σαν όριο σχεδιασμού των εκκινητών ετέθη η αρχή της κωδικοποιητικής αλληλουχίας για τον πρόσθιο εκκινητή (forward primer, Fw) και, το τέλος της κωδικοποιητικής αλληλουχίας για τον αντίστροφο εκκινητή (Reverse primer, Rv). Σαν όριο μεγέθους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ετέθη σαν ελάχιστο το 70 και σαν μέγιστο το 150 και, είτε ζητήθηκε ο εκκινητής να καλύπτει σύνδεση εξωνίου με εξώνιο είτε, το ελάχιστο μήκος του ιντρονίου να είναι 100 και το μέγιστο 1000000. Στα αποτελέσματα της αναζήτησης αξιολογήθηκαν η ειδικότητα, η λήξη σε GC, το μήκος να είναι περίπου 20 bp και ίδιο μεταξύ προσθιοκίνητου και αντίστροφου, να έχουν παρόμοια Tm και χαμηλή συμπληρωματικότητα με τον εαυτό τους.

Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που επιλέγηκαν ήταν για το γονίδιο της 14-3-3β YWHAB ο Fw GCTGAGTTGGACACCCTGAA και Rv CGTCCACAGGGTGAGATTGT, για το γονίδιο της 14-3-3ε YWHAE ο Fw ACCGGCAAATGGTTGAAACTG και Rv TGCTGGAATGAGGTGCTTGT, για το γονίδιο της 14-3-3γ YWHAG ο Fw CGCGAGCAACTAGTGCAGAA και Rv CCACGTTCTTGTAGGCCACC, για το γονίδιο της 14-3-3η YWHAH ο Fw GAGCGCTACGACGACATGG και Rv GATCGCCTGGCACC AACTAC, για το γονίδιο της 14-3-3τ YWHAQ ο Fw CTGGGGCTGGCTCTTAACTT και Rv AAAAGCCGTTTTAGCCAGTGTG και, για το γονίδιο της 14-3-3ζ YWHAZ ο Fw TCTGCAACGACGTA CTGTCTC και Rv CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG.

## **7.4 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA**

Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA ήταν για τον Fw ο AACTTTCGATGGTAGTCGCCG και για τον Rv ο CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT.

### **7.5 qRT-PCR για τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό**

Η διαδικασία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα υπό άσηπτες συνθήκες. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) εκτελέστηκε σε κατάλληλο για qRT-PCR δίσκο 96 κυψελίδων (96 well plate). Η κάθε αντίδραση εκτελέστηκε με ανάμειξη 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 10x, 0.4 μl dNTPs 10 mM, 0.6 μl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.6 μl SYBR Green 1:2000, 0.1 μl Plat-Taq, 0.3 μl Fw εκκινητή 20μM, 0.3 μl Rv εκκινητή 20 μM, 9 μl cDNA από αραιωμένο cDNA 1/20 και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί συνολικός όγκος 20 μl για την κάθε αντίδραση. Για τις αντιδράσεις για τα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το 18S rRNA και η κάθε αντίδραση έγινε με ανάμειξη 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 10x, 0.4 μl dNTPs 10 mM, 0.6 μl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.6 μl SYBR Green 1:2000, 0.1 μl Plat-Taq, 0.3 μl Fw εκκινητή 20μM, 0.3 μl Rv εκκινητή 20 μM, 1.5 μl cDNA από αραιωμένο cDNA 1/20 και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί συνολικός όγκος 20 μl. Στη συνέχεια, ο δίσκος 96 κυψελίδων τοποθετήθηκε στο μηχάνημα της q RT-PCR το οποίο χρησιμοποιεί το λογισμικό πρόγραμμα ABI Prism 7000 Software. Οι συνθήκες ήταν οι συνηθισμένες των τριών κύκλων χρησιμοποιώντας τους ειδικούς για την αλληλουχία εκκινητές. Ακολούθησε σχεδιασμός ειδικής καμπύλης ανάλυσης ώστε να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός μόνο ενός προϊόντος. Για την ποσοτική ανάλυση, τα γονίδια του πειράματός μας ομαλοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου του 18S rRNA με τη μέθοδο ΔΔCT.

### **8. Στατιστική Ανάλυση**

Για τη διερεύνηση ύπαρξης στατιστικής σημαντικότητας στα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε το t-test και αξιολογήθηκαν ως στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα τιμής  $p < 0.05$ .

## ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1. Πρωτεωμική Ανάλυση

Οι Kyrgiou KP et al, στην προσπάθειά τους να διερευνήσουν τα μόρια που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της ίνωσης, διαπίστωσαν ότι η calreticulin υπερεκφράζεται στο νεφρό από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας και, σχεδόν αποκλειστικά, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα [49]. Η calreticulin είναι μια δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, στις οποίες περιλαμβάνεται και η λειτουργία της σαν πρωτεΐνη-συνοδός (chaperon). Στην παρούσα μελέτη, για να διερευνηθεί ο ρόλος της calreticulin στη νεφρική ίνωση και, πιο συγκεκριμένα, για να διερευνηθεί ο ρόλος της υπερέκφρασης της calreticulin στις μεταβολές των ιδιοτήτων των νεφρικών επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων έγινε Πρωτεωμική Ανάλυση σε τρεις σειρές ανθρώπινων κυττάρων εγγύς σωληναρίου (HK-2) οι οποίες παρουσίαζαν, μεταξύ τους, διαφορετική έκφραση calreticulin.

Στην πρώτη κυτταρική σειρά HK-2, που αποτελούσε την ομάδα ελέγχου, έγινε σταθερή διαμόλυνση με κενό φορέα, η σειρά ονομάστηκε pcDNA-7 και, αποτελούσε την ομάδα της φυσιολογικής έκφρασης calreticulin (normal). Στη δεύτερη και τρίτη κυτταρική σειρά έγινε σταθερή διαμόλυνση με πλασμίδιο το οποίο μετέφερε cDNA calreticulin ποντικού. Η δεύτερη κυτταρική σειρά HK-2 ονομάστηκε mCRT-16 και, αποτελούσε την κυτταρική σειρά με τη μέτρια υπερέκφραση calreticulin (Cal+) ενώ, η τρίτη ονομάστηκε mCRT-17 και αποτελούσε την ομάδα με την υψηλή υπερέκφραση calreticulin (Cal++). Ακολούθησε Πρωτεωμική Ανάλυση δηλαδή, πρωτεϊνικός διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις, σύγκριση του πρωτεώματος των κυτταρικών σειρών, ταυτοποίηση των πρωτεϊνών των πρωτεϊνικών κηλίδων με MALDI-TOF/TOF και, ανάλυση και επεξεργασία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών με ειδικά λογισμικά προγράμματα.

#### 1.1 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός

Από την κάθε κυτταρική σειρά, χρησιμοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές καλλιέργειες, απομονώθηκε το πρωτεϊνικό δείγμα της κάθε μίας και, στο κάθε δείγμα έγινε πρωτεϊνικός διαχωρισμός δύο φορές ώστε, τελικά, να επεξεργαστούμε και να έχουμε αποτελέσματα από δύο βιολογικές και δύο τεχνικές επαναλήψεις δειγμάτων. Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός περιελάμβανε τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2D-E), δηλαδή την ισοηλεκτρική εστίαση

(IEF) στην πρώτη διάσταση και την ηλεκτροφόρηση βάσει μοριακού βάρους στη δεύτερη. Τελικά, ελήφθησαν 12 διαφορετικά πηκτώματα, οι εικόνες των οποίων απεικονίζονται στην εικόνα 30 και 31. Στις εικόνες αυτές, στην πρώτη στήλη αντιστοιχούν οι εικόνες από τη 2D-E της ομάδας των HK-2 κυττάρων με τη φυσιολογική έκφραση calreticulin (pcDNA, normal). Στη δεύτερη στήλη αντιστοιχούν οι εικόνες από τη 2D-E της ομάδας των HK-2 κυττάρων με μέτρια υπερέκφραση calreticulin (mCRT-16, Cal+) και, στην τρίτη αντιστοιχούν οι εικόνες από τη 2D-E της ομάδας των HK-2 κυττάρων με την υψηλή υπερέκφραση calreticulin (mCRT-17, Cal++). Στην εικόνα 30, οι πρώτες έξι (6) εικόνες 2D-E αντιστοιχούν στις εικόνες των 2D-E από τις βιολογικές επαναλήψεις ενώ, στην εικόνα 31 οι εικόνες αντιστοιχούν στις εικόνες των 2D-E από τις τεχνικές επαναλήψεις.

### 1.2 Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες

Στη συνέχεια, οι ψηφιακές εικόνες των δισδιάστατων πηκτωμάτων, που ελήφθησαν από τη σάρωση των πηκτωμάτων, αναλύθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα PDQuest 8 Image Processing Software. Έγινε αντιστοίχιση όλων των πρωτεϊνικών κηλίδων από όλα τα πηκτώματα, όλες οι 2D-E συγκρίθηκαν μεταξύ τους και, αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσίαζαν ποσοτική διαφορά έντασης κατά 2 φορές, 5 φορές και 10 φορές μεταξύ των πηκτωμάτων. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης με το λογισμικό πρόγραμμα ήταν η διαπίστωση της ύπαρξης **ογδόντα δύο (82) διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνικών κηλίδων**, οι οποίες απεικονίζονται, με τη σειρά που καταγράφηκαν στο λογισμικό πρόγραμμα, στην εικόνα 32. Συνολικά, **ταυτοποιήθηκαν 160 διαφορετικές και διαφορικά εκφραζόμενες** πρωτεΐνες αφού, από μία πρωτεϊνική κηλίδα μπόρεσε να ταυτοποιηθεί πάνω από μία πρωτεΐνη.

### 1.3 Ταυτοποίηση διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών

Οι διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες αφαιρέθηκαν χειροκίνητα από τα πηκτώματα και, μετά από κατάλληλη επεξεργασία και θρυψινοποίηση (βλέπε ενότητα 2.4, Κεφάλαιο 2, Μέρος III), ελήφθησαν τα πεπτιδιά τους, τα οποία τοποθετήθηκαν στο φασματογράφο μάζας MALDI-TOF/TOF για ταυτοποίηση. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του αλγόριθμου MASCOT και, τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης όλων των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών φαίνονται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 30:

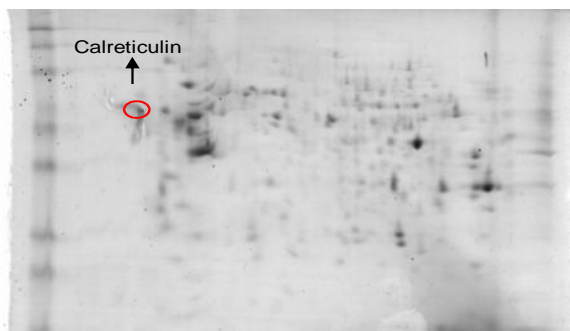
**Πρωτεωμικό Προφίλ**

**3 κυτταρικές σειρές HK-2 Normal (pcDNA), Cal+ (mCRT-16), Cal++ (mCRT-17)  
Από την κάθε κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν 2 ξεχωριστές καλλιέργειες (A και B). Συνολικά, 6  
δείγματα.**

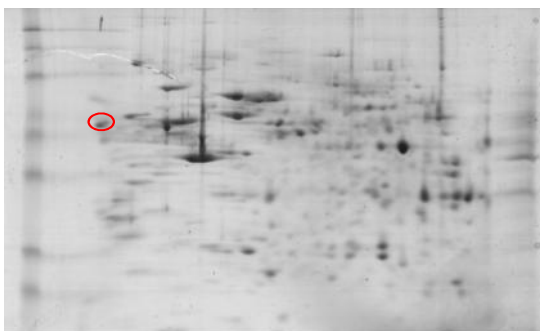
**Το κάθε δείγμα αναλύθηκε με 2D-E 2 φορές. Σύνολο 12 εικόνες πηκτωμάτων**

**Εικόνες πηκτωμάτων των 6 δειγμάτων**

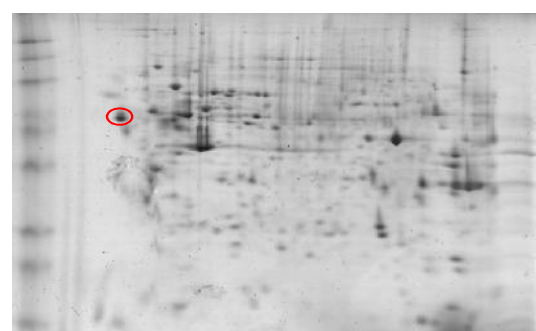
1. Normal A



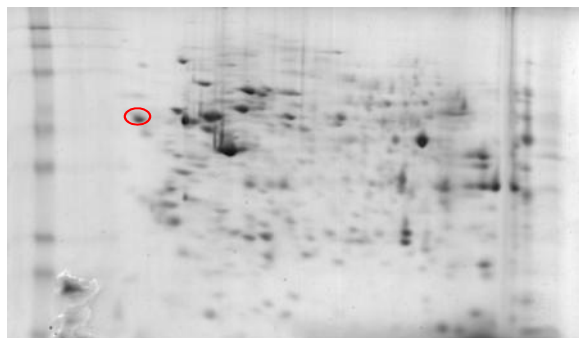
3. Cal+ A



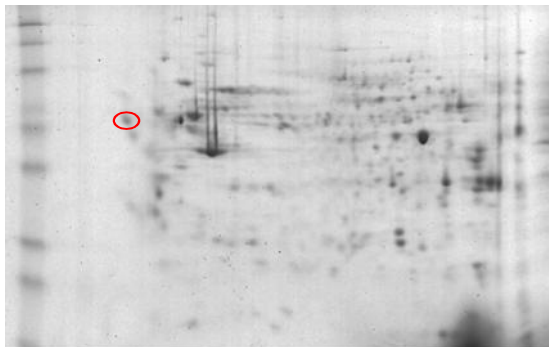
5. Cal++ A



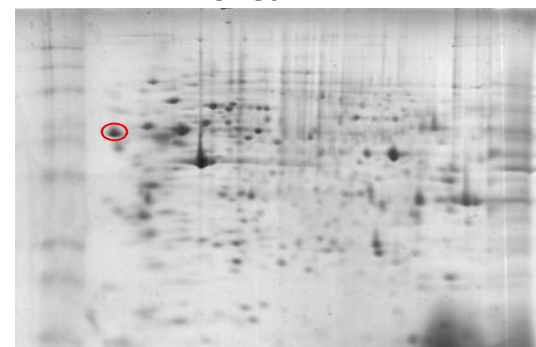
2. Normal B



4. Cal+ B



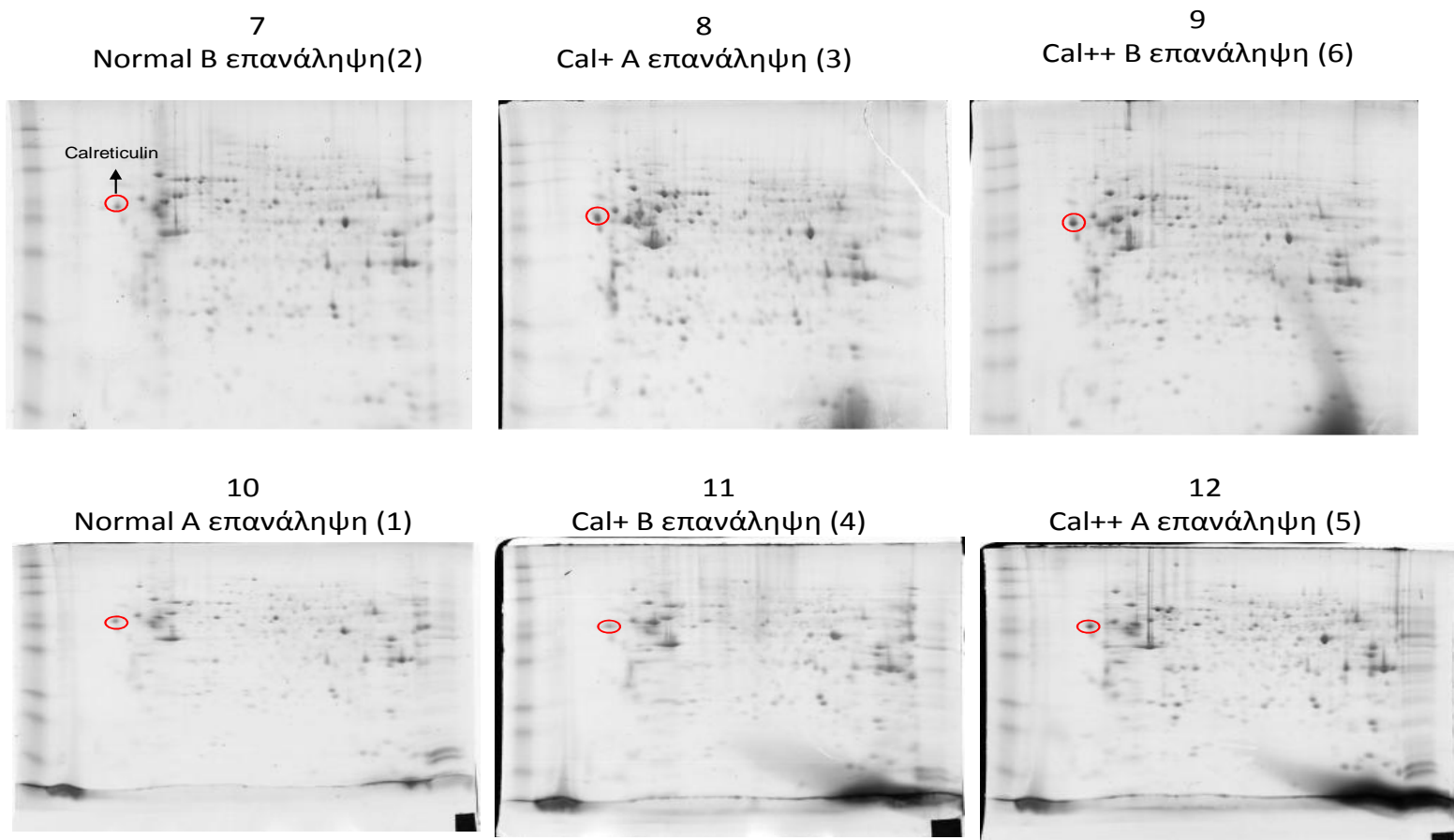
6. Cal++ B

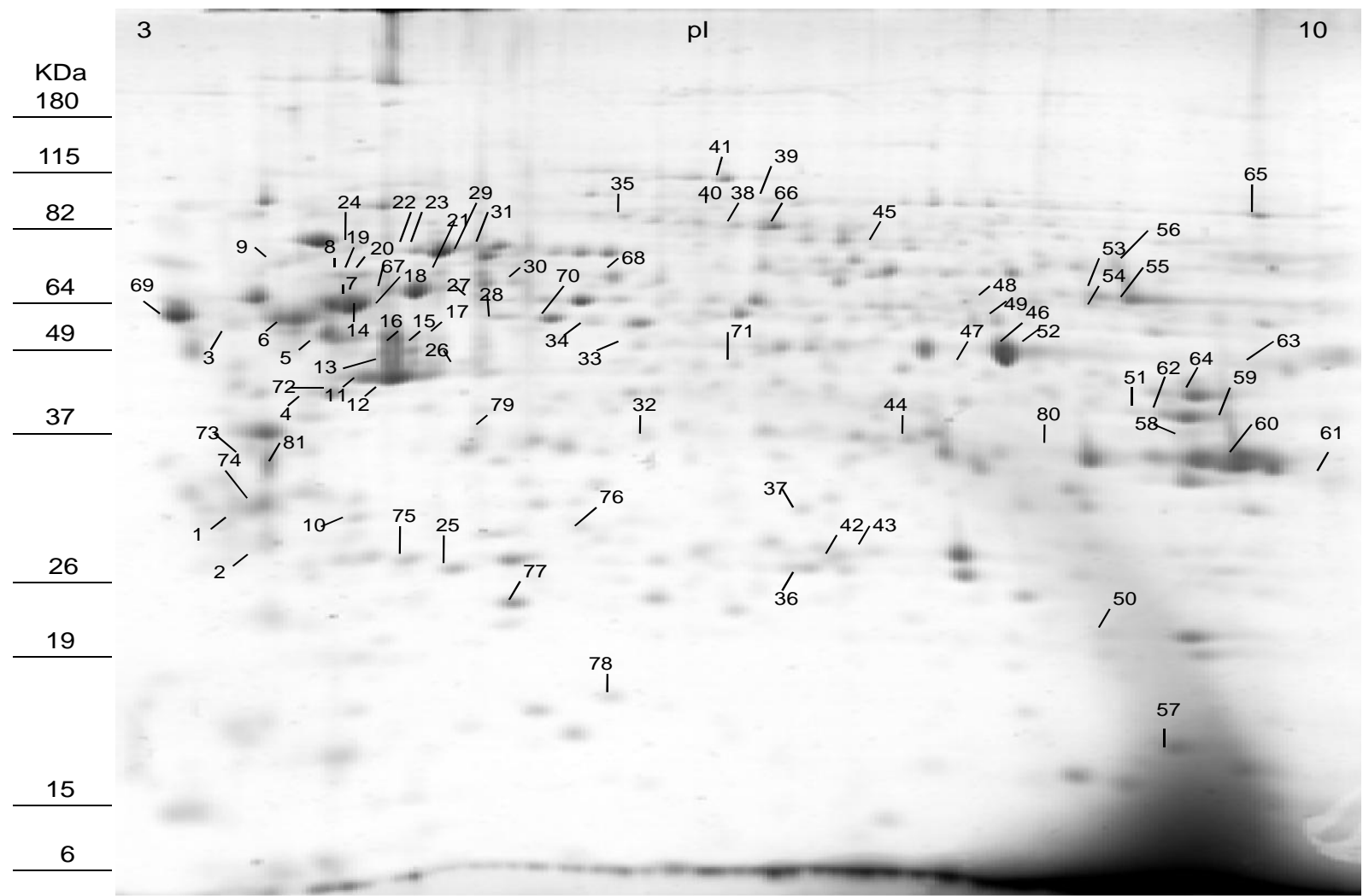


Εικόνα 31:

Εικόνες πηκτωμάτων των 6 επαναλήψεων

Ο αριθμός στις παρενθέσεις αντιστοιχεί στον αριθμό του βιολογικού δείγματος των πρώτων 6 2D-E





Εικόνα 32: Διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες

Πίνακας 1: Ταυτοποιημένες διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες, \*= Cal+/normal, \*\*= Cal++/normal, \*\*\*=Cal++/Cal+

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI	*	**	***
1	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	124	72	29326.00	4.50	2.44	1.44	1.59
2	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	116	67	27899.00	4.60	3.46	1.71	0.20
	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	86	54	28179	4.61			
	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	83	60	28456	4.65			
	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	58	35	28372	4.61			
3	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	58	30	47911.00	4.60	2.1	0.96	0.46
4	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	259	76	44079.00	4.90	0.77	1.01	1.32
5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	162	67	56525.00	5.10	0.41	0.76	1.86
	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	110	52	48490	4.81			
6	Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	228	68	50095.00	4.60	2.66	3.37	1.31
	Tubulin beta-2A chain	TBB2A_HUMAN	189	64	50274	4.64			
	Tubulin beta-2B chain	TBB2B_HUMAN	189	64	50377	4.64			
	Tubulin beta-2C chain	TBB2C_HUMAN	187	60	50255	4.65			
	Tubulin beta-3 chain	TBB3_HUMAN	123	41	50856	4.68			
7	Vimentin	VIME_HUMAN	368	79	53676.00	4.90	0.86	0.95	1.11
8	Vimentin	VIME_HUMAN	156	56	53676.00	4.90	2.49	0.5	0.2
9	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	74	34	42108.00	5.20	Απρ.	Απρ.	2.55
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	74	35	42052	5.18			
10	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	94	47	27248.00	4.90	0.7	0.67	0.95
11	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	139	49	42052.00	5.20	3.29	2.07	0.63
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	139	50	42108	5.20			
12	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	134	57	42052.00	5.20	0.14	0.85	6.19
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	134	57	42108	5.20			
13	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	117	43	42052.00	5.20	Απρ.	Απρ.	0.57
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	117	43	42108	5.20			
14	Vimentin	VIME_HUMAN	166	59	53676.00	4.90			
15	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	89	48	42052.00	5.20	0.08	0.95	11.26

Πίνακας 1

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI	*	**	***
16	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	105	42	42052.00	5.20	1.02	0.31	0.3
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	105	42	42108	5.20			
17	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	58	33	42052.00	5.20			
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	58	34	42108	5.20			
18	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	91	39	42052.00	5.20	1.29	1.00	0.78
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	91	39	42108	5.20			
19	Vimentin	VIME_HUMAN	130	56	53676.00	4.90	1.61	1.32	0.82
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	80	37	51230	5.26			
20	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	72	37	51230.00	5.30	0.45	0.33	0.74
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	70	43	42052	5.18			
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	70	43	42108	5.20			
21	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1_HUMAN	63	34	52189.00	5.30	1.73	0.98	0.57
22	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	90	35	71082.00	5.20	1.27	0.26	0.21
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	56	37	42108	5.20			
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	56	37	42052	5.18			
23	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	131	36	71082.00	5.20	0.6	0.61	1.02
24	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	67	39	42052.00	5.20	1.55	1.55	2.62
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	67	39	42108	5.20			
25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN	111	59	25151.00	5.20	0.66	0.67	0.68
26	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	57	38	42052.00	5.20	1.63	0.15	0.09
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	57	38	42108	5.20			
27	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_HUMAN	63	35	50804.00	4.80	0.95	Απρ.	Απρ.
	Tubulin alpha-1A chain	TBA1A_HUMAN	54	32	50788	4.81			
28	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	61	23	53671.00	5.40	1.13	0.21	1.18
29	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	235	58	70294.00	5.40	1.17	2.28	1.94
	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HS71L_HUMAN	60	27	70730	5.67			

Πίνακας 1

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI	*	**	***
30	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_HUMAN	78	29	61263.00	5.40	1.16	0.63	0.54
31	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	91	34	70294.00	5.40	1.82	1.63	0.89
	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	66	30	71082	5.24			
	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_HUMAN	57	29	73920	5.81			
32	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	110	55	36900.00	5.70	2.39	1.78	0.74
33	26S protease regulatory subunit 7	PRS7_HUMAN	102	40	49002.00	5.60	0.48	0.37	0.76
34	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	55	36	49484.00	5.90	4.55	4.44	0.96
35	Mitochondrial inner membrane protein	IMMT_HUMAN	57	20	84026.00	6.10	2.07	1.30	0.67
36	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	90	56	25133.00	6.00	1.38	0.55	0.4
37	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	61	37	29822.00	6.20	1.73	2.59	1.5
38	Ezrin	EZRI_HUMAN	79	29	69484.00	5.90	0.39	0.97	2.46
39	Ezrin	EZRI_HUMAN	61	25	69484.00	5.90	Απρ.	Απρ.	0.79
40	Prolyl 3-hydroxylase 3	P3H3_HUMAN	60	23	82584.00	5.90	Απρ.	Απρ.	2.64
41	Vinculin	VINC_HUMAN	241	45	124292.00	5.40	1.43	2.58	1.81
42	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_HUMAN	52	32	27838.00	6.40	0.89	1.96	2.21
43	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN	89	59	28900.00	6.80	0.7	0.55	0.78
44	PDZ and LIM domain protein 1	PDLI1_HUMAN	85	55	36505.00	6.60	1.51	1.46	0.97
45	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GUAA_HUMAN	102	34	77408.00	6.40	0.89	0.55	0.61
46	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	211	61	47481.00	7.70	1.96	2.27	1.16
47	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	52	26	59020.00	5.00	0.31	0.21	0.66
48	Fascin	FSCN1_HUMAN	107	44	55123.00	7.00	0.43	0.21	0.48
49	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	DHE3_HUMAN	153	50	61701.00	8.50	0.78	1.41	1.80
	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	DHE4_HUMAN	91	37	61738	9.26			
	Fascin	FSCN1_HUMAN	58	36	55123	7.02			

Πίνακας 1

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI	*	**	***
50	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	96	68	22324.00	9.20	1.56	1.32	0.85
51	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	122	53	39851.00	9.20	1.35	1.37	1.01
52	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	176	66	47481.00	7.70	2.34	5.12	2.18
53	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	68	28	58470.00	9.00	0.24	0.08	0.33
54	T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	76	32	59842.00	8.60	0.33	0.29	0.88
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	70	29	58470	8.97			
55	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	271	65	58470.00	9.00	1.44	1.69	2.43
56	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	169	57	58470.00	9.00	1.16	2.19	1.87
	Transketolase	TKT_HUMAN	80	39	68519	8.54			
57	Cofilin-1	COF1_HUMAN	78	59	18719.00	9.10	0.65	1.76	2.7
58	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	138	52	36201.00	9.30	1.23	0.32	0.26
59	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	129	65	39851.00	9.20	0.3	0.2	0.64
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	59	36	36201	9.26			
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	167	60	36201.00	9.30	0.95	1.96	2.06
61	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	103	43	38837.00	9.60	2.37	2.74	1.16
62	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	189	70	39851.00	9.20	0.4	0.96	2.42
63	Serpin H1	SERPH_HUMAN	59	37	46525.00	9.30	0.18	0.73	4.02
64	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN	187	64	44985.00	9.20	0.64	1.14	1.78
65	Nucleolin	NUCL_HUMAN	120	26	76625.00	4.40			
66	Ezrin	EZRI_HUMAN	168	41	69484.00	5.90	0.45	0.6	1.34
67	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	147	44	61187.00	5.60	2.1	1.66	0.79
68	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4HA1_HUMAN	85	29	61296.00	5.60			
69	Calreticulin	CALR_HUMAN	235	66	48283.00	4.10	1.35	1.62	1.2
70	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	175	46	53671.00	5.40	1.40	1.05	0.75
71	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT_HUMAN	71	23	48846.00	6.60	Απρ.	Απρ.	2.24
72	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	290	84	44079.00	4.90	0.67	0.93	1.38

Πίνακας 1

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI	*	**	***
73	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	59	25	32746.00	4.50	0.8	0.78	0.97
74	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN	76	31	28619.00	4.50	0.87	0.02	0.02
75	Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	96	57	22826.00	6.00	0.96	0.57	0.60
76	Cathepsin D	CATD_HUMAN	53	19	45037.00	6.10	1.02	0.52	0.52
77	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN	109	52	23569.00	5.30	0.34	Απρ.	Απρ.
78	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_HUMAN	60	42	17309.00	5.80	1.05	1.19	1.13
79	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I_HUMAN	95	35	36878.00	5.30			
80	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	138	59	38808.00	8.50			
81	Putative annexin A2-like protein	AXA2L_HUMAN	67	37	38806	6.58	1.72	0.24	0.14
82	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	50	19	32746.00	4.50			



**Πίνακας 2:** Πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
1	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	124	72	29326.00	4.50
2	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	116	67	27899.00	4.60
	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	86	54	28179	4.61
	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	83	60	28456	4.65
	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	58	35	28372	4.61
3	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	58	30	47911.00	4.60
5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	162	67	56525.00	5.10
	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	110	52	48490	4.81
7	Vimentin	VIME_HUMAN	368	79	53676.00	4.90
8	Vimentin	VIME_HUMAN	156	56	53676.00	4.90
9	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	74	34	42108.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	74	35	42052	5.18
10	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	94	47	27248.00	4.90
13	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	117	43	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	117	43	42108	5.20
14	Vimentin	VIME_HUMAN	166	59	53676.00	4.90
16	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	105	42	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	105	42	42108	5.20
17	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	58	33	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	58	34	42108	5.20
19	Vimentin	VIME_HUMAN	130	56	53676.00	4.90
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	80	37	51230	5.26
24	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	67	39	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	67	39	42108	5.20
25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN	111	59	25151.00	5.20
26	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	57	38	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	57	38	42108	5.20

Πίνακας 2

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
27	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_HUMAN	63	35	50804.00	4.80
	Tubulin alpha-1A chain	TBA1A_HUMAN	54	32	50788	4.81
28	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	61	23	53671.00	5.40
29	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	235	58	70294.00	5.40
	Heat shock 70 kDa protein 1-like	HS71L_HUMAN	60	27	70730	5.67
30	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_HUMAN	78	29	61263.00	5.40
31	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	91	34	70294.00	5.40
	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	66	30	71082	5.24
	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_HUMAN	57	29	73920	5.81
32	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	110	55	36900.00	5.70
35	Mitochondrial inner membrane protein	IMMT_HUMAN	57	20	84026.00	6.10
36	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	90	56	25133.00	6.00
39	Ezrin	EZRI_HUMAN	61	25	69484.00	5.90
42	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_HUMAN	52	32	27838.00	6.40
44	PDZ and LIM domain protein 1	PDLI1_HUMAN	85	55	36505.00	6.60
45	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GUAA_HUMAN	102	34	77408.00	6.40
47	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	52	26	59020.00	5.00
50	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	96	68	22324.00	9.20
51	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	122	53	39851.00	9.20
54	T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	76	32	59842.00	8.60
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	70	29	58470	8.97
56	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	169	57	58470.00	9.00
	Transketolase	TKT_HUMAN	80	39	68519	8.54
57	Cofilin-1	COF1_HUMAN	78	59	18719.00	9.10
59	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	129	65	39851.00	9.20
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	59	36	36201	9.26
65	Nucleolin	NUCL_HUMAN	120	26	76625.00	4.40
66	Ezrin	EZRI_HUMAN	168	41	69484.00	5.90

Πίνακας 2

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
68	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4HA1_HUMAN	85	29	61296.00	5.60
69	Calreticulin	CALR_HUMAN	235	66	48283.00	4.10
70	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	175	46	53671.00	5.40
72	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	290	84	44079.00	4.90
73	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	59	25	32746.00	4.50
74	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN	76	31	28619.00	4.50
75	Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	96	57	22826.00	6.00
77	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN	109	52	23569.00	5.30
78	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_HUMAN	60	42	17309.00	5.80
79	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I_HUMAN	95	35	36878.00	5.30
80	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	138	59	38808.00	8.50
81	Putative annexin A2-like protein	AXA2L_HUMAN	67	37	38806	6.58
82	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	50	19	32746.00	4.50

**Πίνακας 3:** Πρωτεΐνες που υποεκφράζονται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
4	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	259	76	44079.00	4.90
6	Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	228	68	50095.00	4.60
	Tubulin beta-2A chain	TBB2A_HUMAN	189	64	50274	4.64
	Tubulin beta-2B chain	TBB2B_HUMAN	189	64	50377	4.64
	Tubulin beta-2C chain	TBB2C_HUMAN	187	60	50255	4.65
	Tubulin beta-3 chain	TBB3_HUMAN	123	41	50856	4.68
11	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	139	49	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	139	50	42108	5.20
12	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	134	57	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	134	57	42108	5.20
15	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	89	48	42052.00	5.20
18	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	91	39	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	91	39	42108	5.20
20	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	72	37	51230.00	5.30
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	70	43	42052	5.18
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	70	43	42108	5.20
21	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1_HUMAN	63	34	52189.00	5.30
22	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	90	35	71082.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	56	37	42108	5.20
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	56	37	42052	5.18
23	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	131	36	71082.00	5.20
33	26S protease regulatory subunit 7	PRS7_HUMAN	102	40	49002.00	5.60
34	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	55	36	49484.00	5.90
37	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	61	37	29822.00	6.20
38	Ezrin	EZRI_HUMAN	79	29	69484.00	5.90
40	Prolyl 3-hydroxylase 3	P3H3_HUMAN	60	23	82584.00	5.90
41	Vinculin	VINC_HUMAN	241	45	124292.00	5.40
43	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN	89	59	28900.00	6.80
46	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	211	61	47481.00	7.70
48	Fascin	FSCN1_HUMAN	107	44	55123.00	7.00

Πίνακας 3

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
49	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	DHE3_HUMAN	153	50	61701.00	8.50
	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	DHE4_HUMAN	91	37	61738	9.26
	Fascin	FSCN1_HUMAN	58	36	55123	7.02
52	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	176	66	47481.00	7.70
53	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	68	28	58470.00	9.00
55	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	271	65	58470.00	9.00
58	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	138	52	36201.00	9.30
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	167	60	36201.00	9.30
61	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	103	43	38837.00	9.60
62	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	189	70	39851.00	9.20
63	Serpin H1	SERPH_HUMAN	59	37	46525.00	9.30
64	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN	187	64	44985.00	9.20
67	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	147	44	61187.00	5.60
71	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT_HUMAN	71	23	48846.00	6.60
76	Cathepsin D	CATD_HUMAN	53	19	45037.00	6.10

**Πίνακας 4:** Πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται κυρίως στα κύτταρα με τη μέτρια υπερέκφραση calreticulin

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
1	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	124	72	29326.00	4.50
3	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	58	30	47911.00	4.60
10	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	94	47	27248.00	4.90
16	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	105	42	42052.00	5.20
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	105	42	42108	5.20
25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN	111	59	25151.00	5.20
28	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	61	23	53671.00	5.40
36	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	90	56	25133.00	6.00
45	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GUAA_HUMAN	102	34	77408.00	6.40
47	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	52	26	59020.00	5.00
54	T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	76	32	59842.00	8.60
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	70	29	58470	8.97
59	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	129	65	39851.00	9.20
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	59	36	36201	9.26

**Πίνακας 5:** Πρωτεΐνες που υποεκφράζονται κυρίως στα κύτταρα με τη μέτρια υπερέκφραση calreticulin

Πρωτεϊνική Κηλίδα	Όνομα Πρωτεΐνης	Κωδικός Πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό MB	pI
37	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	61	37	29822.00	6.20
38	Ezrin	EZRI_HUMAN	79	29	69484.00	5.90
41	Vinculin	VINC_HUMAN	241	45	124292.00	5.40
49	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	DHE3_HUMAN	153	50	61701.00	8.50
	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	DHE4_HUMAN	91	37	61738	9.26
	Fascin	FSCN1_HUMAN	58	36	55123	7.02
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	167	60	36201.00	9.30
61	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	103	43	38837.00	9.60

Αρχικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι, με την Πρωτεωμική Ανάλυση που έγινε, επιβεβαιώθηκε η προοδευτική υπερέκφραση της calreticulin στις κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν. Στην εικόνα 32 η πρωτεϊνική κηλίδα που αντιστοιχεί στην calreticulin είναι η κηλίδα με τον αριθμό 69. Στις εικόνες 30 και 31 η calreticulin είναι περιγεγραμμένη σε όλες τις εικόνες των 2D-E. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχουν πρωτεΐνες που τροποποιούνται διαφορετικά κυρίως στην κυτταρική σειρά της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin (mCRT-16, Cal+).

Στον Πίνακα 2 αναγράφονται οι πρωτεΐνες από τις πρωτεϊνικές κηλίδες των οποίων η ένταση αυξάνεται (υπερεκφράζονται) από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (normal) στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin (cal+, cal++). Στον Πίνακα 3 αναγράφονται οι πρωτεΐνες από τις πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες υποεκφράζονται από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (normal) προς τα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin (cal+, cal++). Στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι πρωτεΐνες από τις πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες υπερεκφράζονται κυρίως στην κυτταρική σειρά της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin (cal+) και, τέλος, στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι πρωτεΐνες από τις πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες υποεκφράζονται κυρίως στην κατηγορία της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin (cal+).

#### **1.4 Κατηγοριοποίηση διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών**

Επιπρόσθετα της καταγραφής των πρωτεϊνών βάσει ποσοτικής έντασης της πρωτεϊνικής κηλίδας από την οποία ταυτοποιήθηκαν, οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες κατηγοριοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού προγράμματος UniProt (Universal Protein Resource) <http://www.uniprot.org/> βάσει κυτταρικής λειτουργίας και οντολογίας των γονιδίων τους. Οι κατηγορίες που δημιουργήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 6 και θα πρέπει να σημειωθεί ότι, πολλές από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες ταξινομούνται σε περισσότερες από μια κατηγορίες.

Η υπερέκφραση της calreticulin στα νεφρικά ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου τροποποίησε την έκφραση **πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τη φλεγμονή**. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υπερέκφραση της 14-3-3ζ πρωτεΐνης, της Protein disulfide-isomerase A6, της Proteasome subunit alpha type-6, της Glutathione S-transferase P, της Heat shock protein beta-1 και της cofilin-1. Επίσης, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υποέκφραση των κυτταροπλασματικών ακτινών-1 και -2, της α-ενολάσης και της μιτοχονδριακής 60 kDa heat shock protein. Η ezrin



υποεκφράζεται στην κυτταρική σειρά με τη μέτρια υπερέκφραση calreticulin και, στη συνέχεια, στην κυτταρική σειρά με τη μεγάλη υπερέκφραση calreticulin, υπερεκφράζεται.

Η υπερέκφραση της calreticulin στα νεφρικά επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από **υπερέκφραση του μεσεγγυματικού δείκτη vimentin** και συνοδεύεται από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την **κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση**. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υπερέκφραση των Cofilin-1, Tropomyosin alpha-1 chain, Tropomyosin alpha-4 chain, Vimentin, Tubulin alpha-1B chain, Tubulin alpha-1A chain, ezrin και της PDZ and LIM domain protein 1. Συνοδεύεται, επίσης, από υποέκφραση των Keratin type I cytoskeletal 19, Tubulin beta chain, Tubulin beta-2A chain, Tubulin beta-2B chain, Tubulin beta-2C chain, Tubulin beta-3 chain και της Fascin. Οι Keratin type II cytoskeletal 8, Keratin type I cytoskeletal 10, Heat shock protein beta-1 και η T-complex protein 1 subunit eta υπερεκφράζονται κυρίως στην κυτταρική σειρά της μέτριας υπερέκφρασης calreticulin ενώ, η vinculin υποεκφράζεται κυρίως στην κυτταρική σειρά της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin.

Επίσης, η υπερέκφραση calreticulin συνοδεύεται από υπερέκφραση των **δεικτών σύνθεσης κολλαγόνου** Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 και Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 και, επιπρόσθετα, παρατηρείται υποέκφραση πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την **εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (ECM)**, για παράδειγμα των Serpin H1, Prolyl 3-hydroxylase 3 και Cathepsin D.

Από τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης προέκυψε ότι η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από τροποποίηση επιπέδων **πρωτεϊνών που παρεμβαίνουν στην απόπτωση**. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των NDKA, πρωτεϊνών 14-3-3ε, 14-3-3ζ, 14-3-3β, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Heat shock 70 kDa protein 1-like, Proteasome subunit alpha type-6 και της Glutathione S-transferase P. Παρατηρήθηκε υπερέκφραση των Pyruvate kinase isozymes M1/M2 και Heat shock protein beta-1 κυρίως στην κυτταρική σειρά της μέτριας υπερέκφρασης ενώ, στην ίδια σειρά, η Proteasome subunit alpha type-1 φαίνεται να υποεκφράζεται. Επίσης, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υποέκφραση των 26S protease regulatory subunit 7, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase και της μιτοχονδριακής 60 kDa heat shock protein.

Όπως αναμενόταν, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από **υπερέκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες**, για παράδειγμα των Protein disulfide-isomerase A6, Chloride intracellular channel protein 1, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Heat shock 70 kDa protein 1-like, Heat shock cognate 71 kDa protein,

Peroxiredoxin-6, PDZ and LIM domain protein 1, Peroxiredoxin-1, Tropomyosin alpha-1 chain, Tropomyosin alpha-4 chain και Glutathione S-transferase P.

Παρατηρήθηκε τροποποίηση επιπέδων **πρωτεϊνών heat shock και chaperons**, για παράδειγμα, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Heat shock 70 kDa protein 1-like, Heat shock cognate 71 kDa protein και T-complex protein 1 subunit eta ενώ, παρατηρήθηκε υποέκφραση των Heat shock cognate 71 kDa protein, 60 kDa heat shock protein, mitochondrial και Serpin H1.

Η υπερέκφραση της calreticulin στα νεφρικά επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από τροποποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην **αναδίπλωση των πρωτεϊνών** αλλά και στην **αποδόμησή τους στο πρωτεάσωμα**. Για παράδειγμα, οι Protein disulfide-isomerase A6, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Heat shock 70 kDa protein 1-like, Heat shock protein beta-1, Proteasome subunit alpha type-6 και η T-complex protein 1 subunit eta υπερεκφράζονται, ενώ, οι Tubulin beta-2B chain, Tubulin beta-2C chain, Heat shock cognate 71 kDa protein, 26S protease regulatory subunit 7, mitochondrial 60 kDa heat shock protein, Proteasome subunit alpha type-1, η Serpin H1 και η Cathepsin D υποεκφράζονται.

Επίσης, η Πρωτεωμική Ανάλυση έδειξε τροποποίηση των επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον **κυτταρικό κύκλο**, για παράδειγμα, υπερέκφραση των 14-3-3ε, 14-3-3γ πρωτεϊνών, RBBP4, Tubulin alpha-1A chain και Proteasome subunit alpha type 6 και, υποέκφραση των Tubulin beta chain, Tubulin beta-2C chain, Proteasome subunit alpha type-1 και 26S proteaseregulatory subunit 7.

Ως προς τον **κυτταρικό μεταβολισμό**, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υπερέκφραση των ATP synthase subunit beta, mitochondrial, L-lactate dehydrogenase B chain, Fructose-bisphosphate aldolase A και της Transketolase, ενώ, συνοδεύεται από υποέκφραση των Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Phosphoglycerate mutase 1, Alpha-enolase, Pyruvate kinase isozymes M1/M2, Glutamate dehydrogenase 1, mit, Glutamate dehydrogenase 2, mit, Phosphoglycerate kinase 1 και της Ornithine aminotransferase, mit.

Από την κατηγορία της **κυτταρικής ανάπτυξης** παρατηρείται υπερέκφραση των NDKA, Histone-binding protein RBBP4, Peroxiredoxin-1, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Stress-70 protein, mitochondrial, Mitochondrial inner membrane protein και υποέκφραση της Alpha-enolase και της Fascin. Επίσης, οι GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] και η Nucleoside diphosphate kinase A, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των πουρινών, υπερεκφράζονται.

**Πίνακας 6: Κατηγορίες ταυτοποιημένων διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών**

<b>ΦΛΕΓΜΟΝΗ</b>	<b>ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b>
Protein disulfide-isomerase A6	NDKA
Alpha-enolase	14-3-3 protein epsilon
Cofilin-1	14-3-3 protein zeta/delta
14-3-3 protein zeta/delta	14-3-3 protein beta/alpha
Actin, cytoplasmic 2	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
Actin, cytoplasmic 1	Heat shock 70 kDa protein 1-like
Ezrin	26S protease regulatory subunit 7
Proteasome subunit alpha type-6	Proteasome subunit alpha type-1
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Proteasome subunit alpha type-6
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
	Heat shock protein beta-1
	Glutathione S-transferase P
<b>ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΗ ΑΝΑΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ</b>	<b>ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΣΤΡΕΣ</b>
Keratin, type I cytoskeletal 19	Protein disulfide-isomerase A6
Tubulin beta chain	Chloride intracellular channel protein 1
Tubulin beta-2A chain	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
Tubulin beta-2B chain	Heat shock 70 kDa protein 1-like
Tubulin beta-2C chain	Heat shock cognate 71 kDa protein
Tubulin beta-3 chain	Peroxiredoxin-6
Tubulin alpha-1B chain	PDZ and LIM domain protein 1
Tubulin alpha-1A chain	Peroxiredoxin-1
Keratin, type II cytoskeletal 8	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
Ezrin	Tropomyosin alpha-1 chain
PDZ and LIM domain protein 1	Tropomyosin alpha-4 chain
Actin, cytoplasmic 1	Glutathione S-transferase P
Actin, cytoplasmic 2	
Heat shock protein beta-1	
Keratin, type I cytoskeletal 10	
Fascin	
Fructose-bisphosphate aldolase A	
T-complex protein 1 subunit eta	
Cofilin-1	
Tropomyosin alpha-1 chain	
Tropomyosin alpha-4 chain	
Vimentin	
Vinculin	
<b>ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ, ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ECM</b>	
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 , -1	
Prolyl 3-hydroxylase 3	
Serpin H1	
Cathepsin D	

**Πίνακας 6: Κατηγορίες ταυτοποιημένων διαφορεικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών**

<b>HEAT SHOCK PROTEINS/CHAPERONS</b>	<b>ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ/ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑ</b>
Heat shock cognate 71 kDa protein	Protein disulfide-isomerase A6
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Tubulin beta-2B chain
Heat shock 70 kDa protein 1-like	Tubulin beta-2C chain
Heat shock cognate 71 kDa protein	Heat shock cognate 71 kDa protein
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
T-complex protein 1 subunit eta	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
Serpin H1	Heat shock 70 kDa protein 1-like
	26S protease regulatory subunit 7
<b>ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΥΡΙΝΩΝ</b>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
	Heat shock protein beta-1
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	Proteasome subunit alpha type-1
Nucleoside diphosphate kinase A	Proteasome subunit alpha type-6
	T-complex protein 1 subunit eta
	Serpin H1
	Cathepsin D
<b>ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ</b>	<b>ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ</b>
14-3-3 protein epsilon	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
14-3-3 protein gamma	L-lactate dehydrogenase B chain
Histone-binding protein RBBP4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Tubulin beta chain	Phosphoglycerate mutase 1
Tubulin beta-2C chain	Alpha-enolase
Tubulin alpha-1A chain	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
Proteasome subunit alpha type-1	Glutamate dehydrogenase 1, mit
Proteasome subunit alpha type-6	Glutamate dehydrogenase 2, mit
26S protease regulatory subunit 7	Fructose-bisphosphate aldolase A
	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
	Transketolase
	Phosphoglycerate kinase 1
	Ornithine aminotransferase, mit
<b>ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ</b>	<b>ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ mRNA</b>
NDKA	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
Histone-binding protein RBBP4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Peroxisredoxin-1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Stress-70 protein, mitochondrial	
Mitochondrial inner membrane protein	
Alpha-enolase	
Fascin	

Τέλος, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από υποέκφραση πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το **εναλλακτικό μάτισμα του mRNA**, για παράδειγμα των Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H και Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου συνοδεύεται από τροποποίηση των επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φλεγμονή και στην κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Παρατηρείται υπερέκφραση μεσεγγυματικού δείκτη και δεικτών παραγωγής κολλαγόνου και, επίσης, παρατηρείται τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας. Παρατηρείται υπερέκφραση πρωτεϊνών του οξειδοαναγωγικού στρες. Τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο ΕΔ αλλά και στην αποδόμησή τους μέσω πρωτεασώματος. Τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το mRNA και το εναλλακτικό του μάτισμα και, τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της calreticulin παρεμβαίνει στον κυτταρικό μεταβολισμό και, παράλληλα, συνοδεύεται από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που παρεμβαίνουν στην απόπτωση.

### **1.5 Δίκτυα αλληλεπίδρασης ταυτοποιημένων πρωτεϊνών**

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (<http://www.ingenuity.com/>) στο οποίο καταχωρήθηκαν, ταυτόχρονα, όλες οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τον κωδικό πρόσβασής τους, με στόχο την αναζήτηση δικτύων αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών.

Διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα εγγύς σωληναρίου τροποποίησε τα επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε τέσσερα (4) δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Το ένα από τα τέσσερα δίκτυα και, συγκεκριμένα το δεύτερο, περιλαμβάνει και την ίδια την calreticulin. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών απεικονίζονται στις εικόνες 33-36.

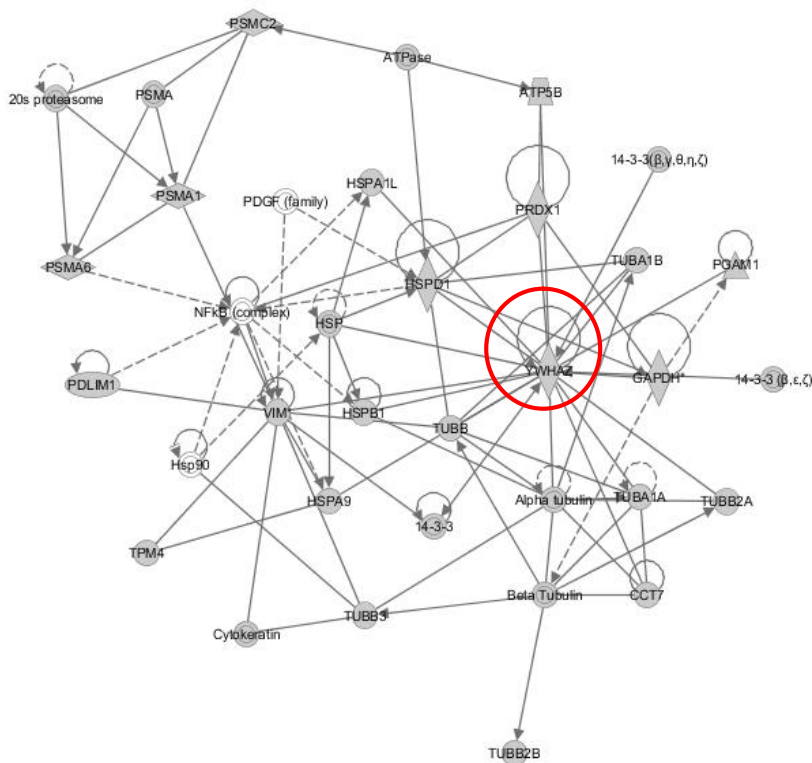
Στο πρώτο δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ζ (YWHAZ) η οποία αλληλεπιδρά κυρίως με heat shock πρωτεΐνες και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Στο δίκτυο αυτό συμμετέχουν οι περισσότερες από τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών (εικόνα 33).

Στο δεύτερο δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, κεντρικό ρόλο κατέχει η calreticulin, η οποία φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, με τον κυτταρικό μεταβολισμό και το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες (εικόνα 34).

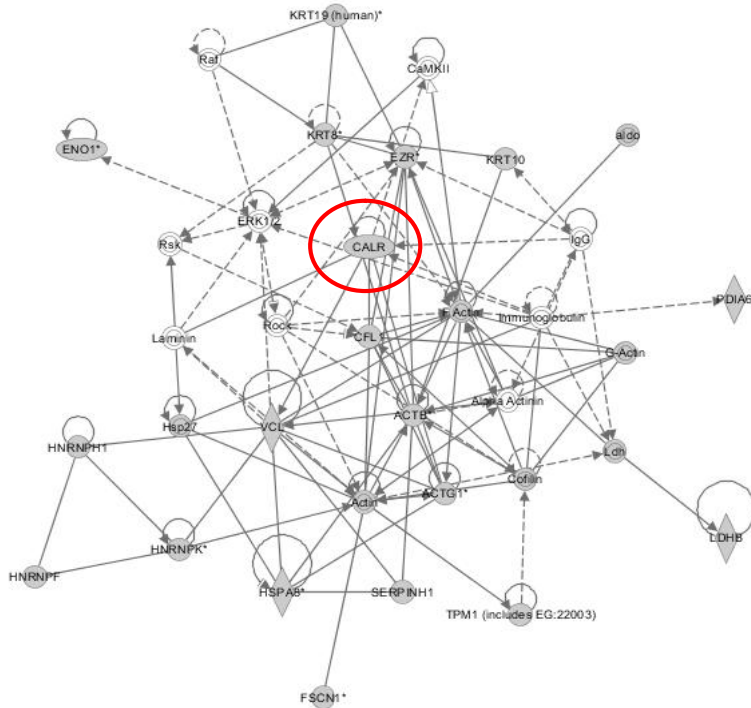
Στο τρίτο δίκτυο που δημιουργήθηκε, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ε (YWHAΕ) η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την απόπτωση, με heat

shock πρωτεΐνες και με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την παραγωγή κολλαγόνου. Σε αυτό συμμετέχουν και οι πρωτεΐνες 14-3-3η, 14-3-3β, 14-3-3γ (εικόνα 35).

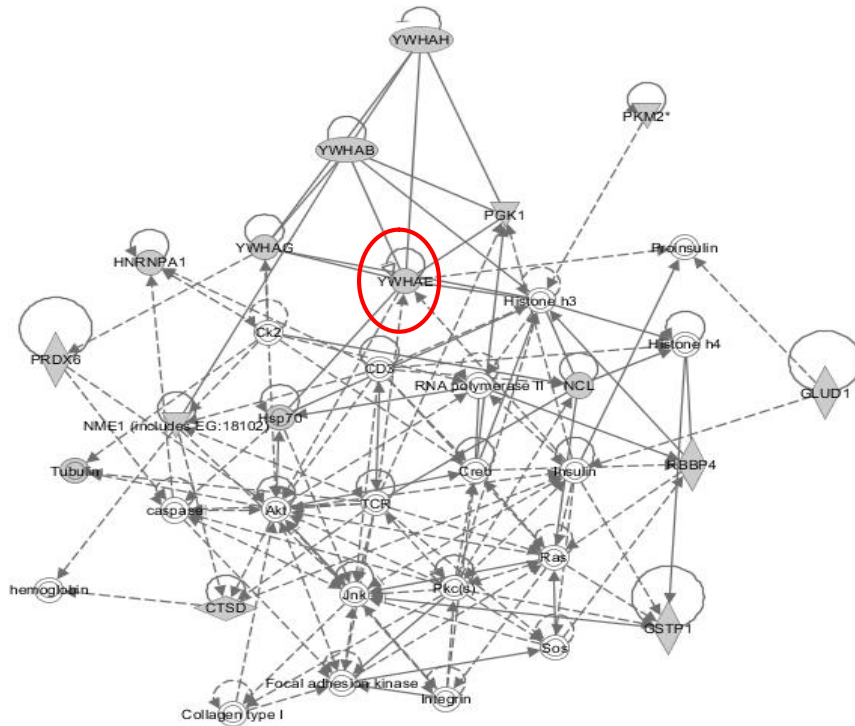
Στο τέταρτο δίκτυο, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη UB C, η οποία δεν ταυτοποιήθηκε από την Πρωτεωμική Ανάλυση. Το τέταρτο δίκτυο είναι ένα δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών στο οποίο συμμετέχουν ταυτοποιημένες πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν δείκτες παραγωγής κολλαγόνου (εικόνα 36).



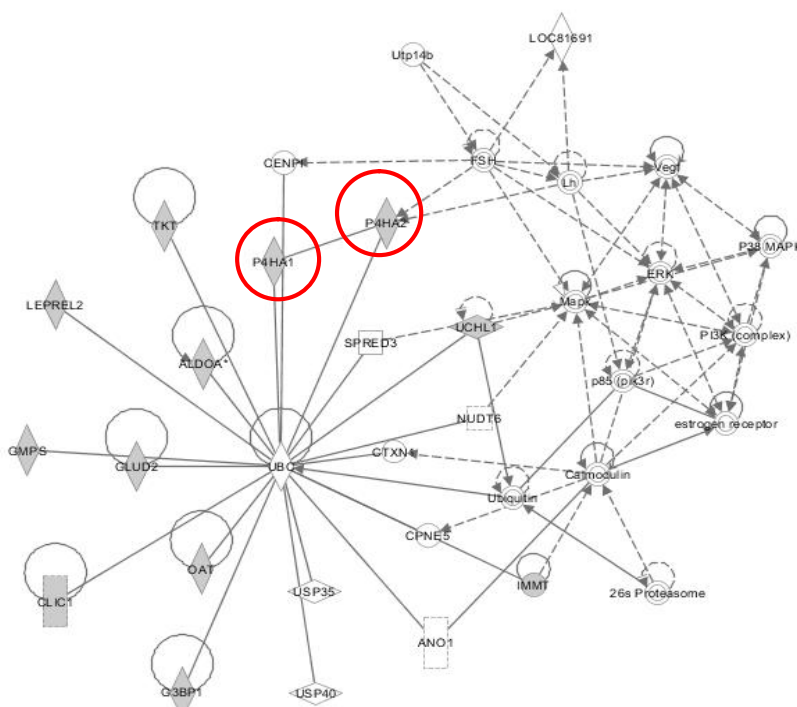
**Εικόνα 33: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 1.** Κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ζ (YWHAZ) η οποία αλληλεπιδρά κυρίως με heat shock proteins και με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η πρωτεΐνη YWHAZ.



**Εικόνα 34: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 2.** Κεντρικό ρόλο κατέχει η calreticulin, η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, τον κυτταρικό μεταβολισμό και τον κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η calreticulin.



**Εικόνα 35: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 3.** Κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ε (YWHAE), η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την απόπτωση, με heat shock proteins και με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την παραγωγή κολλαγόνου. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η YWHAE.



**Εικόνα 36: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 4.** Η πρωτεΐνη UB C, που κατέχει κεντρικό ρόλο στο δίκτυο αυτό, δεν ταυτοποιήθηκε στην Πρωτεωμική Ανάλυση, όμως, στο δίκτυο αυτό συμμετέχουν ταυτοποιημένες πρωτεΐνες που αποτελούν δείκτες παραγωγής κολλαγόνου (απεικονίζονται στους κόκκινους κύκλους).

### 1.6 Επιλογή 14-3-3 πρωτεϊνών ως πρωτεϊνών ενδιαφέροντος

Οι ταυτοποιημένες διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες ήταν πολλές και, αρκετές από αυτές, παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Από όλες αυτές, μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση και εξαιτίας της κεντρικής τους θέσης στα δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνικών δικτύων που σχηματίστηκαν, επιλέγηκαν οι πρωτεΐνες 14-3-3 ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 14-3-3 πρωτεΐνες είναι οι πρωτεϊνικές κηλίδες με αριθμό 1 και 2 (Πίνακας 1 και εικόνα 32). Η πρωτεΐνη 14-3-3ε ταυτοποιήθηκε από την πρωτεϊνική κηλίδα με αριθμό 1 και, η έκφρασή της εμφανίστηκε αυξημένη κυρίως στην ομάδα της μέτριας υπερέκφρασης calreticulin. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ζ, β, γ και η ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεϊνική κηλίδα με αριθμό 2. Η πρωτεΐνη 14-3-3τ παρουσίαζε χαμηλό MASCOT SCORE, παρόλα αυτά, τα πεπτιδία της ταυτοποιήθηκαν στο MALDI-TOF/TOF MS.

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά και στην εισαγωγή, οι **πρωτεΐνες 14-3-3** είναι μία οικογένεια, συντηρημένων κατά την εξέλιξη, όξινων πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 28-33 kDa που εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα πρωτεϊνικών στόχων, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και να δημιουργούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Εξαιτίας της πληθώρας και της



ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών, για παράδειγμα του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, του κυτταρικού μεταβολισμού, της μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της απάντησης του κυττάρου στη βλάβη του DNA και πολλών άλλων [93]. **Μέχρι αυτή τη μελέτη, ο ρόλος τους και η συμμετοχή τους στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης δεν έχει μελετηθεί.**

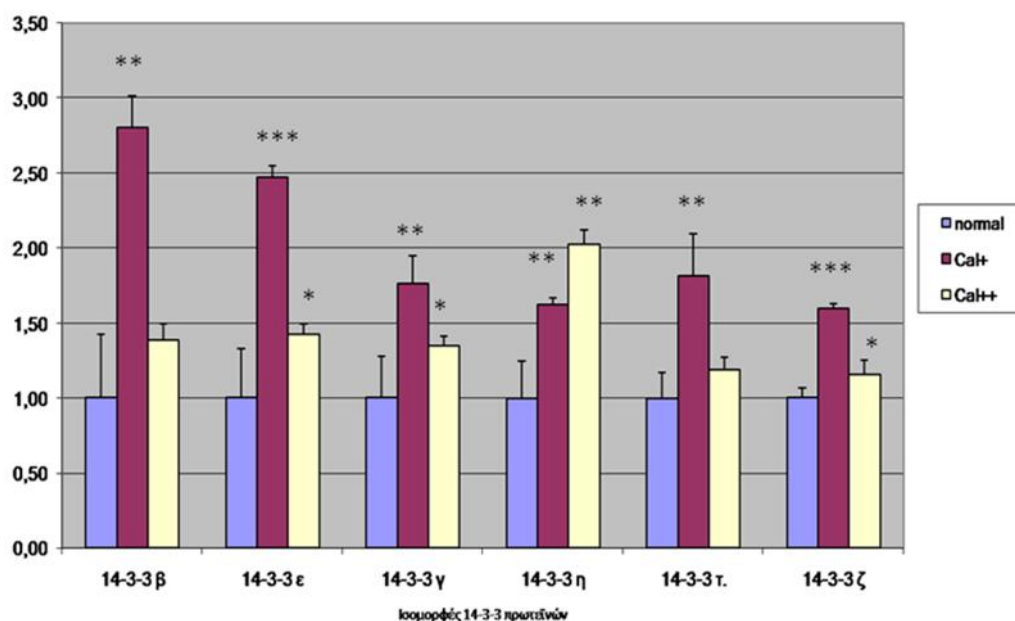
## **2. Επαλήθευση της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 *in vitro***

Για να επαληθευτούν τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης και, πιο συγκεκριμένα, για να επαληθευτεί η υπερέκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου τα οποία υπερεκφράζουν calreticulin, έγινε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν.

Έγινε qRT-PCR για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ των 14-3-3 πρωτεϊνών από RNA που απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές pcDNA-7 (normal), mCRT-16 (Cal+) και mCRT-17 (Cal++). Η qRT-PCR έγινε τρεις φορές για την κάθε κυτταρική σειρά. Το αποτέλεσμα απεικονίζεται στο γράφημα της εικόνας 37 όπου, αποδεικνύεται η **υπερέκφραση του mRNA ισομορφών β, ε, γ, η, τ και ζ των πρωτεϊνών 14-3-3**. Η τροποποίηση του επιπέδου του mRNA των ισομορφών είναι **χαρακτηριστική**, με εξαίρεση αυτή της ισομορφής 14-3-3η. Πιο συγκεκριμένα, το mRNA των 14-3-3 πρωτεϊνών αυξάνεται από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (normal) στα κύτταρα της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin (Cal+) και, στη συνέχεια, στα κύτταρα της μεγάλης υπερέκφρασης της calreticulin ενώ η αύξηση παραμένει, είναι πολύ μικρότερη. Τη μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζει το mRNA της ισομορφής 14-3-3β. Αντίθετα, το mRNA της πρωτεΐνης 14-3-3η αυξάνεται προοδευτικά από την κυτταρική σειρά της ομάδας ελέγχου (normal) προς την κυτταρική σειρά με τη μεγάλη υπερέκφραση calreticulin (Cal++).

Επομένως, στην παρούσα εργασία, σύμφωνα με την Πρωτεωμική Ανάλυση που έγινε, επιπρόσθετα της τροποποίησης των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που είναι σημαντικές στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης, διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου συνοδεύεται από υπερέκφραση των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών. Τα ευρήματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο mRNA για τις ισομορφές των ταυτοποιημένων 14-3-3 πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε υπερέκφραση του mRNA των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin.

mRNA sample / mRNA normal



Εικόνα 37: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ των 14-3-3 πρωτεϊνών στις κυτταρικές σειρές HK-2. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η κυτταρική σειρά rcDNA-7(normal), με μωβ χρώμα απεικονίζεται η κυτταρική σειρά mCRT-16 (Cal+) και με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται η κυτταρική σειρά mCRT-17 (Cal++). Στον άξονα ψ αντιστοιχεί ο λόγος έκφρασης του mRNA των 14-3-3 πρωτεϊνών προς την έκφραση του mRNA στην κυτταρική σειρά rcDNA-7(normal). \*=  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\* =  $p < 0.0001$

### 3. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στη νεφρική ίνωση *in vivo*

Βάσει της παρατήρησης και της επιβεβαίωσής της σε επίπεδο mRNA ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 υπερεκφράζονται στην κυτταρική σειρά των εγγύς επιθηλιακών κυττάρων που δημιουργήθηκαν για να μιμηθούν την υπερέκφραση της calreticulin στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης, το επόμενο βήμα ήταν να μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 *in vivo* κατά τη διεργασία της νεφρικής ίνωσης.

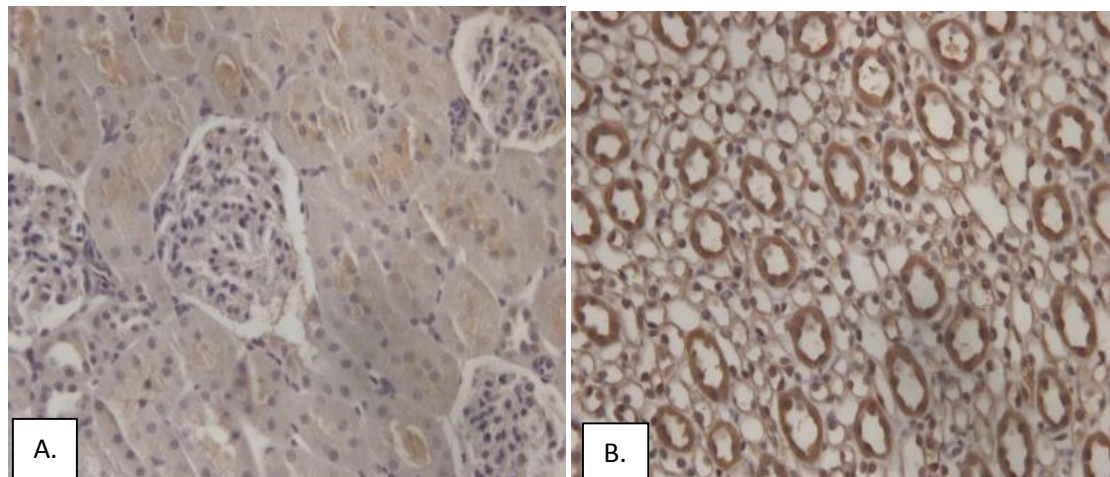
Χρησιμοποιώντας το πειραματικό ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) μελετήθηκε η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό αρουραίου και ποντικού με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοφθορισμό.

Το μοντέλο UUO έγινε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 4, Κεφάλαιο 2, Μέρος III και, τα ζώα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα των χειρουργημένων ζώων της ομάδας ελέγχου, η δεύτερη την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για δύο (2) ημέρες και, η τρίτη αποτελούσε την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για οκτώ (8) ημέρες.

### 3.1 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO από αρουραίο

Οι νεφρικές τομές των αρουραίων μελετήθηκαν ως προς την έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με ανοσοϊστοχημεία, με τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε δέσμευε όλες τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών.

Αρχικά, η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι, στους αρουραίους της ομάδας ελέγχου, δηλαδή στους αρουραίους στους οποίους ο ουρητήρας παρασκευάστηκε αλλά δεν απολινώθηκε, παρατηρείται έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων. Η βασική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού είναι μικρότερη από αυτή της μυελώδους μοίρας. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα, ούτε στο διάμεσο νεφρικό ιστό (εικόνα 38).



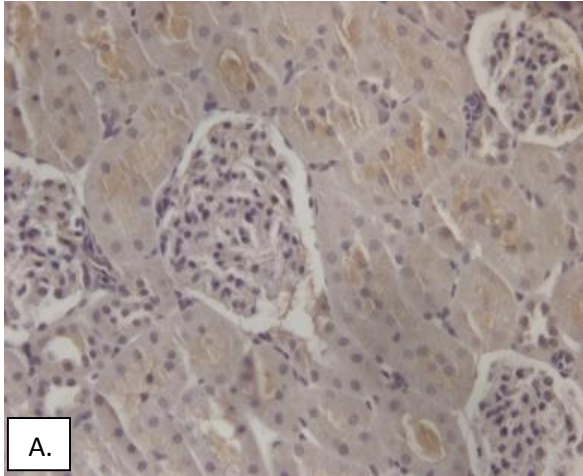
**Εικόνα 38: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό αρουραίου της ομάδας ελέγχου.** Βασική έκφραση 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό. **A: Φλοιός:** Παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα της φλοιώδους μοίρας. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη χρώση στα σπειράματα, ούτε στο διάμεσο ιστό. **B: Μυελός:** Η βασική έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι μεγάλη στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων της μυελώδους μοίρας. (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100, Μεγέθυνση 40x).

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι ο νεφρικός ιστός των αρουραίων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες παρουσίαζε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων αλλά και αύξηση της έκφρασής τους στο σπείραμα. Στο σπείραμα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών φαίνεται ότι αυξάνεται κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman. Στα άπω σωληνάκια παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και, ιδιαίτερο ενδιαφέρον

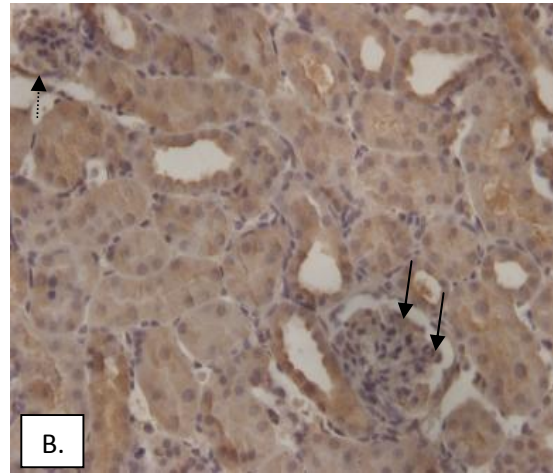
παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής (εικόνα 39).

Ακολούθησε μελέτη του νεφρικού ιστού των αρουραίων με απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες. Στο νεφρικό τους ιστό, επίσης παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών σε σχέση με την έκφρασή τους στο νεφρικό ιστό των αρουραίων της ομάδας ελέγχου. Όμως, η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι μικρότερη από αυτή του νεφρικού ιστού της ομάδας των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Πιο συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων η αύξηση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι ηπιότερη ενώ, παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα (εικόνα 40). Είναι, όμως, πλέον, ιδιαίτερα χαρακτηριστική η μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική μεμβράνη των κυττάρων των άπω σωληναρίων, των οποίων το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται με ηπιότερη χρώση (εικόνα 43).

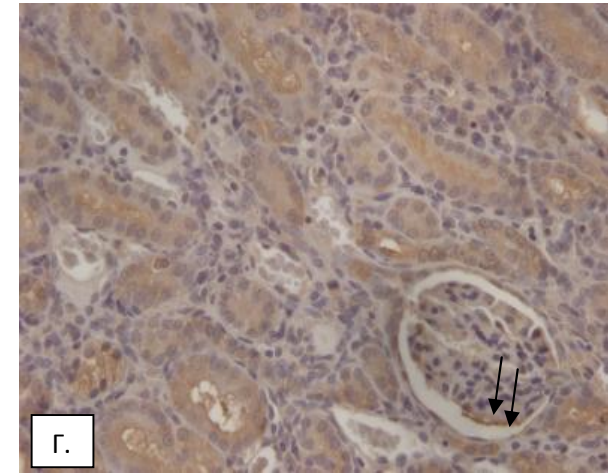
Στα γραφήματα των εικόνων 41 και 42 απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της έντασης του χρώματος στα εγγύς σωληνάκια και στα άπω σωληνάκια, αντίστοιχα.



Ομάδα ελέγχου

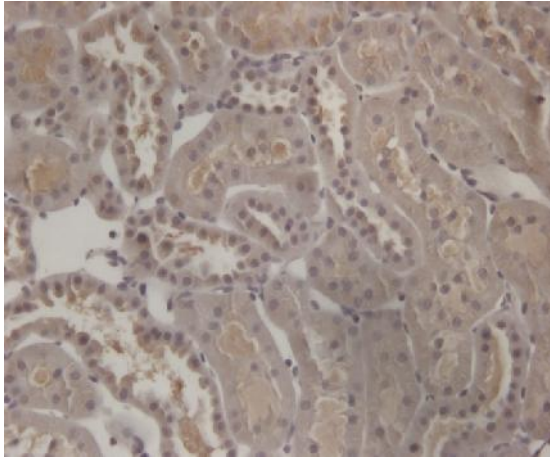


Ομάδα απολίνωσης ουρητήρα 2 ημερών

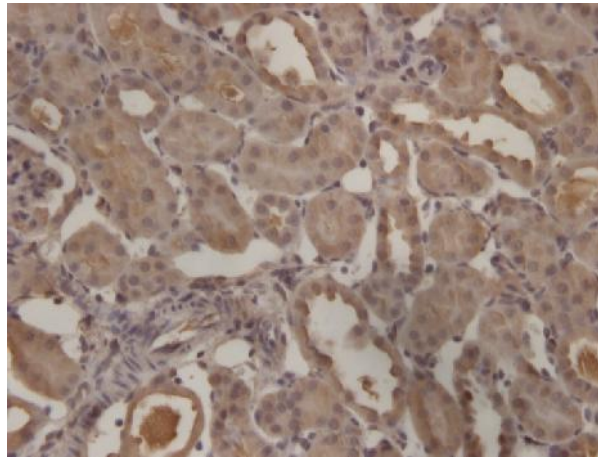


Ομάδα απολίνωσης ουρητήρα 8 ημερών

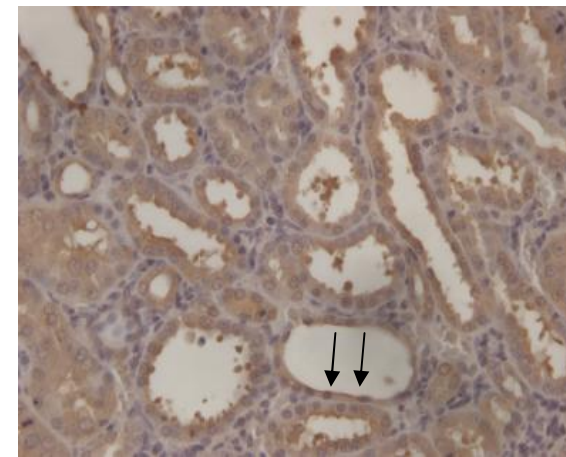
**Εικόνα 39: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό αρουραίου** **A:** Νεφρικός φλοιός της ομάδας ελέγχου. Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων. Δεν παρατηρείται χρώση στα σπειράματα ή στο διάμεσο ιστό. **B.** Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες. Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι αυξημένη στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων. Με τα συνεχή βέλη απεικονίζεται η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο σπείραμα και, με το διακεκομμένο βέλος απεικονίζεται η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα της κάψας του Bowman. **Γ.** Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 8 ημέρες. Παρατηρείται μείωση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στα κύτταρα των σωληναρίων σε σχέση με την εικόνα B, όμως, η αύξηση της έκφρασής τους σε σχέση με την εικόνα A παραμένει. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο σπείραμα (βέλη). (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100).



Ομάδα ελέγχου

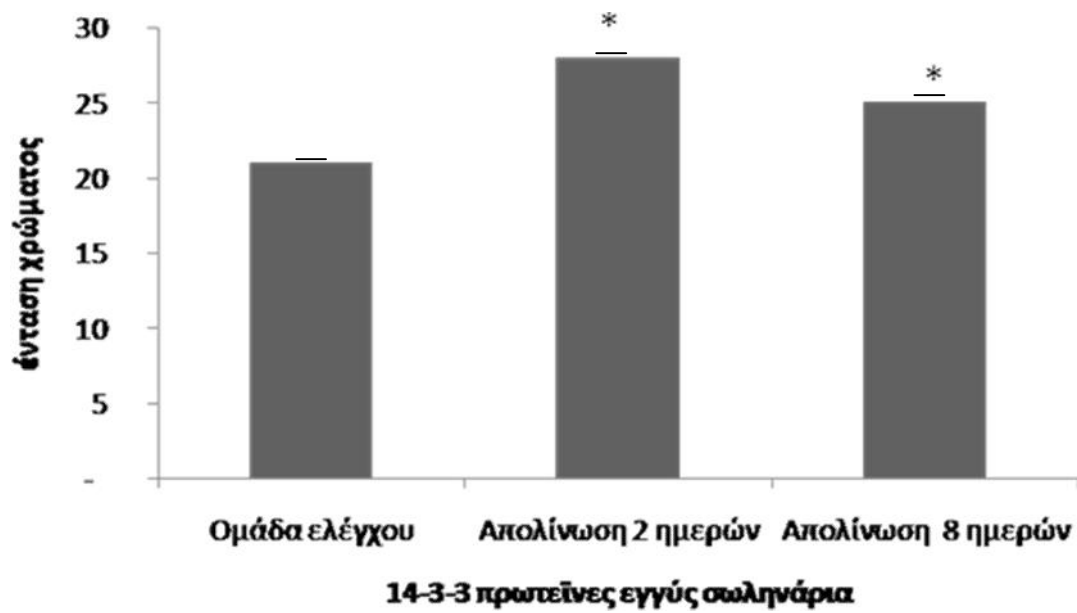


Ομάδα απολίνωσης ουρητήρα 2 ημερών

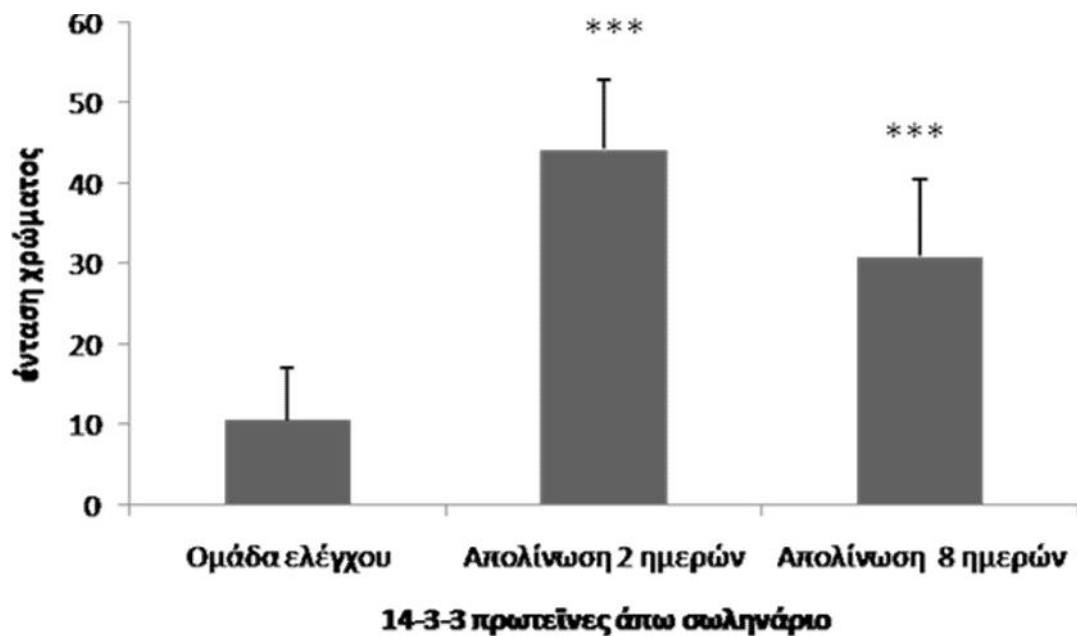


Ομάδα απολίνωσης ουρητήρα 8 ημερών

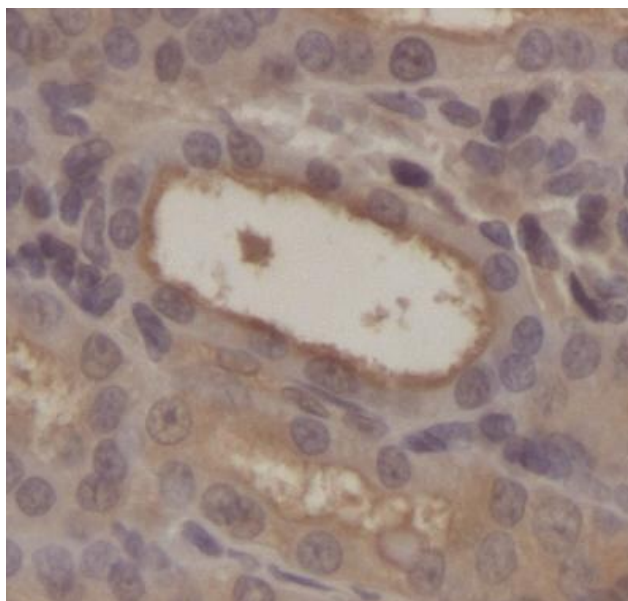
**Εικόνα 40: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό αρουραίου** A: Νεφρικός φλοιός της ομάδας ελέγχου. Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων. B: Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες. Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων. Γ: Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 8 ημέρες. Παρατηρείται μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο κυτταρόπλασμα των σωληναρίων της φλοιώδους μοίρας, παρόλα αυτά, η έκφρασή τους παραμένει αυξημένη σε σχέση με την εικόνα A. Επίσης, οι πρωτεΐνες 14-3-3 από το κυτταρόπλασμα φαίνεται ότι μετακινούνται και συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια των κυττάρων (βέλη). (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100).



Εικόνα 41: Ποσοτικοποίηση αποτελέσματος ανοσοϊστοχημείας για τις 14-3-3 πρωτεΐνες της εικόνας 39. Η μέτρηση έγινε στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναρίων. Η μέτρηση έγινε με το πρόγραμμα Fiji ImageJ.\*= $p < 0.05$



Εικόνα 42: Ποσοτικοποίηση αποτελέσματος ανοσοϊστοχημείας για τις 14-3-3 πρωτεΐνες της εικόνας 40. Η μέτρηση έγινε στο κυτταρόπλασμα των άνω σωληναρίων. Η μέτρηση έγινε με το πρόγραμμα Fiji ImageJ.\*\*\*= $p < 0.0001$



**Εικόνα 43: Ανοσοϊστοχημεία για 14-3-3 πρωτεΐνες σε νεφρικό ιστό αρουραίου.** Στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα, είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική η μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική μεμβράνη των κυττάρων των άπω σωληναρίων, των οποίων το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται με ηπιότερη χρώση.

Συμπερασματικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα διαπιστώνεται στο νεφρικό ιστό αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Η αύξηση αυτή φαίνεται πιο μεγάλη στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων και στο σπείραμα ενώ, στα άπω σωληνάρια χαρακτηριστική είναι η μετακίνησή τους από το κυτταρόπλασμα στην αυλική μεμβράνη των κυττάρων όπου εντοπίζονται τα κανάλια νατρίου και καλίου που συμμετέχουν στην ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών. Επομένως, τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών επιβεβαιώνουν την *in vitro* υπερέκφρασή τους στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin.

### **3.2 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι**

Τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης δηλαδή, η υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών που διαπιστώθηκε στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin, επιβεβαιώθηκαν *in vitro* σε επίπεδο mRNA. Η *in vivo* μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό αρουραίου του πειραματικού μοντέλου νεφρικής ίνωσης που έγινε με ανοσοϊστοχημεία και, το αποτέλεσμα της μελέτης διαπίστωσε την υπερέκφρασή τους. Για την επιβεβαίωση των *in vivo* ευρημάτων της υπερέκφρασης των 14



3-3 πρωτεϊνών και σε άλλο ζώο, έγινε ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό πειραματικού μοντέλου νεφρικής ίνωσης σε ποντίκι.

Διενεργήθηκε ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε ποντίκια, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 στην Ενότητα 4 του Μέρους III. Οι νεφρικές τομές μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία ως προς την έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών, με τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης. Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα κυρίως των εγγύς σωληναρίων αλλά και στο σπείραμα στο νεφρικό ιστό των ζώων με τις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και, επίσης, επιβεβαιώθηκε η μετακίνηση των πρωτεϊνών 14-3-3 στην αυλική επιφάνεια των άπω σωληναριακών κυττάρων. Τα ευρήματα και η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος απεικονίζονται στις εικόνες 44 και 45 αντίστοιχα.

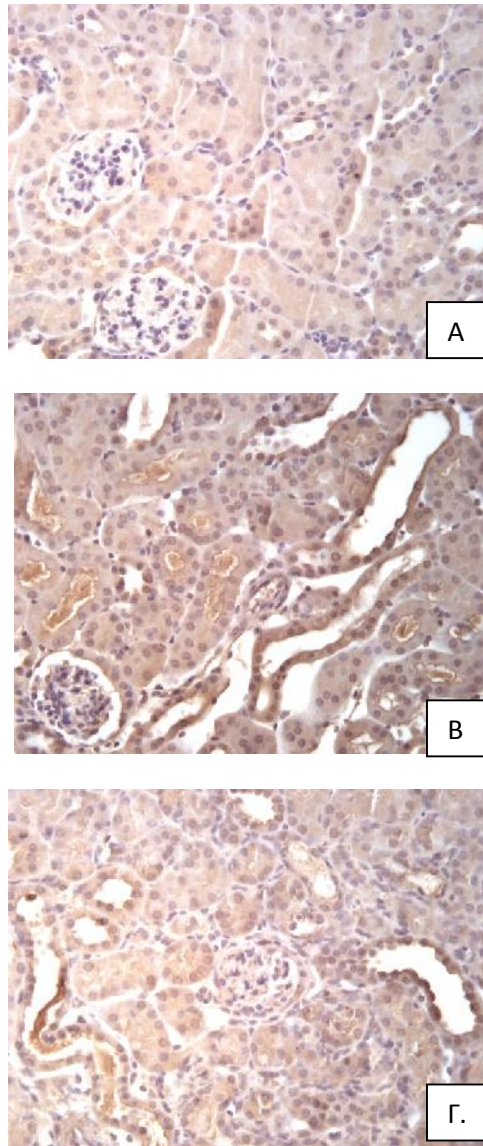
Άρα, τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin επιβεβαιώθηκαν *in vitro* αλλά και *in vivo* τόσο σε νεφρικό ιστό αρουραίου όσο και σε νεφρικό ιστό από ποντίκι.

### **3.3 Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 στο νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε αρουραίο.**

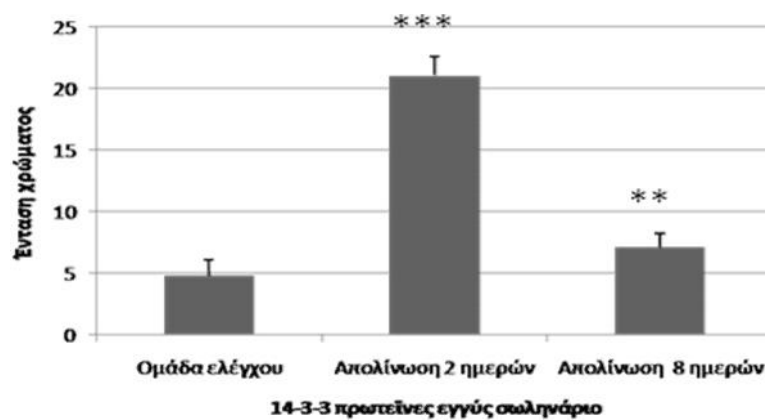
Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό αρουραίου, στο ίδιο ζωικό μοντέλο, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Πρώτα από όλα, με τον ανοσοφθορισμό επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημείας.

Αρχικά, διαπιστώθηκε μεγάλη αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό των αρουραίων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στο νεφρικό ιστό των αρουραίων της ομάδας ελέγχου, η έκφρασή τους παρατηρείται έντονη τόσο στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων του νεφρικού ιστού των ζώων με απολίνωση ουρητήρα για 2 ημέρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών του σπειράματος αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman που διαπιστώθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, επιβεβαιώνεται με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Στο νεφρικό φλοιό των αρουραίων στους οποίους η απολίνωση του ουρητήρα έγινε για 8 ημέρες παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών σε σχέση με αυτή των αρουραίων της ομάδας ελέγχου αλλά, η αύξηση αυτή είναι ιδιαίτερα μικρότερη σε σχέση με αυτή των αρουραίων της απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες (εικόνα 46).



**Εικόνα 64: Ανοσοϊστοχημεία για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε νεφρικό φλοιό από ποντίκι.** Α. Νεφρικός φλοιός από ποντίκι της ομάδας ελέγχου. Β. Νεφρικός φλοιός από ποντίκι της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες. Γ. Νεφρικός φλοιός από ποντίκι της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 8 ημέρες.



**Εικόνα 45: Ποσοτικοποίηση αποτελέσματος ανοσοϊστοχημείας για τις 14-3-3 πρωτεΐνες της εικόνας 44.** Η μέτρηση έγινε στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναρίων. Η μέτρηση έγινε με το πρόγραμμα Fiji ImageJ. \*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*= $p < 0.0001$

Στην εικόνα 47 απεικονίζεται σε μεγέθυνση σπείραμα από την κάθε ομάδα αρουραίων. Ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στο σπείραμα αρουραίων της ομάδας ελέγχου, η έκφρασή τους παρατηρείται έντονη στο σπείραμα των αρουραίων στους οποίους ο ουρητήρας απολινώθηκε για 2 ημέρες και λιγότερο έντονη σε αυτούς στους οποίους ο ουρητήρας απολινώθηκε για 8 ημέρες. Το ίδιο παρατηρείται και στα σωληνάκια που απεικονίζονται σε μεγέθυνση στην εικόνα 48.

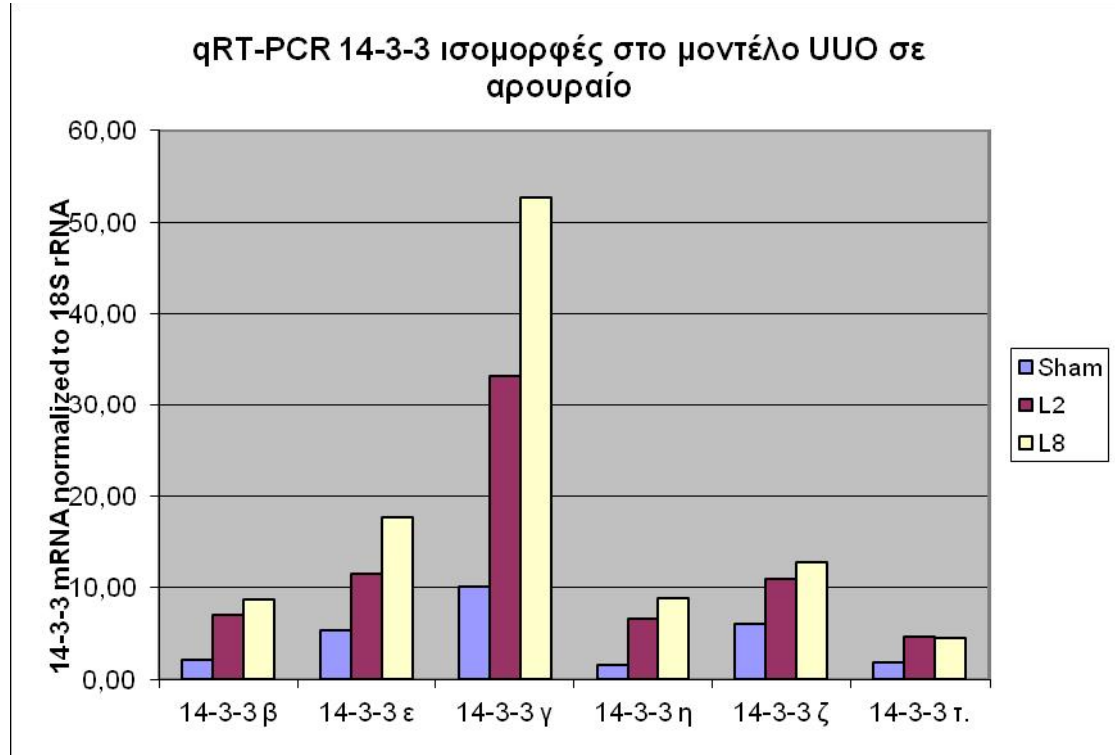
Επιπρόσθετα της επιβεβαίωσης των ευρημάτων της ανοσοϊστοχημείας, η μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών έδωσε τη σημαντική πληροφορία ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες στο νεφρικό ιστό των αρουραίων με απολίνωση του ουρητήρα, δηλαδή στον ινωτικό νεφρικό ιστό, εισέρχονται στον πυρήνα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων τόσο στις 2 όσο και στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα. Το εύρημα αυτό απεικονίζεται στην εικόνα 49.

#### **4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (q RT-PCR) για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από ΥΥΟ**

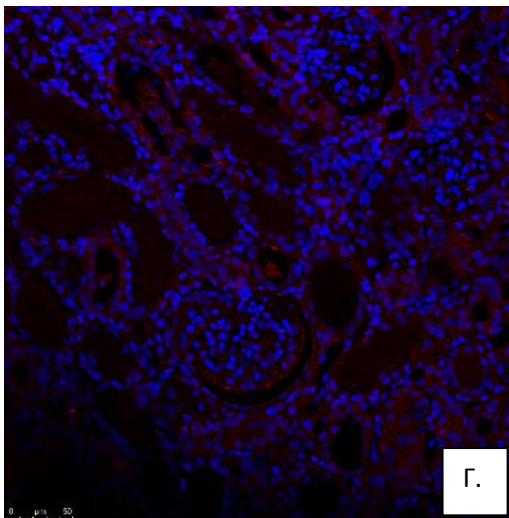
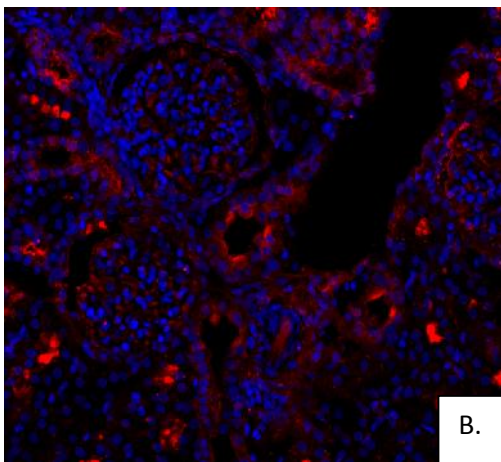
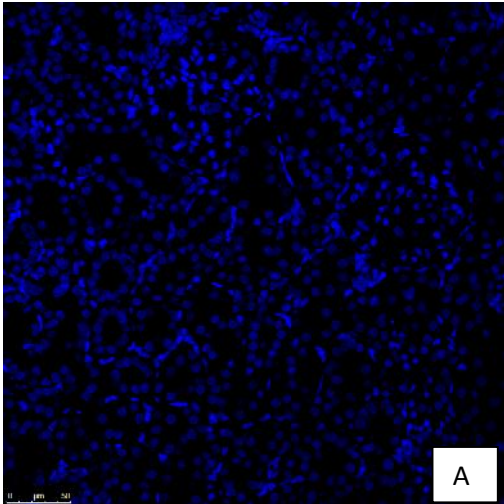
Η Πρωτεωμική Ανάλυση που έγινε στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin έδειξε υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών. Αρχικά, το αποτέλεσμα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης επιβεβαιώθηκε σε επίπεδο mRNA *in vitro* και, στη συνέχεια, διαπιστώθηκε υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό μοντέλου νεφρικής ίνωσης τόσο σε αρουραίο όσο και σε ποντίκι, τόσο με ανοσοϊστοχημεία όσο και με ανοσοφθορισμό. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 6 ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών ήταν μόνο δύο, οι κηλίδες με τον αριθμό 1 και τον αριθμό 2. Επίσης, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντίσωμα το οποίο δεσμεύει ταυτόχρονα όλες τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών. Επομένως, για να μελετήσουμε ξεχωριστά την έκφραση της κάθε ισομορφής των 14-3-3 πρωτεϊνών, ακολούθησε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης για τις ισομορφές των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό αρουραίου στο μοντέλο ΥΥΟ. Έγινε qRT-PCR για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ των 14-3-3 πρωτεϊνών από RNA που απομονώθηκε από το νεφρικό ιστό 2 αρουραίων από την κάθε ομάδα ΥΥΟ. Το αποτέλεσμα απεικονίζεται στο γράφημα τις εικόνας 50. Στο γράφημα αυτό, απεικονίζεται ξεκάθαρα η υπερέκφραση όλων των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών που μελετήθηκαν και, μάλιστα, η υπερέκφρασή τους είναι προοδευτική. Μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζει το mRNA της ισομορφής 14-3-3γ και ακολουθεί αυτό της 14-3-3η.

Συμπερασματικά, παρά το μικρό αριθμό των ζώων που μελετήθηκαν, με την q RT-PCR, διαπιστώθηκε ξεκάθαρη και καθολική υπερέκφραση του mRNA των ισομορφών των 14-3-3

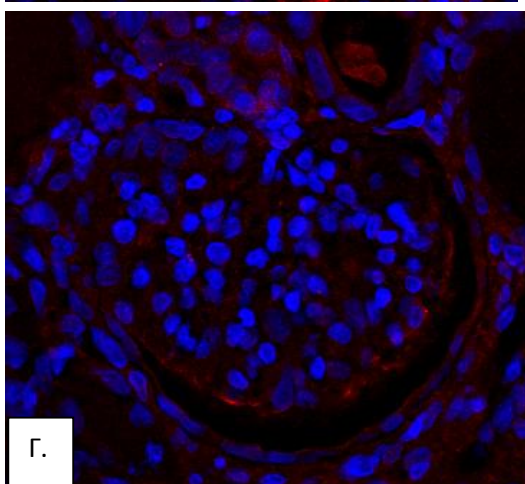
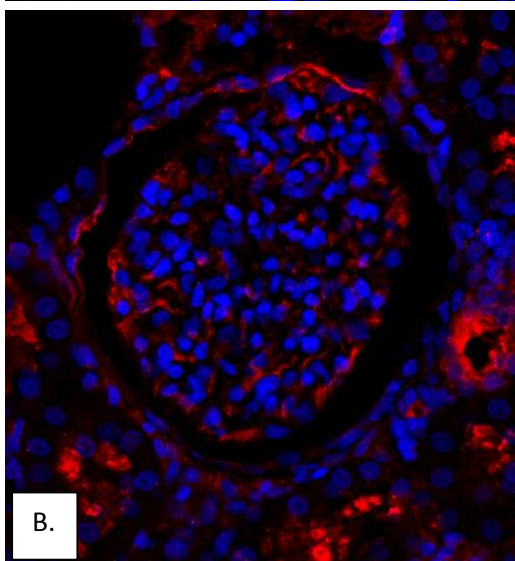
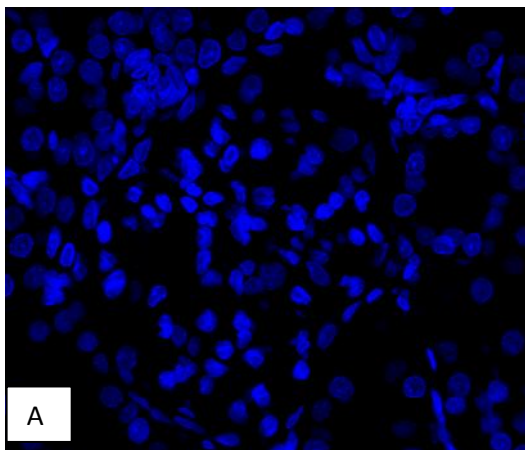
πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό αρουραίου στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης προκαλούμενης από ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα.



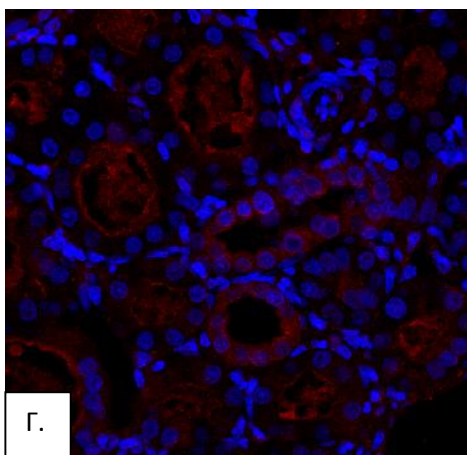
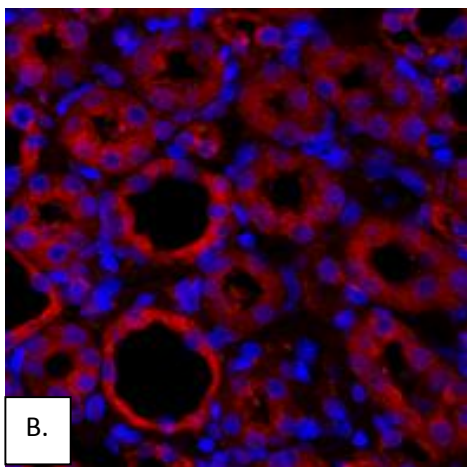
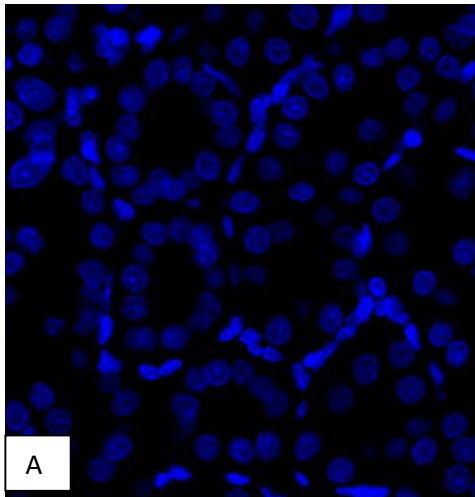
Εικόνα 50: q RT-PCR για τις ισομορφές των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό αρουραίου από το μοντέλο νεφρικής ίνωσης UUO.



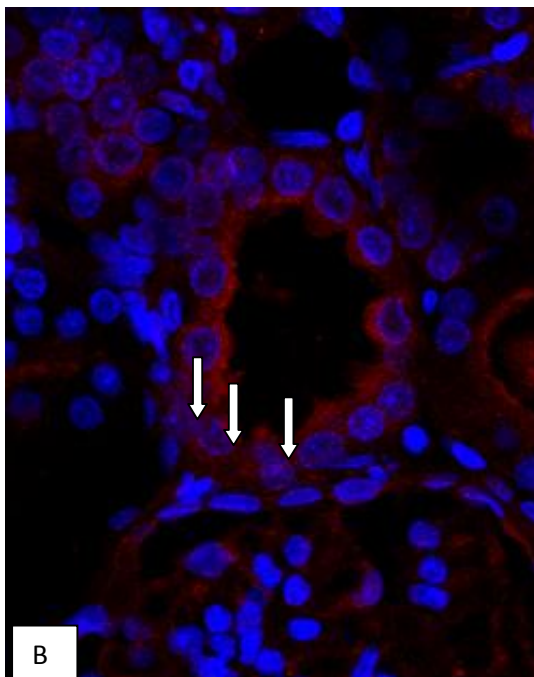
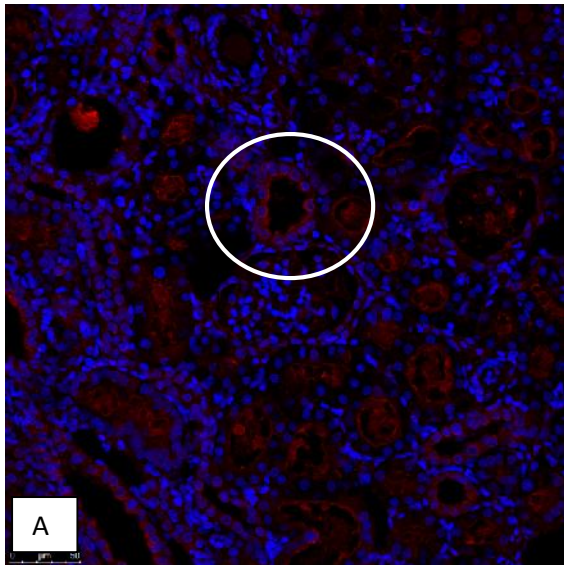
**Εικόνα 46: Ανοσοφθορισμός για τις 14-3-3 πρωτεΐνες σε νεφρικό ιστό αρουραίου.** Α: Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών δεν είναι εμφανής στα ζώα της ομάδας ελέγχου. Β: Στις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα παρατηρείται έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 τόσο στα σωληνάρια όσο και στο σπείραμα. Γ. Στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα, παρά το ότι η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι μικρότερη από ότι στις 2 ημέρες απολίνωσης, παραμένει αυξημένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100, Μεγέθυνση x40, με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων και με κόκκινο οι πρωτεΐνες 14-3-3)



**Εικόνα 47: Ανοσοφθορισμός για τις 14-3-3 πρωτεΐνες σε νεφρικό ιστό αρουραίου.** Α: σε μεγέθυνση απεικονίζεται σπείραμα ζώου της ομάδας ελέγχου στο οποίο η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών δεν είναι εμφανής. Β: σε μεγέθυνση απεικονίζεται σπείραμα ζώου με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Παρατηρείται έκφρασή τους στις τριχοειδικές αγκύλες αλλά και στα τοιχωματικά κύτταρα της κάψας του Bowman. Γ: Παρά το ότι η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα ζώα με την απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες είναι μικρότερη από ότι αυτή των 2 ημερών, η έκφραση στο σπείραμα είναι μεγαλύτερη από αυτή στα ζώα της ομάδας ελέγχου. (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100, με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων και με κόκκινο οι πρωτεΐνες 14-3-3).



**Εικόνα 48: Ανοσοφθορισμός για τις 14-3-3 πρωτεΐνες σε νεφρικό ιστό UUO αρουραίου.** A: Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών δεν είναι εμφανής στα ζώα της ομάδας ελέγχου. B: Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων. Γ: Παρά το ότι η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι χαμηλότερη στα ζώα απολίνωσης του ουρητήρα των 8 ημερών σε σχέση με αυτή των 2 ημερών, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών παραμένει αυξημένη σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου.



**Εικόνα 49:** Ανοσοφθορισμός για τις 14-3-3 πρωτεΐνες σε αρουραίο με απολίνωση ουρητήρα για 8 ημέρες. Η εικόνα Β αποτελεί μεγέθυνση του σωληναρίου της περιγεγραμμένης περιοχής στην εικόνα Α. Παρατηρείται συσσώρευση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική επιφάνεια των κυττάρων των άπω σωληναρίων και επίσης παρατηρείται είσοδος των 14-3-3 πρωτεϊνών στον πυρήνα (άσπρο βέλος, συνεντοπισμός χρωμάτων). (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/100, με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων και με κόκκινο οι πρωτεΐνες 14-3-3).



## ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η **Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ)** είναι ένα νόσημα που προσβάλλει σημαντικό ποσοστό του γενικού πληθυσμού και, στο τελικό της στάδιο, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, με εξωνεφρική κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρού, είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς. Στα επόμενα χρόνια αναμένεται αύξηση των ασθενών με ΧΝΝ των οποίων το κόστος θεραπείας είναι τεράστιο. Ακόμα πιο σημαντικό από το κόστος είναι το ότι, στις αναπτυσσόμενες χώρες, η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη και, επομένως, το τελικό στάδιο της ΧΝΝ ισοδυναμεί με το θάνατο. Βάσει αυτών των δεδομένων, στόχος της Διεθνούς Εταιρίας Νεφρολογίας είναι η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της ΧΝΝ [4-6].

Τα αίτια της ΧΝΝ είναι πολλά και, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκαλεί, η εξέλιξή της συσχετίζεται με τη **νεφρική ίνωση**. Η νεφρική ίνωση, που είναι το τελικό αποτέλεσμα και ο κοινός παρονομαστής πολλών νεφρικών νοσημάτων, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και, σαν πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί μοριακοί και κυτταρικοί μεσολαβητές, θα πρέπει να μελετηθεί με προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων [1-9].

Στα τρωκτικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα διαπιστώθηκε ότι, η **calreticulin**, μια πολυλειτουργική δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ινωτικής διεργασίας και, κυρίως, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα [49]. **Σκοπός της παρούσας μελέτης** ήταν η διερεύνηση του ρόλου της calreticulin στη νεφρική ίνωση και, πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση του πώς μεταβάλλονται οι ιδιότητες των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων κατά την υπερέκφρασή της. **Χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές** ανθρώπινων κυττάρων εγγύς σωληναρίου (**HK-2 κύτταρα**) με διαφορετική έκφραση calreticulin. Η πρώτη κυτταρική σειρά αποτελούσε την ομάδα της φυσιολογικής έκφρασης calreticulin και, στις άλλες δύο υπερεκφράστηκε calreticulin σε αυξανόμενο βαθμό. Οι κυτταρικές σειρές αυτές δημιουργήθηκαν **στην προσπάθειά μας να μιμηθούμε** και να μελετήσουμε **την υπερέκφραση της calreticulin που διαπιστώθηκε** στο ινωτικό νεφρικό μοντέλο στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα [49]. Για την επίτευξη του σκοπού της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και, πιο συγκεκριμένα, **Πρωτεωμική Ανάλυση** ώστε, μέσω τεχνικής υψηλής

απόδοσης (high throughput) μελέτης του πρωτεώματος των κυττάρων, να συλλεχθούν δεδομένα για να ανακαλυφθούν και να μοντελοποιηθούν οι νέες ιδιότητες των κυττάρων αυτών αλλά και, για να δημιουργηθούν πιθανά δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε αυτά. Στη συνέχεια, βάσει των αποτελεσμάτων της Πρωτεωμικής Ανάλυσης, βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης και βάσει των πρωτεϊνικών δικτύων που σχηματίστηκαν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιλέγησαν ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. Μέχρι την παρούσα μελέτη, η συμμετοχή και ο ρόλος των 14-3-3 πρωτεϊνών στη νεφρική ίνωση δεν έχει μελετηθεί. Αρχικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα, διαπιστώθηκε, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού, ότι οι 14-3-3 πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης παρατηρείται υπερέκφραση όλων των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

### **1. Συμπεράσματα Πρωτεωμικής Ανάλυσης-σχολιασμός**

Όπως κάθε ιστική ίνωση, έτσι και η **νεφρική ίνωση** ξεκινά ως διαδικασία απάντησης στα βλαπτικά ερεθίσματα. Εάν ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της βλάβης λειτουργήσει σωστά, τότε παρατηρείται επούλωση. Εάν, όμως, **τα βλαπτικά ερεθίσματα παραμείνουν**, τότε η εξωκυττάρια ουσία συσσωρεύεται, αντικαθιστά το υγιές νεφρικό παρέγχυμα, καταστρέφεται η λειτουργική μονάδα του νεφρού και, εμφανίζεται προοδευτικά επιδεινούμενη χρόνια νεφρική νόσος που θα οδηγήσει, τελικά, σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [1-9]. Κύτταρα τελεστές στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης είναι οι **μυοϊνοβλάστες** αφού, είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και εναπόθεση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας [6]. **Πιθανές πηγές προέλευσής τους** είναι πολλές και, σε αυτές περιλαμβάνονται τα **επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα** [5-9, 12, 13, 15, 19, 21]. Σε μοριακό επίπεδο, το σωληναριακό επιθηλιακό κύτταρο, στην προσπάθειά του να αμυνθεί των βλαπτικών ερεθισμάτων και να επιβιώσει, ενεργοποιείται. Εάν δε διακοπεί το βλαπτικό ερέθισμα ή εάν οι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί δεν επαναφέρουν την ισορροπία, τότε ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία, σε επίπεδο ιστού, θα οδηγήσουν στην ίνωση [7, 11, 15, 27-29].

Στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι, η **υπερέκφραση της calreticulin αποτελεί ένα συνεχές βλαπτικό ερέθισμα** στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. Αρχικά, με την Πρωτεωμική Ανάλυση επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση της calreticulin στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (εικόνες 30 και 31). Στη συνέχεια, με την

κατηγοριοποίηση των δεδομένων της Πρωτεωμικής Ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα οδηγεί σε τροποποίηση των επιπέδων των **πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τη φλεγμονή** (Πίνακας 6).

Σημαντικό στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης θεωρείται από πολλούς ερευνητές το φαινόμενο της **επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής** των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT). Αρκετές μελέτες πιθανολογούν ότι στο νεφρό, σε απάντηση σε ένα βλαπτικό ερέθισμα, τα σωληναριακά νεφρικά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπική αλλαγή, χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά δηλαδή, την πολικότητα, τις διακυττάρειες συνδέσεις και τους επιθηλιακούς τους δείκτες (για παράδειγμα την E-Cadherin και τη β-Catenin), εμφανίζουν *de novo* δείκτες μεσεγχυματικού κυττάρου (για παράδειγμα τη vimentin, τη nestin, την α-SMA, την FSP-1 και το κολλαγόνο I και III), τροποποιούν τον κυτταροσκελετό τους, εκφράζουν μικροϊνίδια, αποκτούν κινητικότητα, διασχίζουν τη βασική μεμβράνη του σωληναρίου και φτάνουν στο διάμεσο ιστό, όπου παράγουν και εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία [1, 5-9, 12-18]. Σε αυτή τη μελέτη, με την Πρωτεωμική Ανάλυση διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα συνοδεύεται από **υπερέκφραση του μεσεγχυματικού δείκτη vimentin και από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση**, υποδεικνύοντας, έτσι, την πιθανότητα η calreticulin να επάγει την EMT στα κύτταρα αυτά, συμμετέχοντας, τελικά, στην εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix, ECM) στο διάμεσο νεφρικό ιστό. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας βρίσκεται σε ισορροπία με την αποδόμησή της. Η ίνωση συσχετίζεται τόσο με ποσοτική όσο και με ποιοτική τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας. Στον ινωτικό νεφρό, ο διάμεσος χώρος είναι γεμάτος ινδοειδές υλικό που περιέχει κυρίως κολλαγόνο τύπου I, τύπου III και ινωδονεκτίνη αλλά και κατάλοιπα θραυσμάτων κολλαγόνου τύπου IV και παραλλαγές της ινωδονεκτίνης. Η αποδόμηση της ECM βασίζεται στη δράση πρωτεασών, για παράδειγμα στη δράση της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) και της πλασμίνης αλλά και στη δράση της λυσοσωματικής οικογένειας των καθειψινών (cathepsins) [5,7,11]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin παρατηρείται τροποποίηση των επιπέδων **δεικτών σύνθεσης κολλαγόνου** (για παράδειγμα των Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 και Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1), τροποποίηση πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την **εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας (ECM)**, για παράδειγμα των Serpin H1, Prolyl 3-hydroxylase 3 αλλά και τροποποίηση των επιπέδων της **Cathepsin D**.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* υφίστανται φαινοτυπική μετατροπή μετά την έκθεσή τους σε προϊνωτικούς παράγοντες, κυρίως στον transforming growth factor-β (TGF-β) [19, 20]. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, δεν έχει αποδειχθεί η *in vivo* φαινοτυπική αλλαγή του επιθηλιακού κυττάρου σε πλήρη ινοβλαστικό φαινότυπο. Κλινικές μελέτες σε βιοψίες νεφρού στον άνθρωπο υποδεικνύουν ότι η EMT πιθανά διαδραματίζει ρόλο στην παθογένεια της ΧΝΝ αφού, παρατηρείται έκφραση μεσεγγυματικών δεικτών σε αρκετές προοδευτικές νεφρικές νόσους και μάλιστα η έκφραση αυτή συσχετίζεται με την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Στη διεθνή βιβλιογραφία, δεν υπάρχει αμφισβήτηση της ύπαρξης της EMT *in vitro*, όμως, τα δεδομένα από τις *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι, πιθανά, τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα, κάτω από συγκεκριμένες περιστάσεις, υφίστανται **μερική EMT ή *in situ* EMT** κατά την οποία, τροποποιούν τους φαινοτυπικούς τους δείκτες αλλά δεν εγκαταλείπουν το μικροπεριβάλλον τους [6-8, 13, 15, 21]. Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα αδημοσίευτα, ακόμα, δεδομένα από τους **Prakoura N και συνεργάτες** που αφορούν στη μελέτη των επιπτώσεων της υπερέκφρασης της calreticulin στο φαινότυπο των νεφρικών επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων **επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης** της παρούσας μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, από τη μελέτη των Prakoura N και συνεργατών διαπιστώθηκε ότι, τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου που υπερεκφράζουν calreticulin εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-Cadherin, αυξημένη έκφραση του μεσεγγυματικού δείκτη Vimentin και επιπρόσθετα, παρατηρείται από αυτά αυξημένη παραγωγή ινωδονεκτίνης και κολλαγόνου τύπου IV. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι, σε καμμία από τις αναλύσεις **δε διαπιστώθηκε τροποποίηση στην έκφραση της α-SMA**. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι, τουλάχιστον, **η υπερέκφραση της calreticulin δεν οδηγεί τα καλλιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα σε πλήρες EMT**.

Η calreticulin διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες περιλαμβάνεται και η λειτουργία της σαν πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone) [86]. Οι συνοδοί πρωτεΐνες του ER είναι υπεύθυνες για τη φυσιολογική αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Το **Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER stress)** αναφέρεται σε κάθε φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση που θα αυξήσει τις απαιτήσεις για αναδίπλωση των πρωτεϊνών ή θα διακόψει τις διαδικασίες αναδίπλωσης, οδηγώντας σε συσσώρευση των παθολογικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ER. Για να αποφύγει τις παθολογικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, το ER ενεργοποιεί δύο μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας, την απάντηση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (unfolded protein response, UPR) και την

αποδόμηση που συσχετίζεται με το ER (ER-associated degradation, ERAD). Η ενεργοποίηση του UPR είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου αφού, επιτρέπει στο κύτταρο να ανακάμψει από το στρες. Αντίθετα, η παρατεταμένη ενεργοποίησή του, μπορεί να γίνει κυτταροτοξική αφού, οδηγεί σε απόπτωση. Η ενεργοποίηση της ERAD θα οδηγήσει στην αποδόμηση των πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα [7, 41, 42]. Είναι γνωστό ότι, η έκθεση των εγγύς σωληναριακών κυττάρων σε βλαπτικό ερέθισμα (για παράδειγμα σε αλβουμίνη) ενεργοποιεί προϊνωτικούς μηχανισμούς και υπερέκφραση δεικτών ER stress, η οποία συσχετίζεται με αύξηση της απόπτωσης [43]. Σε ζωικά μοντέλα με ER stress παρατηρείται, στην προχωρημένη ηλικία των ζώων, εκτεταμένη σωληναριοδιάμεση ίνωση και σωληναριακή ατροφία με διάταση, ακόμα και χωρίς την ύπαρξη βλαπτικού παράγοντα. Στα ζώα αυτά, η απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων είναι αυξημένη [44]. Σε πειραματικό ζωικό μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 η υπερέκφραση δεικτών ER stress συσχετίστηκε με αυξημένη απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων [45] και, ο έλεγχος με μικροσυστοιχίες σε βιοψίες ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια έδειξε ότι τα γονίδια που συσχετίζονται με το UPR είναι αυξημένα στα σωληνάρια σαν προσπάθεια προστασίας των κυττάρων [46]. Στην παρούσα μελέτη, η υπόθεση ήταν ότι, παρεμβαίνοντας στα επίπεδα μιας πρωτεΐνης του ER και, συγκεκριμένα στα επίπεδα της συνοδού πρωτεΐνης calreticulin, αναμενόταν τροποποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν και συσχετίζονται με τη λειτουργία του. Με την Πρωτεωμική Ανάλυση της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της συνοδού πρωτεΐνης calreticulin συνοδεύεται από τροποποίηση των επιπέδων **πρωτεϊνών heat shock και άλλων συνοδών πρωτεϊνών**, από υπερέκφραση **πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες**, όπως επίσης και τροποποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην **αναδίπλωση των πρωτεϊνών** αλλά και στην **αποδόμησή τους στο πρωτεάσωμα** (Πίνακας 6).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε τροποποίηση επιπέδων **πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο** και, επίσης, τροποποίηση επιπέδων **πρωτεϊνών που παρεμβαίνουν στην απόπτωση**. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία, ένα βλαπτικό ερέθισμα σε ένα κύτταρο ενεργοποιεί σήματα «θανάτου» οπότε, το κύτταρο θα υποστεί παύση του κυτταρικού κύκλου για να διορθωθεί το DNA του, αλλιώς, θα υποστεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση μέσω των μεσολαβητών που παράγονται. Μάλιστα, το ποσοστό των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται σε παύση του κυτταρικού κύκλου συσχετίζεται με την έκβαση της ίνωσης και, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν προϊνωτικό φαινότυπο [7, 29, 30, 47]. **Επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης** έρχονται και πάλι τα

αδημοσίευτα δεδομένα των **Prakoura N και συνεργατών**, τα οποία, επιπρόσθετα των άλλων ευρημάτων, υποδεικνύουν αυξημένη έκφραση της συνοδού πρωτεΐνης BiP του ER αλλά και αυξημένη απόπτωση στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin.

Επίσης, η Πρωτεωμική Ανάλυση έδειξε ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από τροποποίηση των επιπέδων πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το **mRNA και το εναλλακτικό του μάτισμα** και, από τροποποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην **κυτταρική ανάπτυξη** και τον **κυτταρικό μεταβολισμό**.

Πλεονεκτήματα της μελέτης των ιδιοτήτων των κυττάρων με Πρωτεωμική Ανάλυση είναι ότι η Πρωτεωμική Ανάλυση είναι η μόνη μέθοδος, η οποία, μέχρι σήμερα, έχει την ικανότητα να διαχωρίζει και να απεικονίζει ταυτόχρονα ένα ιδιαίτερα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, παρέχοντας, έτσι, τη δυνατότητα αξιολόγησης πολλών δεδομένων. Βέβαια, θα πρέπει να τονιστεί ότι, βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μόνο τα κύρια τμήματα του πρωτεϊνικού μείγματος μπορούν να απεικονιστούν και η ευαισθησία της είναι χαμηλή σε πολύ όξινες ή πολύ βασικές πρωτεΐνες, σε πρωτεΐνες πολύ μεγάλου μοριακού βάρους ή σε υδρόφοβες πρωτεΐνες [50,51]. Η πληθώρα των δεδομένων που ελήφθησαν με τη μελέτη αυτή θεωρήθηκε αρκετή για τη συνέχειά της ώστε να μην ακολουθήσει περαιτέρω επεξεργασία και εμπλουτισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε αναζήτηση για πιθανή συμμετοχή των ταυτοποιημένων διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών σε δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Ingenuity Pathway Analysis διαπιστώθηκε ότι, οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες συμμετέχουν σε **τέσσερα διαφορετικά δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων** (εικόνες 33-36). Στο πρώτο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων διαπιστώνεται συμμετοχή, κυρίως, πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και, το δίκτυο αυτό αποτελείται από πολλές heat shock πρωτεΐνες. Κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ζ και σε αυτό συμμετέχουν οι περισσότερες από τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών. Παρόμοιο δίκτυο είναι το τρίτο στο οποίο, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ε και, σε αυτό συμμετέχουν heat shock πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την απόπτωση και την παραγωγή κολλαγόνου. Στο δεύτερο δίκτυο, κεντρικό ρόλο κατέχει η calreticulin και παρατηρείται αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό στρες, τον κυτταρικό μεταβολισμό και την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Στο τελευταίο δίκτυο, του οποίου η πλειοψηφία δεν ταυτοποιήθηκε στην Πρωτεωμική Ανάλυση, διαπιστώνεται η συμμετοχή πρωτεϊνών που αποτελούν δείκτες σύνθεσης κολλαγόνου. Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι τα δίκτυα πρωτεϊνικών

αλληλεπιδράσεων που σχηματίστηκαν αποτελούν μία **επιβεβαίωση της κατηγοριοποίησης** των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών της Πρωτεωμικής Ανάλυσης και, μάλιστα, υποδεικνύουν ότι, **η υπερέκφραση της calreticulin** στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε **διεργασίες και μονοπάτια που συσχετίζονται με τη νεφρική ίνωση**. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, όλα τα δίκτυα που διαπιστώθηκαν αποτελούν μελλοντικούς στόχους περαιτέρω διερεύνησης.

Η Πρωτεωμική Ανάλυση έδωσε μια πληθώρα πληροφοριών από τις ταυτοποιημένες διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες. Πολλές από αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέρον όμως, τελικά, βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης και μελέτης και, βάσει εμπλοκής τους σε κεντρικές θέσεις στα δίκτυα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που σχηματίστηκαν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιλέγησαν ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. **Μέχρι σήμερα, ο ρόλος και η συμμετοχή των πρωτεϊνών 14-3-3 στη νεφρική ίνωση δεν έχει μελετηθεί. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη της συμμετοχής των 14-3-3 πρωτεϊνών στη διεργασία της νεφρικής ίνωσης.**

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5 στο Μέρος II, οι **πρωτεΐνες 14-3-3** είναι μία οικογένεια διμερών, συντηρημένων κατά την εξέλιξη, όξινων πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 28-33 kDa που, εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και, δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα πρωτεϊνικών στόχων με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Μέχρι σήμερα, στα θηλαστικά αναγνωρίστηκαν επτά ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών από επτά διαφορετικά γονίδια, οι οποίες συμβολίζονται με τα ελληνικά γράμματα β ή α, ε, γ, η, τ, ζ ή δ και σ. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών δράσης και, εμπλέκονται, έτσι, στη ρύθμιση και στο συντονισμό της κυτταρικής ανάπτυξης, της κυτταρικής μετανάστευσης, της απόπτωσης, του κυτταρικού μεταβολισμού, της μετακίνησης πρωτεϊνών στο κύτταρο, της μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της απάντησης του κυττάρου στη βλάβη του DNA και πολλών άλλων. Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [93-102].

Στην παρούσα μελέτη, με την Πρωτεωμική Ανάλυση διαπιστώθηκε ότι, στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου που υπερεκφράζουν calreticulin παρατηρείται υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών οι οποίες, στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι, όχι μόνο

συμμετέχουν στα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που σχηματίστηκαν αλλά και ότι, στα δύο από αυτά κατέχουν κεντρικό ρόλο. Είναι γνωστό ότι, στον οργανισμό, ο μεταβολισμός πρέπει να είναι ρυθμισμένος ανάλογα με τις απαιτήσεις των κυτταρικών διεργασιών. Οι διαφορετικοί ιστοί ανταποκρίνονται στις λειτουργίες τους διατηρώντας την απαραίτητη για την επιβίωση ενέργεια. Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια συνεισφέρουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού τόσο στο επίπεδο του κυττάρου όσο και στο επίπεδο των ιστών και, τα τελευταία χρόνια, τα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν στη ρύθμιση αυτή [99]. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με πολλά ένζυμα που **εμπλέκονται στο μεταβολισμό** και σε αυτά περιλαμβάνονται ένζυμα που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, στο μονοπάτι των φωσφοπεντοζών, στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και των νουκλεοτιδίων, στο μεταβολισμό της μεθειονίνης και στις αναγωγικές αντιδράσεις. Τα επίπεδα κάποιων από αυτά τα ένζυμα διαπιστώθηκαν με την παρούσα Πρωτεωμική Ανάλυση να τροποποιούνται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin και, τα ένζυμα αυτά είναι η **πυρουβική κινάση M (PK)**, η **συνθετάση του ATP (ATP-synthase)** και η **αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH)**.

Στην παρούσα μελέτη, στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν με Πρωτεωμική Ανάλυση διαπιστώθηκε ότι, τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον **κυτταρικό κύκλο**. Ένας από τους περισσότερο αποδεδειγμένους ρόλους των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου η οποία, εξαρτάται από την ενεργοποίηση ή την αναστολή των κυκλινών, των ενεργοποιητών τους και των ανασταλτών τους. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύουν τα φωσφορυλιωμένα αυτά μόρια και, είτε αναστέλλουν τη δράση τους, είτε οδηγούν στην τροποποίηση της κινητικής τους από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ο διπλασιασμός του DNA προκαλεί βλάβη στο DNA και, η μετάβαση στη φάση της μίτωσης M προϋποθέτει τη διόρθωση της βλάβης. Η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 είναι σημαντική ώστε να αποφευχθεί η γενομική αστάθεια. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 διατηρούν το κύτταρο στη φάση G2 μέχρι να διορθωθεί το DNA, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου με βλάβη στο DNA. Από τη στιγμή, όμως, που το κύτταρο εισέλθει στη φάση M τότε, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επάγουν την εξέλιξή της, ενεργοποιώντας διαδικασίες κυτταροκίνησης. Επίσης, οι 14-3-3 πρωτεΐνες, ανάλογα με τον προσδέτη τους και ανάλογα με τη φωσφορυλίωσή του, ρυθμίζουν είτε αναστέλλοντας είτε επάγοντας, τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [103].

Όπως προαναφέρθηκε, διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από υπερέκφραση του μεσεγχυματικού δείκτη vimentin



αλλά και από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην **κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση**, υποδεικνύοντας την πιθανότητα η calreticulin να επάγει EMT στα κύτταρα αυτά. Η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση αποδεικνύεται σημαντική διεργασία αφού, εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις στις οποίες περιλαμβάνεται και ο καρκίνος. Με την Πρωτεωμική ανάλυση, οι πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα τροποποιήθηκαν στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin και ταυτόχρονα συσχετίζονται με τις 14-3-3 πρωτεΐνες είναι οι **α- και β- τουμπουλίνη, η ακτίνη, η cofilin-1 και η HspB1**. Έχει αποδειχθεί ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με την α- και β- τουμπουλίνη, την ακτίνη, με τις δεσμεύουσες στην ακτίνη πρωτεΐνες και με τις πρωτεΐνες της ομάδας του παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης (Actin depolymerizing-factor group, ADF). Στην ομάδα ADF ανήκει και η cofilin. Η cofilin είναι μία μικρή πρωτεΐνη η οποία δεσμεύεται στην ινδοειδή F-actin αποσταθεροποιώντας το ινίδιο ακτίνης. Η φωσφορυλιωμένη cofilin δε μπορεί να δεσμευτεί στην F-actin, οπότε δε μπορεί να τη διασπάσει. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύονται στη φωσφορυλιωμένη cofilin, παρεμποδίζουν την αποφωσφορυλίωσή της διατηρώντας αδιάσπαστα τα ινίδια ακτίνης. Πιθανολογείται ότι, οι πρωτεϊνικοί στόχοι που δημιουργούν ισχυρά συμπλέγματα με τις 14-3-3 πρωτεΐνες και που υπάρχουν σε αυξημένες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα μπορούν να εκτοπίσουν την cofilin από τις 14-3-3 πρωτεΐνες και, έμμεσα, να οδηγήσουν σε κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Τέτοιο μόριο είναι η φωσφορυλιωμένη heat shock protein B6 (HspB6, Hsp20). Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι, η φωσφορυλιωμένη heat shock protein B1 (HspB1, Hsp27) επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία ινιδίων στρες (stress fibers). Η αλληλεπίδραση των 14-3-3 πρωτεϊνών με τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν τη HspB1 αναστέλλει τη λειτουργία τους και τον πολυμερισμό της ακτίνης [101, 107, 108].

Ακολούθησε **επαλήθευση των αποτελεσμάτων της Πρωτεωμικής Ανάλυσης** και, πιο συγκεκριμένα, για να επιβεβαιωθεί η υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα ανθρώπινα κύτταρα εγγύς σωληναρίου που υπερεκφράζουν calreticulin, έγινε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (q RT-PCR) για τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν. Οι ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την Πρωτεωμική Ανάλυση, απομονώθηκαν από δύο μόνο πρωτεϊνικές κηλίδες (εικόνα 32, Πίνακας 1). Από τις ισομορφές, η υπερέκφραση της 14-3-3 ε ήταν η πιο πιθανή αφού, ήταν η μόνη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε από την κηλίδα με αριθμό 1, της οποίας η ένταση αυξήθηκε στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Όλες οι υπόλοιπες ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεϊνική κηλίδα με αριθμό 2, της οποίας η ένταση αυξήθηκε αλλά, η πληροφορία αυτή δεν ήταν επαρκής για

ξεκαθαριστεί η έκφραση της κάθε μίας ξεχωριστά. Επομένως, για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης αλλά και για να διαπιστωθεί η έκφραση της κάθε ισομορφής ξεχωριστά, ακολούθησε η RT-PCR στις κυτταρικές σειρές για όλες τις ταυτοποιημένες ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών δηλαδή, για τις ισομορφές β, ε, γ, η, τ και ζ. Ξεκάθαρα, στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η calreticulin παρατηρείται υπερέκφραση όλων των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών. Ενώ το mRNA της πρωτεΐνης 14-3-3η αυξάνεται προοδευτικά από την κυτταρική σειρά της ομάδας ελέγχου προς την κυτταρική σειρά με τη μεγάλη υπερέκφραση calreticulin, το mRNA των υπολοίπων παρουσιάζει ίδια τροποποίηση δηλαδή, αυξάνεται από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου στα κύτταρα της μέτριας υπερέκφρασης της calreticulin και, στα κύτταρα της μεγάλης υπερέκφρασης της calreticulin ενώ η αύξηση παραμένει, είναι πολύ μικρότερη (εικόνα 37). Μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζει το mRNA της ισομορφής 14-3-3 β. Η σημασία της διαφορετικής κινητικής των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin παραμένει αδιευκρίνιστη και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

## **2. Υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στη νεφρική ίνωση *in vivo* - Σχολιασμός αποτελεσμάτων**

Μετά την παρατήρηση και την επιβεβαίωσή της σε επίπεδο mRNA ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 υπερεκφράζονται στην κυτταρική σειρά των εγγύς επιθηλιακών κυττάρων που δημιουργήθηκαν για να μιμηθούν την υπερέκφραση της calreticulin στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης, το επόμενο βήμα ήταν να μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 *in vivo* κατά τη διεργασία της νεφρικής ίνωσης. Το αρχικό εύρημα πάνω στο οποίο στηρίχθηκε η παρούσα μελέτη, δηλαδή το εύρημα της υπερέκφρασης της calreticulin από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ίνωσης στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα, διαπιστώθηκε στο ζωικό μοντέλο της **νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)**. Για αυτό το λόγο και εξαιτίας των υπόλοιπων πλεονεκτημάτων του, τα οποία αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5 στο Μέρος II [27, 47, 48], επιλέχθηκε η χρησιμοποίησή του στην παρούσα μελέτη.

Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο νεφρικής ίνωσης UUO σε τρεις διαφορετικούς χρόνους οι οποίοι ήταν ο χρόνος μηδέν, οι 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και οι 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα. Στο μοντέλο αυτό, σε αρουραίους και σε ποντίκια, μελετήθηκε η ταυτόχρονη έκφραση στο νεφρικό ιστό όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού.

Είναι γνωστό ότι, η έκφραση των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στα κύτταρα, στους ιστούς και στα όργανα διαφέρει και, ο υποκείμενος μηχανισμός μέσω του οποίου εκφράζονται διαφορετικά οι ισομορφές δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί [99]. Η πρώτη διαπίστωση ήταν ότι, **οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται φυσιολογικά στο νεφρικό ιστό** και, μάλιστα, η έκφρασή τους παρουσιάζεται μεγαλύτερη στη μυελώδη μοίρα από ότι στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού (εικόνα 38). Η βασική έκφρασή τους στα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου είναι εμφανής, η έκφρασή τους στα αθροιστικά σωληνάκια είναι ακόμα μεγαλύτερη ενώ, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη έκφρασή τους στο σπείραμα ούτε στο διάμεσο ιστό. Εξαιτίας της διαφορετικής λειτουργικής σημασίας που έχει το κάθε ανατομικό τμήμα του νεφρού αλλά και εξαιτίας της διαφορετικής έκφρασης που παρουσιάζουν οι 14-3-3 πρωτεΐνες σε αυτά, **η αξιολόγηση και η περιγραφή της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών έγινε βάσει ανατομικής περιοχής.**

Διαπιστώθηκε ότι ο νεφρικός ιστός των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες παρουσίαζε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε **αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων** αλλά και **αύξηση της έκφρασής τους στο σπείραμα.** Στο σπείραμα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών φαίνεται ότι αυξάνεται κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman. Στα **άπω σωληνάκια παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα** και, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες **φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου** δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Τα επιπρόσθετα ευρήματα της μελέτης του νεφρικού ιστού με ανοσοφθορισμό ήταν ότι, **οι 14-3-3 πρωτεΐνες εισέρχονται στον πυρήνα των σωληναριακών κυττάρων** (εικόνες 39-49).

Τα τελευταία χρόνια, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 αλληλεπιδρούν με μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην EMT για παράδειγμα με μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- $\beta$  και της Wnt/ $\beta$ -Catenin. Κεντρικό ρόλο στο φαινόμενο της EMT κατέχει ο TGF- $\beta$ , ο οποίος, μετά τη σύνδεσή του στον υποδοχέα του, οδηγεί στην ενεργοποίηση κινασών που θα φωσφορυλιώσουν τα μόρια Smad. Ο ετεροπολυμερισμός των μορίων Smad θα τα οδηγήσει στον πυρήνα, όπου θα ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων κάποια από τα οποία είναι το Snail, το Slug, το Twist και γονίδια που επάγουν ίνωση όπως τα Col1a1, Col1a2, Col11a1, Col1a2, Col1a1, Col1a2, Col1a1, Col1a3 και του ανασταλτή της MMP-1 (TIMP-1) [2, 12, 28-30]. Είναι γνωστό ότι, η πρωτεΐνη 14-3-3ε αλληλεπιδρά, με φωσφορυλιοεξαρτώμενο τρόπο, με τον υποδοχέα τύπου I του TGF- $\beta$  αυξάνοντας τη

σηματοδότηση του TGF- $\beta$  [109]. Είναι, επίσης, γνωστό ότι, η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [102]. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3, κυρίως της πρωτεΐνης 14-3-3ζ, έχει διαπιστωθεί σε καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του στομάχου, σε ουροθηλιακούς καρκίνους, σε *in situ* καρκινώματα μαστού και σε άλλα και, η υπερέκφρασή της συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση [110-114]. Οι Lu J και συνεργάτες, μελετώντας κυτταρικές τροποποιήσεις σε καρκινικά κύτταρα, διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης 14-3-3ζ μείωνε την επαφή των κυττάρων μεταξύ τους, μέσω του φαινομένου της EMT [110]. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη 14-3-3ζ δεσμεύεται στον υποδοχέα τύπου I του TGF- $\beta$ , παρεμποδίζει την ουμπικουϊτινίωσή του και, άρα, την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Τα αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα αυξάνουν τη σηματοδότηση του TGF- $\beta$ /Smad. Τα φωσφορυλιωμένα Smad2 και Smad3 μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου, τελικά, θα καταστείλουν τη μεταγραφή του γονιδίου της E-Cadherin, με αποτέλεσμα την EMT [110]. Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στην παρατήρηση ότι η calreticulin υπερεκφράζεται στα σωληναριακά νεφρικά κύτταρα από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας και, στη συνέχεια, σε αυτή τη μελέτη, επιπρόσθετα των υπόλοιπων τροποποιήσεων, διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, το εμμένον βλαπτικό ερέθισμα της απόφραξης του ουρητήρα οδηγεί, από τη μία, σε **υπερέκφραση της calreticulin** στα σωληναριακά κύτταρα και στην επακόλουθη **αύξηση των 14-3-3 πρωτεϊνών**, από την άλλη, σε ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν την ίνωση, για παράδειγμα σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- $\beta$  (εικόνα 51). Η δέσμευση του TGF- $\beta$  στον υποδοχέα του τύπου I (T $\beta$ R1) οδηγεί σε φωσφορυλίωση των Smad τα οποία, θα κατευθυνθούν στον πυρήνα όπου, μεταξύ άλλων, θα καταστείλουν την έκφραση του γονιδίου της E-Cadherin. Οι αυξημένες 14-3-3 **θα δεσμευτούν στον υποδοχέα τύπου I του TGF- $\beta$** , παρεμποδίζοντας την ουμπικουϊτινίωσή του και, άρα, την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την ύπαρξη **αυξημένης σηματοδότησης του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF- $\beta$ /Smad**.

Στην προσπάθειά τους να αναγνωρίσουν μόρια που αλληλεπιδρούν με τα Smad ώστε να κατανοηθεί η σηματοδότησή τους, οι Seong HA και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι, οι πρωτεΐνες Smad2, Smad3, Smad4 και Smad7 αλληλεπιδρούν με την εξαρτώμενη από το τριφωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση-1 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1, PDK1) [115]. Η PDK1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών

κινασών A, G, C στις οποίες περιλαμβάνεται και η κινάση επιβίωσης AKT, την οποία φωσφορυλιώνει [116, 117]. Η δραστηριότητα της PDK1 ρυθμίζεται από αρκετές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά και, σε αυτές ανήκουν και οι πρωτεΐνες 14-3-3. Στη μελέτη των Seong HA και συνεργατών, βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες Smad αυξάνουν τη δραστηριότητα της PDK1 επειδή ενεργοποιούν την αποδέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών από το σύμπλοκο PDK1/14-3-3 [115]. Επίσης, ο TGF-β, ανεξάρτητα των Smad, ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/AKT. Είναι γνωστό ότι, στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, η υψηλή έκφραση των 14-3-3 συσχετίζεται με αυξημένη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης AKT μέσω της ενεργοποίησης της PI3K. Οι 14-3-3 δεσμεύονται στη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K, με αποτέλεσμα η PI3K να μετακινείται στην κυτταρική μεμβράνη και να ενεργοποιείται [113]. Στην παρούσα μελέτη, σε συνέχεια του υποθετικού μοντέλου, θα μπορούσαμε να πούμε ότι, στο μοντέλο της νεφρικής ίνωσης που μελετήσαμε, το **ενεργοποιημένο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT. Οι αυξημένες 14-3-3 πρωτεΐνες δεσμεύονται στη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K, με αποτέλεσμα η PI3K να μετακινείται στην κυτταρική μεμβράνη, να ενεργοποιείται και να αυξάνει τη φωσφορυλίωση και, άρα, την ενεργοποίηση της κινάσης επιβίωσης AKT.** Επιπρόσθετα, τα φωσφορυλιωμένα Smad αυξάνουν την αποδέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών από την PDK1, η οποία πλέον μπορεί να φωσφορυλιώσει και αυτή την κινάση AKT (εικόνα 51).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-Catenin είναι σημαντικό στην ανάπτυξη ίνωσης κυρίως μέσω της συμμετοχής του στο φαινόμενο της EMT. Η αλληλεπίδρασή του με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β είναι γνωστή. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η β-Catenin αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της E-Cadherin ώστε, η E-Cadherin να αλληλεπιδράσει έμμεσα με τα ινίδια ακτίνης. Η διάσπαση των κυτταρικών επαφών επηρεάζουν την ενδοκυττάρωση της E-Cadherin και παραμένει η β-Catenin διαθέσιμη. Ο TGF-β αποσπά τη β-Catenin από τις επιθηλιακές συνδέσεις και τη σταθεροποιεί στο κυτταρόπλασμα. Το ελεύθερο τμήμα της β-Catenin κατανέμεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ανάλογα με τη φωσφορυλίωσή του. Η φωσφορυλίωση της β-Catenin από το σύμπλεγμα axin/APC/GSK-3β οδηγεί στην ουμπικουϊτινίωσή της και, στη συνέχεια, στην αποδόμησή της στο πρωτεάσωμα. Η αποφωσφορυλιωμένη β-Catenin δε διασπάται στο πρωτεάσωμα, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην EMT, για

παράδειγμα του Snail και του Twist [34, 35, 37-40]. Επίσης, το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -Catenin ρυθμίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Το στρες του κυττάρου καταστέλλει την GSK-3 $\beta$  με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται η  $\beta$ -Catenin στο κυτταρόπλασμα [35]. Για να αναλύσουν το σύμπλεγμα πρωτεϊνών της  $\beta$ -Catenin, οι Tian Q και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η  $\beta$ -Catenin αλληλεπιδρά με την 14-3-3ζ πρωτεΐνη μετά τη φωσφορυλίωσή της από την κινάση επιβίωσης AKT [124]. Η δέσμευση της  $\beta$ -Catenin στις 14-3-3ζ πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα τη δομική τροποποίηση της  $\beta$ -Catenin και τη σταθεροποίησή της στο κυτταρόπλασμα [124, 125]. Από την άλλη, η φωσφορυλίωση της  $\beta$ -Catenin από την AKT στη Ser<sup>552</sup> έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπασή της από τις ενδοκυττάρειες συνδέσεις, τη δέσμευσή της στις 14-3-3ζ πρωτεΐνες και, τελικά, τη μετακίνησή της στον πυρήνα [126]. Η πρωτεΐνη Chibby είναι ένας ανταγωνιστής της  $\beta$ -Catenin αφού, με τη δέσμευσή του σε αυτή, αναστέλλει τη μεταφραστική της ικανότητα. Η φωσφορυλίωση της Chibby από την κινάση AKT οδηγεί στη δέσμευσή του με τις πρωτεΐνες 14-3-3 και η δημιουργία του συμπλόκου  $\beta$ -Catenin/14-3-3ζ/Chibby επάγει την έξοδο της  $\beta$ -Catenin από τον πυρήνα και την καταστολή της μεταγραφικής της δραστηριότητας [107, 127, 128]. Στην παρούσα μελέτη, σε συνέχεια και πάλι του υποθετικού μοντέλου, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, στα επιθηλιακά σωληναρικά κύτταρα του μοντέλου νεφρικής ίνωσης που μελετήθηκε, η  **$\beta$ -Catenin** αποσπάται από τις επιθηλιακές συνδέσεις και **σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα**. Επιπρόσθετα, **το οξειδοαναγωγικό στρες** των επιθηλιακών κυττάρων, όπως διαπιστώθηκε στα κύτταρα αυτά με την Πρωτεωμική ανάλυση, οδηγούν σε **καταστολή της GSK $\beta$** . Επίσης, η ενεργοποιημένη κινάση AKT καταστέλλει και αυτή την GSK $\beta$  οπότε η  $\beta$ -Catenin δε φωσφορυλιώνεται, δε διασπάται στο πρωτεάσωμα και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλίωσή της, όμως, από την κινάση AKT έχει σαν αποτέλεσμα την **αλληλεπίδρασή της με τις υπερεκφρασμένες 14-3-3 πρωτεΐνες** και την ενίσχυση της συσσώρευσής της. Η **μετακίνησή της  $\beta$ -Catenin στον πυρήνα** θα ενεργοποιήσει, μεταξύ άλλων, γονίδια που θα καταστείλουν την έκφραση της E-Cadherin (εικόνα 51).

Σημαντικός ρυθμιστής της EMT είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Snail αφού, καταστέλλει τη μετάφραση της E-Cadherin με τη σύνδεσή του στο E-Box του υποκινητή του γονιδίου της [118]. Η πρωτεΐνη Snail αποτελείται από μια αμινοτελική SNAG κατασταλτική περιοχή και από 4 καρβοξυτελικά μοτίβα Ψευδαργύρου (Zinc finger motifs). Στην προσπάθειά τους να διαπιστώσουν τα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του Snail, οι Hou Z και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη Snail εμφανίζει δύο μοτίβα δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών, και, στη συνέχεια, διαπίστωσαν ότι η άμεση αλληλεπίδραση του Snail με τις 14-3-3 πρωτεΐνες είναι απαραίτητη ώστε να κατασταλεί η μεταγραφή της E-

Cadherin. Πιθανά, οι πρωτεΐνες 14-3-3 λειτουργούν ως συμπαράγοντες του Snail, ρυθμίζοντας άμεσα τη δράση του [119]. Η πρωτεϊνική κινάση D1 (Protein Kinase D1, PKD1) ρυθμίζει, με τη δράση της, αρκετές κυτταρικές διεργασίες στις οποίες περιλαμβάνονται η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η κινητικότητα [120]. Σε καρκίνο προστάτη, σε καρκίνο στομάχου και σε καρκίνο μαστού, η PKD1 εμφανίζεται κατεσταλμένη [121]. Μία από τις λειτουργίες της PKD1 είναι η φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής ουράς της E-Cadherin, σταθεροποιώντας, έτσι, την αλληλεπίδραση της E-Cadherin με τη β-Catenin [122, 123]. Οι Hu C και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι, η PKD1 αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει, σε ένα κατάλοιπο στο τέλος της περιοχής SNAG, τον μεταγραφικό παράγοντα Snail, δημιουργώντας μοτίβο δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Επομένως, η δέσμευση του φωσφορυλιωμένου Snail στις 14-3-3 πρωτεΐνες οδηγεί στη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Επίσης, η μετακίνηση του φωσφορυλιωμένου Snail στο κυτταρόπλασμα έχει σαν αποτέλεσμα την πρωτεολυτική του διάσπαση [121]. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι, για να διερευνηθούν την επίδραση της υπερέκφρασης της calreticulin στα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα, οι Hayashida Y και συνεργάτες, διαπίστωσαν ότι νεφρικά κύτταρα MDCK (Madin-Darby canine kidney) τα οποία υπερεκφράζουν calreticulin τροποποιούν τη μορφολογία τους, καταστρέφεται ο επιθηλιακός τους φαινότυπος, καταστέλλεται η έκφραση της E-Cadherin και, αυξάνεται η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών. Στη συνέχεια, έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Slug (Snail2) υπερεκφράζεται στα κύτταρα αυτά, δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου της E-Cadherin όπου καταστέλλει την έκφρασή της [89]. Στην παρούσα μελέτη θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα του μοντέλου νεφρικής ίνωσης που μελετήθηκε, η **δράση της PKD1, που θεωρείται ανταγωνίστρια της EMT, είναι μειωμένη**. Επομένως, από τη μία η μειωμένη φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής ουράς της E-Cadherin έχει σαν αποτέλεσμα της συσσώρευση της β-Catenin στο κυτταρόπλασμα και, από την άλλη, ο φωσφορυλιωμένος **μεταγραφικός παράγοντας Snail, δεσμευμένος στις υπερεκφρασμένες 14-3-3 πρωτεΐνες, παραμένει στον πυρήνα**, όπου συνεχίζει να ασκεί τη δράση του, καταστέλλοντας την έκφραση της E-Cadherin (εικόνα 51). Υπέρ της πιθανότητας αυτής είναι η διαπίστωση ότι, στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε **μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στον πυρήνα των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων** (εικόνα 49) τόσο στους αρουραίους με απολίνωση του ουρητήρα για **2 ημέρες** όσο και σε αυτούς με απολίνωση του ουρητήρα **για 8 ημέρες**.

Στο ER, η calreticulin ρυθμίζει τη μήτρα ινωδονεκτίνης μέσω ρύθμισης της ενδοκυττάριας σηματοδότησης ασβεστίου. Επιπρόσθετα, η κυτταροπλασματική calreticulin,

είναι γνωστό ότι, συνδέεται με την κυτταροπλασματική ουρά των α-ιντεγκρινών σταθεροποιώντας την προσκόλληση στο κολλαγόνο. Σε ινοβλάστες με διαφορετική έκφραση calreticulin διαπιστώθηκε ότι, η ενδοκυττάρια calreticulin ρυθμίζει σε πολλαπλά επίπεδα την έκφραση, τη μετακίνηση και την εναπόθεση στην ECM του κολλαγόνου τύπου I [92]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το προαναφερθέν προτεινόμενο υποθετικό μοντέλο θα μπορούσε να εξηγήσει τη συμμετοχή της calreticulin στη διεργασία της νεφρικής ίνωσης.

Ένα επιπρόσθετο και ενδιαφέρον στοιχείο που προέκυψε από την παρούσα μελέτη είναι η διαπίστωση ότι, στα **άπω σωληνάρια, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου** δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή (εικόνα 43). Η συσσώρευση φαίνεται ότι ξεκινά από τις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και μεγιστοποιείται στις 8 ημέρες. Στην αυλική μεμβράνη του τελικού τμήματος των άπω εσπειραμένων σωληναρίων και των αθροιστικών σωληναρίων βρίσκεται το κανάλι Νατρίου (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel, ENaC) του οποίου η δράση, υπό την επίδραση της ορμόνης αλδοστερόνης, είναι η επαναρρόφηση νατρίου. Η νατριοευαισθησία στα πλαίσια της αρτηριακής υπέρτασης, η οποία είναι χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα σχεδόν όλων των νεφρικών νοσημάτων, συσχετίζεται με αυξημένη επαναρρόφηση νατρίου από το νεφρό. Στην αυλική επιφάνεια των σωληναριακών κυττάρων του άπω νεφρώνα, βρίσκεται ο Nedd4-2 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated), που είναι μια λιγκάση η οποία προσθέτει ουμπικουϊτίνη στο ENaC ώστε να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα για αποδόμηση. Η φωσφορυλίωση του Nedd4-2 από την κινάση SGK1, AKT και από άλλες δημιουργεί μοτίβο δέσμησης των πρωτεϊνών 14-3-3. Η δέσμηση του Nedd4-2 στις πρωτεΐνες 14-3-3 παρεμποδίζει τη δέσμηση του Nedd4-2 στο ENaC, οπότε παραμένει στην αυλική επιφάνεια, δεν αποδομείται στο πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη επαναρρόφηση νατρίου [130-134]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, οι Sugahara T και συνεργάτες, μελετώντας τη σχέση της calreticulin με το κανάλι Νατρίου διαπίστωσαν ότι, η υπερέκφραση της calreticulin, πιθανά μέσω της δράσης της σαν λεκτίνη, αυξάνει την έκφραση των υπομονάδων του ENaC στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου. Διαπίστωσαν, επίσης, ότι η calreticulin αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες του ENaC αυξάνοντας τη δραστηριότητά του [90]. Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε ότι η **υπερέκφραση της calreticulin** στα σωληναριακά κύτταρα συσχετίζεται με **υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών**, οι οποίες, στον άπω νεφρώνα, **συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια των σωληναριακών κυττάρων**. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, η μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική επιφάνεια των κυττάρων του άπω νεφρώνα έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσδεση του Nedd4-2 σε αυτές, οπότε **το ENaC παραμένει στην αυλική επιφάνεια**



συνεχίζοντας την επαναρρόφηση νατρίου. Από την άλλη, η αυξημένη calreticulin, πιθανά, **αυξάνει την έκφραση και τη δραστικότητα του ENaC**, συνεισφέροντας στην παθογένεια της αρτηριακής υπέρτασης που είναι ένα από τα κυριότερα κλινικά σημεία των περισσότερων νεφρικών νοσημάτων. Εάν οι 14-3-3 πρωτεΐνες δεσμεύονται στην calreticulin και όλες μαζί στον Nedd4-2 παραμένει αδιευκρίνιστο.

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης παρατηρείται **υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας** δηλαδή από τις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα. Παρά το ότι, η αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών παραμένει **στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα, η αύξηση αυτή είναι πολύ μικρότερη από αυτή των 2 ημερών** απολίνωσης του ουρητήρα. Το εύρημα αυτό διαπιστώθηκε τόσο με την ανοσοϊστοχημεία όσο και με τον ανοσοφθορισμό. Η Πρωτεωμική Ανάλυση των επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin έδειξε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin συνοδεύεται από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που παρεμβαίνουν στην απόπτωση. Καθοριστική για την κυτταρική μοίρα είναι η ισορροπία μεταξύ των σημάτων επιβίωσης και των σημάτων «θανάτου». Τα σήματα επιβίωσης του κυττάρου αυξάνουν το όριο πάνω από το οποίο τα αποπτωτικά σήματα θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, η μείωση των σημάτων επιβίωσης μειώνει το όριο ενεργοποίησης των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στα αποπτωτικά σήματα [104]. Όταν το κύτταρο δέχεται σήματα επιβίωσης, οι κινάσες που επάγονται από τα σήματα επιβίωσης, για παράδειγμα η κινάση AKT, ενεργοποιούνται. Η επακόλουθη φωσφορυλίωση των προαποπτωτικών μορίων (για παράδειγμα του μορίου BAD) θα δημιουργήσει μοτίβο δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Η δέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα προαποπτωτικά μόρια έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στο κυτταρόπλασμα και την απενεργοποίησή τους. Όταν, όμως, τα σήματα επιβίωσης μειωθούν ή όταν τα σήματα θανάτου αυξηθούν, τα μόρια που επάγονται από το στρες, για παράδειγμα η κινάση JNK (Jun-N-terminal kinase) ή το σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK ενεργοποιούνται. Η φωσφορυλίωση των 14-3-3 πρωτεϊνών από την κινάση JNK, οδηγεί σε απελευθέρωση των προαποπτωτικών μορίων, τα οποία κατευθύνονται στο μιτοχόνδριο όπου θα ξεκινήσουν τους μηχανισμούς απόπτωσης [104-106]. Στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, αρχικά, τα σωληναριακά κύτταρα εκτίθενται σε σήματα επιβίωσης και προσπαθούν να αμυνθούν από το συνεχές βλαπτικό ερέθισμα, που είναι η απολίνωση του ουρητήρα. Τα σήματα επιβίωσης αναστέλλουν την απόπτωση αφού, οι πρωτεΐνες 14-3-3 καθηλώνουν στο κυτταρόπλασμα τις φωσφορυλιωμένες προαποπτωτικές πρωτεΐνες. Όταν, όμως, τα αποπτωτικά σήματα είναι

συνεχή (στην περίπτωση αυτή το σήμα είναι η εμμένουσα απολίνωση του ουρητήρα), παρατηρείται φωσφορυλίωση των ίδιων των 14-3-3 πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών από αυτές, ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση. **Οι πρωτεΐνες 14-3-3, πιθανά, αντιπροσωπεύουν το κοινό σημείο αλληλεπίδρασης των σημάτων επιβίωσης και απόπτωσης. Η μείωση των 14-3-3 πρωτεϊνών, που παρατηρήθηκε στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα, θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος «θανάτου» και, επομένως, την απόπτωση.**

### **3. Υπερέκφραση όλων των mRNAs όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης.**

Για να μελετηθεί ξεχωριστά η έκφραση της κάθε ισομορφής των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης ακολούθησε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης. Το αποτέλεσμα απεικονίζεται στο γράφημα της εικόνας 50 και υποδεικνύει την ξεκάθαρη υπερέκφραση όλων των mRNAs όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, οι οποίες αυξάνονται στις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και μειώνονται στις 8 ημέρες, το mRNA των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών αυξάνεται προοδευτικά. Ο αριθμός των ζώων που μελετήθηκαν για την κάθε ομάδα είναι μικρός. Η επανάληψη του πειράματος με περισσότερα ζώα στην κάθε ομάδα είναι απαραίτητη ώστε, με ασφάλεια, να διαπιστωθούν ασφαλή αποτελέσματα. Βέβαια, η ρύθμιση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στους ιστούς είναι γνωστό ότι βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο επιγενετικών ρυθμίσεων, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και ρυθμίσεων από microRNAs [99]. Επομένως, η μείωση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα θα μπορούσε να αποδοθεί στη δράση microRNAs ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται ώστε να εξακριβωθεί η πιθανότητα αυτή.

### **4. Πρωτεΐνες 14-3-3 ως θεραπευτικός στόχος**

Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων [102]. Η διαταραχή των 14-3-3 πρωτεϊνών έχει, περιγραφεί και έχει μελετηθεί κυρίως στον καρκίνο όπου η υπερέκφρασή τους συσχετίζεται με κακή

έκβαση. Επίσης, αρκετά νευρολογικά νοσήματα συσχετίζονται με διαταραχή των 14-3-3 πρωτεϊνών και κάποια από αυτά είναι η εγκεφαλοπάθεια Creutzfeldt-Jakob, η Νόσος Parkinson και η Νόσος Alzheimer. Διαταραχή στις 14-3-3 πρωτεΐνες έχει διαπιστωθεί στη διαβητική μυοκαρδιοπάθεια, στη σκλήρυνση κατά πλάκας, στην ενδομητρίωση, στις αρθρίτιδες, στο γλαύκωμα, στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και σε άλλες [135, 136]. Το τρέχον δίκτυο νοσημάτων στο οποίο εμπλέκονται οι 14-3-3 πρωτεΐνες (“14-3-3 diseasome”) αποτελείται από 4 τάξεις νοσημάτων, την ογκογένεση, μεταβολικά νοσήματα, καρδιαγγειακά νοσήματα και νοσήματα νευροψυχιατρικά και, αναμένεται να επεκταθεί [97]. Η συσχέτιση των 14-3-3 πρωτεϊνών με την πληθώρα αυτών των νοσημάτων αλλά κυρίως με τον καρκίνο, τις θέτει ως υποψήφιους μοριακούς θεραπευτικούς στόχους για την καταπολέμηση των νοσημάτων αυτών. Ήδη, έχουν δημιουργηθεί ανταγωνιστές των 14-3-3 πρωτεϊνών, για παράδειγμα το R18 και το diprofein, οι οποίοι μιμούνται τη θέση δέσμευσης των πρωτεϊνικών στόχων στην αύλακα των πρωτεϊνών 14-3-3, επομένως ανταγωνίζονται τον πρωτεϊνικό στόχο στη δέσμευσή του στις 14-3-3 πρωτεΐνες. Έχουν, επίσης, δημιουργηθεί, μόρια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου, για παράδειγμα το BV02 και το FOBISIN. Έχουν συντεθεί και μόρια που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών 14-3-3 και πρωτεϊνικού στόχου, για παράδειγμα η Pyrrolidone και η Eribestatin, οι οποίες διατηρούν τις 14-3-3 πρωτεΐνες δεσμευμένες [136]. Εξαιτίας της υψηλής έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στα κύτταρα σε φυσιολογικές καταστάσεις, είναι απαραίτητο να αναγνωριστούν οι ακριβείς διαταραχές τους ώστε, οι ρυθμιστές τους να στοχεύουν μόνο αυτές. Το συγκεκριμένο θεραπευτικό παράθυρο θα μειώσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Η ικανότητα αναστρέψιμης ρύθμισης της αλληλεπίδρασης 14-3-3 πρωτεϊνών και πρωτεϊνικού στόχου θα βοηθήσει στην κατανόηση της βιολογίας των πρωτεϊνών αυτών και θα οδηγήσει στη δημιουργία πιθανών θεραπευτικών σκευασμάτων. Η κυτταρική ειδικότητα και ευαισθησία των ρυθμιστών των 14-3-3 πρωτεϊνών δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ρυθμίζουν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και σημαντικές κυτταρικές διεργασίες. Η στόχευση συγκεκριμένου μορίου σε ένα συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν οι 14-3-3 πρωτεΐνες θα ήταν η ιδανική. Περαιτέρω μελέτη και έρευνα απαιτείται ώστε να επιβεβαιωθούν οι πρωτεϊνικοί στόχοι των 14-3-3 πρωτεϊνών ως συμμετέχοντες στην παθογένεια των νοσημάτων [136].

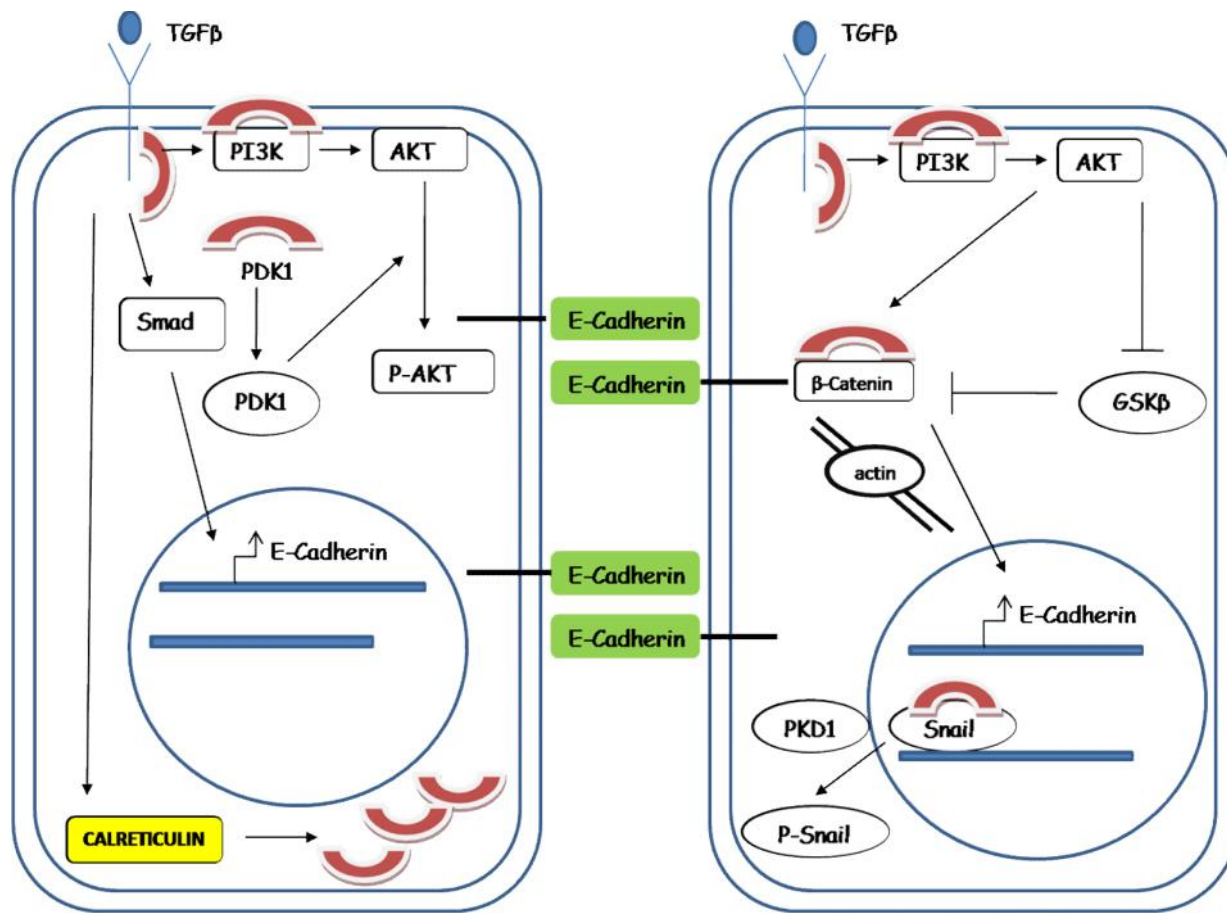
**Συμπερασματικά**, με την Πρωτεωμική Ανάλυση διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου συνοδεύεται από τροποποίηση των επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φλεγμονή και στην κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Παρατηρείται υπερέκφραση μεσεγχυματικού δείκτη και δεικτών

παραγωγής κολλαγόνου και, επίσης, παρατηρείται τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που συσχετίζονται με την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας. Παρατηρείται υπερέκφραση πρωτεϊνών του οξειδοαναγωγικού στρες. Τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο ΕΔ αλλά και στην αποδόμησή τους μέσω πρωτεασώματος. Τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συσχετίζονται με το mRNA και το εναλλακτικό του μάτισμα και, τροποποιούνται επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της calreticulin παρεμβαίνει στον κυτταρικό μεταβολισμό και, παράλληλα, συνοδεύεται από τροποποίηση επιπέδων πρωτεϊνών που παρεμβαίνουν στην απόπτωση. Αρκετές διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες συμμετέχουν σε 4 δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών υποδεικνύοντας ότι, η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνοδεύεται από αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διεργασίες και μονοπάτια που συσχετίζονται με τη νεφρική ίνωση. Βάσει της Πρωτεωμικής Ανάλυσης, βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης και εξαιτίας της κεντρικής τους θέσης στα σχηματισθέντα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιλέγησαν ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. Μέχρι σήμερα, ο ρόλος και η συμμετοχή τους στη νεφρική ίνωση δεν έχει μελετηθεί. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε το εύρημα της Πρωτεωμικής Ανάλυσης στις κυτταρικές σειρές σε επίπεδο mRNA και, στη συνέχεια, για να μελετηθεί η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών *in vivo*, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο νεφρικής ίνωσης σε τρωκτικά, όπου, στο νεφρικό ιστό έγινε ανοσοϊστοχημεία και ανοσοφθορισμός. Διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας. Η αύξηση αυτή φαίνεται πιο μεγάλη στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων και στο σπείραμα ενώ, στα άπω σωληνάρια χαρακτηριστική είναι η μετακίνησή τους από το κυτταρόπλασμα στην αυλική μεμβράνη των κυττάρων όπου εντοπίζονται τα κανάλια νατρίου και καλίου που συμμετέχουν στην ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών. Στη, συνέχεια, σε επίπεδο mRNA διαπιστώθηκε αύξηση όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών στον ινωτικό νεφρό.

**Οι προοπτικές για το μέλλον** είναι αρκετές. Επί επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων της υπερέκφρασης του mRNA στο νεφρικό ιστό κυρίως στις 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα, θα πρέπει να διερευνηθεί η πιθανότητα ρύθμισης της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών από miRNAs ή από επιγενετικές ρυθμίσεις. Η επιλογή μίας ισομορφής των 14-3-3 πρωτεϊνών προς περαιτέρω μελέτη θα ήταν ιδανική ώστε το υποθετικό μοντέλο συμμετοχής τους στη διεργασία της νεφρικής ίνωσης να μπορεί να επιβεβαιωθεί. Η επιβεβαίωση και η διευκρίνιση της συμμετοχής των 14-3-3 πρωτεϊνών στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης

στον άνθρωπο είναι απαραίτητη. Η μελέτη των ήδη δημιουργηθέντων φαρμακευτικών σκευασμάτων σε ζωικά μοντέλα σε διαφορετικά στάδια της νεφρικής ίνωσης είναι σημαντική ώστε, στη συνέχεια, να μπορέσουν να μελετηθούν σε επίπεδο ανθρώπου. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών αποτελούν μελλοντικούς στόχους διερεύνησης όπως αποτελεί και η διερεύνηση της πιθανότητας συμμετοχής των 14-3-3 πρωτεϊνών στην επαναρρόφηση νατρίου και μέσω της πιθανής συσχέτισής τους με την calreticulin.

**Με την παρούσα μελέτη, υποδεικνύουμε ότι, εξαιτίας της υπερέκφρασής τους παρουσία υψηλών επιπέδων calreticulin, οι 14-3-3 πρωτεΐνες συμμετέχουν στη διεργασία της νεφρικής ίνωσης και μάλιστα από τα αρχικά της στάδια. Προτείνουμε την περαιτέρω μελέτη τους ώστε να επιβεβαιωθεί και να διευκρινιστεί η συμμετοχή τους στη νεφρική ίνωση, η οποία, πιθανά, θα μπορούσε να προστεθεί στο τρέχον “14-3-3 disease”. Η ακριβής κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους, πιθανά, θα οδηγήσει στο μέλλον, στη φαρμακευτική στόχευσή τους ως πιθανούς μοριακούς μεσολαβητές της νεφρικής ίνωσης.**



Εικόνα 51:Υποθετικό μοντέλο συμμετοχής 14-3-3 πρωτεϊνών στη νεφρική ίνωση

## ΜΕΡΟΣ IV

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σάββας ΑΠ. Επίτομη ανατομική του ανθρώπου. Το ουροποιητικό σύστημα. Σελίδες 369-380. Δ' Έκδοση, Τόμος Α', Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1989.
2. Greenberg A et al. Primer on Kidney Diseases. 4<sup>th</sup> edition, National Kidney Foundation, Elsevier Saunders, 2005. Section I. Structure and function of the kidneys and their clinical assessment, Chapter 1: Overview of kidney function and structure, 2-19.
3. Kriz W, Elger M. Renal Anatomy. Comprehensive Clinical Nephrology, 3<sup>rd</sup> edition, Feehally J et al MOSBY ELSEVIER, 2007, Section I, Chapter 1, Renal Anatomy, 1-11
4. Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO. *Kidney Int* 2009; 76 (Suppl 113)
5. National Kidney Foundation, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, KDOQI, Clinical practice guidelines for chronic kidney disease, evaluation, classification and stratification.
6. El Kossi M, El Nahas M. Epidemiology and pathophysiology of Chronic Kidney Disease: Natural History, Risk Factors and Management. Comprehensive Clinical Nephrology 3<sup>rd</sup> Edition, Mosby Elsevier, Section 14, Chapter 68, 813-82
7. Jefferson JA, Schrier RW. Pathophysiology and etiology of acute renal failure. Comprehensive Clinical Nephrology 3<sup>rd</sup> Edition, Mosby Elsevier, Section 13, Chapter 63, 755-770
8. Conway B, Hughew J. Cellular orchestrators of renal fibrosis. *Q J Med* 2012; 105: 611-615
9. Cernaro V, Lacquantiti A et al. Fibrosis, regeneration and cancer: what is the link? *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 21-27
10. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001; 99: 308-319
11. Wunn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524-529
12. Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanism and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 289-300

13. Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 183-193
14. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 643
15. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 2011; 121: 468-474
16. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011; 92: 158
17. Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 247-262
18. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1819-1834
19. Carew RM, Wang B, Kantharides P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 103-116
20. Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis-evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 2011; 92: 143-150
21. Dussaule JC, Guerrot D et al. The role of cell plasticity in progression and reversal of renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011; 92: 151-157
22. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 212-222
23. Hewitson TD. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F1239
24. Galichon P, Hertig A. Epithelial to Mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? *Fibro Tis Repair* 2011; 4: 11
25. Li J, Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology* 2010; 15: 507-512
26. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1-12
27. Iwano M, Plieth D et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110: 341-350
28. Hertig A, Anglicheau D et al. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1584-1591



29. Zeisberg EM, Potenta SE et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2282-2287
30. Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol* 2009; 175: 1380-1388
31. Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Intern* 2008; 74: 860-866
32. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Intern* 2011; 80: 915-925
33. Baylis C, Brenner B. The physiological determinants of ultrafiltration. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1978; 80: 1-46
34. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Intern* 2009; 75: 1145-1152
35. Lopez-Hernandez FJ, Lopea-Novoa JM. Role of TGF- $\beta$  in chronic kidney disease: an integration of tubular, Glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 141-154
36. Lan HY. Smads as therapeutic targets for chronic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 2012; 31: 4-11
37. Docherty NG, O'Sullivan OE et al. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F4-F13
38. Masszi A, Fan L et al. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am J Pathol* 2004; 165: 1955-1967
39. Masszi A, Speight P et al. Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *J Cell Biol* 2010; 188: 383-399
40. Papageorgis P, Lambert AW et al. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res* 2010; 70: 968-978
41. Bowley E, O'Gorman DB et al.  $\beta$ -catenin signaling in fibroproliferative disease. *J Surg Res* 2007; 138: 141-150
42. Hwang I, Seo EY, Ha H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1653-1662

43. Lam AP, Gottardi CJ. B-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 562-567
44. Guo Y, Xiao Li et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiol Rev* 2012, PMID 22670697
45. Tian X, Liu Z et al. E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotech* 2011; 2011: 1-6
46. He W, Dai C et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 765-776
47. He W, Tan RJ et al. Matrix metalloproteinase-7 as a surrogate marker predicts renal Wnt/beta-catenin activity in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 294-304 (Abstract).
48. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 2009; 112: e1-e9
49. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney Intern* 2010; 77: 187-193
50. Ohse T, Inagi R et al. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Intern* 2006; 70: 1447-1455
51. Kimura K, Jin H et al. Dysfunction of the ER chaperone BiP accelerates the renal tubular injury. *Biochem Biophys Res Com* 2008; 366: 1048-1053
52. Liu G, Sun Y et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease. *Biochem Biophys Res Com* 2008; 370: 651-656
53. Lindenmeyer MT, Rastaldi MP et al. Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2225-2236
54. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Intern* 2005; 68: 925-937
55. Eddy AA, Lopez-Guisa JM et al. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 1233
56. Kypreou KP, Kavvadas P et al. Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics* 2008; 8: 2407-2419
57. Fountoulakis M. Proteomics: Current technologies and applications in neurological disorders and toxicology. *Amino Acids* 2001; 21: 363
58. Fountoulakis M. Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectr Rev* 2004; 23: 231-258
59. Borman. Proteomics; taking over where genomics leaves off. *Chem Engin News* 2000; 31: 31-37

60. Eisenberg D, Marcotte EM et al. Protein function in the post-genomic era. *Nature* 2000; 405: 823-826
61. Fountoulakis M, Takacs B. Design of protein purification pathways. Application to the proteome of *Haemophilus influenza* using heparin chromatography. *Prot Expr Purif* 1998; 14: 113-119
62. Chevallet M, Santoni V et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophor* 1998; 19: 1901-1909
63. Rabilloud T, Blisnick T et al. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium Falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* 1999; 20: 3603-3610
64. Gorg A, Drews O et al. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 2009; 30: S122-S132
65. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
66. Manno C, Strippoli GF et al. Predictors of bleeding complications in percutaneous ultrasound-guided renal biopsy. *Kidney Int* 2004; 66: 1570-1577
67. Klein J, Kavvadas P et al. Renal Fibrosis: Insight from proteomics in animal models and human disease. *Proteomics* 2011; 11 805-815
68. Prunotto M, Ghiggeri G et al. Renal fibrosis and proteomics: current knowledge and still key open questions for proteomic investigation. *J Proteomics* 2011; 74: 1855-1870
69. Tesch GH. Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: a pathophysiological perspective. *Nephrology* 2010; 15: 609-616
70. Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 1849
71. Sharma K, Lee SoHee et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of the urine proteome in human diabetic nephropathy. *Proteomics* 2005; 5: 2648
72. Banon-Maneus E, Diekmann F et al. Two-dimensional difference gel electrophoresis urinary proteomic profile in the search of nonimmune chronic allograft dysfunction biomarkers. *Transplantation* 2010; 89: 548
73. Malmstrom J, Lindberg H et al. Transforming Growth Factor-beta 1 specifically induces proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 466-477

74. Kang JH, Cho HJ et al. Comparative proteome analysis of TGF- $\beta$ 1-induced fibrosis processes in normal rat kidney interstitial fibroblast cells in response to ascofuranone. *Proteomics* 2009; 9: 4445-4456
75. Shakib K, Norman JT et al. Proteomics profiling of nuclear proteins for kidney fibroblasts suggests hypoxia, meiosis, and cancer may meet in the nucleus. *Proteomics* 2005; 5: 2819-2838
76. Chen YX, Li Y et al. Phosphoproteomic study of human tubular epithelial cell in response to transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Nephrol* 2010; 31: 24-35
77. So EJ, Kim HJ et al. Proteomic Analysis of human proximal tubular cells exposed to high glucose concentrations. *Proteomics-Clinical Applications* 2008; 2: 1118-1126
78. Ramachandra RSP, Wassell R et al. Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1182-1189
79. Li Z, Zhang H et al. Proteomic profile of primary isolated rat mesangial cells in high-glucose culture condition and decreased expression of PSMA6 in renal cortex of diabetic rats. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 635-648
80. Hwang JC, Chang LC et al. Effects of fungal statins on high-glucose-induced mouse mesangial cell hypocontractility may involve filamentous actin, t-complex polypeptide 1 subunit beta, and glucose regulated protein 78. *Transl Res* 2010; 156: 80-90
81. Barati MT, Merchant ML et al. Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end-product metabolism in glomeruli of db/db diabetic mice. *Am J Physiol* 2007; 293: F1157
82. Thongboonkerd V, Barati MT et al. Alterations in the renal elastin-elastase system in type 1 diabetic nephropathy identified by proteomic analysis. *JASN* 2004; 15: 650-662
83. Gong D, Chen X et al. Quantitative proteomic profiling identifies new renal targets of copper (II)-selective chelation in the reversal of diabetic nephropathy in rats. *Proteomics* 2009; 9: 4309-4320
84. Xu BJ, Shyr Y et al. Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms. *JASN* 2005; 16: 2967-2975
85. Shui HA, Huang TH et al. Urinary proteome and potential biomarkers associated with serial pathogenesis steps of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 176-185

86. Reuter S, Reiermann S et al. IFTA-related metabolic changes – proteome analysis of rat renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2492-2501
87. Giannakis ECS, Hewitson TD et al. Aberrant protein expression in plasma and kidney tissue during experimental obstructive nephropathy. *Proteomics Clin Applic* 2009; 3: 1211-1224
88. Charonis A, Luider T et al. Is the time ripe for kidney tissue proteomics? *Proteomics Clin Appl* 2011; 5: 215-221
89. Park MR, Wang EH et al. Establishment of a 2D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics* 2006; 6: 1066-1076
90. Wittke S, Haubitz M et al. Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 2479-2488
91. Quintana LF, Sole-Gonzalez A et al. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *JASN* 2009; 20: 428-435
92. Sethi S, Fervenza FC et al. Proliferative glomerulonephritis secondary to dysfunction of the alternative pathway of the complement. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1009-1017
93. Michalak M, Groenendyk J et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417: 651-666
94. Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *Intern J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 531-538
95. Gold LI, Eggleton P et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease
96. Hayashida Y, Urata Y et al. Calreticulin represses E-Cadherin gene expression in Madin-Darby Canine Kidney cells via Slug. *J BIOL Chem* 2006; 281: 32469-32484
97. Sugahara T, Koga T et al. Calreticulin positively regulates the expression and function of epithelial sodium channel. *Exp Cell Res* 2009; 315: 3294-3300
98. Fadel MP, Szewczenko-Pawlikowski M et al. Calreticulin affects  $\beta$ -Catenin-associated pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 27083-27089
99. Van Duyn Graham L, Sweetwyne MT et al. Intracellular calreticulin regulates multiple steps in fibrillar collagen expression, trafficking, and processing into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2010; 285: 7067-7078
100. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 663-672

101. Moore BW, Perez VJ. Specific acidic proteins of the nervous system. In: Carlson FD, editor. Physiological and biochemical aspects of nervous integration. Woods Hole, MA: Prentice-Hall, Inc., The Marine Biological Laboratory; 1967. p. 343-359
102. Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 673-680
103. Obsilova V, Silhan J et al. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* 2008; 57: S11-S21
104. Chen S, Synowsky S et al. The capture of phosphoproteins by 14-3-3 proteins mediates actions of insulin. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 429-436
105. HUGO Gene Nomenclature Committee Home Page, HGNC, <http://www.genenames.org/>
106. Kleppe R, Martinez A et al. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 713-719
107. Haan D, Ye G et al. Functional identification of a novel 14-3-3 epsilon splicing variant suggests dimerization is not necessary for 14-3-3 epsilon to inhibit UV-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 401-406
108. Freeman KA, Morrison DK. 14-3-3 Proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 681-687
109. Wilker E, Yaffe MB. 14-3-3 proteins-a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 633-642
110. Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling interaction points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 688-695
111. Sunayama J, Tsuruta F et al. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* 2005; 170: 295-304
112. Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 16-23
113. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1938-1945
114. Sluchanko NN, Gusev NB. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochem (Moscow)* 2010; 75: 1528-1546
115. Lopes LB, Furnish EJ et al. Cell permanent peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 590-598

116. McGonigle S, Beall MJ et al. Conserved role for 14-3-3  $\epsilon$  downstream of type I TGF $\beta$  receptors. *FEBS* 2001; 490: 65-69
117. Lu J, Guo H et al. 14-3-3 $\zeta$  cooperates with ErbB2 to promote progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 2009; 16: 195-207
118. Neal CL, Yao J, Yang W. 14-3-3 $\zeta$  overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* 2009; 69: 3425-3432
119. Neal CL, Yu D. 14-3-3 $\zeta$  as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 1343-1354
120. Neal CL, Xu J et al. Overexpression of 14-3-3 $\zeta$  in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene* 2012; 31: 897-906
121. Hong HY, Jeon WK et al. 14-3-3 sigma and 14-3-3 zeta plays an opposite role in cell growth inhibition mediated by transforming growth factor-beta 1. *Mol Cells* 2010; 29: 305-309
122. Seong HA, Jung H et al. 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 PDK1 negatively regulates transforming growth factor- $\beta$ -induced signaling in a kinase-dependent manner through physical interaction with Smad proteins. *J Biol Chem* 2007; 282: 12272-12289
123. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Regulation of kinase activity of 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *J Biol Chem* 2002; 277: 39360-39367
124. Seong HA, Jung H et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$  signaling and PDK1 kinase activity by physical interaction between PDK1 and serine-threonine kinase receptor-associated protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 42897-42908
125. Molina-Ortiz P, Villarejo A et al. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-Cadherin and EMT induction: modulation by Serine 4 phosphorylation. *Plos One* 2012; 7: e36132, 1-12
126. Hou Z, Peng H et al. 14-3-3 binding sites in the Snail protein are essential for Snail-mediated transcriptional repression and epithelial-mesenchymal differentiation. *Cancer Res* 2010; 70: 4385-4393
127. Sundram V, Chauhan SC et al. Curcumin attenuates  $\beta$ -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of Protein Kinase D1. *Plos One* 2012; 7: e35368, 1-13

128. Du C, Zhang C et al. Protein kinase D suppresses Epithelial-to-Mesenchymal transition through phosphorylation of Snail. *Cancer Res* 2010; 70: 7810-7819
129. Jaggi M, Rao PS et al. E-Cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C $\mu$  is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 483-492
130. Fu Y, Rubin CS. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO reports* 2011; 12: 785-796
131. Tian Q, Feetham MC et al. Proteomic analysis identifies that 14-3-3 $\zeta$  interacts with  $\beta$ -Catenin and facilitates its activation by AKT. *PNAS* 2004; 101: 15370-15375
132. Tian Q, He XC et al. Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 Kinase/Akt and 14-3-3 $\zeta$ . *Cell Cycle* 2005; 4: 215-216
133. Fang D, Hawke D et al. Phosphorylation of  $\beta$ -Catenin by AKT promotes  $\beta$ -Catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007; 282: 11221-11229
134. Li FQ, Mofunanya A et al. Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate  $\beta$ -Catenin subcellular distribution and signaling activity. *JCB* 2008; 22:1141-1154
135. Takemaru KI, Fischer V, Li FQ. Fine-tuning of nuclear  $\beta$ -Catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell Cycle* 2009; 6: 210-213
136. Faul C, Donnelly M et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature Med* 2008; 14: 931-8 (Abstract).
137. Liang X, Peters K et al. 14-3-3 isoforms are induced by aldosterone and participate in its regulation of epithelial sodium channels. *J Biol Chem* 2006; 281: 16323-16332
138. Liang X, Butterworth et al. An obligatory heterodimer of 14-3-3 $\beta$  and 14-3-3 $\epsilon$  is required for aldosterone regulation of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 2008; 283: 27418-27425
139. Wiemuth D, Lott JS et al. Interaction of serum- and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) with the WW-domains of Nedd4-2 is required for epithelial sodium channel regulation. *Plos One* 2010; 5: e12163, 1-9
140. Yang B, Kumar S. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ* 2010; 17: 68
141. Liang X, Butterworth MB et al. AS160 modulates aldosterone-stimulated epithelial sodium channel forward trafficking. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 2024-2033



142. Gurusamy N, Watanabe K et al. Inactivation of 14-3-3 protein exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis through enhanced expression of protein kinase C  $\beta$ 2 in experimental diabetes. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 957-962
143. Zhao J, Meyerkord CL et al. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Devel Biol* 2011; 22: 705-712