



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Κοσμητολογία – Δερματοφαρμακολογία»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ
ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗ**

ΧΑΡΑ ΑΛΜΠΑΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, ΙΒΕ,

ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Μελέτη της δράσης θυμοσινικών πεπτιδίων σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες για τη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών σχετικών με την επούλωση»

Χαρά Χρυσοστόμου Αλμπάνη

A.M.: 180105

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μιχαήλ Ράλλης: Αναπληρωτής Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συνεπιβλέποντες:

Δημήτριος Κλέτσας, Ερευνητής Α' - Διευθυντής ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Χαράλαμπος Πράτσηνης, Ερευνητής Β' - ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μιχαήλ Ράλλης: Αναπληρωτής Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Χαράλαμπος Πρατσίνης: Ερευνητής Β' ΙΒΕ ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ευάγγελος Καραλής: Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 02.10.2020

Περίληψη

Υπόβαθρο: Τη ρήξη της επιθηλιακής συνέχειας του δέρματος (τραύμα), ακολουθεί η επούλωση, μια εξελικτικά συντηρημένη, πολυκυτταρική, πολυμοριακή διαδικασία. Επιπλοκές στην επούλωση, επηρεάζουν εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας μια σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών μέσων. Οι θυμοσίνες, ενδογενή πεπτίδια με πλειοτροπική δράση, εγείρουν το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη θεραπεία ολοένα και περισσότερων ασθενειών. Ιδιαίτερως η θυμοσίνη β4 καθώς και το αμινοτελικό της πεπτίδιο, AcSDKP, έχουν μελετηθεί ως θεραπευτικοί παράγοντες στην επούλωση του δέρματος, όπως καταδεικνύουν προκλινικές μελέτες σε διάφορα μοντέλα επούλωσης πληγών. Όμως οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα, παραμένουν ένα ανεξερεύνητο πεδίο.

Αντικειμενικοί στόχοι: Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου διαπιστώθηκε πως η θυμοσίνη α1 (Tα1), η θυμοσίνη β4 (Tβ4) και το AcSDKP διεγείρουν το ρυθμό σύνθεσης κολλαγόνου σε φυσιολογικούς ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, σε κάποιες περιπτώσεις μέσω επίδρασης στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου Colα1. Με βάση αυτά τα ευρήματα, στην παρούσα εργασία διερευνώνται στα ίδια κύτταρα τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που ενδέχεται να επηρεάζονται από τα θυμοσινικά πεπτίδια σε διάφορα χρονικά σημεία και σε ποικίλες συγκεντρώσεις με τελικό στόχο τον εντοπισμό των μονοπατιών που εμπλέκονται στη διέγερση της σύνθεσης κολλαγόνου από τις θυμοσίνες. Επιπλέον, διερευνάται η πιθανή επίδραση της Tβ4 ή/και του AcSDKP στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες.

Μέθοδος: Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG 01523 καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία θυμοσινικών πεπτιδίων και/ή μετασχηματίζοντας αυξητικό παράγοντα (TGF-β) σε ποικιλία χρόνων και συγκεντρώσεων. Με ανάλυση Western ελέγχθηκαν i) η ενεργοποίηση των SMAD2 & SMAD3, ii) η σηματοδότηση των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK), iii) η ενεργοποίηση της κινάσης AKT του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3k-AKT και iv) τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης α-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων (α-SMA), που αποτελεί χαρακτηριστικό του μυοϊνοβλαστικού φαινότυπου.

Αποτελέσματα: Παρόλο που η ενδοκυτταρική οδός σηματοδότησης TGF-β/SMAD θεωρείται από τους κύριους ινωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, φαίνεται πως τα θυμοσινικά πεπτίδια δεν επιδρούν σε αυτή. Αντίθετα και τα τρία πεπτίδια φαίνονται να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της ERK, ενώ το AcSDKP και η Tβ4 ενεργοποιούν επιπλέον τις κινάσες JNK και AKT. Συνεργιστική δράση της Tα1 και Tβ4 με τον TGF-β φαίνεται να ασκείται επί της σηματοδότησης της JNK. Τέλος, η Tβ4 και το AcSDKP δεν φαίνεται να επάγουν τον μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο.

Θεματική Περιοχή: Επούλωση πληγών του δέρματος

Λέξεις-κλειδιά: Θυμοσίνη α1, Θυμοσίνη β4, AcSDKP, ινοβλάστες, σηματοδότηση, επούλωση, δέρμα

Abstract

Background: Skin rupture of epithelial continuity (trauma) is followed by healing, an evolutionarily conserved, multicellular, multimolecular process. Complications in healing affect millions of people around the world, representing a major challenge both for basic research and for clinicians. Thymosins, endogenous peptides with pleiotropic action, are being studied as potential therapeutics for a growing number of diseases. In particular, thymosin β 4 and its N-terminal peptide, AcSDKP, have long been recognized as potential healing agents, as demonstrated in preclinical studies in various wound healing models. However, molecular mechanisms that regulate the therapeutic outcome remain “terra incognita”.

Objectives: Previous research in our laboratory showed that thymosin α 1 (T α 1), thymosin β 4 (T β 4) and AcSDKP stimulate the rate of collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts, in certain cases through the transcriptional regulation of col α 1 gene. Based on these findings, the present work aims to study the intracellular signaling pathways activated by thymosins at various concentrations and time-points in the same cell type, the final goal being the identification of the pathways implicated in collagen synthesis stimulations by thymosins. Moreover, the possible effects of T β 4 and/or AcSDKP on the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts are being investigated.

Method: Human skin fibroblasts AG 01523 were cultured in the presence or absence of thymosins and / or transforming growth factor (TGF- β) in a dose and time-dependent manner. Using Western analysis we tested i) activation of SMAD2 & SMAD3, ii) mitogen-activated kinase (MAPK) signaling, iii) AKT kinase activation and iv) the expression levels of α -SMA protein, characteristic of the myofibroblastic phenotype.

Results: Although the intracellular TGF- β / SMAD signaling pathway is considered to be one of the major fibrotic mechanisms at the cellular level, thymosins failed to stimulate the phosphorylation of SMAD. In contrast, all three peptides appear to be involved in ERK activation, while AcSDKP and its precursor T β 4 further activate JNK and AKT. Synergistic action of TGF- β with T α 1 and T β 4 appears to be exerted on JNK signaling. Finally, T β 4 and AcSDKP do not appear to induce differentiation of fibroblasts into the myofibroblast phenotype.

Subject Area: Skin wound healing

Keywords: Thymosin α 1, Thymosin β 4, AcSDKP, fibroblasts, signalling, healing, skin, collagen

Στους αγαπημένους μου αδελφούς

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, νιώθω απέραντη ευγνωμοσύνη και την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνετέλεσαν σε αυτή, τόσο σε υλικό όσο και σε ηθικό επίπεδο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ Δημήτρη Κλέτσα, Διευθυντή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης (ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος) που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και μου παρείχε όλα τα απαραίτητα μέσα, υλικά και μεθοδολογικά, για την εκπόνηση της εργασίας. Πάνω από όλα, όμως, τον ευχαριστώ γιατί στο χρόνο που πέρασα στο εργαστήριο, μπόρεσα να εκτιμήσω την ευγένεια, τον επαγγελματισμό, την οργάνωση, την καθοδήγηση, την αγάπη για γνώση και έρευνα, αξίες που πάντα φροντίζε να μεταδίδει και στους φοιτητές του.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ τον Δρ Χαράλαμπο Πρατσίνη, Ερευνητή Β΄ του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, που μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διπλωματικής εργασίας. Χάρη στις επιστημονικές του ανησυχίες και τη σκληρή δουλειά που ο ίδιος έχει καταβάλει επί του θέματος, είχα την τύχη να εργαστώ σε μία μελέτη άκρως ενδιαφέρουσα και καινοτόμο. Νιώθω ευγνωμοσύνη για την καθοδήγηση που δέχτηκα από έναν τέτοιο επιστήμονα, μα πάνω από όλα σπουδαίο άνθρωπο με αναρίθμητες αρετές και πολυσχιδή ενδιαφέροντα. Μου έδωσε το χώρο και το χρόνο να ανακαλύψω το θέμα της εργασίας μου και ήταν συγκινητική η απλότητα και η αμεσότητα που επιδείκνυε για να συζητήσουμε κάθε πτυχή του θέματος της παρούσας μελέτης. Νιώθω πολύ τυχερή που τον συνάντησα σε αυτό το ταξίδι και που μπόρεσα να μάθω τόσο από όσα μου δίδαξε όσο και από το ήθος του στην επιστήμη και στη ζωή εν γένει.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Δρ Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α΄ του ΙΠΡΕΤΕΑ,ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Με χρόνια ενασχόληση και βαθιά γνώση για τις θυμοσίνες, ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει με όποιο μέσο μπορούσε για την ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων μας.

Ευχαριστώ ακόμη τους καθηγητές μου στο Πανεπιστήμιο Αθηνών. Ιδιαίτερως, ευχαριστώ τον καθηγητή Μιχαήλ Ράλλη, εμπνευστή και οραματιστή αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος. Μας αγκάλιασε όλους με πολλή αγάπη και σαν πατέρας θέλησε να μας περάσει όσες περισσότερες γνώσεις και ερεθίσματα μπορούσε. Είναι αξιοθαύμαστο με πόσο ήθος, σεβασμό και αγάπη αντιμετωπίζει την επιστήμη και τη διδακτική. Αγκάλιασε τα προτερήματα και τα ελαττώματα του καθενός μας και με την

ίδια ταπεινότητα στάθηκε δίπλα μας ως ίσος προς ίσο να μας παροτρύνει να προσπαθούμε και να γινόμαστε λίγο καλύτεροι από την προηγούμενη ημέρα.

Ακόμη, ευχαριστώ τον καθηγητή Ευάγγελο Καραλή, ενάν σπουδαίο νέο επιστήμονα, που με την ίδια ανιδιοτελή αγάπη φρόντισε να μας γνωρίσει, να μας διδάξει και να μας βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που αντιμετωπίσαμε. Με τίμησε να είναι μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής μου και τον ευχαριστώ ιδιαίτερος που από τη συνέντευξη ακόμα, αναγνώρισε τη θέληση μου να ενταχθώ στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα. Με τα λόγια του με συγκίνησε και με παρότρυνε να μην σταματώ να θέτω νέους στόχους και να προσπαθώ γι' αυτούς.

Τέλος, ευχαριστώ τον καθηγητή Αριστείδη Μουστάκα (Uppsala University, Sweden) για τη γενναιόδωρη παροχή προς το εργαστήριο των αντισωμάτων, SMAD2 και phosphoSMAD2.

Από το Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης ευχαριστώ ακόμη τη Δρ Ελένη Μαυρογονάτου, τη Δρ Μάντω Παπαδοπούλου και τον Δρ Αναστάσιο Κουρούμαλη για την αμέριστη βοήθεια και την πολύτιμη συμβολή τους για έναν οργανωμένο και λειτουργικό χώρο εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη τη Μαρίνα Κελεμένη, τη Χριστίνα Ντόγκα και τη Βάνια Μπέρν για την άψογη συνεργασία, και για τις ανησυχίες και χαρές που μοιραστήκαμε κατά την εκπόνηση των εργασιών μας.

Ευχαριστώ τους συμφοιτητές και πλέον καλούς μου φίλους Γιώργο Λαδόπουλο, Ελισάβετ Θεοδωράκη, Αλεξάνδρα Σαρίκα και Κατερίνα Κυρίτση. Μαζί ενώσαμε τα όνειρα, τους στόχους, τις αδυναμίες, τα γέλια και τις ανησυχίες μας και κάναμε αυτό το ταξίδι πιο όμορφο.

Κλείνοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους επί χρόνια φίλους μου Κωνσταντίνο Αδαμόπουλο, Στέλλα Σαπουντζή και Φραντζέσκα Παράσχου για την αμέριστη στήριξη, καθώς και στον Παναγιώτη, στην Εύα, στους αγαπημένους μου γονείς, Χρυσόστομο και Λευκοθέα, και αδελφούς, Τάκη και Βαγγέλη, που πάντα φροντίζουν να με κακομαθαίνουν και να μου προσφέρουν απλόχερα τη βοήθεια τους σε ό,τι κι αν χρειαστώ.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
Πρόλογος.....	15
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	16
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
1.1 Η δομή του δέρματος.....	20
1.2 Επούλωση πληγών στον ενήλικα	22
1.2.1 Αιμόσταση & Φλεγμονή	25
1.2.2 Πολλαπλασιασμός.....	28
1.2.3 Αναδιαμόρφωση	33
1.3 Επιπλοκές επούλωσης.....	35
1.4 Αναπτυξιακές οδοί σηματοδότησης στην επούλωση πληγών	39
1.5 Σύγχρονη θεραπευτική.....	41
1.5.1 Αυξητικοί παράγοντες	41
1.5.2 Κυτταρικές θεραπείες	44
1.6 Θυμοσινικά πεπτίδια.....	45
1.6.1 Θυμοσίνη α1.....	47
1.6.2 Θυμοσίνη β4.....	54
1.6.3 Θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP.....	61
1.7 Ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης	68
1.7.1 Μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων.....	68
1.7.2 Κυτταρική σηματοδότηση TGF-β.....	71
1.7.3 Ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες.....	77
1.7.4 Σηματοδοτική οδός PI3K-AKT	90
2. ΣΚΟΠΟΣ	95
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	98
3.1 Επιλογή Κυτταρικής Σειράς & Κυτταροκαλλιέργεια	98
3.2 Θυμοσινικά Πεπτίδια	102
3.3 Θετικοί Μάρτυρες - Επαγωγικοί Παράγοντες.....	103
3.4 Κυτταρική σηματοδότηση	104
3.4.1 Κυτταρική λύση απευθείας σε διάλυμα φόρτωσης.....	105
3.4.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE).....	106

3.4.3 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες	109
3.4.4 Ανοσοαποτύπωση	112
3.4.5 Επαναχρησιμοποίηση μεμβράνης (stripping)	115
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	117
4.1 Μελέτη της επίδρασης της θυμοσίνης α1 (Τα1) στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK /ERK / p38 MAPK / AKT συναρτήσει του χρόνου	118
4.2 Μελέτη της επίδρασης της θυμοσίνης β4 (Τβ4) στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK /ERK / p38 MAPK / AKT συναρτήσει του χρόνου	122
4.3 Μελέτη της επίδρασης του θυμοσινικού πεπτιδίου AcSDKP στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK /ERK / p38 MAPK/ AKT συναρτήσει του χρόνου	126
4.4 Μελέτη διερεύνησης της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης TGF/SMAD υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των θυμοσινικών πεπτιδίων	132
4.5 Μελέτη της ενεργοποίησης οδών σηματοδότησης MAPK & PI3K/AKT συναρτήσει αυξανόμενων συγκεντρώσεων Τβ4 και AcSDKP	134
4.6 Μελέτη ενεργοποίησης της μοριακής οδού σηματοδότησης TGF-b/SMAD από τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Τβ4 και AcSDKP: i) μεμονωμένων ii) συνδυαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β1.....	138
4.7 Μελέτη εκτίμησης της φωσφορυλίωσης των SMAD3 & JNK υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και AcSDKP συνδυαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β1, σε δύο χρόνους (15min & 60min)	140
4.8 Μελέτη ενεργοποίησης οδών σηματοδότησης TGF-b/SMAD & MAPK ύστερα από συγχρόνηση θυμοσίνης β4 και επαγωγικού παράγοντα TGF-β1 σε τρία χρονικά σημεία	142
4.9 Ρύθμιση μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου	144
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	191

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Εγκάρσια διατομή δέρματος	22
Εικόνα 2: Στάδια επούλωσης και χαρακτηριστικά μόρια επικοινωνίας μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων	24
Εικόνα 3: Αλληλεπίδραση κυτταρικών και χυμικών παραγόντων στην επούλωση πληγών.	26
Εικόνα 4: Φαινότυποι μακροφάγων αναλόγως του ερεθίσματος	28
Εικόνα 5: Διαφοροποίηση ινοβλάστη σε μυοϊνοβλάστη μέσω σηματοδότησης TGF-β και PDGF	30
Εικόνα 6: Φάσμα σχηματισμού ουλής (κλινική εικόνα)	36
Εικόνα 7: Η επούλωση των πληγών σε παθολογικές ουλές	37
Εικόνα 8: Αναπτυξιακές οδοί σηματοδότησης στη συμπεριφορά κερατινοκυττάρων στο επιδερμικό κλείσιμο και στη συμπεριφορά των ινοβλαστών και στην εναπόθεση μήτρας στη δερματική ανασύσταση	40
Εικόνα 9: Κατανομή των περισσότερων όξινων θυμοσινικών πεπτιδίων του TF5	46
Εικόνα 10: Αμινοξική αλληλουχία του N-ακετυλιωμένου θυμοσινικού πεπτιδίου α1.	47
Εικόνα 11: Ανοσοτροποποιητική και ανοσοτροποποιητική δράση της θυμοσίνης α1	50
Εικόνα 12: Επίδραση θυμοσίνης α1 στην επούλωση δερματικών πληγών αρουραίων	53
Εικόνα 13: Μοριακή δομή της θυμοσίνης β4	55
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης και αποδόμησης του Ac-SDKP	62
Εικόνα 15: Επαγόμενη από τον TGF-β φυσιολογική ρύθμιση της κολλαγονοσύνθεσης (α) και αναστολή του AcSDKP (b) που οδηγεί σε ίνωση	63
Εικόνα 16: Κολλαγόνο ύστερα από ανοσοφθορισμό σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες με και χωρίς επώαση με 1nM AcSDKP	67
Εικόνα 17: Φυλογενετικό δένδρο κινασών	70
Εικόνα 18: Έκκριση TGF-β και ενεργοποίηση	72
Εικόνα 19: Οικογένεια SMAD πρωτεϊνών	74
Εικόνα 20: Μηχανισμός ενεργοποίησης TGF-β και ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης	76
Εικόνα 21: Υπεροικογένεια κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (MAPK)	79
Εικόνα 22: RAS/RAF/MEK/ERK σηματοδοτικό μονοπάτι	82
Εικόνα 23: Σηματοδοτική οδός p38-MAPK σε οστεοβλάστη	84
Εικόνα 24: Συνολική οργάνωση των οδών σηματοδότησης JNK	87
Εικόνα 25: Υποστρώματα και λειτουργίες της ενδοκυτταρικής οδού σηματοδότησης PI3K/AKT	92
Εικόνα 26: Καλλιέργεια ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών με και χωρίς χρώση	100
Εικόνα 27: Φωσφο-σηματοδοτικά μονοπάτια (Ardito et al., 2017)	105
Εικόνα 28: SDS-PAGE	107
Εικόνα 29: Διάταξη ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE	109
Εικόνα 30: Διάταξη ηλεκτρομεταφοράς σε μεμβράνη	111
Εικόνα 31: Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	112
Εικόνα 32: Κινητική έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών υπό την επίδραση της θυμοσίνης α1	119
Εικόνα 33: Επίδραση της θυμοσίνης α1 στην κινητική της έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK	119

Εικόνα 34: Επίδραση της θυμοσίνης α1 στην κινητική της έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK	120
Εικόνα 35: Επίδραση της θυμοσίνης α1 στην κινητική της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης κινάσης p38	121
Εικόνα 36: Επίδραση της θυμοσίνης α1 στην κινητική της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης κινάσης AKT	121
Εικόνα 37: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών με ή χωρίς Τβ4 σε επτά χρονικά σημεία	122
Εικόνα 38: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK με ή χωρίς Τβ4 σε επτά χρονικά σημεία	123
Εικόνα 39: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK με ή χωρίς θυμοσίνη β4 για επτά χρονικά σημεία	124
Εικόνα 40: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης p38 με ή χωρίς Τβ4, σε επτά χρονικά σημεία	125
Εικόνα 41: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης Akt με ή χωρίς θυμοσίνη β4 για επτά χρονικά σημεία	125
Εικόνα 42: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών με ή χωρίς AcSDKP σε επτά χρονικά σημεία	126
Εικόνα 43: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK με ή χωρίς το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP σε επτά χρονικά σημεία	127
Εικόνα 44: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK με ή χωρίς AcSDKP (10nM) για επτά χρονικά σημεία	128
Εικόνα 45: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης p38 με ή χωρίς AcSDKP σε επτά χρονικά σημεία	128
Εικόνα 46: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης Akt με ή χωρίς το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP για επτά χρονικά σημεία	129
Εικόνα 47: Συνοπτική παρουσίαση πειραμάτων κινητικής συναρτήσεως του χρόνου για τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Τβ4 και AcSDKP σε συγκέντρωση 10nM σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523.	130
Εικόνα 48: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των θυμοσινικών πεπτιδίων για χρονικό διάστημα 0.5h	132
Εικόνα 49: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων MAPK (JNK, ERK, p38) και κινάσης Akt ύστερα από επώαση σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις Τβ4 (1, 5, 10, 20, 100, 500 nM) και τρεις συγκεντρώσεις AcSDKP (10, 100, 100 nM)	135
Εικόνα 50: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών ύστερα από επώαση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Τβ4 & AcSDKP, μόνα τους ή συνδυαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β	139
Εικόνα 51: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 & AcSDKP μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β	140
Εικόνα 52: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων JNK σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από επώαση τους με τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Τβ4 & AcSDKP σε συνδυασμό με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β.	141
Εικόνα 53: Επίπεδα φωσφορυλιωμένης SMAD3 σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τβ4(10nM) μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml).	142

Εικόνα 54: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων MAPK σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων Tβ4 μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β.	143
Εικόνα 55: Επίπεδα έκφρασης α-SMA στις 72h ύστερα από επώαση με Tβ4 και AcSDKP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις.	144
Εικόνα 56: Διάγραμμα ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης στο υπερκείμενο καλλιεργειών ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών AG01523 υπό την επίδραση θυμοσινικών πεπτιδίων ή/και TGF-β με τη μέθοδο της ελεύθερης πρωτεασών κολλαγενάσης	189
Εικόνα 57: Μελέτη της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Tβ4 & AcSDKP σε συγκέντρωση 1nM & 10nM στη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Col1α1 μέσω qRT-PCR. Παραρηρείται η διεγερτική δράση της Tβ4 και του Ac-SDKP	190
Εικόνα 58: Μελέτη της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Tβ4 & AcSDKP σε συγκέντρωση στη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Col3α1 μέσω qRT-PCR. Ανασταλτική δράση της Τα1 & του Ac-SDKP (10nM). Διέγερση σύνθεσης μεταγράφου από την Tβ4.	190
Εικόνα 59: Παρουσίαση στυπώματος Western επανάληψης πειράματος με διαφορετικό χειρισμό κατά την προσθήκη της θυμοσίνης β4	191

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας των κύριων διεργασιών της φυσιολογικής επούλωσης στον άνθρωπο.	34
Πίνακας 2: Μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη θεραπευτικών μέσων για την επούλωση πληγών.....	43
Πίνακας 3: Προκλινικές μελέτες για τη δράση της θυμοσίνης β4 στην επούλωση ελκών του δέρματος.	56
Πίνακας 4: Κλινικές μελέτες της θυμοσίνης β4 στην επούλωση ελκών του δέρματος.	58
Πίνακας 5: Δράση του AcSDKP σε διάφορες ασθένειες και πειραματικά μοντέλα.	64
Πίνακας 6: Διαχωριστική ικανότητα πηκτής διαχωρισμού βάσει της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα.....	108
Πίνακας 7: Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης και διαχωρισμού.	108
Πίνακας 8: Πρωτογενή και δευτερογενή αντι σώματα	114

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» υπό την επίβλεψη του Δρ Δημήτριου Κλέτσα, Διευθυντή Ερευνών (Α' βαθμίδα), κατά τη χρονική περίοδο 2019-2020 στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών «Κοσμητολογία & Δερματοφαρμακολογία». Συνεπιβλέπων και εμπνευστής του θέματος ήταν ο Δρ Χαράλαμπος Πρατσίνης, Κύριος Ερευνητής (Β' βαθμίδα), ενώ σημαντική ήταν και η συμβολή της Δρ Ευαγγελίας Λιβανίου, Ερευνήτριας Α' (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος). Η παρούσα μελέτη συνιστά τη συνέχεια προηγούμενων ερευνών του εργαστηρίου και διερευνά ερωτήματα που προέκυψαν χάρις σε αυτές. Δυστυχώς λόγω της πανδημίας και των περιοριστικών μέτρων που προέκυψαν, ο χρόνος στο εργαστήριο μειώθηκε και ο αρχικός στόχος της συσχέτισης των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που διεγείρονται από τα θυμοσινικά πεπτίδια με την κολλαγονοσύνθεση, μέσω χρήσης ειδικών φαρμακολογικών αναστολέων, δεν μπόρεσε να επιτευχθεί.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ACE: angiotensin converting enzyme, μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης

AHQ: περιοχή πλούσια σε Ala- His- Glu

ALK: Activin receptor-like kinase, κινάση τύπου υποδοχέα ακτιβίνης

APS: ammonium persulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο

ATF2: activating transcription factor

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BMP: bone morphogenetic protein, μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών

BRMs: Biological Response Modifiers, τροποποιητές βιολογικής απόκρισης

BSA: bovine serum albumin, αλβουμίνη βόειου ορού

CCL-5: chemokine (C-C motif) ligand 5, προσδέτης CC χημειοκινών - 5

Co-SMADs common mediator SMADs, σε αυτές που συνεργάζονται με τις ενεργοποιημένες από τους υποδοχείς SMAD

CPDs: cumulative population doublings, διπλασιασμοί του κυτταρικού πληθυσμού

DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium, ελάχιστο στοιχειώδες θρεπτικό υλικό κατά Dulbecco

DUSP: dual specificity phosphatase, φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης

ECL: Enhanced Chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

ECM: extracellular matrix, εξωκυττάρια μήτρα

ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο

EGF: epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

EPDC : Epicardium Derived Cell, κύτταρα προερχόμενα από το επικάρδιο

ERK: extracellular signal-regulated kinase, ρυμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα πρωτεϊνική κινάση

FBS: fetal bovine serum, βόειος εμβρυϊκός ορός

FDA: Food and Drug Administration, Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων

FGF: fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών

FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 1

FSP1: Fibroblast-specific protein 1, πρωτεΐνη-1, ειδική για ινοβλάστες

GAGs: glycosaminoglycans, γλυκοζαμινογλυκάνες

GPCR: G-protein coupled receptor, υποδοχέας, συζευγμένος με G πρωτεΐνη

GSK3: Glycogen synthase kinase 3, κινάση συνθάσης γλυκογόνου-3

HAE-A549: human alveolar epithelial cell line-A549

HIF-1: Hypoxia induced factor -1, επαγόμενος από υποξία παράγοντας -1

HRP: Horseradish peroxidase, Υπεροξειδάση χρένου (*Armoracia rusticana*)

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης ομφάλιας φλέβας

IL: interleukin, ιντερλευκίνη

IFN-γ: interferon gamma, ιντερφερόνη-γ

I-SMADs: inhibitory SMADs, ανασταλτικές SMAD

JNK: c-Jun N-terminal kinase, κινάση του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun

KD: Kinase domain, τομέας κινάσης

KGF: keratinocyte growth factor, αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων

LAP: latency associated peptide, πεπτίδιο που σχετίζεται με την ωρίμανση

LLC: large latent complex, μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο

LOXL1: lysyl oxidase like1, οξειδάση της λυσίνης 1

LTBP: Latent TGF-beta binding protein, λανθάνουσα πρωτεΐνη δέσμησης TGF-β

MAPK: mitogen activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα

MCP-5: monocyte chemoattractant protein-5, χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκύτταρων 5

MEF2: myocyte enhancer factor, μεταγραφικός παράγοντας μυοκυττάρων 2

MEK: MAPK kinase, κινάση MAPK

MH1: MAD homology 1

MH2: MAD homology 2

MHC: Major histocompatibility complex, σύμπλεγμα μείζονος ιστοσυμβατότητας

MKKK: MAPK kinase kinase, κινάση της κινάσης της MAPK

MMP: matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεάση της μήτρας

NFκ-B: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFM: non fat milk, άπαχο γάλα

NLK: Nemo-like kinase, κινάση τύπου Nemo

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor type 1, αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου

PAK: p-21 activated kinase, κινάση ενεργοποιούμενη από p-21

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen, πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων

PDGF: platelet derived growth factor, αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας

P-MAP4K4: mitogen activated protein kinase kinase kinase 4

PTM: post-translational modification, μετα-μεταφραστική τροποποίηση

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinases, κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

PI3KCA/AKT: phosphatidylinositol-3 kinase Calcium/serine-threonine protein kinase

POP: prolyl-oligopeptidase, προλυλ-ολιγοπεπτιδάση

RANTES: Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted;

RAS: renin angiotensin system, σύστημα ρενίνης - αγγειοτενσίνης

Ras-GTPase: μονομερής πρωτεΐνη με δραστικότητα GTPασης

Rho: μονομερής πρωτεΐνη με δραστικότητα GTPασης

ROS: reactive oxygen species, ενεργές ρίζες οξυγόνου

R-SMADs: Receptor regulated SMADs, ρυθμιζόμενες μέσω υποδοχέα SMAD

RTK: receptor tyrosine kinase, υποδοχέας κινάσης τυροσίνης

SAPK: stress-activated kinases, κινάση ενεργοποιούμενη από στρες

SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome, βαρύ οξύ αναπνευστικό σύνδρομο

SDS: sodium dodecyl sulphate, δωδεκυλοθειικό νάτριο

SOD: superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση

Ser: Serine, σερίνη (S)

SMAD: small worm-mothers against decapentaplegic

Tα1: thymosin alpha 1, θυμοσίνη α1

TAD: transactivation domain, περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης

Tβ4: thymosin beta 4, θυμοσίνη β4

TβR: TGF-β receptors, υποδοχείς TGF-β

TBS-T: Tris- buffered saline /Tween-20, αλατούχο διάλυμα της βάσης Tris με Tween-20

TEMED: N, N, N', N' tetramethylethylenediamine, N, N, N', N' –τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη

TGF-β: transforming growth factor beta, μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases, ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεασών

Tyr: Tyrosine, τυροσίνη, (Y)

TNF-α: tumor necrosis factor alpha, παράγοντας νέκρωσης όγκων α

VEGF: vascular endothelial growth factor, αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου

VIP: vasoactive intestinal peptide, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η δομή του δέρματος

Για την καλύτερη κατανόηση της επούλωσης των ελκών του δέρματος, είναι απαραίτητη μια βασική κατανόηση της δομής (Εικόνα 1) και της λειτουργίας του. Το δέρμα δρα ως φραγμός ανάμεσα στα εσωτερικά όργανα και το εξωτερικό περιβάλλον για την προστασία από τραυματισμούς, μικρόβια, απώλεια υγρών, ενώ έχει ανοσο-νευροενδοκρινικές λειτουργίες που συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος (Eming et al. 2009). Χωρίζεται σε διάφορα βασικά στρώματα που μπορούν στη συνέχεια να υποδιαιρεθούν περαιτέρω με βάση την κυτταρική διαφοροποίηση και τους κυτταρικούς τύπους.

Το πιο επιφανειακό στρώμα του δέρματος είναι η επιδερμίδα. Η επιδερμίδα σχηματίζεται από ένα λεπτό στρώμα εμβρυϊκού εξωδέρματος. Μετά τη νευρογένεση στο έμβρυο, το μονοκύτταρο στρώμα του απλού εξωδέρματος εκτείνεται για να σχηματιστεί ένα πλακώδες επιθήλιο, γνωστό ως περίδερμα. Το επιθήλιο τελικά διαφοροποιείται στα εξής στρώματα: βασική στιβάδα (stratum basale), ακανθωτή στιβάδα (stratum spinosum), κοκκιώδη στιβάδα (stratum granulosum), διαυγή στιβάδα (stratum lucidum) και τελικά κεράτινη στιβάδα (stratum corneum). Η επιδερμίδα περιέχει ένα στρώμα κυττάρων, γνωστό ως βασικά κύτταρα που χρησιμεύουν ως δεξαμενή βλαστικών κυττάρων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Κάθε στρώμα χαρακτηρίζεται από το επίπεδο ωρίμανσης των κερατινοκυττάρων.

Τα πλούσια σε πρωτεΐνη κερατινοκύτταρα περιέχουν κυρίως κερατίνη και κερατοϋαλίνη. Τα κερατινοκύτταρα ξεκινούν τον κύκλο της ζωής τους στη βασική μεμβράνη και σταδιακά μεταναστεύουν προς τα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας, όπου αποβάλλουν τους πυρήνες τους για να σχηματίσουν ένα στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο. Εκτός όμως των κερατινοκυττάρων, η επιδερμίδα περιέχει μελανοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα Langerhans και άλλα ανοσοκύτταρα, αισθητήριους άξονες, και την επιδερμική-δερμική βασική μεμβράνη (Pasparakis, Haase, and Nestle 2014).

Κάτω από την επιδερμίδα βρίσκεται η δερμίδα ή αλλιώς χόριο, ένα παχύ στρώμα πλούσιο σε πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix, ECM). Στο χόριο εντοπίζονται οι βάσεις των δερματικών εξαρτημάτων (τριχοθυλάκια, ιδρωτοποιοί

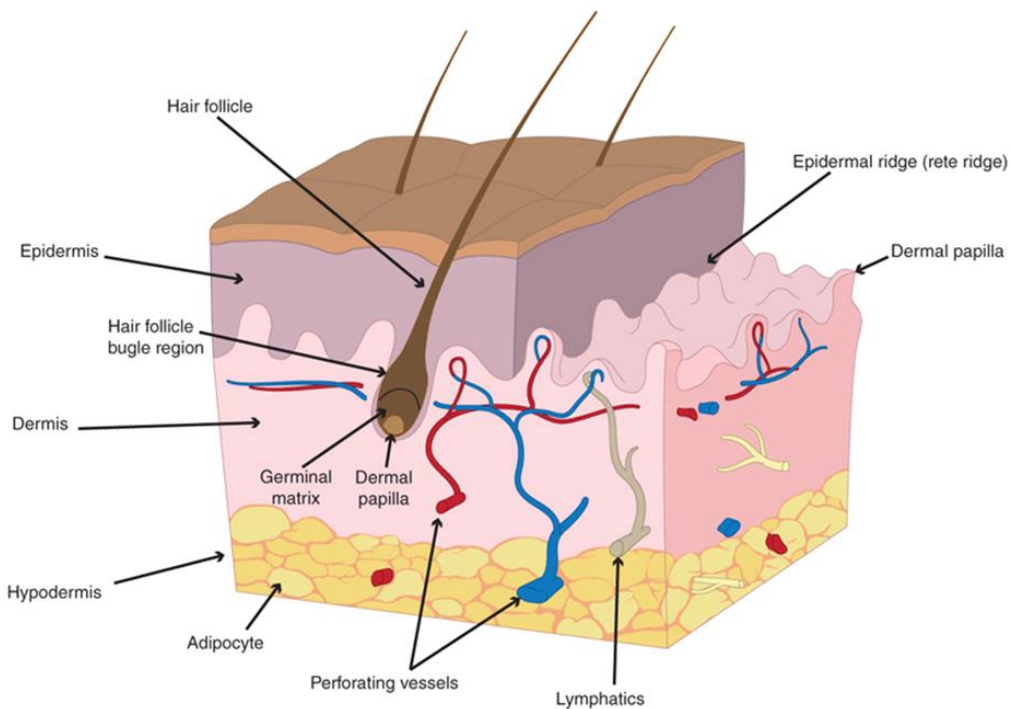
αδένες), νεύρα, μύες, δερματικοί ινοβλάστες, σιτευτικά κύτταρα, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καθώς και μόνιμα και παροδικά ανοσοκύτταρα (Kupper and Fuhlbrigge 2004). Το ραχιαίο, το κοιλιακό και το κρανιακό χόριο έχουν διαφορετική εμβρυϊκή προέλευση, αν και είναι όλα μεσοδερμικά.

Ενώ τα στρώματα της επιδερμίδας είναι πλούσια σε κύτταρα, τα στρώματα της δερμίδας αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο και ελαστίνη σε ένα πήκτωμα γλυκοζαμινογλυκανών. Η δερμίδα αποτελείται από χαλαρά και πυκνά ακανόνιστα στρώματα συνδετικού ιστού. Το χαλαρό στρώμα συνδετικού ιστού βρίσκεται ακριβώς κάτω από τα στρώματα του επιθηλίου και αποτελείται από λεπτά και αραιά κύτταρα με υψηλή συγκέντρωση θεμέλιας ουσίας, καθώς και από διαφορετικά φλεγμονώδη κύτταρα και ανοσοκύτταρα. Το πυκνό ακανόνιστο συνδετικό στρώμα (δικτυωτό στρώμα δερμίδας) χαρακτηρίζεται από χαμηλές κυτταρικές πυκνότητες (συνήθως ινοβλάστες) και υψηλή συγκέντρωση κολλαγόνου. Το σύμπλοκο εξωκυττάριας μήτρας παρέχει υποστήριξη σε ενδοκυτταρικές συνδέσεις, κυτταρική κίνηση, προσδίδει εφελκυστική αντοχή στο δέρμα και ρυθμίζει τις λειτουργίες των κυτοκινών και των αυξητικών παραγόντων.

Κάτω από το χόριο εντοπίζεται το υπόδερμα. Το υπόδερμα είναι πλούσιο σε λίπος, αισθητήρια νεύρα και γλυκοζαμινογλυκάνες και συνδέει το δερματικό ιστό με τα εσωτερικά όργανα. Αυτό το στρώμα παρέχει μόνωση, προστατευτική επένδυση και δρα ως αποθήκη ενέργειας. Πρόκειται για ένα στρώμα υποδόριου λίπους που περιέχει τα διάτρητα αιμοφόρα αγγεία του δέρματος. Τα αιμοφόρα αγγεία στο δέρμα εκβάλλουν από το βαθύτερο μυϊκό ιστό και διαπερνούν στη συνέχεια το χόριο και την επιδερμίδα. Στο χόριο και την επιδερμίδα, τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζουν ένα δίκτυο τριχοειδών για να παρέχουν στα κύτταρα του δέρματος το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά.

Η ομοιοστασία του δέρματος στηρίζεται σε ένα πυκνό δίκτυο αισθητήριων και αυτόνομων νευρικών ινών που σχηματίζουν στενές συνδέσεις με κερατινοκύτταρα και μεταδίδουν αισθήσεις πόνου, θερμοκρασίας, πίεσης, δόνησης και κνησμού (Ebenezer and Polydefkis 2014). Η κυκλοφορία του δέρματος επιτελείται από παράλληλη αρτηριακή-φλεβική, θερμορυθμιστική κυκλοφορία που ελέγχεται από αδρενεργικά συμπαθητικά αγγειοσυσταλτικά και αγγειοδιασταλτικά νεύρα που δημιουργούν ένα υποεπιδερμικό τριχοειδές δίκτυο (Chao and Cheing 2009). Τα λεμφικά αγγεία του δέρματος αποτελούνται από λεμφικά τριχοειδή που διατρέχουν οριζόντια την επιδερμίδα, ακολουθούμενα από αγγεία προ-συλλεκτών που βρίσκονται βαθύτερα στο

χόριο και αγγεία συλλογής λέμφων στο υποδόριο στρώμα λίπους. Τα λεμφικά αγγεία συνδέονται με τους τοπικούς λεμφαδένες αποστράγγισης του δέρματος (Thomas, Rohner, and Edwards 2016).



Εικόνα 1: Εγκάρσια διατομή δέρματος (Moore et al. 2019).

1.2 Επούλωση πληγών στον ενήλικα

Στο δέρμα, προσβολές με τη μορφή τραυμάτων, χειρουργικών τομών, εγκαυμάτων, διαδικασιών μείζονος νόσου ή λοιμώξεων περιλαμβάνουν ρήξη της επιθηλιακής συνέχειας του δέρματος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της δομής και της λειτουργίας των υποκείμενων ιστών. Όταν η επούλωση του δέρματος είναι «φυσιολογική», έχει ως αποτέλεσμα μια ινωτική και οργανωμένη ουλή χωρίς αισθητήρια, τρίχες και αδένες. Εναλλακτικά, η επούλωση μπορεί να είναι δυσλειτουργική, οδηγώντας σε σοβαρότερες επιπλοκές της επούλωσης, όπως είναι τα άτονα έλκη και οι υπερτροφικές ουλές.

Μετά τον τραυματισμό, η ακεραιότητα του δέρματος πρέπει να αποκατασταθεί αμέσως, προκειμένου να προληφθεί η μόλυνση και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια υγρών. Η φυσιολογική επούλωση του δέρματος συμβαίνει μέσω πολλαπλών αλληλεπιδράσεων

μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος, των κερατινοκυττάρων και των άλλων δερματικών κυττάρων. Πρόκειται για μια εξελικτικά συντηρημένη, πολυκυτταρική, πολυμοριακή διαδικασία που περιλαμβάνει τη συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ σύνθετων δικτύων σηματοδότησης που οδηγούν στην επιδιόρθωση τραυματισμένων ιστών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ουλών (τουλάχιστον στον ενήλικο οργανισμό). Πολλοί τύποι κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοκυττάρων (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα), των ενδοθηλιακών κύτταρων, των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών, υφίστανται σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και το φαινότυπο, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων, διαφοροποίηση και μετανάστευση (Aarabi 2007; Singer and Clark 1999).

Σημαντικά μοριακά μονοπάτια περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης, πρωτεΐνες, κυτοκίνες, χημειοκίνες καθώς και πληθώρα αυξητικών παραγόντων. Αυτά τα σήματα παράγονται από, και επηρεάζουν τη συμπεριφορά κυττάρων όπως οι ινοβλάστες, τα κερατινοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά και τα φλεγμονώδη κύτταρα με αποτέλεσμα την κυτταρική, φαινοτυπική και λειτουργική πλαστικότητα, καθώς και τον έλεγχο της σύνθεσης και της αναδιαμόρφωσης δομικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων του κολλαγόνου και της φμπρονεκτίνης (Gurtner et al. 2008).

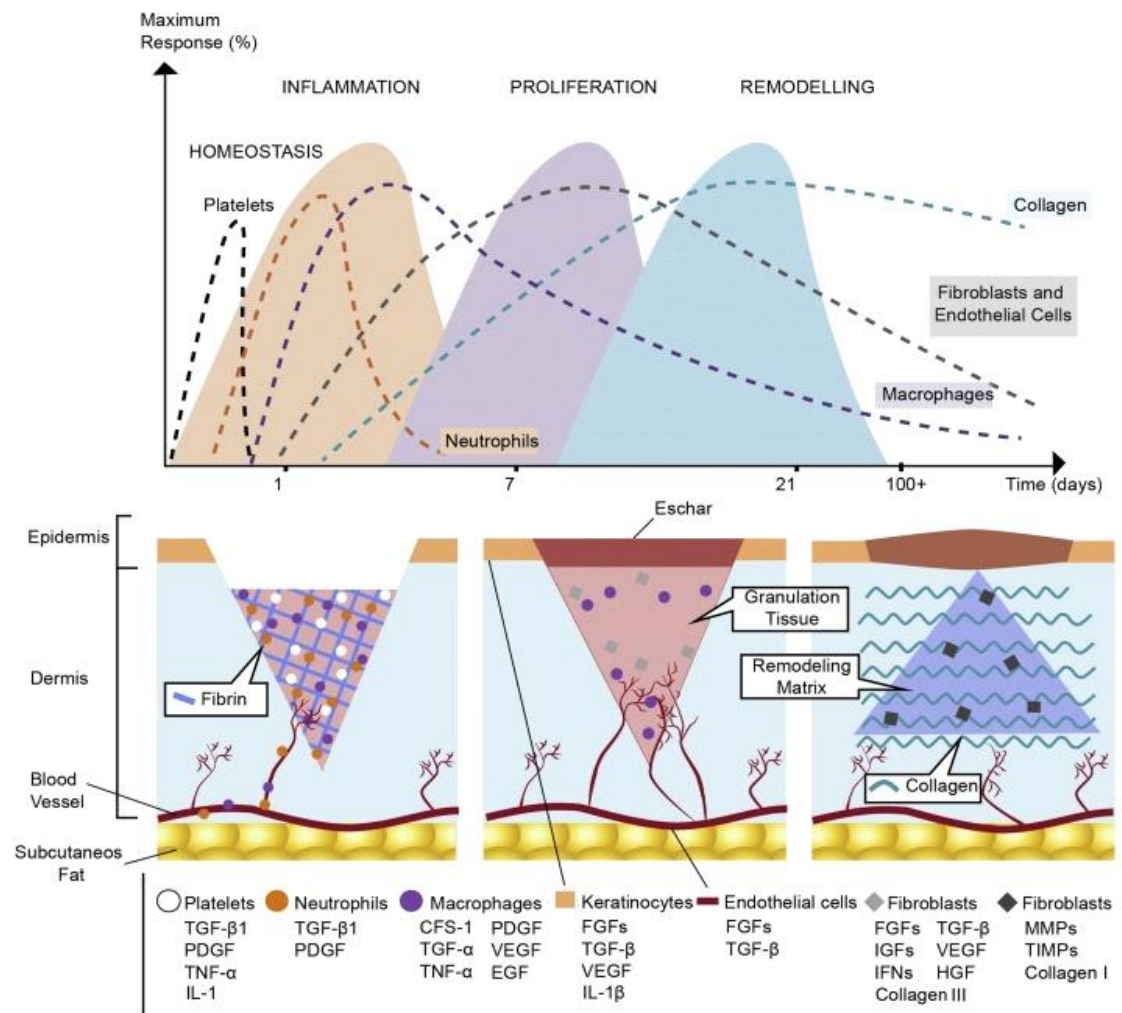
Δεδομένης της πολυπλοκότητας της διαδικασίας αποκατάστασης τραυμάτων είναι αξιοσημείωτο ότι σπάνια γίνεται ανεξέλεγκτη και ένας κακοήθης μετασχηματισμός είναι ένα ασυνήθιστο γεγονός στο περιβάλλον της πληγής (Trent 2003; Konigova 2000). Παραδόξως, σε ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η απόκριση στον τραυματισμό μπορεί να επαναφέρει πλήρως την αρχική αρχιτεκτονική του ιστού μέσω της διαδικασίας της αναγέννησης (Reinke and Sorg 2012). Ομοίως και στα αρχικά στάδια της οντογένεσης στα έμβρυα των θηλαστικών, παρατηρείται ιστική αναγέννηση, χωρίς τη δημιουργία ουλώδους ιστού (Pratsinis, Mavrogonatou, and Kletsas 2019).

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ επιδιόρθωσης, επούλωσης μέσω σχηματισμού ουλώδους ιστού και αναγέννησης. Η απώλεια δέρματος πλήρους πάχους σε ενήλικα έχει συνήθως ως αποτέλεσμα μια επουλωτική παρά αναγεννητική απόκριση, οδηγώντας στον σχηματισμό ουλώδους ιστού. Η εναπόθεση μιας πλούσιας σε κολλαγόνο μήτρας στη δερμίδα καθιστά το δέρμα επιρρεπές σε συστολή, μειώνει την ελαστικότητα και την αντοχή σε εφελκυσμό και προωθεί το σχηματισμό υπερτροφικών ουλών. Η επιθηλιοποίηση χωρίς την ανάπτυξη εξαρτημάτων του δέρματος σε μεγάλη επιφάνεια επιφέρει αλωπεκία και θερμική ανισορροπία.

Στάδια φυσιολογικής επούλωσης πληγών

Για να περιγραφεί η περίπλοκη διαδικασία της επούλωσης του δέρματος, έχει οργανωθεί σε τρία διαδοχικά και αλληλεπικαλυπτόμενα στάδια: μια φλεγμονώδη φάση, μια κοκκιώδη φάση με σύνθεση νέου συνδετικού ιστού και κλείσιμο του επιθηλιακού τραύματος, και τέλος μια φάση αναδιαμόρφωσης της ουλής (Singer and Clark 1999; Woodley et al. 2015). Αυτά τα στάδια αλληλεπικαλύπτονται και αλληλοεξαρτώνται (Εικόνα 2). Η διάρκεια καθενός εκ των σταδίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο τύπος, το πλάτος, το βάθος και η θέση του τραύματος, η ηλικία και η γενική υγεία του ατόμου.

Το κάθε στάδιο περιγράφεται αναλυτικά στις υποενότητες που ακολουθούν:



Εικόνα 2: Στάδια επούλωσης και χαρακτηριστικά μόρια επικοινωνίας μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων (Zomer and Trentin 2018).

1.2.1 Αιμόσταση & Φλεγμονή

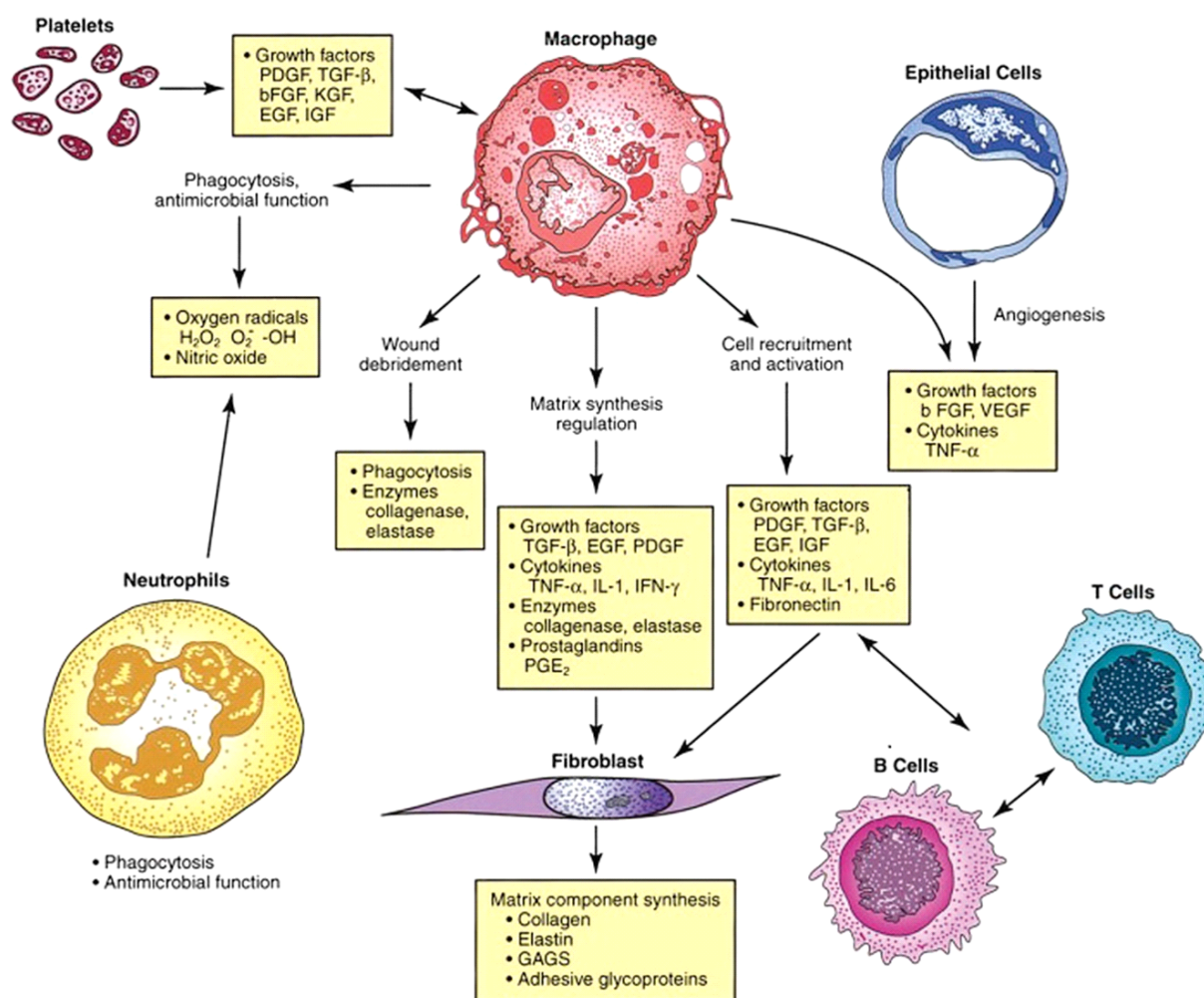
Αμέσως μετά τον τραυματισμό του δέρματος, η πληγωμένη περιοχή γεμίζει με αίμα που αποτελείται από κύτταρα και πρωτεΐνες από την κυκλοφορία, πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τον τραυματισμένο ιστό και αγγειοδραστικές αμίνες από τα τοπικώς κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία και κερατινοκύτταρα.

Η αιμόσταση ξεκινά με την έκθεση των συστατικών του αίματος στα υποενδοθηλιακά στρώματα των τοιχωμάτων των αγγείων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και παίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό του αρχικού αιμοστατικού βύσματος μετά από συσσωμάτωση και προσκόλληση στις εκτεθειμένες επιφάνειες κολλαγόνου. Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται οι καταρράκτες πήξης και συμπληρώματος. Μέσα στον ιστό, η προθρομβίνη ενεργοποιείται για να σχηματίσει θρομβίνη, η οποία στη συνέχεια διασπά το ινωδογόνο για το σχηματισμό ινώδους. Μαζί με τα αιμοπετάλια και την ινωδονεκτίνη πλάσματος, το ινώδες σχηματίζει το θρόμβο.

Ο θρόμβος αποτελείται κυρίως από διασυνδεδεμένο ινώδες, κύτταρα όπως ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια, καθώς και άλλες πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας (ECM), όπως η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη. Εκτός από τον περιορισμό της απώλειας αίματος, ο θρόμβος χρησιμεύει ως πρώτη άμυνα κατά της μικροβιακής εισβολής και ως προσωρινή μήτρα για την προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων (Ebenezer and Polydefkis 2014). Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων προκαλείται από ενεργοποιημένους υποδοχείς ιντεγκρίνης στην επιφάνειά τους (Chao and Cheing 2009; Thomas et al. 2016). Τα αιμοπετάλια του θρόμβου αποκοκκιώνονται, απελευθερώνοντας παράγοντες που έλκουν φλεγμονώδη κύτταρα, παράγοντες ενεργοποίησης για τοπικούς ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, και αγγειοσυστολείς, όπως η χημειοκίνη (CC μοτίβο) πρόσδεμα 5 (CCL5), η θρομβίνη, ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β (TGF-β), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Εικόνα 3).

Ο θρόμβος ινώδους δρα επίσης ως προσωρινή μήτρα για την αρχική μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στη θέση του τραύματος (Laurens, Koolwijk, and de Maat 2006). Τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, προσελκύονται στη θέση του τραυματισμού από κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των TGF-β και PDGF. Τα ουδετερόφιλα απομακρύνουν βακτήρια και / ή ξένα σωματίδια από την πληγή και ακολουθούνται από μονοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μακροφάγα (Wynn and Vannella 2016). Ενώ τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν ξένους

οργανισμούς, σωματίδια και ουδετερόφιλα, απελευθερώνουν επίσης TGF- β και άλλες κυτοκίνες, και έτσι διεγείρουν τη μετανάστευση ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων στην πληγή (Delavary et al. 2011) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αλληλεπίδραση κυτταρικών και χημικών παραγόντων στην επούλωση πληγών. Παρουσιάζεται η πλειοτροπική δράση του μακροφάγου στην διαδικασία της επούλωσης. FGF2 = βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών. EGF=επιδερμικός αυξητικός παράγοντας; GAGs= γλυκοζαμινογλυκάνες; H_2O_2 =υπεροξείδιο του υδρογόνου; IFN- γ =ιντερφερόνη γάμμα; IGF=ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας, IL1=ιντερλευκίνη-1; IL6=ιντερλευκίνη-6; KGF=αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων; O_2^- =ανιόν σουπεροξειδίου; $-OH$ =ρίζα υδροξυλίου; PDGF = αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, PGE $_2$ = προσταγλανδίνη E2; TGF- β = μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας βήτα; TNF- α = νεκρωτικός παράγοντας όγκου-άλφα; VEGF = αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Moore et al. 2018).

Οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες μπορούν να φθάσουν στα κύτταρα-στόχους μέσω ενδοκρινών, παρακρινών ή αυτοκρινών οδών και να διεγείρουν την απόκριση των κυττάρων-στόχων μετά από δέσμευση σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, ενεργοποίηση ειδικών σηματοδοτικών οδών και τελικά ρύθμιση (θετική ή αρνητική) της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο PDGF, μπορούν να δρουν με διάφορους τρόπους, π.χ. δεν προσελκύουν μόνο ουδετερόφιλα και μακροφάγα, αλλά έχουν μιτογόνο και χημειοτακτική δράση για ινοβλάστες και κύτταρα λείου μυός που διεγείρουν την αγγειογένεση, τη σύνθεση κολλαγόνου, την κολλαγενάση και ούτω καθεξής. Μια κυτοκίνη ή αυξητικός παράγοντας μπορεί να έχει πλειοτροπική δράση, επηρεάζοντας διαφορετικά κύτταρα-στόχους μέσω των υποδοχέων τους.

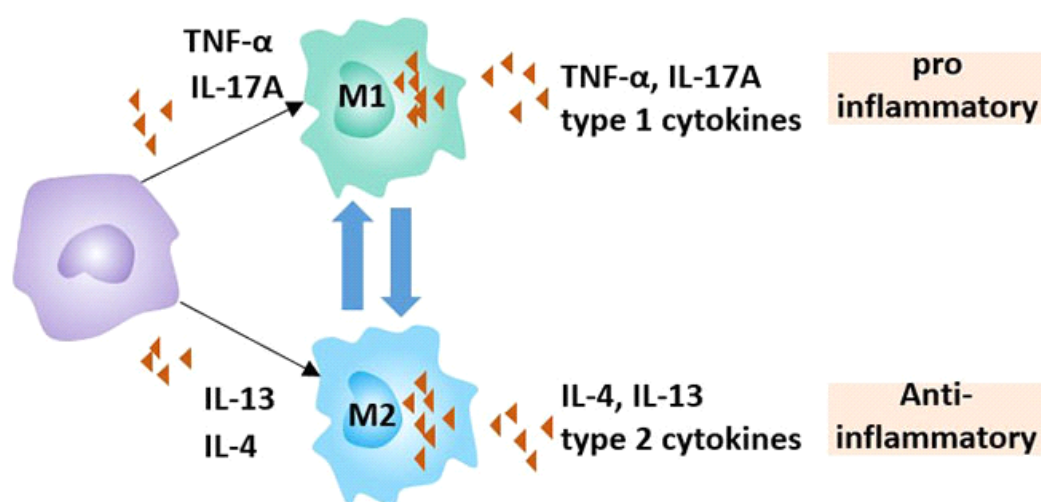
Ο ρόλος της φλεγμονής στην επούλωση πληγών είναι αμφιλεγόμενος. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η φλεγμονώδης φάση είναι ζωτικής σημασίας για να προχωρήσει η επούλωση πληγών. Ωστόσο και ο έλεγχος της φλεγμονής έχει οδηγήσει σε θετικά αποτελέσματα (Kieran et al. 2013). Επίσης, ενώ η φυσιολογική επούλωση ενηλίκων οδηγεί σε ινώδη ουλή, οι πρώιμες εμβρυϊκές πληγές που έχουν πολύ μικρή εάν όχι ανύπαρκτη, φλεγμονώδη απόκριση εμφανίζουν επούλωση χωρίς ουλές με πλήρη αποκατάσταση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του δέρματος (Lo et al. 2012).

Στους ενήλικες, η επούλωση του στοματικού βλεννογόνου παρέχει το πλησιέστερο παράδειγμα αναγεννητικής ίασης καθώς σχηματίζονται ελάχιστες ουλές (Guo and DiPietro 2010). Τόσο η στοματική βλεννογόνος όσο και το δέρμα του εμβρύου μπορούν να θεωρηθούν ως «προστατευμένο περιβάλλον» για την επούλωση πληγών. Το ανθρώπινο εμβρυϊκό δέρμα παρατηρήθηκε ότι επιδιορθώθηκε χωρίς ουλή όταν μεταμοσχεύτηκε υποδόρια σε άτριχους μύες με ανοσοανεπάρκεια, ενώ η μεταμόσχευση δέρματος από ηλικιωμένο πρόβατο σε έμβρυο εντός του αμνιακού υγρού είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ουλής (Larson, Longaker, and Lorenz 2010). Συνεπώς, φαίνεται ότι η ικανότητα της ιστικής επιδιόρθωσης χωρίς ουλή αποτελεί ενδογενές (intrinsic) χαρακτηριστικό των εμβρυϊκών ιστών (Colwell 2003).

Ο ρόλος των μακροφάγων στην επούλωση

Παρόλο που η εξάλειψη φλεγμονωδών κυττάρων έχει ελάχιστη επίδραση στην επούλωση των πληγών, αυτό δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση των μακροφάγων. Τα μακροφάγα πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης των πληγών. Φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων στην πληγή, για την έναρξη του πολλαπλασιασμού του

δέρματος και για τον προσδιορισμό του υποτύπου στην εναπόθεση κολλαγόνου. Τα τελευταία χρόνια, η ενεργοποίηση των μακροφάγων έχει ταξινομηθεί σε δύο καταστάσεις, M1 και M2, ανάλογως του ερεθίσματος. Η ενεργοποίηση M1 οδηγεί σε έναν εξαιρετικά προφλεγμονώδη φαινότυπο μακροφάγων, ο οποίος μεσολαβείται από υποδοχείς τύπου Toll (TLR-4) και IFN- γ και γίνεται η πηγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η ενεργοποίηση του φαινότυπου M2 μεσολαβείται από τις ιντερλεκίνες IL-4 και / ή IL-13 και απελευθερώνει ορισμένους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι PDGF, aFGF, bFGF, TGF- α , TGF- β κλπ., υποδηλώνοντας έναν σημαντικό ρόλο για τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα (M2) μακροφάγα στη φάση της επούλωσης των πληγών.



Εικόνα 4: Φαινότυποι μακροφάγων αναλόγως του ερεθίσματος (πηγή: *cusabio*).

1.2.2 Πολλαπλασιασμός

Αυτό το στάδιο της επούλωσης αλληλεπικαλύπτεται με τη φλεγμονώδη φάση και αρχίζει με την αποικοδόμηση της αρχικής μήτρας ινώδους-αιμοπεταλίων και την εισχώρηση ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix metalloproteinases-MMPs) εκκρίνονται για να διευκολύνουν την κυτταρική μετανάστευση μέσω του θρόμβου ινώδους και της προσωρινής μήτρας.

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει: (α) την ινοπλασία, συμπεριλαμβανομένων των διεργασιών του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και της διαφοροποίησης τους σε μυοϊνοβλάστες, την απόθεση εξωκυττάριας μήτρας και τη συστολή του τραύματος, (β) την επανεπιθηλίωση και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική

αλληλεπίδραση μεταξύ κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών, (γ) την αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού ενδοθηλίου και νέων αγγείων και (δ) την επιδιόρθωση περιφερικών νευρών που συνίσταται σε παράπλευρη επένδυση και αναγέννηση νευρών. Τα μακροφάγα είναι τα κυρίαρχα φλεγμονώδη κύτταρα που ενορχηστρώνουν την πολλαπλασιαστική φάση της επιδιόρθωσης του τραύματος του δέρματος (Novak and Koh 2013; Wynn and Vannella 2016).

Ινοπλασία

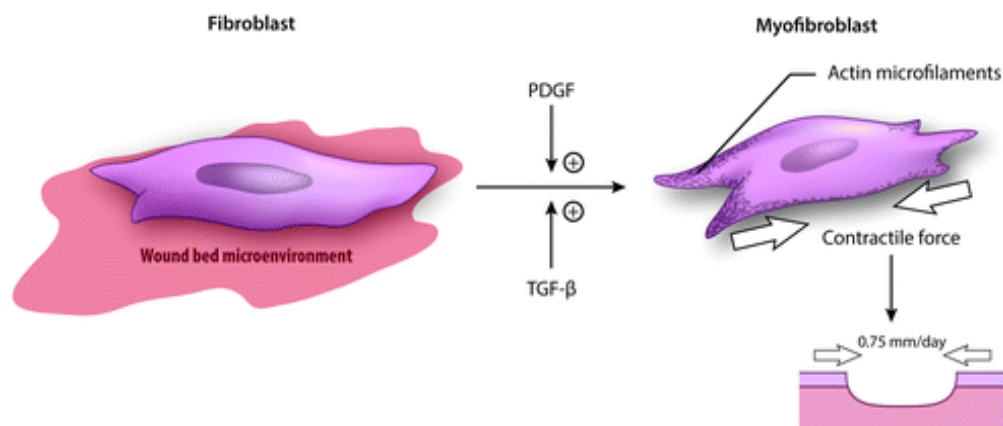
Οι ινοβλάστες είναι ο βασικός τύπος κυττάρων σε αυτό το στάδιο, ενώ αποτελούν τον κυρίαρχο κυτταρικό τύπο τρεις έως πέντε ημέρες μετά τον τραυματισμό. Οι ινοβλάστες είναι μια ατελώς ορισμένη, ετερογενής ομάδα κυττάρων με μεγάλη πλαστικότητα και διαφορετικούς ρόλους σε διακριτά δερματικά στρώματα (Werner 2007; Tracy, Minasian, and Caterson 2016). Οι ινοβλάστες είναι σε θέση να ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια σήματα όπως η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α), ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας βήτα (TGF-β) (Takehara 2000), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 2 (FGF-2), που απελευθερώνονται από αιμοπετάλια, μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα (Donovan et al. 2013; Greaves et al. 2013; Schäfer and Werner 2007).

Αυτές οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τους ινοβλάστες, έτσι ώστε να ξεκινήσουν να πολλαπλασιάζονται και να ρυθμίζουν την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών και αναστολέων μεταλλοπρωτεϊνών (Wynn 2008). Οι ώριμοι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και παράγουν πρωτεΐνες εξωκυττάριας μήτρας φιβρονεκτίνη, υαλουρονικό οξύ, κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, οι οποίες συνεισφέρουν στην κατασκευή της νέας εξωκυττάριας μήτρας και ενός ικριώματος για τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων (Rosa and Fantozzi 2013). Η προσωρινή μήτρα ινώδους αντικαθίσταται σταδιακά από τον κοκκιώδη ιστό. Οι ώριμοι ινοβλάστες μεταναστεύουν στον κοκκιώδη ιστό, ξεκινούν τη σύνθεση κολλαγόνου, αντικαθιστούν την προσωρινή μήτρα ινώδους (Greaves et al. 2013) και κάποιοι διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, αυξάνοντας την εναπόθεση κολλαγόνου και ξεκινώντας τη συστολή της πληγής (Hinz 2007).

Οι ινοβλάστες αντιλαμβάνονται επίσης τη δύναμη και την κατεύθυνση του μηχανικού φορτίου και μεταφράζουν αυτές τις πληροφορίες μέσω σημάτων μηχανικής μεταγωγής σε γονιδιακή έκφραση και παραγωγή αυξητικών παραγόντων έτσι ώστε να επιτευχθεί

προσαρμοστική απόκριση και αλλαγή φαινοτύπου σε μυοϊνοβλάστες (Eckes et al. 2006; Tracy et al. 2016). Η απόκριση των ινοβλαστών στη μηχανική μεταγωγή σήματος έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό μέσο στην επούλωση (Barnes et al. 2018).

2 weeks post-injury



Εικόνα 5: Διαφοροποίηση ινοβλάστη σε μυοϊνοβλάστη μέσω σηματοδότησης TGF-β και PDGF (Marshall et al. 2018)

Εξωκυττάρια μήτρα

Η εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix – ECM) είναι μια τρισδιάστατη δομή που αποτελείται από εξωκυτταρικά μακρομόρια όπως κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, ιντεγκρίνες και λαμινίνες που παρέχουν δομική και βιοχημική υποστήριξη και αγκύρωση στα γύρω κύτταρα.

Τα μόρια και τα κύτταρα της πληγής αλληλεπιδρούν με την παρουσία υποδοχέων διαμεμβρανικής κυτταρικής επιφάνειας που ονομάζονται ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι κρίσιμες στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στη μετανάστευση και στον πολλαπλασιασμό στην επούλωση πληγών και στην προσκόλληση μέσω μηχανισμού μεταγωγής αμφίδρομου σήματος μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας μήτρας, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση επιθηλιακών και συνδετικών ιστών. Οι πιο σημαντικές ιντεγκρίνες στην επούλωση τραυμάτων και τα κύτταρα που τις εκφράζουν περιλαμβάνουν τις: β3, β1, α5β1 (ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα), α9, α11β1 (ινοβλάστες), α3β1, ανβ5, ανβ6, α2β1, α5β1 (κερατινοκύτταρα), α3β1 (κερατινοκύτταρα), ανβ3 (ενδοθηλιακά κύτταρα) και αμ2 (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα) (Sorrentino et al. 2015).

Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών που υπάρχουν στην ECM και είναι σημαντική για την επούλωση τραυμάτων είναι οι λαμινίνες. Είναι οι πιο άφθονες γλυκοπρωτεΐνες της

βασικής μεμβράνης και έχουν ουσιαστικούς ρόλους στην εδραίωση της αρχιτεκτονικής και της σταθερότητας των ιστών, παρέχοντας στα κύτταρα ένα δομικό ικρίωμα, συμβάλλοντας σε δύο κύριες πτυχές της επιδιόρθωσης του τραύματος: την αγγειογένεση και την επανεπιθηλίωση. Η λαμινίνη-8, η λαμινίνη-10 και η λαμινίνη-5 είναι οι κύριες λαμινίνες που εμπλέκονται ενεργά στην επιδιόρθωση τραυμάτων. Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, η λαμινίνη-8 προάγει την προσκόλληση δερματικών ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση και το σχηματισμό μικροσωληνίσκων, ενώ η λαμινίνη-10 εκφράζεται έντονα στα αιμοφόρα αγγεία γύρω από δερματικά τραύματα. Κατά τη διάρκεια της επανεπιθηλίωσης, οι λαμινίνες παρέχουν το υπόστρωμα στα επιθηλιακά κερατινοκύτταρα ώστε να μεταναστεύσουν και να καλύψουν την πληγή, αποκαθιστώντας τον επιθηλιακό φραγμό (Li, Zhang, and Kirsner 2003).

Επανεπιθηλίωση

Η επανεπιθηλίωση ξεκινά 16-24 ώρες μετά τον τραυματισμό και συνεχίζεται μέχρι το στάδιο της αναδιαμόρφωσης. Νωρίς μετά τον τραυματισμό, τα κερατινοκύτταρα διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν μεταξύ του θρόμβου ινώδους και της πλούσιας σε κολλαγόνο δερμίδας, ενώ τα υπερβασικά κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στις άκρες του τραύματος πολλαπλασιάζονται για να καλύψουν το κενό. Τα υπερβασικά κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν πάνω από τα βασικά κερατινοκύτταρα, ενορχηστρώνοντας τη διαφοροποίηση. Στα τελικά στάδια της επανεπιθηλίωσης, τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά κύτταρα που παραμένουν σταθερά προσκολλημένα στη βασική μεμβράνη. Αλληλεπιδράσεις κυττάρων και κυττάρων-εξωκυττάριας μήτρας, αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες που απελευθερώνονται από διάφορους τύπους κυττάρων διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα να μεταναστεύσουν πάνω από την προσωρινή μήτρα για να καλύψουν το κενό της πληγής, ενώ τα κερατινοκύτταρα στις άκρες του τραύματος αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να ακολουθούν το μεταναστευτικό πρότυπο (Pastar et al. 2014).

Η εξωκυττάρια μήτρα παίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία της επανεπιθηλίωσης. Ταυτόχρονα, μέσω παρακρινούς αλληλεπίδρασης μεταξύ κερατινοκυττάρων, ινοβλαστών, ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων-μακροφάγων και ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνεται η ποσότητα των κυτοκινών, των αυξητικών παραγόντων και άλλων βιομορίων για την προώθηση της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής αλληλεπίδρασης μεταξύ κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών. Τα κερατινοκύτταρα διεγείρουν τους ινοβλάστες να

εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Schäfer and Werner 2007; Wynn and Vannella 2016). Τέλος, οι ινοβλάστες διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, αυξάνοντας την εναπόθεση κολλαγόνου και ξεκινώντας τη συστολή της πληγής (Hinz 2007).

Αγγειογένεση

Κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού, ο αντιφλεγμονώδης φαινότυπος του μακροφάγου (M2) εμφανίζεται ως ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός, ενορχηστρώνοντας την αλληλεπίδραση με ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, εξωκυττάρια μήτρα και περιφερικά νεύρα (Brancato and Albina 2011; Wynn and Vannella 2016). Η μείωση της παροχής αίματος και ο επιταχυνόμενος μεταβολισμός των κυττάρων προκαλούν υποξία στους ιστούς της πληγής που αποτελεί ένα σημαντικό ερέθισμα για την αγγειογένεση. Οι υποξικές καταστάσεις διεγείρουν τη σύνθεση του παράγοντα υποξίας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) στα μακροφάγα, στους ινοβλάστες, στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κερατινοκύτταρα (Choudhry and Harris 2018). Η απελευθέρωση προαγγειογόνων παραγόντων όπως οι VEGF, VEGFA, FGF2, PDGF, TGF-β1 και ο μεταβολικός διακόπτης των ενδοθηλιακών κυττάρων ξεκινούν τη νεοαγγείωση.

Επισκευή περιφερικών νεύρων

Μετά τον τραυματισμό, τα τραυματισμένα νεύρα επηρεάζουν την ομοιοστατική λειτουργία του δέρματος. Η αποκατάσταση των νευρικών λειτουργιών, ύστερα από τον τραυματισμό περιφερικών νευρών, περιλαμβάνει δύο διαδικασίες: την παράπλευρη επένδυση και την αναγέννηση των νεύρων. Στους ενήλικες, το περιφερικό νευρικό σύστημα είναι σε θέση να αναγεννήσει τη νευρική λειτουργία μετά από έναν τραυματισμό, αναδημιουργώντας τα άκρα των μυελινωμένων κολοβωμάτων δύο νεύρων και επανασυνδέοντας το τραυματισμένο νεύρο. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν μακροφάγα, κύτταρα Schwann, ινοβλάστες, φλεγμονώδεις κυτοκίνες, μεταγραφικοί παράγοντες, συμπλήρωμα και μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος.

1.2.3 Αναδιαμόρφωση

Ο κοκκιώδης ιστός αντιπροσωπεύει ένα προσωρινό στρώμα που αναδιαμορφώνεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς η σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας αλλάζει, το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων διακλαδώνεται και το ινώδες δίκτυο εξωκυττάριας μήτρας οργανώνεται και ευθυγραμμίζεται. Ο κοκκιώδης ιστός χρησιμεύει ουσιαστικά ως ένα προσωρινό ικρίωμα, που επιτρέπει στους ινοβλάστες και σε άλλα κύτταρα να μεταναστεύσουν στη θέση του τραύματος, και καθοδηγεί την ευθυγράμμισή τους καθώς εναποθέτουν και οργανώνουν τη μόνιμη εξωκυττάρια μήτρα. Η φάση αναδιαμόρφωσης είναι η μεγαλύτερη σε διάρκεια φάση της επούλωσης πληγών (1-2 χρόνια ή ακόμα και περισσότερο στον άνθρωπο) (Velnar, Bailey, and Smrkolj 2009). Ο προηγούμενος πλούσιος σε κύτταρα ιστός χάνει τα περισσότερα κύτταρα, καθώς τα υπόλοιπα φλεγμονώδη κύτταρα, πολλοί ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται απόπτωση, αφήνοντας τελικά ένα μικρότερο αριθμό ινοβλαστών και αιμοφόρων αγγείων (Greenhalgh 1998).

Σε σχέση με το ώριμο επουλωμένο τραύμα, ο κοκκιώδης ιστός έχει υψηλότερη αναλογία φιμπρονεκτίνης, κολλαγόνου τύπου III, ελαστίνης, πρωτεογλυκανών και υαλουρονικού οξέος και είναι λιγότερο πυκνός και πιο ενυδατωμένος. Με την πάροδο του χρόνου, οι ινοβλάστες αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια μήτρα και οι άλλες δομικές πρωτεΐνες αντικαθίστανται σταδιακά για να σχηματίσουν μια πυκνότερη εξωκυττάρια μήτρα που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I (Xue and Jackson 2015; Yates, Bodnar, and Wells 2011). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες κολλαγόνου (MMPs) που απελευθερώνονται από τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα αποικοδομούν το κολλαγόνο τύπου III του κοκκιώδους ιστού (Xue and Jackson 2015). Η διασύνδεση και η αναδιοργάνωση του κολλαγόνου ξεκινούν και μπορούν να διαρκέσουν για μήνες ή χρόνια μετά τον τραυματισμό για την αποκατάσταση της δομής και της λειτουργίας των ιστών. Στον ουλώδη ιστό, η ευθυγράμμιση του κολλαγόνου συμβαίνει σε μία μόνο κατεύθυνση. Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης μπορεί να συνεχιστεί επ'αόριστον, η αντοχή του ιστού αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, όμως ο ουλώδης ιστός δεν θα ανακτήσει ποτέ την ανθεκτικότητα του ανέπαφου δέρματος.

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας των κύριων διεργασιών της φυσιολογικής επούλωσης στον άνθρωπο

Στάδιο επούλωσης	Κύριες διεργασίες
Αιμόσταση	αιμόσταση
&	αγγειοσυστολή
Φλεγμονή	σχηματισμός θρόμβου ινώδους
	φλεγμονή
	απελευθέρωση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων από αιμοπετάλια, ανοσοκύτταρα και από τη διαταραγμένη ECM
	εισβολή φλεγμονωδών κυττάρων
Πολλαπλασιασμός	απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων από μακροφάγα και ινοβλάστες
	μετανάστευση και πολλαπλασιασμός ινοβλαστών
	σύνθεση πρωτεϊνών ECM (φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο)
	αγγειογένεση
	μετανάστευση, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση κερατινοκυττάρων
	συνεισφορά από βλαστοκύτταρα τριχοθυλακίων
	πιθανή συμβολή από τα μεσαγγειακά επιδερμικά βλαστικά κύτταρα
Αναδιαμόρφωση	αναδιοργάνωση και αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας
	σχηματισμός μυοϊνοβλαστών
	συστολή της πληγής
	κυτταρική απόπτωση

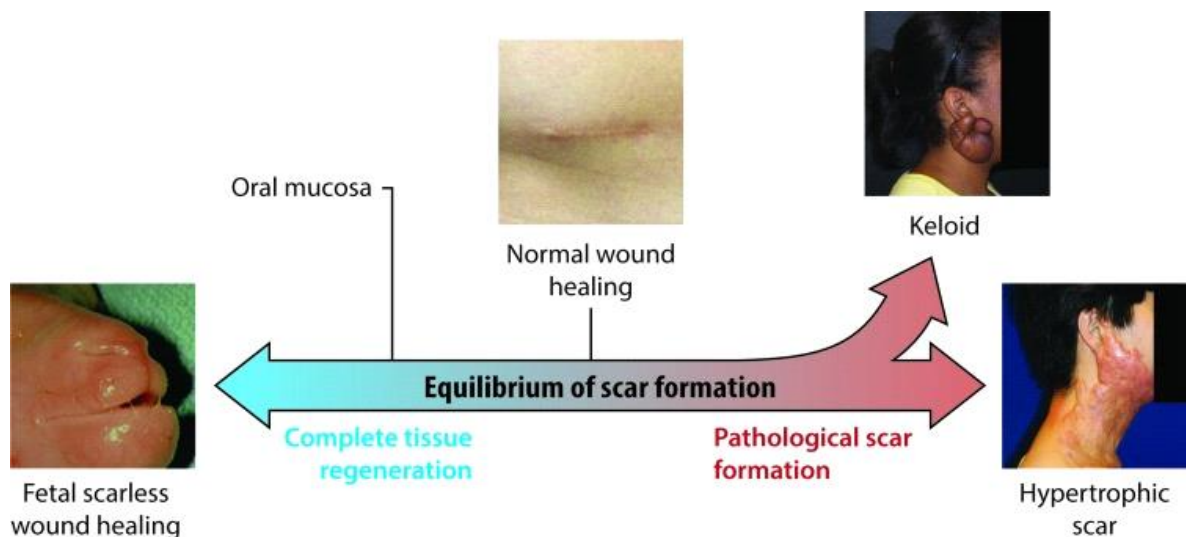
1.3 Επιπλοκές επούλωσης

Ο καταρράκτης της επούλωσης πληγών μπορεί να σταματήσει σε οποιαδήποτε από τα προαναφερθέντα στάδια. Αναφέρθηκε ήδη πως πολλοί μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονωδών κυττάρων, των αυξητικών παραγόντων, των πρωτεασών (όπως MMPs) και άλλων κυτταρικών και εξωκυτταρικών στοιχείων, διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη διαδικασία της επούλωσης πληγών. Οι αλλαγές σε έναν ή περισσότερους από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε ελλιπή επούλωση. Η επούλωση πληγών μπορεί επίσης να επηρεαστεί αρνητικά από πολλούς εξωγενείς παράγοντες, όπως ο διαβήτης, η νεφρική ανεπάρκεια, ο υποσιτισμός, το κάπνισμα, η έκθεση σε ακτινοβολία, η μόλυνση της πληγής και η ανοσοκαταστολή. Παρουσία αυτών των παραγόντων, οι πληγές μπορεί να αποτύχουν να επουλωθούν επαρκώς με αποτέλεσμα την καθυστερημένη επούλωση, τα χρόνια έλκη ή τον παθολογικό σχηματισμό ουλής. Αυτές οι επιπλοκές επηρεάζουν εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας μια σημαντική πρόκληση για την υγεία των ασθενών αλλά και τις υγειονομικές δαπάνες παγκοσμίως (Sen 2019).

Παθολογικές ουλές

Με σπάνιες εξαιρέσεις, οποιαδήποτε πληγή στο ενήλικο ανθρώπινο χόριο θα επουλωθεί με το σχηματισμό ουλής κάποιου βαθμού (Greaves et al. 2013). Οι παθολογικές, όμως, ουλές είναι γενικά αποδεκτό πως προκύπτουν λόγω παρατεταμένης, παρεκκλίνουσας επούλωσης που χαρακτηρίζεται από υπερβολική συμμετοχή ινοβλαστών και εναπόθεση κολλαγόνου.

Οι ουλές εμφανίζονται έντονα ως αποχρωματισμένες και συχνά επηρμένες περιοχές του ινώδους ιστού. Πιθανότατα, συνιστούν εξελικτικό πλεονέκτημα για τον ταχύ περιορισμό της αιμορραγίας και την αποκατάσταση του δερματικού φραγμού έναντι περιβαλλοντικών παθογόνων (Bayat and McGrouther 2005). Οι ουλές σχηματίζονται και λειτουργούν για την επιτάχυνση της επούλωσης και τελικώς για επιβίωση και αναπαραγωγή. Υπάρχει ένα φάσμα στο σχηματισμό ουλής με την αναγέννηση χωρίς ουλές στο ένα άκρο, το φυσιολογικό σχηματισμό ουλών στο κέντρο και τον παθολογικό σχηματισμό ουλών (υπερτροφικές ουλές, χηλοειδή) στο άλλο άκρο (Εικόνα 6).



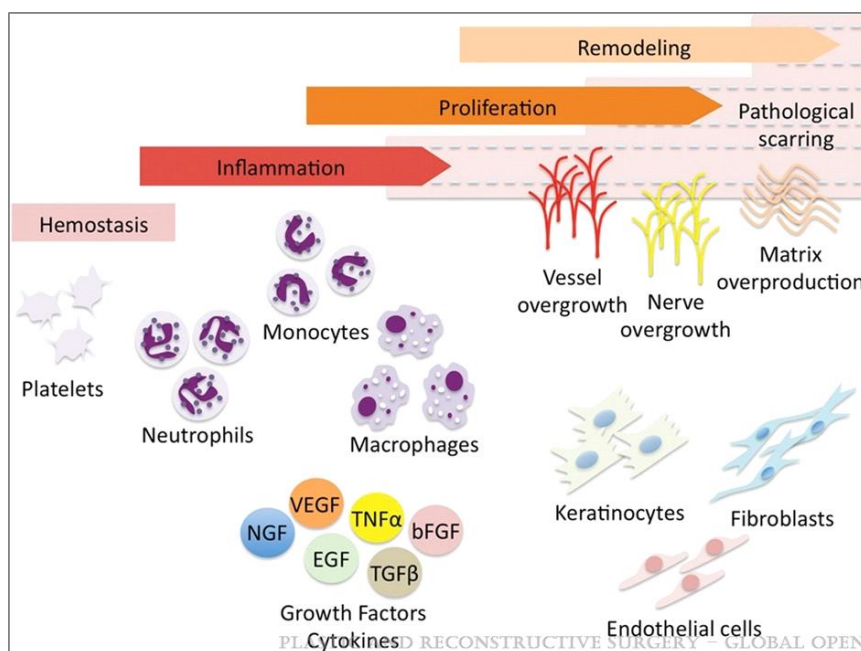
Εικόνα 6: Φάσμα σχηματισμού ουλής (κλινική εικόνα). Το αποτέλεσμα της επούλωσης αντιπροσωπεύει ένα ευρύ φάσμα και ποικίλλει ανάλογα με το περιβάλλον της πληγής. Η αναγεννητική επούλωση (αριστερά) στα έμβρυα πρώιμης κύησης είναι το «ιδανικό» αποτέλεσμα ιστικής επιδιόρθωσης και έχει ως αποτέλεσμα ιστούς που δεν διακρίνονται από το μη τραυματισμένο ιστό. Η τυπική δερματική επούλωση των ενηλίκων οδηγεί σε κάποια ίνωση με σχηματισμό φυσιολογικής ουλής (μέση), η οποία περιέχει κολλαγόνο προσανατολισμένο σε μια πυκνή, παράλληλη ευθυγράμμιση και δεν επανεμφανίζει δερματικά εξαρτήματα (π.χ. τριχοθυλάκια). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να δημιουργηθούν παθολογικές ουλές (δεξιά), όπως οι υπερτροφικές ουλές ή τα χηλοειδή. Σε σύγκριση με τις κανονικές ουλές, αυτές οι υπερτροφικές ουλές έχουν αυξημένη ποσότητα και πυκνότητα κολλαγόνου, είναι εμφανέστερες με αυξημένο αποχρωματισμό, ενώ μπορεί να συνυπάρχει κνησμός ή και πόνος (Marshall et al. 2018).

Ενώ οι φυσιολογικές και οι υπερτροφικές ουλές δεν ξεπερνούν τα όρια της πληγής και συνήθως υποχωρούν με την πάροδο του χρόνου, τα χηλοειδή μπορεί να εκτείνονται πολύ πέρα από τα όρια, να αναπτύσσονται συνεχώς και συχνά να υποτροπιάζουν μετά από εκτομή (Leventhal, Furr, and Reiter 2006). Μοριακές μελέτες ινοβλαστών υπερτροφικών ουλών και χηλοειδών δείχνουν χρόνια φλεγμονή (π.χ. ιντερλευκίνες 6 & 1β, TNF-α) και απώλεια έκφρασης p53 (χηλοειδή), ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα χηλοειδή είναι πραγματικά καλοήθεις όγκοι, στους οποίους συνεχίζεται η πολλαπλασιαστική φάση της επούλωσης επ'αόριστον (Ladin et al. 1998; Ogawa 2017). Έτσι, έχει προταθεί πως οι φυσιολογικές ουλές, οι υπερτροφικές ουλές και τα χηλοειδή βρίσκονται σε ένα φάσμα αυξανόμενης ινωτικής απόκρισης στον τραυματισμό (Huang et al. 2013).

Ιστολογικά, μπορεί οι υπερτροφικές και οι χηλοειδείς ουλές να περιέχουν και οι δύο μη φυσιολογικές ποσότητες κολλαγόνου, όμως οι υπερτροφικές ουλές αποτελούνται κυρίως από ίνες κολλαγόνου τύπου III, διατεταγμένες παράλληλα με την επιφάνεια του δέρματος, ενώ τα χηλοειδή περιέχουν κολλαγόνο τύπου I και III σε παχιές υαλινωμένες δέσμες με τυχαίο προσανατολισμό (Carswell and Borger 2019). Ενώ η υπερτροφική ουλή

περιέχει λίγη ελαστίνη, το βαθύ δερμидικό στρώμα της χηλοειδούς ουλής περιέχει στην πραγματικότητα περισσότερη ελαστίνη από το κανονικό δέρμα (Köse And Waseem 2008).

Η υπερβολική εξωκυττάρια μήτρα στις υπερτροφικές και χηλοειδείς ουλές προκαλείται από τη συσσώρευση δερματικών ινοβλαστών. Φαίνεται πως το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει λόγω ανισορροπίας μεταξύ του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και της απόπτωσής τους και μεταξύ των πρωτεϊνικών προϊόντων των ινοβλαστών. Όσον αφορά στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, ενώ οι ινοβλάστες είναι τα κύρια κυτταρικά συστατικά στις φυσιολογικές δερματικές ουλές, εμφανίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στη διαταραγμένη κατάσταση. Τα χηλοειδή διαφέρουν από τις υπερτροφικές ουλές στο γεγονός πως έχουν υψηλότερη έκφραση πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA), υποδηλώνοντας πως οι ινοβλάστες στα χηλοειδή πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό. Ακόμη, οι ινοβλάστες των χηλοειδών αντιστέκονται στη διαμεσολαβούμενη από Fas απόπτωση. Είναι πιθανό, αυτή η καθυστέρηση στην απόπτωση να επιτρέπει στα κύτταρα να παράγουν τεράστιες ποσότητες ECM πριν τελικά εξαφανιστούν, αφήνοντας μόνο μια ακυτταρική μάζα κολλαγόνου (Huang et al. 2013).



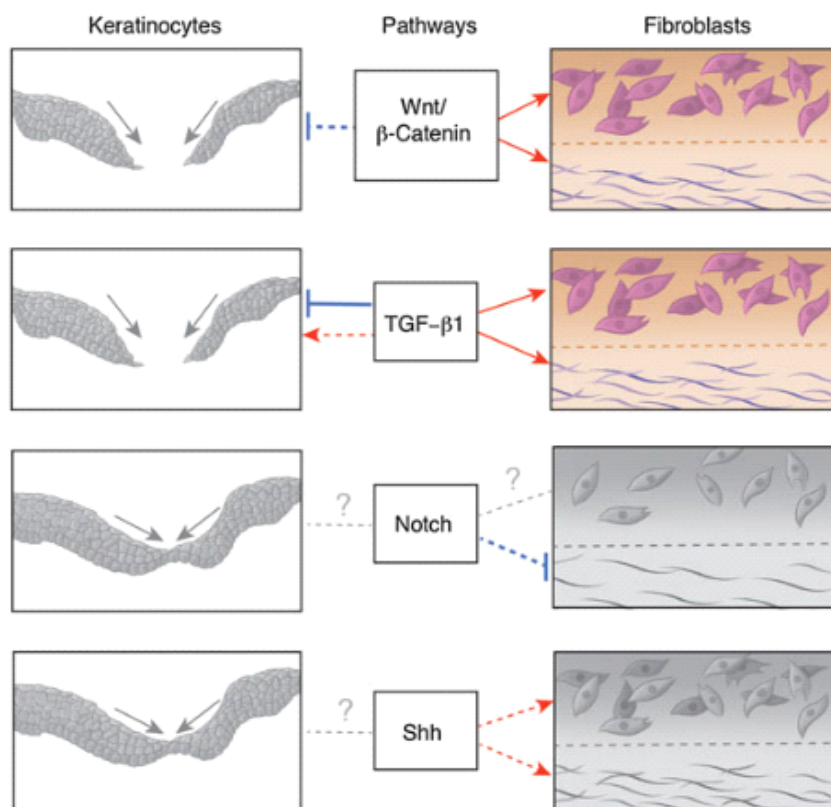
Εικόνα 7: Διαδικασία επούλωσης με σχηματισμό παθολογικής ουλής. Χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη και ισχυρότερη φάση φλεγμονής, με ακατάλληλα απελευθερούμενες κυτοκίνες ακολουθούμενη από καθυστέρηση στην απόκριση της επούλωσης. bFGF, βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών. EGF, επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας; NGF, αυξητικός παράγοντας νέρυων TGFβ, μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β; TNFα, παράγοντας νέκρωσης όγκου α; VEGF, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Huang et al. 2013).

Η δεύτερη επιπλοκή είναι τα χρόνια έλκη. Οι πληγές αυτές περιλαμβάνουν μια διαταραγμένη διαδικασία επιδιόρθωσης και μπορούν να ταξινομηθούν κυρίως σε αγγειακά έλκη (όπως φλεβικά και αρτηριακά έλκη), διαβητικά έλκη και έλκη πίεσης. Στα άτονα έλκη παρατηρείται παρατεταμένη φλεγμονή με αποτέλεσμα την εισχώρηση μικροοργανισμών, την ανάπτυξη βιοϋμενίου και την παρατεταμένη απελευθέρωση αιμοπεταλιακών παραγόντων. Ο προφλεγμονώδης καταρράκτης κυτοκινών, όπως της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNFα), συνεχίζεται για παρατεταμένη περίοδο, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα πρωτεασών. Στα χρόνια έλκη, τα επίπεδα πρωτεασών υπερβαίνουν εκείνα των αναστολέων, προκαλώντας καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας και παράταση των σταδίων της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού. Αντιθέτως, οι πρωτεάσες ρυθμίζονται αυστηρά από τους αναστολείς τους σε οξείες πληγές, αποφεύγοντας με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας (Qing 2017).

1.4 Αναπτυξιακές οδοί σηματοδότησης στην επούλωση πληγών

Η επούλωση του δέρματος μοιράζεται πολλά κοινά με την ανάπτυξη του εμβρυϊκού δέρματος. Και οι δύο διαδικασίες περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων για τη δημιουργία του πολυστρωματικού ιστού που συγκροτεί το δέρμα (Bielefeld, Amini-Nik, and Alman 2013). Αυτές περιλαμβάνουν τις οδούς Wnt/ β -catenin, NOTCH, Hedgehog και διάφορους αυξητικούς παράγοντες / κυτοκίνες, όπως ο TGF- β . Αξίζει να αναφερθούν μερικές από τις διαδικασίες της επούλωσης, όπου συμμετέχουν τα ανωτέρω αναπτυξιακά μονοπάτια (Εικόνα 8):

- Η σηματοδότηση των Wnt/ β -catenin φαίνεται να εμπλέκεται i) στην ανασύσταση της δερμίδας, επιδρώντας στον αριθμό και τη συμπεριφορά των ινοβλαστών και στη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας (Cheon et al. 2002, 2005, 2006; Poon et al. 2009; Sheikholeslam et al. 2018), ii) στην αναγέννηση των τριχοθυλακίων σε μεγάλες πληγές (Ito 2007) κ.α.
- Η σηματοδότηση του TGF- β έχει αναφερθεί πολλές φορές στο παρόν κείμενο και περιγράφεται με περισσότερες λεπτομέρειες κατωτέρω (βλ. 1.7.2). Από την πλειοτροπική δράση αυτού του παράγοντα, επιγραμματικά αναφέρονται η ανασύσταση της δερμίδας, η επίδραση στον πολλαπλασιασμό και τη συμπεριφορά των ινοβλαστών, η σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας, ο σχηματισμός μυοϊνοβλαστών και η συστολή της πληγής (Denton et al. 2009; Desmouliere et al. 1993; Martinez-Ferrer et al. 2010; Vaughan, Howard, and Tomasek 2000). Ανασταλτικό ρόλο φαίνεται να ασκεί στην επανεπιθηλίωση (Denton et al. 2009; Martinez-Ferrer et al. 2010).
- Η σηματοδότηση των NOTCH δεν έχει μελετηθεί στον ίδιο βαθμό με τα προαναφερθέντα μονοπάτια όσον αφορά στην επούλωση. Μπορεί να εμπλέκεται στην ανασύσταση της δερμίδας, επιδρώντας στη συμπεριφορά των μακροφάγων, την αγγειογένεση, τη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας (Caiado et al. 2008; Chigurupati et al. 2007; Hamilton Outtz et al. 2010).
- Η σηματοδότηση του Sonic-Hedgehog δεν είναι ακόμα καλά καθορισμένη. Μπορεί να συμμετέχει στην ανασύσταση της δερμίδας μέσω επίδρασης στη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση (Le et al. 2008).



Εικόνα 8: Απεικονίζεται η επίδραση των αναπτυξιακών οδών σηματοδότησης στη συμπεριφορά κερατινοκυττάρων στο επιδερμικό κλείσιμο και στη συμπεριφορά των ινοβλαστών και στην εναπόθεση μήτρας στη δερματική ανασύσταση, αντίστοιχα. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν μια θετική ή διεγερτική επίδραση μιας οδού σε έναν τύπο κυττάρου / αποτέλεσμα. Τα μπλε «ανασταλτικά» σύμβολα υποδηλώνουν ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα. Οι συμπαγείς γραμμές δείχνουν ότι η επίδραση μιας οδού σε κάθε τύπο κυττάρου ή / και το αποτέλεσμα υποστηρίζεται από ουσιαστικά *in vivo* στοιχεία στη βιβλιογραφία. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν επιδράσεις, οι οποίες είτε δεν έχουν επαρκή ή *in vivo* αποδεικτικά στοιχεία. Οι διακεκομμένες γκρι γραμμές με ερωτηματικό υποδεικνύουν άγνωστα ή ασαφή αποτελέσματα. Τα χρωματιστά διαγράμματα αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα των μονοπατιών σε κάθε τύπο κυττάρου (ή εναπόθεση ECM) που υποστηρίζονται από ουσιαστικά *in vivo* στοιχεία στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, τα γκριζα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα, που βασίζονται κυρίως σε *in vitro* στοιχεία ή απαιτούν περαιτέρω έρευνα *in vivo*. Τα γκριζα διαγράμματα που συνδέονται με μια απλή διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει ούτε αποτέλεσμα, ή ότι το αποτέλεσμα δεν είναι γνωστό (Bielefeld, Amini-Nik, and Alman 2013)

1.5 Σύγχρονη Θεραπευτική

Η επούλωση πληγών στον άνθρωπο μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φάσμα, με τον τυπικό σχηματισμό ουλής να αντιπροσωπεύει τον «φυσιολογικό» φαινότυπο, τις χρόνιες πληγές στο ένα άκρο και τις υπερτροφικές ουλές και τα χηλοειδή στο άλλο. Προηγούμενες μελέτες έχουν αρχίσει να διερευνούν μηχανισμούς με τους οποίους η δυσλειτουργία των ινοβλαστών θα μπορούσε να συμβάλει στις παθολογικές καταστάσεις επούλωσης πληγών:

1.5.1 Αυξητικοί παράγοντες

Αρκετοί αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των PDGF, FGF και TGF-β, είναι γνωστό ότι διεγείρουν τη διαίρεση, τη δραστηριότητα και / ή τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών.

Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)

Ο PDGF είναι ένα από τα ισχυρότερα μιτογόνα για κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και διεγείρει πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτά των κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK) και των phosphoinositide 3-kinase (PI3k)/AKT, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των κυττάρων. Μέχρι σήμερα, μόνο ένας αυξητικός παράγοντας, ένα ανασυνδυασμένο σκεύασμα ανθρώπινου PDGF (REGRANEX Gel, Smith & Nephew, London, UK) έχει εγκριθεί για διαβητικά έλκη. Όμως, μόνο το 15% των ελκών σημείωσε βελτίωση σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, ενώ το 2008 ο FDA (Food & Drug Administration) προειδοποίησε για αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας, από καρκίνο, στους ασθενείς που χρειάζονται εκτεταμένη θεραπεία με PDGF-BB.

Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας (TGF-β)

Η υπεροικογένεια του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα βήτα (TGF-β) λαμβάνει την προσοχή για την ικανότητά του ως πανταχού παρόντα αυξητικού παράγοντα στην επούλωση πληγών. Ο TGF-β έχει τρεις βασικές ισομορφές, 1, 2 και 3, καθένας από τους οποίους εμπλέκεται στενά στη διαδικασία της μετανάστευσης κυττάρων, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και δυνητικά της ανοσοαπόκρισης (Lichtman, Otero-Vinas, and Falanga 2016) (βλ. και παρακάτω 1.7.2). Αυτές οι πρωτεΐνες, ενώ έχουν εντυπωσιακή δομική ομολογία, πιστεύεται ότι εμφανίζουν διαφορετικές και δυνητικά ανταγωνιστικές δράσεις στο περιβάλλον της πληγής. *In vivo*, οι ισομορφές του TGF-β έχουν συγκεκριμένες χρονικές και χωρικές κατανομές, υποδηλώνοντας ενδεχομένως

τους μεμονωμένους τους ρόλους στην επούλωση ελκών και στην αναγεννητική αποκατάσταση. Επίσης, ένα σημαντικό μέρος της λειτουργίας του TGF-β είναι ότι μπορεί να δεσμευτεί και να αποθηκευτεί στην εξωκυττάρια μήτρα όπου μέχρι να διασπαστεί από τις πρωτεάσες του ορού, παραμένει σε ηρεμία, ως μία αδρανής δεξαμενή ((Lichtman et al. 2016).

Οι προσπάθειες ενίσχυσης της έκφρασης ή της απελευθέρωσης TGF-β δεν έχουν έως σήμερα στεφθεί με επιτυχία. Μεταξύ 2008 και 2011, δοκιμάστηκε κλινικά ο ανασυνδυασμένος TGF-β3 (Avotermin) για τη βελτίωση του σχηματισμού ουλών μετά από χειρουργικές επεμβάσεις (So et al. 2011). Δυστυχώς, αυτό το προϊόν απέτυχε στις κλινικές μελέτες φάσης III και στη συνέχεια εγκαταλείφθηκε. Φαίνεται, πως είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της σηματοδότησης του TGF-β για την επίτευξη πλήρους κατανόησης του μηχανισμού της επούλωσης πληγών. Ωστόσο, δεδομένης της συμμετοχής του TGF-β σε μια σειρά από πολύπλοκες κυτταρικές οδούς, η στόχευσή του στη θεραπεία πληγών κρίνεται προβληματική (Hameedaldein et al. 2014) .

Κι άλλοι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο FGF, απέτυχαν να βελτιώσουν σημαντικά την επούλωση πληγών σε ασθενείς (Desjardins-Park, Foster, and Longaker 2018). Ενώ έχουν γίνει προσπάθειες ενσωμάτωσης βιοϋλικών για ελεγχόμενη απελευθέρωση αυξητικού παράγοντα (Dill and Mörgelin 2020), σημαντικές ανακαλύψεις δεν έχουν ακόμη φτάσει στην κλινική πρακτική.

Η γενική αποτυχία των θεραπειών αυξητικού παράγοντα, πιθανότατα, οφείλεται σε πολλαπλούς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένου του μικρού χρόνου ημιζωής. Ακόμη, η μοριακή ανάλυση των χρόνιων πληγών δείχνει ότι δεν υπάρχει έλλειψη αυξητικών παραγόντων στη θέση του τραύματος, αλλά μάλλον ένας υπερβολικός αριθμός φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών λόγω της απορύθμισης του φυσιολογικού κύκλου της φλεγμονής, του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης που πρέπει να συμβεί σε μια πληγή (Goldstein and Kleinman 2015).

ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ

Η φλεγμονώδης απόκριση αποτελεί μία από τις βασικές διαφορές μεταξύ της επιδιόρθωσης του δερματικού έλκους και της ανάπτυξης εμβρυϊκού δέρματος στα θηλαστικά. Όπως συζητήθηκε ανωτέρω, οι δράσεις των φλεγμονωδών κυττάρων και των κυτοκινών που απελευθερώνονται κατά την επιδιόρθωση του τραύματος συμβάλλουν στην ίνωση και στο σχηματισμό ουλώδους ιστού. Ο στόχος των κλινικών θεραπειών πρέπει να είναι η επίτευξη της βέλτιστης ισορροπίας μεταξύ της προστατευτικής

λειτουργίας της φλεγμονής και της πρόληψης υπερβολικού σχηματισμού ουλωτικού ιστού.

Ιντερλευκίνες

Οι ιντερλευκίνες είναι κυτοκίνες, σημαντικές στη χημειοταξία και την ενεργοποίηση μεσολαβητών φλεγμονωδών κυττάρων. Η ιντερλευκίνη-6 διεγείρει τη χημειοταξία των μονοκύτταρων και την ενεργοποίηση των μακροφάγων, ενώ η ιντερλευκίνη-8 προσελκύει ουδετερόφιλα και διεγείρει τη νεοαγγείωση. Η πληγή προκαλεί αύξηση της ιντερλευκίνης-6 και της ιντερλευκίνης-8, η οποία επιμένει μέχρι τις 72 ώρες στον ενήλικα αλλά εξαφανίζεται στις 12 ώρες στο έμβρυο. Τόσο η έκφραση της ιντερλευκίνης-6 όσο και της ιντερλευκίνης-8 είναι σημαντικά χαμηλότερη στους πρώιμους ινοβλάστες του εμβρύου σε σύγκριση με τους ινοβλάστες ενηλίκων. Η προσθήκη ιντερλευκίνης-6 σε εμβρυϊκές πληγές δημιουργεί ουλή σε τραύματα. Η ιντερλευκίνη-10 έχει αντιφλεγμονώδη λειτουργία μέσω της μειωμένης παραγωγής ιντερλευκίνης-6 και ιντερλευκίνης-8 (Singampalli et al. 2020; Sun et al. 2020). Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται οι μοριακοί στόχοι που έχουν διερευνηθεί για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών για την επούλωση του δέρματος.

Πίνακας 2: Μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη θεραπευτικών μέσων για την επούλωση πληγών

Μοριακοί στόχοι	Μηχανισμός	Επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα	Σκεύασμα και έκβαση
Αυξητικοί παράγοντες			
WNTs	WNT	επικοινωνία επιδερμικών κυττάρων-δερματικών ινοβλαστών -->αναγέννηση τριχοθυλακίων	δυσκολία στη σύνθεση ανασυνδυασμένων WNT
TGF-β	SMAD (canonical pathway) MAPK NOTCH	μιτογόνο δράση (μέσω ενίσχυσης), αντιϊνωτική δράση (μέσω παρεμπόδισης)	αποτυχία avotermin (ανασυνδυασμένος TGF-β3 (κλινική φάση III) / πλειοτρόπος δράση αδυναμία χειρισμού του επουλωτικού μηχανισμού

FGF-9	ενεργοποίηση και άλλων FGF, ενεργοποίηση οδού WNT2A/β catenin	νεογένεση τριχοθυλακίου	πιθανό θεραπευτικό μέσο στην επούλωση, χρειάζονται περισσότερες μελέτες
PDGF	MAPK	μιτογόνος δράση, ταχύτερο κλείσιμο πληγής	REGRANEXGel, Smith &Nephew, London, UK
Κυτοκίνες			
TNF-α		μείωση φλεγμονώδους απόκρισης (χρόνιες πληγές)	αναστολέας adalimumab (TNF-α)--> χρήζει περισσότερων κλινικών μελετών
IL	ελέγχουν την λειτουργία των ανοσοκυττάρων	IL1:ινωτική	
		IL10: αντι-ινωτική, αντιφλεγμονώδης	IL 10 (βρίσκεται στο στάδιο κλινικών δοκιμών)
Ένζυμα			
MMPs	αναδιομόρφωση ECM	μείωση ουλής κατά την επούλωση	δεν έχουν γίνει ακόμα κλινικές δοκιμές

1.5.2 Κυτταρικές Θεραπείες

Η αποτελεσματική θεραπεία πληγών απαιτεί έναν παράγοντα που να αντικατοπτρίζει το σύνθετο *in vivo* περιβάλλον των κυτταρικών τύπων και των αυξητικών παραγόντων. Μία προσέγγιση είναι η παροχή ζωντανών αλλογενών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, στη θέση του τραύματος. Αυτά τα κύτταρα δεν παραμένουν επ'αόριστον (Adler et al. 2017), αλλά χρησιμεύουν ως πηγή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών για την υποστήριξη της λειτουργίας των κυττάρων του ίδιου του ασθενούς.

Οι κυτταρικές θεραπείες χρησιμοποιούνται συχνότερα για χρόνιες πληγές, ίσως επειδή όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα κύτταρα αυτών των ασθενών μπορεί να είναι προβληματικά στην επούλωση. Θεραπείες βασισμένες σε κύτταρα, εγκεκριμένες για χρήση σε πληγές, περιλαμβάνουν ποικίλο εύρος κυττάρων: από ινοβλάστες μόνο έως ινοβλάστες μαζί με κερατινοκύτταρα ή ακόμη και πλήρως κρυοσυντηρημένο δέρμα. Μια πιο πρόσφατη εξέλιξη στην κυτταρική θεραπεία ελκών, το Graftex (Osiris Therapeutics, MD, USA), αποτελείται από κρυοσυντηρημένο ιστό πλακούντα που περιλαμβάνει και εξωκυττάρια μήτρα πλακούντα και ινοβλάστες.

1.6 Θυμοσινικά πεπτίδια

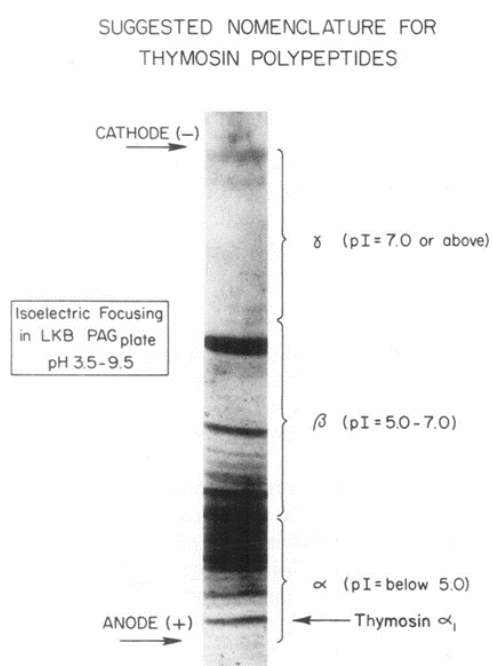
Παρά τις εξελίξεις που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, αυτές οι προσεγγίσεις δεν οδήγησαν σε ουσιαστικές αλλαγές στη φροντίδα των ασθενών. Είναι πιθανό, η περιορισμένη θεραπευτική επιτυχία ενός παράγοντα να οφείλεται στις επιδράσεις εκτός στόχου, στη δυσκολία στο σωστό χρονισμό της χορήγησής τους κατά τη διάρκεια της θεραπείας και στη δυναμική φύση της διαδικασίας της επούλωσης πληγών.

Ανάμεσα στους θεραπευτικούς στόχους, αναφέρθηκαν διάφορες κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες. Τα μόρια αυτά ορίζονται ως τροποποιητές βιολογικής απόκρισης (Biological Response Modifiers - BRMs). Μια ακόμα κατηγορία τροποποιητών βιολογικής απόκρισης που ανακαλύφθηκε στα τέλη του 20^{ου} αιώνα είναι οι θυμοσίνες. Στις ενότητες που θα ακολουθήσουν παρουσιάζονται θυμοσινικά πεπτίδια με πιθανή βιολογική ρύθμιση διεργασιών σχετικών με την επούλωση.

Ιστορική Αναδρομή

Οι μελέτες, οι οποίες τελικά οδήγησαν στην ανακάλυψη των θυμοσινών, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Abraham White. Η αρχή έγινε το 1964, όπου οι συνεργάτες του, A Goldstein και JJ Klein, κατάφεραν να παρασκευάσουν εκχύλισμα από θύμο αδένος ποντικού, αρουραίου και μοσχαριού που ενίσχυε την λεμφοποίηση και τον *in vivo* πολλαπλασιασμό κυττάρων του ανοσοποιητικού σε λεμφαδένες ποντικών. Το 1966, παρασκευάστηκε βιοδραστικό εκχύλισμα βόειου θύμου αδένος, το λεγόμενο θυμοσινικό κλάσμα 3 (Thymosin Fraction 3/TF-3) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος «θυμοσίνη», σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού αυτού του δραστικού λεμφοποιητικού παράγοντα που περιέχεται στο εκχύλισμα, από την ίδια ομάδα (Goldstein, Slater, and White 1966). Οι έρευνες συνεχίστηκαν έως το 1972, όπου ο Goldstein και οι συνεργάτες κατάφεραν να απομονώσουν ένα εκχύλισμα από βόειο θύμο αδένος, με μια διαδικασία 5 σταδίων, που το ονόμασαν θυμοσινικό κλάσμα 5 /TF-5 (Goldstein et al. 1972). Οι προκλινικές μελέτες επί των ανοσοενισχυτικών ιδιοτήτων του TF5 που ακολούθησαν έθεσαν την επιστημονική βάση για τις πρώτες κλινικές δοκιμές με TF5, το 1974. Η χορήγηση TF5 ήταν αποτελεσματική στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ορισμένων παιδιών με σύνδρομο DiGeorge και άλλες θυμικές δυσπλασίες. Αυτές οι δοκιμές οδήγησαν σε περαιτέρω ενδιαφέρον για τα δραστικά συστατικά του TF5 και για τον χημικό χαρακτηρισμό των βιολογικά ενεργών θυμοσινικών πεπτιδίων (Goldstein and Badamchian 2004).

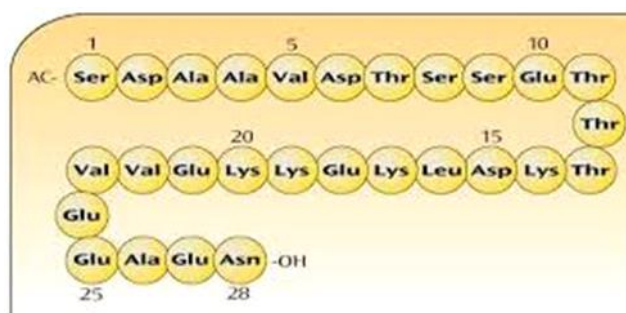
Ενώ αρχικά η θυμοσίνη θεωρήθηκε ορμόνη του θύμου αδένος και το μοναδικό συστατικό του TF5, αργότερα αποδείχθηκε ότι αποτελείται από ένα σύνολο περίπου 40 μικρών όξινων πεπτιδίων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 1 έως 15 kDa και ότι κάποια από τα πεπτίδια αυτά είναι θραύσματα μεγαλύτερων πολυπεπτιδίων που προκύπτουν υπό τις συνθήκες παρασκευής του TF5. Τα πεπτίδια του TF5 κατηγοριοποιήθηκαν βάσει του ισοηλεκτρικού τους σημείου (pI) σε θυμοσίνες α- (pI < 5 (πολύ όξινα πεπτίδια), θυμοσίνες β- (5 < pI < 7), θυμοσίνες γ- (pI > 7), ενώ βάσει της σειράς απομόνωσής τους από το TF5, καθορίζονται από αριθμητικούς δείκτες (Εικόνα 9). Δύο από τα βιολογικά δραστικά μόρια του TF5 είναι η θυμοσίνη α1 (Τα1, το πρώτο πεπτίδιο που απομονώθηκε από το TF5) και η θυμοσίνη β4 (Τβ4). Τα συγκεκριμένα μόρια έχουν αλληλουχηθεί και σήμερα παρασκευάζονται με εργαστηριακές μεθόδους είτε μέσω χημικής σύνθεσης είτε μέσω ανασυνδυασμού (Goldstein 2007).



Εικόνα 9: Ισοηλεκτρικά εστιασμένο δείγμα TF5 που δείχνει την κατανομή των περισσότερων όξινων πεπτιδίων. Οι περιοχές υποδεικνύουν την κατάτμηση του πηγματος με βάση τις περιοχές pI που προτείνονται για την ονοματολογία των πεπτιδίων. Πεπτίδια από κάθε περιοχή, που έχουν απομονωθεί και καθαριστεί, υποδεικνύονται από την ονοματολογία με ένα δείκτη που υποδηλώνει τη σειρά καθαρισμού. Μέχρι σήμερα, έχουν καθοριστεί πάνω από 20 θυμοσινικά πεπτίδια (Goldstein 2007).

1.6.1 Θυμοσίνη α1

Η θυμοσίνη α1 (Τα1) ή αλλιώς θυμαλφασίνη είναι πεπτίδιο 28 αμινοξέων (MB: 3.108 Da), η N-αμινοτελική σερίνη του οποίου είναι ακετυλιωμένη (Low and Goldstein 1985). Πρόκειται για το αμινοτελικό προϊόν πρωτεολυτικής διάσπασης της προθυμοσίνης (Haritos, Goodall, and Horecker 1984) και προέρχεται από τη διάσπαση της προθυμοσίνης από τη λυσοσωμική ασπαραγινυλική ενδοπεπτιδάση (λεγουμειΐνη) (Sarandeses et al. 2003). Η θυμοσίνη α1 είναι ένα πολύ συντηρημένο πεπτίδιο και επομένως υψηλής βιολογικής σημασίας καθώς η αλληλουχία αμινοξέων του είναι ομόλογη σε είδη βοοειδών, χοίρων, προβάτων και ανθρώπου (Schulof 1985) και παρόμοια πεπτίδια έχουν βρεθεί ακόμη και σε καρκινοειδή (Oates and Erdos 1989). Η θυμαλφασίνη, η συνθετική μορφή της Τα1, έχει δραστηριότητα παρόμοια με το φυσικό πεπτίδιο (Wang et al. 2009); Αυτή η ένωση έχει χρησιμοποιηθεί για προκλινικές και κλινικές μελέτες.



Εικόνα 10: Αμινοξική αλληλουχία του N-ακετυλιωμένου θυμοσινικού πεπτιδίου α1.

Η ενδογενής θυμοσίνη α1 είναι απαραίτητη για την ομοιοστασία του οργανισμού. Μπορεί να ανιχνευθεί στον ορό και ενώ υπάρχει μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα της, τείνει να είναι χαμηλότερη σε άτομα με ασθένεια, χαμηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες και τέλος υψηλότερη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Jevremovic et al., 1997; Sherman, Jones, Goldstein, & Naylor, 1991; Welch, Lee, Sokol, & Mutchnick, 1988; Welch, Mutchnick, Weller, & Sokol, 1987). Τα χαμηλά επίπεδα Τα1 στον ορό σχετίζονται με διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις και μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικό δείκτη. Σε περίπτωση θεραπείας με Τα1, είναι σημαντικό να γνωρίζει ο θεράπων ιατρός το βασικό επίπεδο Τα1 στον ορό του ασθενούς για τον αποτελεσματικό καθορισμό του πρωτοκόλλου θεραπείας (Pica et al. 2018). Ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Τα1 εντοπίζονται στο θύμο αδέν, το πεπτίδιο έχει επίσης ανιχνευθεί

στον σπλήνα, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στον εγκέφαλο, στο αίμα και σε έναν αριθμό άλλων ιστών. Η πηγή και οι μηχανισμοί απελευθέρωσης και ρύθμισης της κυκλοφορίας της θυμοσίνης παραμένουν άγνωστοι.

Η θυμοσίνη α1 έχει ομολογία αλληλουχίας αμινοξέων με την ιντερφερόνη άλφα (IFNα) και μέλη της οικογένειας πεπτιδίων γλυκογόνου αγγειοδραστικού εντερικού πεπτιδίου (VIP) –σεκρετίνης β (King and Tuthill 2016). Παρόλο που έχει αναφερθεί δέσμευση υψηλών συγκεντρώσεων θυμοσίνης Τα1 σε υποδοχείς VIP και έχει βρεθεί ότι διεγείρει ασθενώς τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, οι υποδοχείς για την Τα1 δεν είναι γνωστοί. Είναι πιθανό ότι η θυμοσίνη α1 έχει ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, καθώς μπορεί να αναδιπλωθεί σε δομημένη έλικα σε οργανικούς διαλύτες και επομένως να διασχίσει τη μεμβράνη χωρίς βοήθεια (Grottesi et al. 1998).

Η θυμοσίνη α1 έχει ανοσορυθμιστική δράση και σε αντίθεση με άλλα βιολογικά φάρμακα που στοχεύουν σε μεμονωμένους ανοσοποιητικούς μεσολαβητές είναι ένα πολλά υποσχόμενο μόριο λόγω της πλειοτροπικής του δράσης (Romani et al. 2012). Η πολύπλοκη παθοφυσιολογία των φλεγμονωδών ανοσοποιητικών και αυτοάνοσων νοσημάτων, από λοιμώξεις έως καρκίνο, και η εγγενής ανθεκτικότητα των έμβιων όντων έναντι διαφόρων διαταραχών είναι βασικοί παράγοντες που δυσχεραίνουν την εύρεση θεραπείας. Οποιοδήποτε επιτυχημένο φάρμακο θα πρέπει να είναι πλειοτροπικό και να αλληλεπιδρά με πολλά συστατικά του φλεγμονώδους / αυτοάνοσου καταρράκτη. Η έλλειψη σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών της θυμαλφασίνης έρχεται σε έντονη αντίθεση με άλλους σημαντικούς ρυθμιστές, όπως η ιντερφερόνη (IFN) και η ιντερλευκίνη 2 (IL-2). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες και τοξικότητες των τελευταίων φαρμάκων καθιστούν δύσκολο για τους περισσότερους ασθενείς να τα ανεχθούν.

Δεδομένων των ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων της, η θυμαλφασίνη έχει εξεταστεί για χρήση στη θεραπεία πολλών διαταραχών για τις οποίες χρησιμοποιούνται ήδη άλλοι ανοσορυθμιστές. Είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με την IFN-α η θυμαλφασίνη έχει εγκριθεί σε 37 χώρες με το εμπορικό όνομα Zadaxin (SciClone Pharmaceuticals). Έχει χρησιμοποιηθεί παγκοσμίως ως ανοσοενισχυτικό ή ανοσοθεραπευτικό μέσο για τη θεραπεία ποικίλων ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων ιογενών λοιμώξεων (ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα C, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS)) (Andreone et al. 2004; You et al. 2006), ενώ στην Ευρώπη και την Αμερική βρίσκεται στο τελικό στάδιο έγκρισης για την θεραπεία της ηπατίτιδας C και του μελανώματος (Carraro et al. 2012; Goldstein and Goldstein 2009). Έχει χρησιμοποιηθεί ακόμα ως παράγοντας ενίσχυσης εμβολίων.

Ακόμη, πραγματοποιούνται μελέτες και άλλες ολοκληρωμένες δοκιμές σε μια σειρά ασθενειών και διαταραχών όπως το σηπτικό σοκ, το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, η περιτονίτιδα, η οξεία μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό, η φυματίωση, το βαρύ, οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (severe acute respiratory syndrome: SARS) και οι μολύνσεις των πνευμόνων σε κρίσιμα νοσήματα. Το φάσμα των ασθενειών, στις οποίες η θεραπεία με θυμοσίνη α1 μπορεί να είναι επωφελής, αυξάνεται συνεχώς όπως επιβεβαιώνεται από τα πολύ πρόσφατα ευρήματα για τη σκλήρυνση κατά πλάκας και την κυστική ίνωση (Romani et al. 2017).

Βιολογικές Δράσεις

Ανοσοτροποποιητική δράση

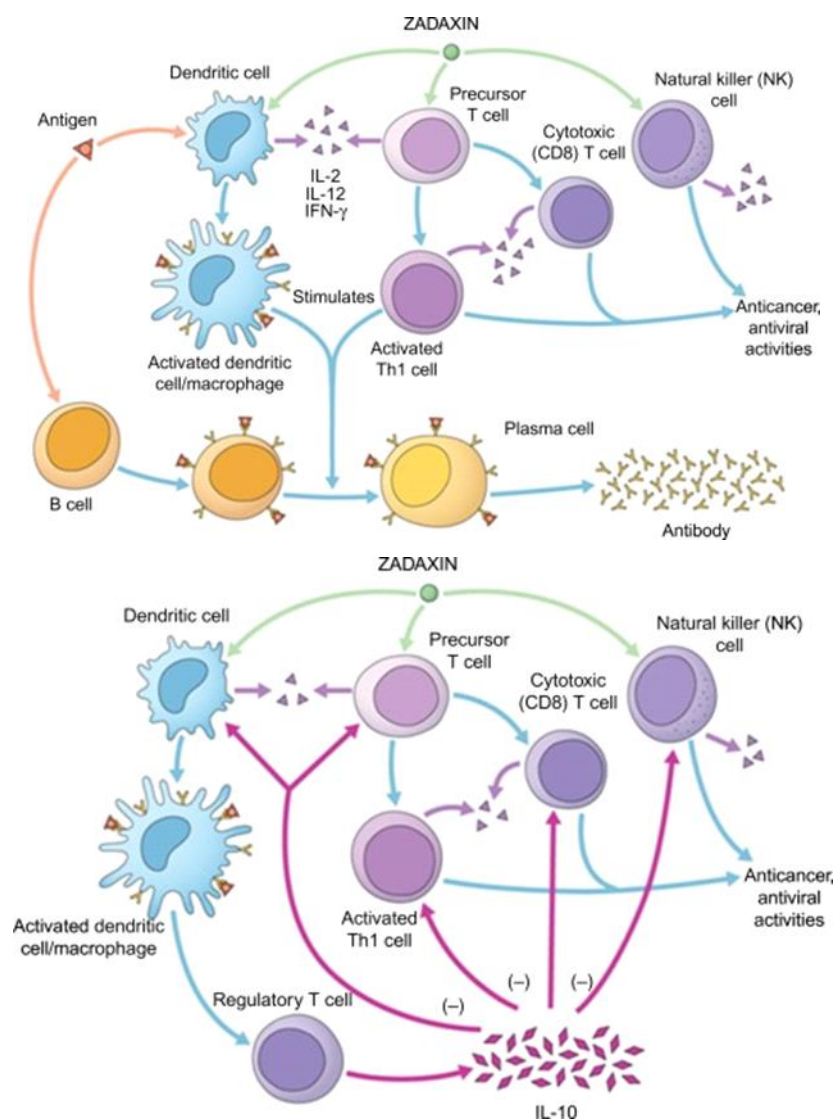
- **Η θυμαλφασίνη διεγείρει τα βλαστικά κύτταρα και αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων NK, CD4 και CD8.**

Η Τα1 διεγείρει τα βλαστικά κύτταρα να παράγουν αυξημένο αριθμό ώριμων T κυττάρων. Η προσθήκη θυμαλφασίνης σε καλλιέργεια ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων CD34 αύξησε τη θυμοποίηση με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των συνολικών CD3 T κυττάρων και τη σύνθεση της ιντερλευκίνης-7 (IL-7), μιας κυτοκίνης κρίσιμης για την ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Ο κυρίαρχος υποπληθυσμός που αυξήθηκε ήταν τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (CD4) (Hadden et al. 1995). Ακόμη, μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή κυττάρων CD3, CD4 και CD8 σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B και καρκίνο, σε μύες μολυσμένους με ιό γρίπης A (D'Agostini et al. 1996) και σε ανοσοκατασταλμένους μύες υπό θεραπεία υδροκορτιζόνης (Hadden et al. 1995). Η Τα1 αυξάνει τη δράση των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killers: NK) σε πολλά ζωικά μοντέλα (Di Francesco et al. 1992; Mastino et al. 1992), σε υγιή άτομα, και σε ασθενείς με λοίμωξη HIV. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι σημαντικό για την καταπολέμηση της ιογενούς λοίμωξης, καθώς η μόλυνση από ηπατίτιδα C έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα των NK.

- **Η θυμαλφασίνη αυξάνει την παραγωγή κυτοκινών Th1.**

Η Τα1 μπορεί να αυξήσει την παραγωγή των IFN γ , IL-2, IL-3 και την έκφραση του υποδοχέα IL-2 μετά από ενεργοποίηση από μιτογόνα ή αντιγόνα. Αυτό το μοτίβο αυξημένης παραγωγής κυτοκινών, δηλαδή IFN γ και IL-2, καταδεικνύει ότι η θυμαλφασίνη προάγει την ανοσοαπόκριση τύπου Th1. Το σημαντικό είναι ότι μια

απόκριση Th1 σχετίζεται με έντονη αντιική απόκριση, ενώ μια απόκριση Th2 σχετίζεται με την επιμονή αυτών των λοιμώξεων. Η θυμαλφασίνη μειώνει επίσης την απόπτωση των T-κυττάρων. Μπορεί να ανταγωνιστεί την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση στα θυμοκύτταρα *in vitro* με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.



Εικόνα 11: Ανοσοτροποποιητική και ανοσοτροποποιητική δράση της θυμοσίνης α1 (εμπορικό σκεύασμα Zadaxin)

Άμεση αντιική δράση

Η θυμοσίνη α1 αυξάνει την έκφραση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης 1 (MHC 1). Δεδομένου ότι τόσο η λοίμωξη από τον ιό όσο και ο καρκίνος σχετίζονται με μείωση της έκφρασης του αντιγόνου MHC 1 και ως εκ τούτου μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει αυτές τις μολύνσεις ή τους καρκίνους, αυτό αντιπροσωπεύει έναν άλλο μηχανισμό με τον οποίο η θυμαλφασίνη μπορεί να στοχεύσει τα ελαττωματικά κύτταρα. Παρόλο που και η IFNα μπορεί επίσης

να οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης MHC 1, αποδείχθηκε ότι αυτά τα δύο ανοσορρυθμιστικά μόρια, Τα1 και IFN α , δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

Η αύξηση της έκφρασης του MHC 1 βρέθηκε να οφείλεται στην επίδραση της θυμάλφασίνης στην έκφραση του μεταγραφικού ενεργοποιητή NF- κ B. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η επίδραση στην έκφραση του NF κ B θα μπορούσε να εξηγήσει τα πλειοτροπικά αποτελέσματα της θυμοσίνης α 1, καθώς αυτό το μόριο εμπλέκεται σε πολλές οδούς δράσης της Τα1, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης των κυτοκινών Th1, της αναστολής της απόπτωσης και της αναστολής της αντιγραφής του ιού. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού NF- κ B θα μπορούσε επομένως να είναι μια σημαντική βάση για τον μηχανισμό δράσης του Zadaxin.

Μείωση οξειδωτικού στρες

Η θεραπεία με θυμάλφασίνη μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες τόσο σε μολυσμένα από ιό κύτταρα όσο και σε λεμφοκύτταρα που διεγείρονται για απόπτωση. Αυτές οι επιδράσεις είναι σημαντικές άμεσες δράσεις του Zadaxin, καθώς το οξειδωτικό στρες και η μείωση των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης είναι ορόσημα της ιογενούς λοίμωξης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στην πραγματικότητα, η αποκατάσταση των επιπέδων γλουταθειόνης έχει αποδειχθεί ότι μειώνει δραματικά τον ιικό πολλαπλασιασμό και βελτιώνει την κλινική κατάσταση.

Ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού

Λόγω της ικανότητάς της να προάγει την παραγωγή IFN τύπου I και να ενεργοποιεί τα CD8 T-κυττάρα, η θυμοσίνη α 1 έχει προταθεί για τη θεραπεία ή την πρόληψη αναπνευστικών ιογενών λοιμώξεων και ως ανοσοενισχυτικό στον εμβολιασμό κατά της γρίπης των ηλικιωμένων και των ασθενών αιμοκάθαρσης. Κατά τη διάρκεια της πανδημικής επιδημίας της γρίπης H1N1, το 2009, η θυμοσίνη α 1 παρείχε μεγαλύτερη απόκριση στο εμβόλιο σε μια κλινική μελέτη με το μονοσθενές εμβόλιο H1N1 Focetria[™] MF59. Είναι ενδιαφέρον ότι η χρήση της Τα1 είχε μελετηθεί στο βαρύ οξύ αναπνευστικό συνδρόμο, γνωστό ως SARS (Kumar, Jung, and Liang 2013).

Με τη μείωση του ποσοστού θνησιμότητας και της συχνότητας εμφάνισης δευτερογενών λοιμώξεων, η θυμοσίνη α 1 έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενη και στη θεραπεία της σήψης (Pei, Guan, and Wu 2018). Δεν προκαλεί έκπληξη συνεπώς το γεγονός ότι η θυμοσίνη α 1 συμπεριλήφθηκε σε μια πρόσφατη τυχαioποιημένη, ανοιχτή, ελεγχόμενη

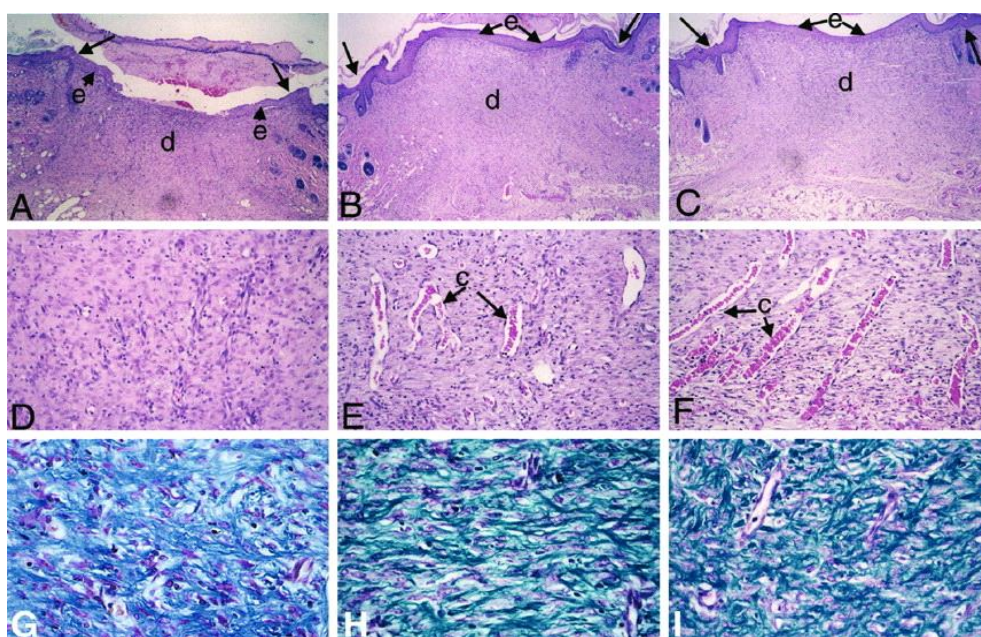
δοκιμή σε συνδυασμό με δαρουναβίρη / κομπικιστάτη ή λοπιναβίρη στη θεραπεία της ασθένειας κορωνοϊού 2019 (Corona virus disease 2019: COVID-19). Λόγω της ικανότητας της να διατηρεί ανοσοποιητική ομοιόσταση, ενεργοποιώντας το ανοσογόνο μονοπάτι του καταβολισμού τρυπτοφάνης μέσω του ανοσορρυθμιστικού ενζύμου ινδολαμίνη 2,3-διοξυγενάση 1, η Τα1 συγκεκριμένα παρείχε ενισχυμένη ανοσολογική ανοχή σε νοσούντες πνεύμονες, σπάζοντας τον φαύλο κύκλο που συνδέει τη χρόνια πνευμονική φλεγμονή και τις λοιμώξεις (Romani et al. 2017).

Έτσι, η Τα1 αντιπροσωπεύει ένα ιδανικό υποψήφιο φάρμακο που, όπως προτείνεται (Yufang Shi et al. 2020), θα ενισχύει την ανοσία στο πρώιμο στάδιο της λοίμωξης SARS-CoV-2 και θα προωθεί την ανοσολογική ανοχή και την ομοιόσταση ιστού στο βαρύ αναπνευστικό στάδιο. Πράγματι, σε μεταγενέστερη μελέτη φάνηκε πως η Τα1 μειώνει σημαντικά τη θνησιμότητα ασθενών σε βαρύτερες περιπτώσεις. Οι ασθενείς με COVID-19 με αριθμό CD8 T-κυττάρων ή CD4 T-κυττάρων στην κυκλοφορία λιγότερο από 400/μL ή 650/μL, αντίστοιχα, επωφελήθηκαν περισσότερο από την Τα1 (Liu et al. 2020)

Θυμοσίνη α1 στην επούλωση

Ενώ τα θυμοσινικά πεπτίδια μελετώνται εκτενώς από ερευνητικές ομάδες για τη δράση τους στην επούλωση πληγών, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη δράση της θυμοσίνης α1 είναι ελάχιστα και χρονολογούνται πίσω, στο 1998. Συγκεκριμένα, οι Malinda και οι συνεργάτες στην ερευνητική ομάδα των Goldstein και Kleinman χρησιμοποίησαν μοντέλο διάτρησης για την πρόκληση πληγών σε αρουραίους και έδειξαν πως η χορήγηση θυμοσίνης α1 είτε ενδοπεριτοναϊκά είτε τοπικά επιταχύνει την επούλωση πληγών. Επιπλέον, έδειξαν ότι η θυμοσίνη α1 προάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και κερατινοκυττάρων *in vivo* και ότι προάγει την αγγειογένεση *in vivo* (κατάθεση ευρεσιτεχνίας). Στην εικόνα ιστού που δημοσίευσαν, παρατήρησαν αυξημένη ποσότητα κολλαγόνου σε σχέση με τον μάρτυρα, γεγονός που απέδωσαν σε αύξηση της συστολής, χωρίς όμως να διεξάγουν περαιτέρω πειράματα γι' αυτό το εύρημα.

Τα *in vitro* πειράματα της ομάδας εξέτασαν την επίδραση της Τα1 στη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων της κυτταρικής σειράς HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) καθώς και στη μετανάστευση κυττάρων HUVEC *in vitro* και *in vivo*. Η Τα1 φάνηκε να ενισχύει το σχηματισμό δομών σωληναριακού τύπου από κύτταρα HUVEC που καλλιεργήθηκαν σε υλικό Matrigel.



Εικόνα 12: Επίδραση θυμοσίνης α1 στην επούλωση δερματικών πληγών αρουραίων (8^η ημέρα). Ιστολογικές τομές, αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Τα βέλη υποδηλώνουν τον ιστό που δέχεται επιδιόρθωση. Α. Ένα τραύμα ελέγχου χωρίς θεραπεία με επιθηλιακή απώλεια και γειτονικά εστιακά εκτεταμένο στρώμα ουδετερόφιλων / ηωσινοφίλων. Η επιθηλιακή μετανάστευση και το υπερπλαστικό επιθήλιο είναι ορατά δίπλα στο τραύμα, Β. πλήρης επανεπιθηλίωση της πληγής με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Ta1 (60mg / 300ml σε εναλλασσόμενες ημέρες). Ο κοκκιώδης ιστός διηθείται από μεγάλο αριθμό κυττάρων και μέτριο αριθμό αγγείων, C. η τοπική αγωγή (5mg/50ml) οδήγησε σε πλήρη επανεπιθηλίωση του τραύματος με 2 έως 3 στρώματα παχιάς επιδερμίδας. Οι περιοχές της δερμίδας παρουσιάζουν κοκκιώδη ιστό που διηθείται από ινοβλάστες και εκτεταμένη νεοαγγείωση, D-F. η δερμίδα κοντά στη δερμική-επιδερμική σύνδεση, D.έλεγχος, που δείχνει λίγα κύτταρα κοντά στο χόριο και λίγη νεοαγγείωση, E. ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Ta1 και F.η τοπική εφαρμογή οδήγησε σε ανάπτυξη τριχοειδών στον κοκκιώδη ιστό και την υπερκυτταρική δερμίδα. Η νεοαγγείωση είναι πιο εκτεταμένη σε τοπικώς θεραπευόμενες πληγές σε σύγκριση με τις πληγές με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση G-I. η χρώση δείχνει το κολλαγόνο σε μπλε και τα ενδοθηλιακά κύτταρα με κόκκινο χρώμα. Η Ta1, ανεξαρτήτως του τρόπου χορήγησης, ενίσχυσε τη σύνθεση κολλαγόνου σε σύγκριση με τον μάρτυρα (G) (Malinda et al. 1998).

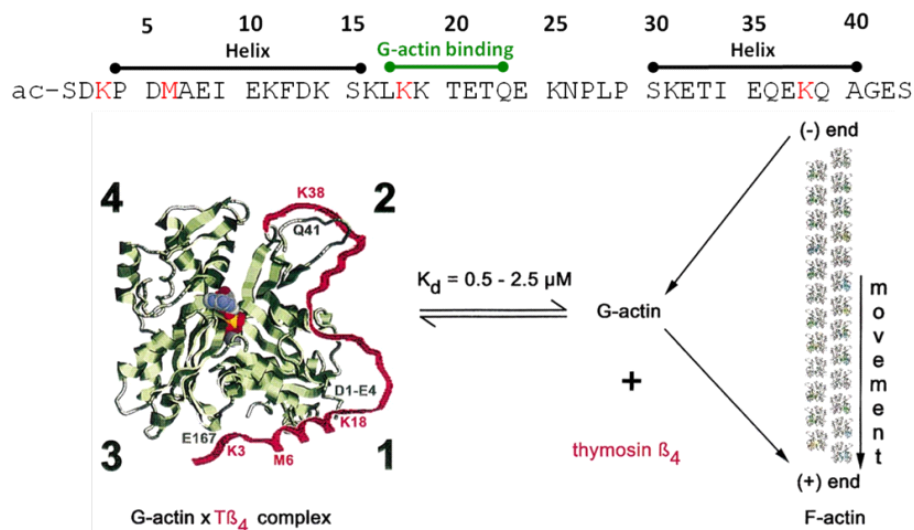
1.6.2 Θυμοσίνη β4

Οι β-θυμοσίνες αποτελούν μια οικογένεια από δομικά σχετιζόμενες, πολύ συντηρημένες αλληλουχίες αμινοξέων από τα θηλαστικά έως και τα εχινόδερμα. Από τα 16 γνωστά μέλη της οικογένειας, η θυμοσίνη β4 (Τβ4), η θυμοσίνη β10 (Τβ10) και η θυμοσίνη β15 (Τβ15) έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο. Παρά την ομολογία στη δομή (43-44 αμινοξικά κατάλοιπα), αυτά τα τρία όξινα πολυπεπίδια προέρχονται από διαφορετικά γονίδια και έτσι είναι βιοχημικά και λειτουργικά διακριτά μόρια.

Δομή και Λειτουργία Τβ4

Η θυμοσίνη β4 είναι ένα μικρό, ενδοκυτταρικό πεπτίδιο 43 αμινοξέων (5 kDa) που απομονώθηκε για πρώτη φορά από ιστό βόειου θύμου αδένος. Έχει ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 5,1 (ελαφρώς όξινο) και είναι υδατοδιαλυτή. Αν και σε μεγάλο βαθμό μη δομημένη σε νερό, η φασματοσκοπική ανάλυση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) δείχνει ότι η Τβ4 τείνει να σχηματίζει α-έλικες σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν φθοριωμένες αλκοόλες. Οι δύο έλικες που σχηματίζονται περιλαμβάνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα 4-16 και 30-40. Αυτό το βιολογικά ενεργό πεπτίδιο υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις (έως 500 μM) σχεδόν σε κάθε κυτταρικό τύπο θηλαστικών, εκτός των ερυθροκυττάρων (Treadwell et al. 2012). Συναντάται επίσης σε όλα τα υγρά του σώματος όπως τα δάκρυα, το σάλιο, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τα υγρά πλεγμών (Badamchian et al. 2007; Huang et al. 2006). Η συγκέντρωση θυμοσίνης β4 στα κύτταρα κυμαίνεται από 5nM έως 600nM, με τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα να έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Τόσο τα αιμοπετάλια όσο και τα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν Τβ4 στο υγρό του τραύματος, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να φτάνει μέχρι και 2.6 μM (Fromm M, Gunne H, and Bergman AC 1996).

Η Τβ4 είναι γνωστή ως η κύρια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη δέσμευσης της G-ακτίνης όπως διαπιστώθηκε αρχικά σε ανθρώπινα αιμοπετάλια. Η Τβ4 βρέθηκε να σχηματίζει σύμπλοκο με τη G-ακτίνη σε αναλογία 1:1 και επομένως να αναστέλλει έτσι τον αυθόρμητο πολυμερισμό της G-ακτίνης μέσω στερικής παρεμπόδισης. Σε μοριακό επίπεδο, το μοτίβο ακολουθίας LKKTETQEK έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες πως σχετίζεται άμεσα με τη δέσμευση G-ακτίνης. Περαιτέρω αναλύσεις NMR κατέδειξαν ότι για τη δέσμευση και την απομόνωση της G-ακτίνης, το N-αμινοτελικό άκρο της θυμοσίνης β4 πρέπει να σχηματίσει μια α-έλικα (Εικόνα 13) .



Εικόνα 13: Μοριακή δομή της θυμοσίνης β4 (Tβ4). Η Tβ4 είναι ένα πεπτίδιο 5 kDa με 43 αμινοξικά κατάλοιπα. Παρουσιάζονται οι τρεις κύριοι τομείς της, οι δύο α-έλικες που εκτείνονται από τα κατάλοιπα 4 – 16 και 30 - 40 και το μοτίβο «LKKTTETQEΚ» που δεσμεύει την G-ακτίνη. Μέσω της στερικής παρεμπόδισης, η Tβ4 αναστέλλει τον αυθόρμητο πολυμερισμό των μονομερών G-ακτίνης (Huff et al. 2002).

Tβ4 στη φυσιολογική επούλωση πληγών του δέρματος

Η πρώτη μελέτη που αναφέρθηκε στην επιδιορθωτική δράση της Tβ4 πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους (Malinda et al. 1999). Στο παρελθόν, είχε βρεθεί ότι προάγει την αγγειογένεση και ότι περιέχεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα αιμοπετάλια (Grant et al. 1995; Hannapel and van Kampen 1987; Malinda, Goldstein, and Kueinman 1997; Philp, Badamchian, et al. 2003). Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια είναι τα πρώτα κύτταρα που εισέρχονται στην πληγή γίνεται σαφές ότι η Tβ4 θα έπρεπε να δοκιμαστεί σε δερματικές πληγές σε ένα ζωικό μοντέλο (Malinda et al. 1999, 1997; Philp, Badamchian, et al. 2003). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως ο ορός της πληγής έχει συγκέντρωση Tβ4 έως 13μg/ml, κυρίως λόγω της απελευθέρωσης από κατεστραμμένα αιμοπετάλια. Στην πρώτη δερματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πληγές δέρματος, πλήρους πάχους 8mm, σε αρουραίους (Malinda et al. 1999), βρέθηκε ότι η Tβ4 σε συγκέντρωση 5μg ανά 50μL φυσιολογικού ορού, ρυθμισμένου με φωσφορικά άλατα.

- επιταχύνει το κλείσιμο του τραύματος
- αυξάνει την αγγειογένεση και
- επιταχύνει την εναπόθεση κολλαγόνου

Η Τβ4 εφαρμόστηκε μόνο τη στιγμή του τραύματος και στις 48 ώρες από τη στιγμή που σχηματίστηκε το ινώδες. Ορατή μακροσκοπική βελτίωση παρατηρήθηκε στην ομάδα που υποβλήθηκε σε αγωγή μέχρι την 4η ημέρα. Η μελέτη διαπίστωσε επίσης ότι η Τβ4 προήγαγε τη μετανάστευση κερατινοκυττάρων *in vitro*, με δραστικότητα στο εύρος των pg/ml. Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν σε διάφορα πρόσθετα ζωικά μοντέλα (Πίνακας 3) και οδήγησαν στις κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με χρόνια έλκη (Πίνακας 4).

Αν και η θυμοσίνη β4 είναι ένα μικρό μόριο, φαίνεται ότι έχει ένα ευρύ φάσμα αναγεννητικών δραστηριοτήτων, ενώ συγκεκριμένες θέσεις στο μόριο της φαίνεται πως είναι υπεύθυνες για τις ιδιότητες αυτές (Goldstein and Kleinman 2015; Sosne et al. 2010). Και οι χημικώς συνθεθειμένες και οι ανασυνδυασμένες μορφές της έχουν δείξει αποτελεσματικότητα ως προς τη δερματική επούλωση σε προκλινικά μοντέλα και σε δοκιμές σε ασθενείς (Ehrlich and Hazard 2012; Kim and Kwon 2014, 2015; Malinda et al. 1999; Philp, Badamchian, et al. 2003; Philp et al. 2006; Philp and Kleinman 2010; Ti et al. 2015; Treadwell et al. 2012). Μια διμερής μορφή φαίνεται πως επιταχύνει το ρυθμό της δερματικής επούλωσης σε ζωικό μοντέλο πιο γρήγορα από αυτόν του αρχικού μορίου (Xu et al. 2013).

Η θυμοσίνη β4 επιδεικνύει επιδιορθωτική και αναγεννητική δραστικότητα και σε τραυματισμούς σε μια πληθώρα ιστών πέραν του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί μοντέλα όπως εγκεφαλική βλάβη, τραυματισμός του νωτιαίου μυελού, εγκεφαλικό επεισόδιο, ένα μοντέλο πολλαπλής σκλήρυνσης, ισχαιμικά άκρα και καρδιακή βλάβη λόγω ισχαιμίας (Bock-Marquette et al. 2004; Cheng et al. 2014; Morris et al. 2010; Philp and Kleinman 2010; Smart et al. 2007, 2011; Sopko et al. 2011; Wei et al. 2014; Xiong et al. 2011; Zuo et al. 2013).

Πίνακας 3: Προκλινικές μελέτες για τη δράση της θυμοσίνης β4 στην επούλωση ελκών του δέρματος.

Μοντέλο	Δόση	Αποτέλεσμα	Μηχανισμός	Αναφορές
Αρουραίος: Ένθεμα δέρματος	5mg/kg 2x ημέρα 7 ημέρες	παραμονή ενθέματος	↑VEGF, μαλονδιαλδεΐδη ↓SOD	(Lin et al. 2015)
Μυς: Έγκαυμα	5.3 mg/kg διαδερμικά - x εβδομάδα	↑ταχύτητα επούλωσης αγγειογένεση	αυξημένη αναδιαμόρφωση ακτίνης	(Kim and Kwon 2014)

	2 εβδομάδες	HSP 70		
Μυς: Έγκαυμα διαβήτης	5mg/kg διαδερμικά 2x εβδομάδα, 2 εβδομάδες	↑κλείσιμο πληγής ↑αγγειογένεση ↑κοκκίωση	↓RAGE	(Kim and Kwon 2014)
Αρουραίος: Ισχαιμία κάτω άκρων Διαβήτης	Tβ4 σε σπόγγο κολλαγόνου – χιτοσάνης 21 ημέρες	↑αγγειογένεση ↑επούλωση	↓TNF, IL ↑VEGF, PDGF ↑αγγειογένεση	(Ti et al. 2015)
Αρουραίος: Πληγή	ανασυνδυασμένο Διμερές 0.25, 0.125 mg/ml 2x την ημέρα 21 ημέρες	↑αγγειογένεση ↑επούλωση	↑μετανάστευση	(T. J. Xu et al. 2013)
Μύες: Πληγή	Ανασυνδυασμένη Tβ4 5μg/50μl Τοπικά την ημέρα 0 και 2	↑επούλωση	↑μετανάστευση	(Li et al. 2007)
Αρουραίος: Πληγή	5μg/50μl τοπικά Ημέρα 0 & 2	↑αγγειογένεση ↑επούλωση	↑μετανάστευση	(Philp, Huff, et al. 2003)
Αρουραίος: Πληγή	60μg ενδοπεριτοναϊκά Ημέρα 0 & 2	↑επούλωση	↑μετανάστευση	(Malinda et al. 1999)

Πίνακας 4: Κλινικές μελέτες της θυμοσίνης β4 στην επούλωση ελκών του δέρματος.

Τύπος έλκους	Ασθενείς	Διάρκεια μελέτης (ημέρες)	Βέλτιστη δόση	Αποτέλεσμα
Έλκη κατάκλισης	72	84	0.02	τάση επούλωσης, μη στατιστικά σημαντική
Φλεβικά έλκη	72	84	0.03	τάση επούλωσης, μη στατιστικά σημαντική
Πομφολυγώδης επιδερμόλυση	28	56	0.03	τάση επούλωσης, μη στατιστικά σημαντική

Δράση της θυμοσίνης β4 στην επούλωση πληγών

Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση της δράσης της θυμοσίνης β4 στην πληγή οι Kleinman και Sosne συνοψίζουν τη δράση της Τβ4 στους εξής τρεις πυλώνες: Προστασία, επιδιόρθωση και αναγέννηση (H. K. Kleinman and Sosne 2016):

.Προστασία

Αντιαποπτωτική και αντιφλεγμονώδη δράση

Η προστασία που παρέχει η Τβ4 είναι λόγω της αντιφλεγμονώδους και της αντιαποπτωτικής δράσης της στον τραυματισμένο ιστό, προστατεύοντας τον ιστό από περαιτέρω βλάβη (Ho et al. 2008; Sosne et al. 2002, 2004). Σε ινοβλάστες ούλων υπό την επίδραση TNF-α, η Τβ4 μείωσε την έκκριση IL-8, ενώ προστάτεψε τα κύτταρα από απόπτωση λόγω TNF-α και χλωρεξιδίνης.

Αντικυτταροτοξική δράση

Άμεσες μελέτες σχετικά με την τοξικότητα με χρήση γλουταμινικού, βενζαλκονίου και αιθανόλης έχουν καταδείξει τα αντικυτταροτοξικά αποτελέσματα του Τβ4 (Poroli et al. 2007; Sosne et al. 2010).

Αντιοξειδωτική Δράση

Η υποξία στην πληγή αυξάνει επίσης την έκφραση της Τβ4. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τις μορφές ενεργού οξυγόνου (ROS) σε ορισμένα κύτταρα, και αυτό θα μπορούσε επίσης να συμβαίνει και κατά τη δερματική επούλωση (Ho et al. 2008; Kumar and Gupta 2011; Wei et al. 2012).

.Επιδιόρθωση

Μετανάστευση

Κατά τη φάση πολλαπλασιασμού της δερματικής επούλωσης, η Τβ4 προάγει τη μετανάστευση διαφόρων κυττάρων στην πληγή, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των κερατινοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και αποθέτουν τον κοκκιώδη ιστό. Η Τβ4 αυξάνει τη μετανάστευση κερατινοκυττάρων μέσω του κοκκιώδους ιστού που είναι σημαντικό για την αποκατάσταση ενός φραγμού για την πρόληψη της απώλειας υγρών και της μόλυνσης. Διεγείρει επίσης την αγγειογένεση που βοηθά στην προστασία της πληγής αφαιρώντας τα θραύσματα και αυξάνοντας τα θρεπτικά συστατικά για επιδιόρθωση (Grant et al. 1995; Malinda et al. 1999, 1997). Τα βλαστικά κύτταρα πιθανώς στρατολογούνται στο δερματικό τραύμα και διαφοροποιούνται όπως φαίνεται σε μοντέλα τραυματισμού άλλων ιστών (Hinkel et al. 2008; Kupatt, Bock-Marquette, and Boekstegers 2008; Philp et al. 2004).

Κολλαγόνο

Η θυμοσίνη β4 αυξάνει την εναπόθεση και το ρυθμό σύνθεσης κολλαγόνου και προάγει την καλύτερη οργάνωση κατά το σχηματισμό των ινών κολλαγόνου (Ehrlich and Hazard 2012; Malinda et al. 1999).

Αύξηση γονιδιακής έκφρασης

Η Τβ4 αυξάνει σημαντικές πρωτεΐνες για την επούλωση πληγών, συμπεριλαμβανομένων της λαμινίνης-332, των αυξητικών παραγόντων HGF και VEGF και διαφόρων φλεγμονωδών μεσολαβητών, κ.λπ. (Jo et al. 2010; Sosne et al. 2004, 2005, 2007).

Μικρότερος σχηματισμός ουλής

Η φυσιολογική ουλή περιέχει λίγους ινοβλάστες και καθόλου μυοϊνοβλάστες. Αντίθετα μια υπερτροφική ουλή περιέχει μυοϊνοβλάστες που δεν υπέστησαν απόπτωση. Η Τβ4 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το σχηματισμό μυοϊνοβλαστών και αυτό πιθανώς εξηγεί την ικανότητά να μειώνει το σχηματισμό ίνωσης / ουλής (Ehrlich and Hazard 2010, 2012). Η Τβ4 φαίνεται πως δρα, διαταράσσοντας τους μικροσωληνίσκους και παρεμβαίνοντας στη σηματοδοτική οδό TGF-β/SMAD. Ακόμη, σε ινοβλάστες χηλοειδών φαίνεται πως η θυμοσίνη β4 υποεκφράζεται (Nie, Wu, and Qin 2005). Έχει περιγραφεί ότι συγκεκριμένα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) επάγουν την έκφραση θυμοσίνης β4 με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο και τη συγκέντρωση και επομένως μπορεί να

έχουν θέση στη θεραπεία της παθολογικής ουλής(Jain et al. 2004).

. Αναγέννηση

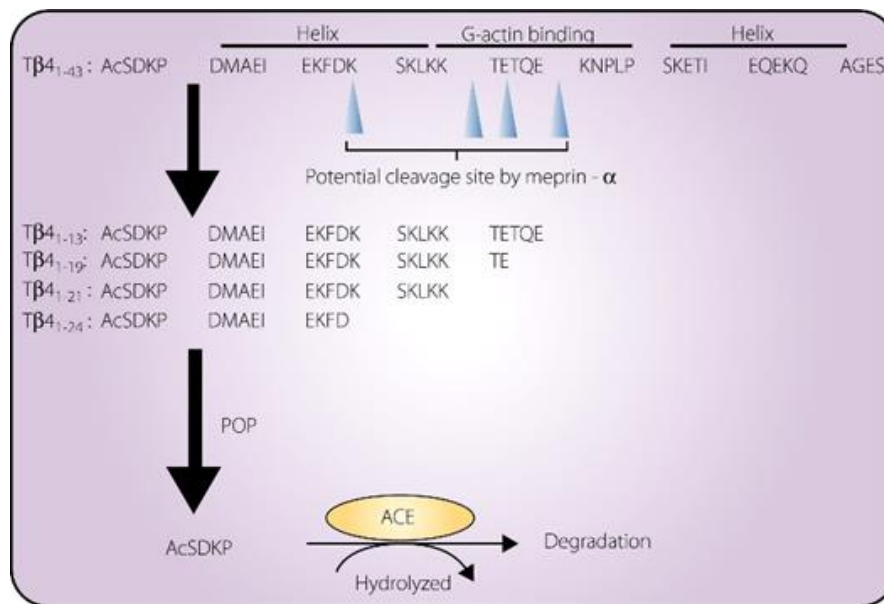
Κατά τη διάρκεια της φάσης της αναδιαμόρφωσης, η Τβ4 δρα για την καλύτερη οργάνωση των ινών κολλαγόνου και πιθανώς μειώνει το σχηματισμό ουλών. Διάφορες μελέτες σε μη δερματικούς ιστούς έδειξαν ότι η Τβ4 και το αμινοτελικό πεπτίδιο AcSDKP όχι μόνο αποτρέπουν την ινωτική κατάσταση αλλά επίσης την αναστρέφουν (Castoldi et al., 2013; Cavasin, 2006; Cavasin, Liao, Yang, Yang, & Carretero , 2007; Gonzalez et al., 2014; Wang, Liu, Jia, Mu, & Xie, 2010; Zuo et al., 2013). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι προάγει την ανάπτυξη των μαλλιών σε διάφορα ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων των αρουραίων, των ποντικών, των ηλικιωμένων ποντικών και των ποντικών με τριχόπτωση που προκαλείται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Goldstein et al. 2012; Goldstein and Kleinman 2015; Philp et al. 2004). Τα ποντίκια που υπερεκφράζουν Τβ4 έχουν επίσης αυξημένη ποσότητα τριχών και τα ποντίκια που δεν εκφράζουν την Τβ4 εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη των τριχών (Cha et al. 2010; Gao et al. 2015b).

1.6.3 Θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP

Δομή

Πρόκειται για το αμινοτελικό 1-4 άκρο της θυμοσίνης Tβ4 με αμινοξική αλληλουχία Acetyl Ser-Asp-Lys-Pro-OH που απομονώθηκε πρώτη φορά από βόειο εμβρυϊκό μυελό των οστών. Αν και η μοριακή οδός της ενδογενούς σύνθεσης AcSDKP δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, η θυμοσίνη β4 είναι ο ισχυρότερος υποψήφιος ως πρόδρομο μόριο για το AcSDKP (Hannappel 2010). Το AcSDKP προκύπτει από τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του τέταρτου και πέμπτου αμινοξέος της Tβ4 που καταλύεται από την πρωτεάση σερίνης, προλυλ-ολιγοπεπτιδάση (Prolyl-OligoPeptidase, POP). Είναι ενδιαφέρον ότι σε μύες με ανεπάρκεια Tβ4 στους νεφρούς και την καρδιά, αν και τα επίπεδα AcSDKP ήταν σαφώς μειωμένα, αυτά δεν εξαλείφθηκαν πλήρως. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι ομόλογα πεπτίδια της Tβ4 (όπως το Tβ15) θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν την απουσία θυμοσίνης β4.

Στη διαδικασία σύνθεσης AcSDKP από την Tβ4, πρόσφατες μελέτες προτείνουν την αναγκαία επιπρόσθετη ενζυμική διάσπαση. Οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στη βιολογία της POP. Η POP μπορεί να διασπάσει ένα πεπτίδιο που είναι βραχύτερο από την αλληλουχία 30 αμινοξέων. Ως εκ τούτου, θεωρητικά, θα πρέπει να προηγείται μια επιπλέον διαδικασία ενζυμικής διάσπασης. Φαίνεται ότι η μεπρίνη-α επιτελεί αυτή τη διάσπαση και στη συνέχεια επιτρέπει στην POP να διασπάσει θραύσματα Tβ4 για να συνθέσει το AcSDKP (Kumar et al. 2016). Από την άλλη πλευρά, το AcSDKP αποδομείται από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) (Εικόνα 14) ((Rasoul et al. 2004).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης και αποδόμησης του AcSDKP (Kanasaki 2020b).

Δράση

Το AcSDKP εντοπίζεται ευρέως σε όργανα θηλαστικών, πλάσμα, ούρα και μονοκύτταρα κύτταρα (Mora et al. 2014). Μια από τις πρώτες βιολογικές δράσεις που αποδόθηκαν στο τετραπεπτίδιο ήταν η αναστολή του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού όπως προέκυψε από *in vitro* μελέτες που έγιναν σε βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα βόειου εμβρυϊκού μυελού των οστών (Kanasaki 2020a).

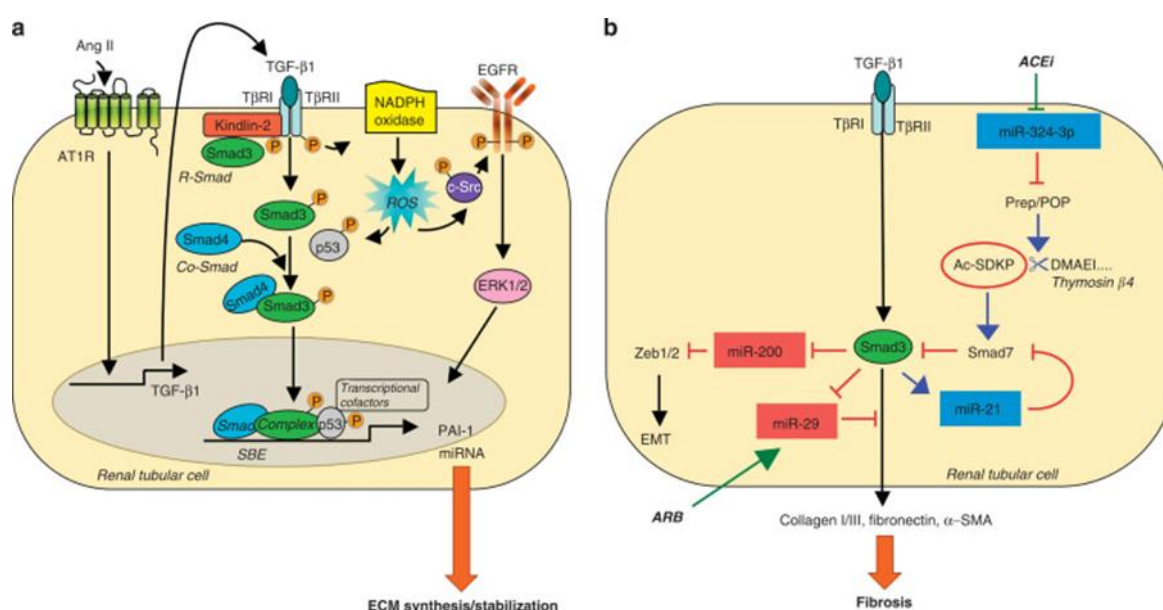
Το AcSDKP παρέχει την αντι-ινωτική δράση της θυμοσίνης β4 όπως προσδιορίζεται *in vivo* και την αντιφλεγμονώδη δράση όπως προσδιορίζεται *in vitro* (Cavasin 2006; Sosne et al. 2010). Διάφορες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι μπορεί να αντιστρέψει την ίνωση στην καρδιά και τα νεφρά (Castoldi et al. 2013; Cavasin 2006; Cavasin et al. 2007; González et al. 2014; Zuo et al. 2013).

Είναι ενδιαφέρον ότι η Τβ4 μαζί με τον αναστολέα της POP, ο οποίος αποτρέπει τον μεταβολισμό της Τβ4 σε AcSDKP, επιδείνωσε τόσο την πρώιμη όσο και την όψιμη διάμεση ίνωση σε μύες, καταδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο του AcSDKP στην αντι-ινωτική δράση της Τβ4 (Cavasin et al. 2004, 2007). Αντίθετα, η θεραπεία με AcSDKP μείωσε τόσο την πρώιμη όσο και την όψιμη ίνωση, με λιγότερη εναπόθεση κολλαγόνου και φμπρονεκτίνης, λιγότερους μυοϊνοβλάστες και μονοκύτταρα/μακροφάγα και κατασταλμένους παράγοντες, PAI-1 και TGF-β1 (Zuo et al. 2013). Ακόμη, σε μία μελέτη που εξετάζει την αντι-ινωτική δράση της Τβ4 και του AcSDKP σε ανθρώπινους ινοβλάστες

πνεύμονα φαίνεται ότι η θυμοσίνη β4 αυξάνει την έκφραση του κολλαγόνου, αν και αυτό το γεγονός δεν τονίζεται από τους συγγραφείς (Conte et al. 2015b)

Από την άλλη μεριά, οι αναστολείς της ACE αυξάνουν τα επίπεδα του ελεύθερου SDKP έως και πέντε φορές. Οι αναστολείς της ACE μειώνουν την ίνωση και είναι πιθανό η προστασία των ιστών που παρατηρείται με τους αναστολείς ACE να οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα AcSDKP. Πράγματι, σε μια μελέτη οι Rasouli και οι συνεργάτες εφάρμοσαν σε μύες μία τέτοια δόση AcSDKP, όση περίπου θα προέκυπτε με τη δράση του αναστολέα του ενζύμου ACE. Βρήκαν πως τόσο ο αναστολέας της ACE όσο και η χορήγηση SDKP μείωσε τη διείσδυση μακροφάγων και σιτευτικών κυττάρων, τον TGF-β, τον CTGF και την απόθεση κολλαγόνου, χωρίς να επηρεάζεται η υπέρταση (Rasouli et al. 2004).

Το φυσιολογικό λειτουργικό ρόλο του AcSDKP ανέδειξε μια μελέτη, όπου το πεπτίδιο αυτό, σε βασικές συγκεντρώσεις, αποτρέπει τη συσσώρευση κολλαγόνου σε όργανα (καρδιά, νεφροί) (Εικόνα 15) (Cavasin et al. 2007).



Εικόνα 15: Επαγόμενη από τον TGF-β φυσιολογική ρύθμιση της κολλαγονοσύνθεσης (a) και αναστολή του AcSDKP (b) που οδηγεί σε ίνωση (Macconi, Remuzzi, and Benigni 2014).

Πίνακας 5: Δράση του AcSDKP σε διάφορες ασθένειες και πειραματικά μοντέλα.

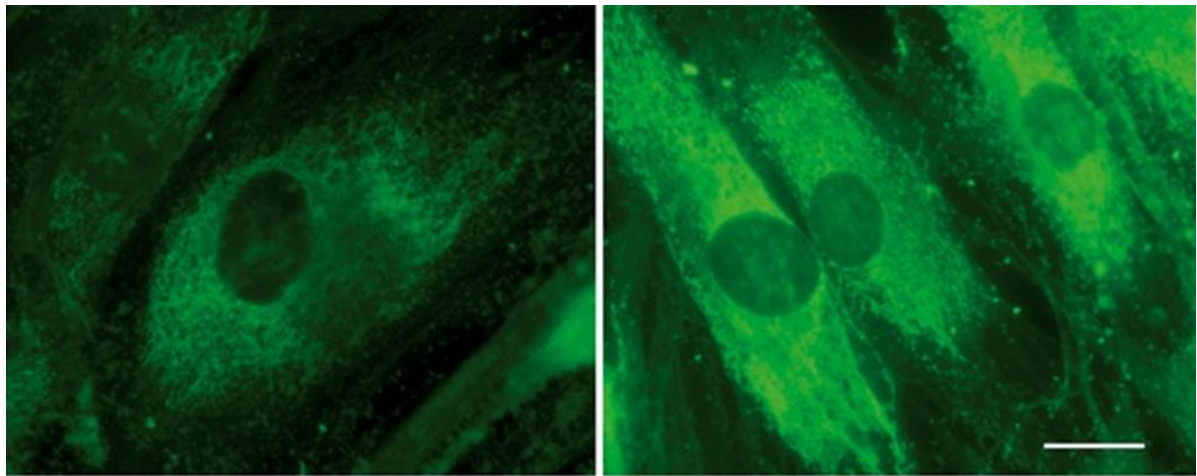
Πειραματικά μοντέλα/ ασθένειες	Είδος	Δόση / Διάρκεια	Παρατηρούμενη δράση	Μηχανισμοί	Αναφορές
Εγκεφαλική βλάβη	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0,8mg/kg/day 3 ημέρες	Αποκατάσταση εγκεφαλικής λειτουργίας	Μειωμένη ινώδη συσσώρευση, ενεργοποίηση μικρογλοίων/μακροφάγων, βελτιωμένη αγγειογένεση, νευρογένεση & αύξηση του αριθμού δενδριτών.	(Zhang et al. 2017)
Εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0,8mg/kg/day 3 ημέρες	Ελαφρύ εγκεφαλικό και μειωμένα νευρολογικά ευρήματα	Απενεργοποίηση της σηματοδότησης του TGF-β και του NF-κΒ	(Zhang et al. 2014)
Συστημικός Ερυθηματώδης Λύκος	Μύες, <i>in vivo</i>	0,8mg/kg/day 3 μήνες	Καθυστερημένη εμάνιση σοβαρής υπέρτασης, λευκωματουρία, πρόωρη θνησιμότητα, βελτιωμένη νεφρική λειτουργία	Αποτροπή σπειραματοσκλήρυνσης, μείωση μακροφάγων & νεφρικής διήθησης T -κυττάρων	(Liao et al. 2015) (Nakagawa et al. 2017)
Νεφρίτιδα Λύκου	Μύες, <i>in vivo</i>	1.0mg/kg/day 12-20 εβδομάδες	Μειωμένη πρωτεϊνουρία και βελτιωμένη νεφρική λειτουργία.	Μείωση νεφρικής διήθησης T-κυττάρων και μακροφάγων, παρεμπόδιση NF-κΒ & TNF-α, α-SMA, φιμπρονεκτίνης, pSMAD2/3	(Tan et al. 2012)
Μονομερής παρεμπόδιση ουρητήρα	Μύες, <i>in vivo</i>	1 mg/kg/day 1 εβδομάδα	Μείωση της γονιδιακής έκφρασης ινωτικών δεικτών	Μείωση έκφρασης κολλαγόνου IV, α-SMA και MCP-1	(Chan et al. 2015)
Μονομερής παρεμπόδιση ουρητήρα	Μύες, <i>in vivo</i>	1.6 mg/kg/day 5-14 ημέρες	Μείωση έκφρασης νεφρικού κολλαγόνου 1 και ίνωσης	Μείωση pSMAD3, μακροφάγων, PAI-1	(Zuo et al. 2013)
Πυριτίαση	Αρουραίοι, <i>in vivo</i> ινοβλάστες πνεύμονα H460 <i>in vitro</i>	0.8 mg/kg/day 4 & 8 εβδομάδες <i>in vitro</i> , 10 ⁻⁸ M	Μείωση της αυξημένης εκπυριτίωσης πνευμονικής ίνωσης & επαγόμενη από TGF-β1 διαφοροποίηση ινοβλαστών; Μείωση απόπτωσης επιθηλιακών κυττάρων	Αναστολή: 1) της έκφρασης του TGF-β1 και της σηματοδότησης της RAS, 2) διαφοροποίησης μυο-ινοβλαστών μέσω μειωμένης SRF και εντοπισμός α-SMA-θετικών μυοϊνοβλαστών	(Xu et al. 2012)
Ευαισθησία στο άλας	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8 & 1,6 mg/kg/day 6 εβδομάδες	Αποτρέπει την κυτταρική διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων λόγω υπέρτασης, την εναπόθεση κολλαγόνου, τη μειωμένη ρύθμιση νεφρίνης και τη λευκωματουρία	Παρεμπόδιση των μακροφάγων, διήθηση T κυττάρων και νεφρική ίνωση.	(Worou et al. 2015)
Αρουραίοι με υπερευαισθησία στην αγγειοτενσίνη	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8 mg/kg/day 3 εβδομάδες	Μείωση της διακλάδωσης του καρδιακού κολλαγόνου και της φλεγμονής στους αρουραίους με υπερευαισθησία στην αγγειοτενσίνη	Μείωση TGF-β1, LOXL1 και Λεμφοκυττάρων, διήθηση μακροφάγων και αναστολή NF-κΒ	(González et al. 2014)
Καρδιακή βλάβη και δυσλειτουργία, λόγω Galactin-3	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8mg/kg/day 4 εβδομάδες	Αποτροπή καρδιακής φλεγμονής, ίνωσης, υπερτροφίας και δυσλειτουργίας	Αποτροπή καρδιακής φλεγμονής λόγω GAL-3, αναστολή σηματοδότησης TGF-β/SMAD3	(Liu et al. 2009)
Υπερτασικοί μύες	Μύες, <i>in vivo</i>	0.8mg/kg/day 12 εβδομάδες	Αποτροπή φλεγμονώδους κυτταρικής διήθησης, εναπόθεσης κολλαγόνου,	Μειωμένη εναπόθεση κολλαγόνου στο νεφρό που προκαλείται από υπέρταση,	(Rhaleb et al. 2011)

			μειωμένης ρύθμισης νεφρίνης και λευκωματουρίας	διεύρυνση μήτρας σπειράματος και διήθηση μονοκυττάρων / μακροφάγων	
Υπερευαισθησία στην αγγειοτενσίνη	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8mg/kg/day 3 εβδομάδες	Αντι-ινωτική και αντιφλεγμονώδης επίδραση στη θωρακική αορτή	Αυξημένη έκφραση της κατασταλτικής SMAD7	(Lin et al. 2008)
5/6 νεφρεκτομή	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8mg/kg/day 3 εβδομάδες	Μειωμένη λευκωματουρία, φλεγμονή νεφρών και ίνωση και βελτίωση διήθησης.	Μειωμένη φλεγμονή, μερικώς αποκατεστημένη έκφραση νεφρίνης	(Liao et al. 2010)
Διαβήτη τύπου 1	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	1mg/kg/day 8 εβδομάδες	Βελτίωση της ίνωσης	Μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών TGF-β1 & SMAD 2/3	(Castoldi et al. 2010, 2013)
διαβητικοί μύες τύπου 1 και 2	Μύες, <i>in vivo</i>	0.5mg/kg/day έως και 4 εβδομάδες	Μειωμένη νεφρική ίνωση και προστασία νεφρικής λειτουργίας	Μειωμένη έκφραση φμπρονεκτίνης, FSP-1, α-SMA, Μειωμένη σηματοδότηση TGF-β / SMAD	(Nitta et al. 2016; Shibuya et al. 2005)
Σακχαρώδης διαβήτης	Μύες, <i>in vivo</i>	0,5mg/kg/day 8 εβδομάδες	Αναστολή ίνωσης και ενδοθηλιακής, μεσεγχυματικής μετάβασης (EndMT) στην καρδιά και στα νεφρά.	Αναστολή της EndMT που σχετίζεται με την αποκατάσταση των FGFR1 και microRNA let-7, PMAP4K4; Αναστολή σηματοδότησης TGF-β/ SMAD3	(Nagai et al. 2014)
Έμφραγμα μυοκαρδίου	Μύες Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8 -1.6 mg/kg/day 4-6 εβδομάδες	Μείωση καρδιακής ρήξης, φλεγμονής, και ίνωσης, βελτίωση αγγειογένεσης και καρδιακής λειτουργίας.	Καταστολή υπερβολικής φλεγμονής, ίνωσης, στρες ΕΔ; Αυξημένη έκφραση αγγειογόνων γονιδίων και SERCA2α	(Ma et al. 2014; Nakagawa et al. 2018; Wang et al. 2004; Xiang et al. 2014; Yang et al. 2004)
Αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	0.8mg/kg/day 4 εβδομάδες	Αποτροπή καρδιακής δυσλειτουργίας, υπερτροφίας και ίνωσης.	Αναστολή 1) έμφυτης προσαρμοστικής ανοσοποιητικής διήθησης κυττάρων 2) έκφρασης προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως κυτοκίνες (IL-1α, TNF-α, IL-2, IL-17), χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης ICAM-1, L-σελεκτίνη και MMP.	(Nakagawa et al. 2012)
Αντι-σπειραματική βασική μεμβράνη νεφρίτιδας	Αρουραίοι, <i>in vivo</i>	1mg/kg/day 4 εβδομάδες	Βελτιωμένη πρωτεϊνουρία και νεφρική δυσλειτουργία και αναστολή σπειραματοσκλήρυνσης και πνευμονικής ίνωσης	Καταστολή γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης της φμπρονεκτίνης, διήθησης μακροφάγων. Αναστολή TGF-β1, SMAD2 φωσφορυλίωσης και αυξημένη έκφραση SMAD 7.	(Omata et al. 2006)
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ενδοθηλιακή ή κυτταρική σειρά αορτής μύος	0,01 – 10 nM	Διέγερση πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων και μετανάστευσης και σχηματισμού σωληνίσκων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.	Πιθανώς, ο μηχανισμός να συνδέεται με την MMP-1	(Liu et al. 2003; Wang et al. 2004)(
Καρδιακοί ινοβλάστες	Ανθρώπινα κύτταρα, <i>in vitro</i>	0,1 – 10 nM	Αναστολή της επαγόμενης από TGF-β1 διαφοροποίησης ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες	Αναστολή επαγόμενων από τον TGF-β1 φαινομένων; Αναστολή σύνθεσης TGF-β1 επαγόμενης από ET-1.	(Peng et al. 2010)

Καρδιακοί ινοβλάστες	Αρουραίοι, <i>in vitro</i>	0,1 – 100 nM	Αναστολή δραστηριότητας και έκφρασης κολλαγένωσης	Αναστολή των MMP από το AcSDKP που σχετίζεται με αυξημένη έκφραση TIMP-1 και TIMP-2.	(Rhaleb et al. 2013)
Καρδιακοί ινοβλάστες	Αρουραίοι, <i>in vitro</i>	0,1 – 100 nM	Αναστολή ET-1 - επαγόμενης σύνθεσης κολλαγόνου και πολλαπλασιασμού κυττάρων.	Διατήρηση δραστηριότητας SHP-2, αποτρέποντας την ενεργοποίηση της p44 /42 MAPK	(Peng et al. 2012; Rhaleb et al. 2001)(
Μεσαγγειακά κύτταρα	Ανθρώπινα κύτταρα , <i>in vitro</i>	10 nM	Αναστολή πολλαπλασιασμού κυττάρων	Αυξημένες p53 και p27 ^{kip1}	(Kanasaki et al. 2006)
Καρκινικές κυτταρικές σειρές	Κυτταρικές σειρές ανθρώπου και μύος	5-100 μM	Ρύθμιση πολλαπλασιασμού κυττάρων	Το μονοπάτι PI3KCA/AKT μεσολαβεί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το AcSDKP .	(Hu et al. 2013)
Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση	Φυσιολ. ινοβλάστες πνεύμονα, ινοβλάστες IPF	20-2000nM	Αντι-ινωτική δράση	Μείωση μεταγραφικής και μεταφραστικής έκφρασης κολλαγόνου, α-SMA στους ινωτικούς ινοβλάστες	(Conte et al. 2015a)

AcSDKP στην επούλωση του δέρματος

Το πεπτιδίο AcSDKP στην επούλωση του δέρματος πιστεύεται ότι δρα στη μείωση του σχηματισμού ουλής λόγω της αντι-ινωτικής δράσης και στη μείωση της φλεγμονής (H K Kleinman and Sosne 2016). Σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες παρουσιάζονται δύο αντικρουόμενες μελέτες. Η πρώτη συνάδει με τα δεδομένα από καρδιακούς και πνευμονικούς ινοβλάστες και ηπατικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα παρατηρεί στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και μείωση της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου Col1a ύστερα από διέγερση με τον TGF-β (Zhiming et al. 2009), ενώ η δεύτερη ταυτίζεται με τις προηγούμενες μελέτες του παρόντος εργαστηρίου (**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II**) και παρατηρεί αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης (Εικόνα 16) (Hajem et al. 2013). Το AcSDKP φαίνεται να διεγείρει επιπλέον τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών. Ενισχύει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων προγονικών επιδερμικών κερατινοκυττάρων και βλαστικών κυττάρων. Το AcSDKP *ex vivo* αυξάνει το πάχος της επιδερμίδας και ρυθμίζει αναλυτικά τη σύνθεση κερατίνης, φιμπρονεκτίνης, κολλαγόνου III και IV καθώς και των γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs). Σε *ex vivo* καλλιεργημένα τριχοθυλάκια, το AcSDKP προάγει την επιμήκυνση του άξονα των τριχών και προκαλεί μορφολογικές και μοριακές τροποποιήσεις που ταιριάζουν στα κριτήρια της ανάπτυξης των τριχών. Επιπλέον, το AcSDKP αποδείχθηκε ότι βελτιώνει τον επιδερμικό φραγμό, διεγείροντας την έκφραση τριών πρωτεϊνικών συστατικών στενών συνδέσεων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη σύνδεση γειτονικών κυττάρων.



Control

10^{-9} M AcSDKP

Εικόνα 16: Κολλαγόνο ύστερα από ανοσοφθορισμό σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες με και χωρίς επώαση με 1nM AcSDKP (Hajem et al. 2013)

1.7 Ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης

1.7.1 Μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων

Όλοι οι οργανισμοί ανεξαρτήτως της φυλογενετικής τους προέλευσης προκειμένου να επιβιώσουν, πρέπει να ανταποκριθούν σε ένα μεγάλο αριθμό εξωκυτταρικών ερεθισμάτων και περιβαλλοντικών αλλαγών, όπως μιτογόνων, ορμονών, στρες, αλλαγών της θερμοκρασίας και της οσμωτικής πίεσης κ.α. Για το σκοπό αυτό, κάθε κύτταρο διαθέτει ένα πολύπλοκο σύστημα που του επιτρέπει να λαμβάνει και να επεξεργάζεται ένα πλήθος πληροφοριών-μηνυμάτων από το περιβάλλον. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει πρωτεΐνες-υποδοχείς που λειτουργούν ως δέκτες μηνυμάτων, πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφατάσες, καθώς και μια πληθώρα άλλων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Τα μηνύματα μπορεί να συνιστούν υδρόφοβες χημικές ενώσεις (στεροειδείς και θυρεοειδείς ορμόνες) ή αέριες ενώσεις (NO και CO), οι οποίες διαχέονται στο εσωτερικό των κυττάρων-στόχων, διαμορφώνοντας την απόκριση τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, το μήνυμα είναι μια υδρόφιλη χημική ένωση ικανή να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου-στόχου (Alberts et al 2018). Η σύνδεση του σήματος με τον αντίστοιχο υποδοχέα είναι αντιστρεπτή και αποτελεί ουσιαστικά το πρώτο βήμα μιας ακολουθίας γεγονότων, με την οποία επιτυγχάνεται η ενδοκυτταρική μεταβίβαση του μηνύματος προς ένα μόριο που λειτουργεί ως τελικός αποδέκτης (Schenk and Snaar-Jagalska 1999). Η ακολουθία αυτή των γεγονότων, χάρη στην οποία ένα εξωκυτταρικό μήνυμα, επιδρά στα κύτταρα-στόχους προκαλώντας την εκδήλωση μιας συγκεκριμένης απόκρισης, ονομάζεται μηχανισμός μεταγωγής μηνυμάτων ή οδός σηματοδότησης.

Ανάλογα με τους μηχανισμούς σηματοδότησης που χρησιμοποιούν, οι μεμβρανικοί υποδοχείς χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες (Nishizuka 2003): i) στους υποδοχείς συζευγμένους με κανάλια ιόντων (Ion-channel-linked receptors ii) στους υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, GPCRs) και iii) στους υποδοχείς συζευγμένους με ένζυμα (Enzyme-linked receptors). Σε μια οδό σηματοδότησης τη διέγερση του υποδοχέα ακολουθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την αδρανοποίηση τους. Κεντρικό ρόλο στη συγκεκριμένη ακολουθία γεγονότων έχουν οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης. Η προσθήκη μίας ή περισσότερων φωσφορικών ομάδων στο μόριο μιας πρωτεΐνης οδηγεί κατά κύριο λόγο στην ενεργοποίηση της, ενώ η αδρανοποίηση

μιας πρωτεΐνης συνοδεύεται συνήθως με αφαίρεση φωσφορικών ομάδων από το μόριο της. Ο βαθμός φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τις σχετικές δραστηριότητες της κινάσης που τη φωσφορυλιώνει και της φωσφατάσης που την αποφωσφορυλιώνει (Nishizuka 2003). Έτσι, οι πρωτεϊνικές κινάσες καθώς επίσης και οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις οδούς σηματοδότησης των κυττάρων, καθώς λειτουργούν ως ρυθμιστές διαφόρων βιολογικών διεργασιών.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι οι βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας που η έκφραση τους ρυθμίζεται από μία από τις μεγαλύτερες και λειτουργικά διαφορετικές οικογένειες γονιδίων. Προσθέτοντας φωσφορικές ομάδες σε πρωτεΐνες υποστρώματος, κατευθύνουν τη δραστηριότητα, τον εντοπισμό και τη συνολική λειτουργία πολλών πρωτεϊνών και χρησιμεύουν για την ενορχήστρωση της δραστηριότητας σχεδόν όλων των κυτταρικών διεργασιών. Οι κινάσες έχουν ενεργό ρόλο στη μεταγωγή σήματος και στο συντονισμό πολύπλοκων λειτουργιών, όπως ο κυτταρικός κύκλος. Η πληθώρα των βασικών λειτουργιών που μεσολαβούνται από κινάσες γίνεται εμφανής από τις περίπου πενήντα συντηρημένες διαφορετικές οικογένειες κινάσης μεταξύ ζυμομυκήτων, ασπόνδυλων και θηλαστικών. Από τις 518 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες, 478 ανήκουν σε μια μοναδική υπεριοικογένεια των οποίων οι καταλυτικοί τομείς εμφανίζουν αλληλουχική ομολογία. Οι κινάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες, οικογένειες και υπο-οικογένειες, με αυξανόμενη ομοιότητα ακολουθίας και βιοχημική λειτουργία και μπορούν να διαχωριστούν σε επτά μεγάλες ομάδες κινασών. Για παράδειγμα, οι κινάσες τυροσίνης σχηματίζουν μια ξεχωριστή ομάδα, των οποίων τα μέλη φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες σε κατάλοιπα τυροσίνης, ενώ οι κινάσες στις υπόλοιπες ομάδες φωσφορυλιώνουν κυρίως κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Άλλες 40 «άτυπες» κινάσες δεν έχουν ομοιότητα αλληλουχίας με τις τυπικές κινάσες, αλλά είναι γνωστές ή προβλέπεται πως έχουν ενζυμική δραστηριότητα και ορισμένες προβλέπεται ότι έχουν παρόμοια δομική αναδίπλωση με τις τυπικές κινάσες (Εικόνα 17).

1.7.2 Κυτταρική σηματοδότηση TGF-β

Ο TGF-β είναι μια πολυλειτουργική κυτοκίνη που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε πληθώρα ασθενειών. Παίζει σημαντικό ρόλο στην επούλωση και την επιδιόρθωση πληγών, καθώς αποτελεί βασικό ρυθμιστή στην παραγωγή και την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας μέσω της επίδρασής του σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει εμφανές πως η σηματοδότηση του TGF-β είναι πολύπλοκη με πολλές αλληλεπιδράσεις υποδοχέων-προσδετών, πολλές ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης και μια σειρά από μηχανισμούς, οι οποίοι όχι μόνο ελέγχουν τη σηματοδότηση αλλά μπορούν επίσης να καθορίζουν και την απόκριση στο σήμα του TGF-β.

Η υπερικογενεία των πρωτεϊνών TGF-β περιλαμβάνει περισσότερα από 30 μέλη, με παρόμοια δομή. Εντοπίζεται φυλογενετικά σε σπονδυλωτά, έντομα και νηματώδη. Κυριότερες υποικογένειες συνιστούν οι TGF-β, BMP (Bone Morphogenetic Protein: μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών) και η ακτιβίνη. Με τους ειδικούς υποδοχείς να είναι πανταχού παρόντες, εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η πρόσφυση. Κατά συνέπεια, αυτοί οι παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο σε φυσιολογικές διεργασίες όπως η εμβρυογένεση και η επούλωση πληγών, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος και η ίνωση ιστών (Schiller, Javelaud, and Mauviel 2004).

Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί τρεις δομικά σχεδόν πανομοιότυπες ισομορφές του TGF-β (TGF-β1-3), από τρία διακριτά γονίδια. Ο TGF-β συντίθεται ως ομοδιμερής προ-πρωτεΐνη που περιέχει τόσο τον αυξητικό παράγοντα στο C-άκρο (ώριμος TGF-β) όσο και ένα προπεπτίδιο (αναφέρεται ως πεπτίδιο που σχετίζεται με την ωρίμανση [Latency associated peptide-LAP]). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η προ-πρωτεΐνη συνδέεται με μια άλλη λανθάνουσα πρωτεΐνη δέσμησης TGF-β (LTBP), μέσω δύο δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ LTBP και LAP. Το σύμπλοκο μεταφέρεται στη συνέχεια στο σύμπλεγμα Golgi, όπου το LAP διασπάται από τον ώριμο αυξητικό παράγοντα μέσω δράσεων που προκαλούνται από τη φουρίνη, ωστόσο, ο TGF-β και το LAP παραμένουν στενά συνδεδεμένα μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Ο TGF-β εκκρίνεται από τα κύτταρα, είτε ως τριμερές μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα (LLC) που αποτελείται από τον ώριμο TGF-β, το πεπτίδιο LAP και την LTBP ή ως σύμπλοκο TGF-β / LAP, γνωστό ως το μικρό λανθάνον σύμπλοκο (Robertson and Rifkin 2016). Δέσμηση του LAP στον ώριμο TGF-β συνιστά την λανθάνουσα κατάσταση, εμποδίζοντας τη σύνδεση του αυξητικού

Υποδοχείς TGF-β

Ανάλογα με την ισομορφή που συμμετέχει στο μονοπάτι καθορίζεται και ο τύπος του μηνύματος. Όλες οι ισομορφές TGF-β προσδένονται σε υποδοχείς που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με ενσωματωμένη δράση κινάσης σερίνης-θρεονίνης (Ser/Thr). Η δράση κινάσης βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Οι υποδοχείς TGF-β ονομάζονται TβR (TGF-β receptors) και οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι ο TβRI και ο TβRII.

Μηχανισμός ενεργοποίησης

Από δομικής άποψης, οι υποδοχείς TβRI και TβRII είναι παρόμοιες γλυκοπρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από μία πλούσια σε κυστεΐνη εξωκυττάρια περιοχή, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μια μία κυτταροπλασματική περιοχή με δράση κινάσης Ser/Thr. Κάθε μέλος της υπεροικογένειας TGF-β σηματοδοτεί μέσω ενός χαρακτηριστικού συνδυασμού TβR τύπου I και τύπου II (Heldin and Moustakas 2016; Massagué, Blain, and Lo 2000). Ο διμερής προσδέτης TGFβ αρχικά προσδένεται στον υποδοχέα TβRII και σε αυτή τη μορφή αναγνωρίζεται από τον TβRI. Ο TβRI συνδέεται στο σύμπλοκο TGFβ-TβRII, δημιουργώντας ένα ετεροολιγομερές όπου ο TβRII, έχοντας δράση κινάσης Ser/Thr, φωσφορυλιώνει τον TβRI. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TβRI γίνεται σε μία περιοχή που βρίσκεται λίγο κάτω από την πλασματική μεμβράνη και είναι πλούσια σε γλυκίνη και σερίνη (Gly/Ser), γνωστή ως GSbox (Massagué 2000). Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TβRI δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για σηματοδοτικά μόρια τελεστές. Ενώ η έκφραση του TβRI δεν εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων, ο TβRII εκφράζεται σε υψηλότερο επίπεδο στους δερματικούς ινοβλάστες σε σύγκριση με τα κερατινοκύτταρα.

Υπάρχουν επτά υποδοχείς τύπου I στον άνθρωπο που ονομάζονται κινάσες τύπου υποδοχέα ακτιβίνης (ALK) 1–7 και πέντε υποδοχείς τύπου II. Και οι τρεις ισομορφές TGF-β προκαλούν τη σηματοδότηση μέσω ενός απλού υποδοχέα τύπου II (TβRII). Δέσμευση των TGF-β στους συστατικά ενεργούς TβRII στρατολογούν και φωσφορυλιώνουν τις κινάσες υποδοχέα τύπου I. Στους περισσότερους τύπους κυττάρων, ο TGF-β ενεργοποιεί τον πανταχού εκφραζόμενο υποδοχέα τύπου I ALK5 (Rahimi and Leof 2007). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο TGF-β ασκεί διακριτές δράσεις μέσω ενός δευτέρου τύπου TβRI, ALK1 (Goumans 2002). Αν και ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο TGF-β μπορεί να διεγείρει τη σηματοδότηση μέσω ALK-1 και σε άλλους τύπους κυττάρων,

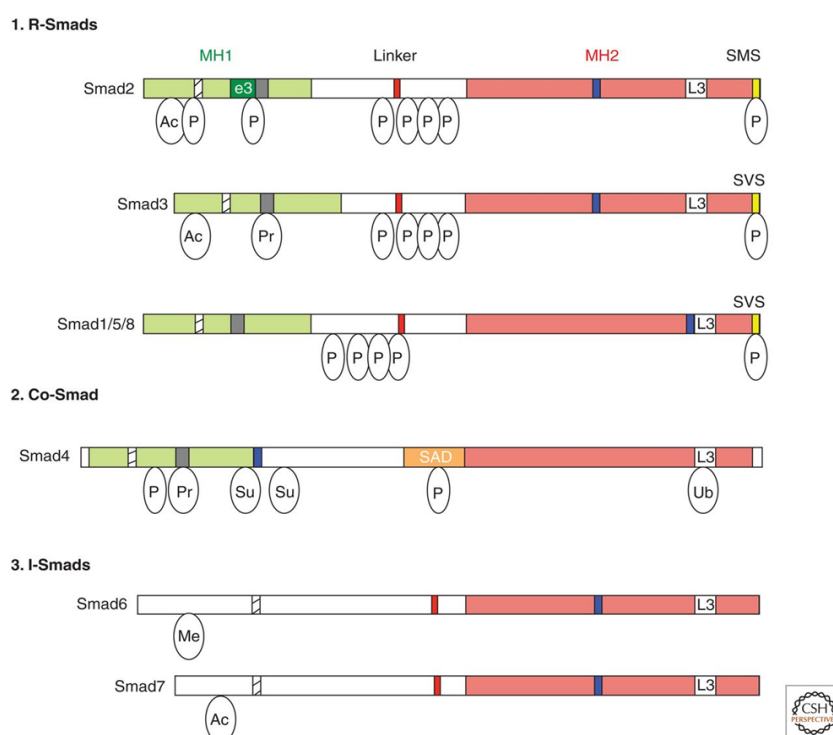
συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών (Zhang 2017) και των μακροφάγων (Nurgazieva et al. 2015), ο ρόλος αυτών των οδών παραμένει ασαφής.

Κανονικό Σηματοδοτικό Μονοπάτι

Μεταγραφικοί παράγοντες SMAD

Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων SMAD από τον TGF- β είναι κοινή στους περισσότερους τύπους κυττάρων και ως εκ τούτου αυτή η διαδρομή είναι γνωστή ως κανονική διαδρομή TGF- β . Υπάρχουν οκτώ διαφορετικές SMAD πρωτεΐνες (Εικόνα 19), οι οποίες διαχωρίζονται στις:

- i) R-SMAD (Receptor regulated SMADs), που ρυθμίζονται μέσω υποδοχέα και περιλαμβάνουν τις SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 & SMAD8
- ii) Co-SMAD (common mediator SMADs), που συνεργάζονται με τις ενεργοποιημένες από τους υποδοχείς SMAD και περιλαμβάνουν μόνο τη SMAD4
- iii) I-SMAD (inhibitory SMADs), οι οποίες σταματούν την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος και περιλαμβάνουν τις SMAD6 & SMAD7.



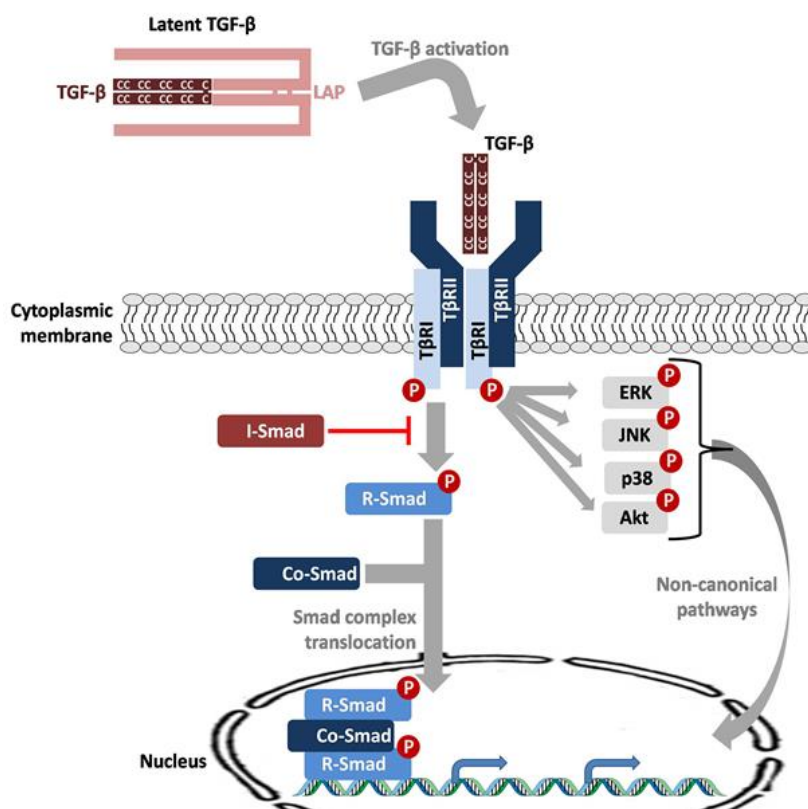
Εικόνα 19: Οικογένεια SMAD πρωτεϊνών.

Δομή των SMAD

Τόσο οι πρωτεΐνες R-SMAD, όσο και οι co-SMAD περιλαμβάνουν δύο πολύ συντηρημένες περιοχές, γνωστές ως περιοχές Mad (Mother against decapentaplegic) homology 1 (MH1) και MH2. Η N-τελική περιοχή MH1 περιέχει πυρηνικά σήματα εντοπισμού και δομή β-φουρκέτας που είναι κρίσιμη για τη σύνδεση DNA (Εικόνα 19) και τη συσχέτιση με ένα υποσύνολο πρωτογενών μεταγράφων microRNA (miRNA) (pri-miRNAs). Η C-τελική περιοχή MH2 περιλαμβάνει τη δομή βρόχου L3 που καθορίζει την αλληλεπίδραση των R-Smads με υποδοχείς τύπου I (Lo 1998), οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού μοτίβου SSXS των R-SMAD από κινάσες υποδοχέα τύπου I. Ο τομέας MH2 της SMAD4 περιέχει έναν βρόχο L3 (Lo 1998), αλλά δεν διαθέτει το καρβοξυτελικό μοτίβο SSXS και δεν φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα τύπου I. Η φωσφορυλίωση με τη μεσολάβηση του υποδοχέα τύπου I του καρβοξυτελικού άκρου των R-SMAD ενεργοποιεί τη σύνδεσή με τον τομέα MH2 της SMAD4. Το ετερομερές σύμπλεγμα SMAD, το οποίο είναι ένα τριμερές δύο R-SMAD και της SMAD4, μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με DNA μέσω του τομέα MH1 (Massagué 2012). Στον πυρήνα, ο τομέας MH2 αλληλεπιδρά με διάφορους πυρηνικούς παράγοντες και ελέγχει την έκφραση γονιδίων τροποποιώντας τη μεταγραφή ή τον επιγενετικό τόπο (Massagué 2012; Moustakas and Heldin 2009).

Μη Κανονικό Σηματοδοτικό Μονοπάτι

Εκτός από την ενεργοποίηση του κανονικού καταρράκτη που εξαρτάται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SMAD, ο TGF-β μπορεί να επάγει σηματοδότηση, φωσφορυλιώνοντας και κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen activated protein kinases-MAPK), και πιο συγκεκριμένα τις ERK, p38 MAPK και JNK (Εικόνα 20). Οι επιδράσεις του TGF-β στη σηματοδότηση MAPK μπορεί και να εμπεριέχουν την εξαρτώμενη από τις SMAD σηματοδότηση ή να δρουν ανεξάρτητα από τις SMAD (Funaba, Zimmerman, and Mathews 2002; Furukawa et al. 2003; Kretzschmar et al. 1999). Επιπλέον, ο TGF-β μπορεί επίσης να ενεργοποιεί τα μονοπάτια PI3K/AKT και Rho GTPase και να εμπλέκεται και με τους καταρράκτες σηματοδότησης Wnt και NOTCH (Derynck and Zhang 2003).



Εικόνα 20: Μηχανισμός ενεργοποίησης TGF-β και ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης (Pratsinis, Mavrogomatou, and Kletsas 2017).

1.7.3 Ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες

Βασικά χαρακτηριστικά

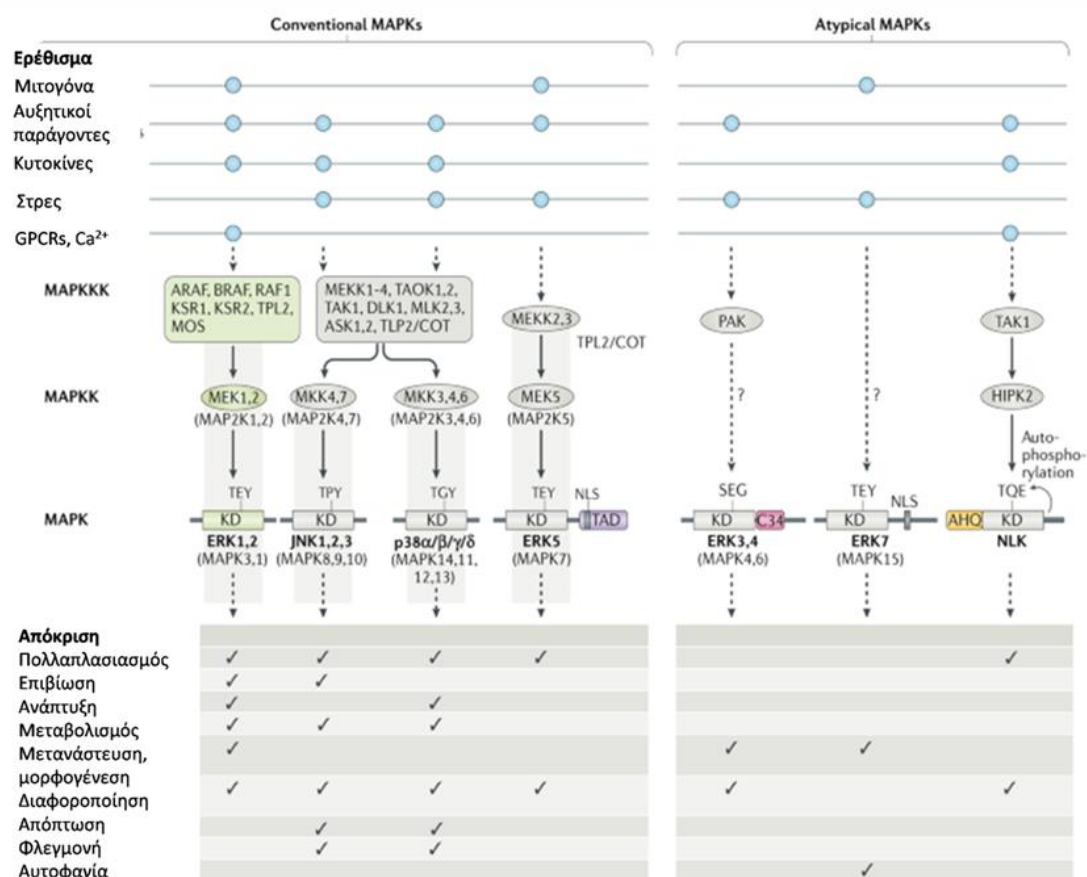
Πάνω από τρεις δεκαετίες έχουν περάσει από τότε που οι Sturgill και Ray ανίχνευσαν και χαρακτήρισαν μια νέα κινάση σερίνης / θρεονίνης, η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης 2 που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους (MAP-2) σε λιποκύτταρα 3T3-L1, που έχουν υποστεί αγωγή με ινσουλίνη (Ray and Sturgill 1987, 1988). Η κινάση κλωνοποιήθηκε δύο χρόνια αργότερα και ονομάστηκε ρυθμιζόμενη από εξωκυττάριο σήμα κινάση 1 (ERK1). Καθώς τα περισσότερα μέλη της οικογένειας εμπλέκονται στην επεξεργασία σημάτων που διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες, αυτή η υπεροικογένεια κινάσων ονομάστηκε «ενεργοποιημένες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες» (Mitogen activated protein kinases, MAPK).

Εκτεταμένη έρευνα έχει δείξει πως οι MAPK παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετατροπή εξωκυτταρικών ερεθισμάτων σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Πράγματι, οι κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα και εκφράζονται στους ευκαρυώτες σηματοδοτούν ποικίλες θεμελιώδεις κυτταρικές συμπεριφορές ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα. Τα γονιδιώματα των θηλαστικών κωδικοποιούν 14 διαφορετικές MAPK, οι οποίες ταξινομούνται ως συμβατικές ή άτυπες βάσει της ακολουθίας και του τρόπου ενεργοποίησής τους (Keshet and Seger 2010; Raman, Chen, and Cobb 2007). Οι συμβατικές MAPK περιλαμβάνουν τις εξής υποοικογένειες: τις ρυθμιζόμενες από εξωτερικό σήμα κινάσες ERK1 και ERK2, τις κινάσες του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-JUN (JNK), τις p38-MAPK και την ERK5 (Εικόνα 21). Όλες έχουν ένα μοτίβο TXY στο τμήμα ενεργοποίησής τους, το οποίο απαιτεί διπλή φωσφορυλίωση από ανοδικές κινάσες MAPK (MAPKKs) για την καταλυτική ενεργοποίησή τους. Εκτός από την ERK5, η οποία περιέχει ένα μακρύ καρβοξυτελικό άκρο, οι συμβατικές MAPK αποτελούνται από έναν τομέα κινάσης (Kinase domain- KD) με βραχεία αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Οι άτυπες MAPK περιλαμβάνουν τις ERK3, ERK4, ERK7 και την κινάση τύπου Nemo (Nemo-like kinase, NLK). Έχουν μακρές αμινοτελικές ή καρβοξυτελικές αλληλουχίες που μπορούν να εξυπηρετήσουν ρυθμιστικούς σκοπούς και, εκτός από την ERK7, η περιοχή φωσφορυλίωσής τους

αποκλίνει από το TXY μοτίβο. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης και οι επακόλουθες λειτουργίες των συμβατικών MAPK έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Οι MAPK αναμεταδίδουν σήματα ως μέρος τριών επιπέδων καταρράκτη κινάσης που περιλαμβάνουν επίσης τις ανοδικές MAPKK και τις κινάσες MAPKK (MAPKKK), οι οποίες λαμβάνουν σήματα από δέκτες συνδεδεμένους με μεμβράνη (Cuevas, Abell, and Johnson 2007). Κάθε μονοπάτι διαφέρει από τα υπόλοιπα στην ευαισθησία ως προς τα εξωτερικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η διέγερση από αυξητικό παράγοντα μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των ERK, JNK και / ή p38. Όμως, οι κινάσες JNK και p38 ενεργοποιούνται από ένα επιπλέον φάσμα σημάτων περιβαλλοντικού στρες, όπως οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, το οξειδωτικό στρες και οι βλάβες DNA. Η ERK5, η λιγότερο μελετημένη από τις συμβατικές MAPK, ενεργοποιείται επίσης από μιτογόνα, αυξητικούς παράγοντες και συγκεκριμένες καταστάσεις στρες όπως οξειδωτικό και οσμωτικό στρες. Οι διαφορές στην έκφραση, την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση, συνεργάτες ικριώματος και τους μηχανισμούς υποστρώματος συμβάλλουν στη διαφορική δυναμική, την εκλεκτικότητα του υποστρώματος και το εύρος δράσης των συμβατικών υποοικογενειών MAPK.

Μόλις διευκρινίσθηκαν η βασική αρχιτεκτονική αυτών των μονοπατιών και η ταυτότητα των βασικών συστατικών, έγινε εφικτό να προσδιοριστούν οι κρίσιμοι παράγοντες της ενεργοποίησης των μονοπατιών και της επιλογής υποστρώματος. Ο κυρίαρχος πολυλειτουργικός τελεστής του μονοπατιού MAP3K / MAP2K / MAPK είναι το στοιχείο MAPK. Αποδείχθηκε νωρίς πως η πρόσδεση σε υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, η ένταση και η διάρκεια της διέγερσης του καταρράκτη MAP3K / MAP2K / MAPK, όπως ελέγχεται π.χ., από την πυκνότητα του υποδοχέα, ασκούν αποφασιστική επίδραση στην κυτταρική λειτουργία, αλλάζοντας τη διάρκεια της ενεργοποίησης της MAPK και, συνεπώς, την πιθανότητα εισόδου στον πυρήνα και την πρόσβαση σε πυρηνικούς στόχους (Avruch 2007).



Εικόνα 21: Υπεροικογένεια MAPK. AHQ, Ala- His- Glu- πλούσια περιοχή; C34, διατηρημένη περιοχή στις ERK3 και ERK4, GPCRs: υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες, NLS: σήμα πυρηνικού εντοπισμού; PAK, p21- ενεργοποιημένη κινάση; TAD, τομέας ενεργοποίησης (Lavoie, Gagnon, and Therrien 2020).

MAPK στην κολλαγονοσύνθεση

Η εξωκυτταρική μήτρα (ECM) είναι ένα σχετικά σταθερό τρισδιάστατο (3D) δομικό ικρίωμα στο συνδετικό ιστό. Τα κύτταρα που παράγουν αυτά τα εξωκυτταρικά μακρομόρια, κυρίως ινοβλάστες και άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα, αλληλεπιδρούν με τα δικά τους προϊόντα ECM και την εξωκυττάρια μήτρα που παράγεται από παρακείμενα κύτταρα. Η ECM ρυθμίζει τις κυτταρικές λειτουργίες, κυρίως μέσω των οδών σηματοδότησης που μεσολαβούνται από ιντεγκρίνη. Οι υποδοχείς της οικογένειας ιντεγκρίνης είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε μια ποικιλία οδών μεταγωγής σήματος, όπως οι διαδρομές MEK-ERK και PI3K (Boudreau and Jones 1999). Οι υπομονάδες ιντεγκρίνης α και β διμερίζονται μη ομοιοπολικά για τη μεσολάβηση της κυτταρικής προσκόλλησης με συγκεκριμένους προσδέτες ECM, συνδέοντας έτσι την ECM με

διαφορετικούς καταρράκτες σηματοδότησης, επιτρέποντας στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον και να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, την επιβίωση των κυττάρων και την κινητικότητα.

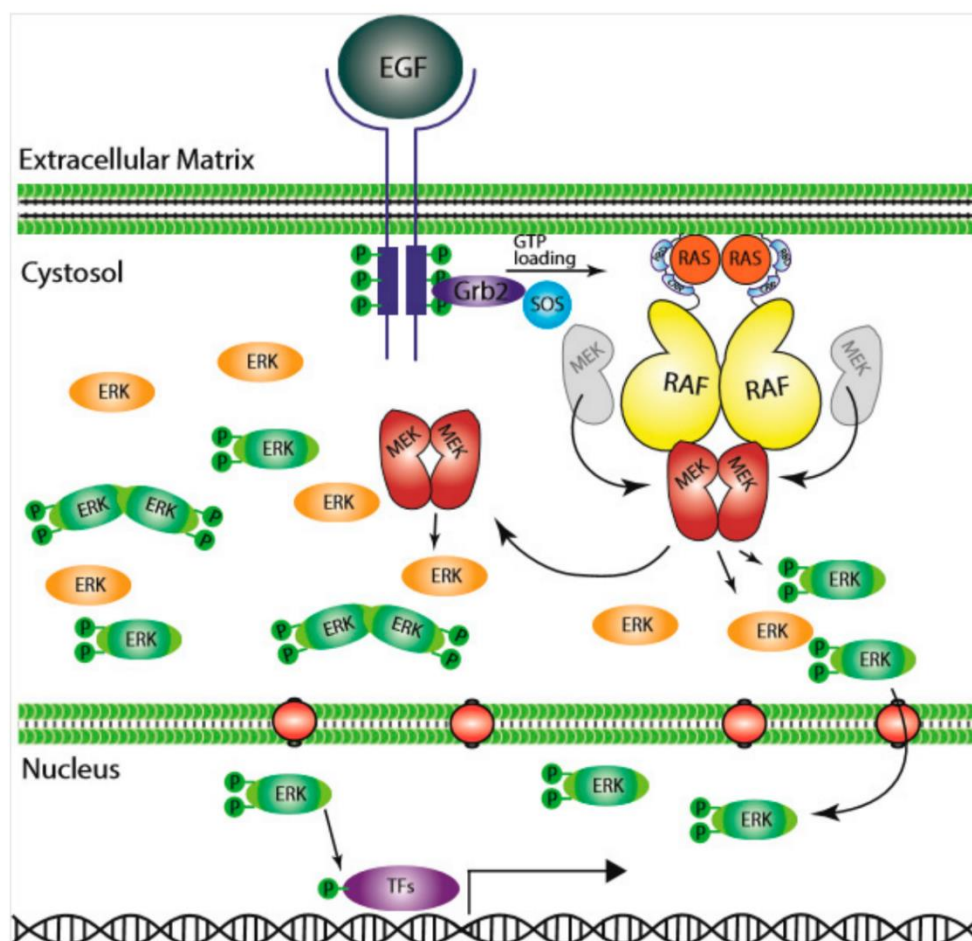
Ταυτόχρονα, τα ίδια μόρια της ECM μπορούν να επηρεασθούν από τα ανωτέρω σηματοδοτικά μονοπάτια, γεγονός που επιτρέπει και την αναδραστική (feedback) ρύθμισή τους. Για παράδειγμα, μελέτη καταδεικνύει ένα συνεργιστικό ρόλο της p38 MAPK στην έκφραση του γονιδίου Col1a1 που επάγεται από τον TGF-β τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε παθολογικούς δερματικούς ινοβλάστες (Sato et al. 2002). Σε σχέση με το ρόλο της σηματοδότησης JNK στη συμπεριφορά των ινοβλαστών, η τρέχουσα βιβλιογραφία παρουσιάζει αντιθέσεις και απαιτείται περαιτέρω έρευνα. Πιο συγκεκριμένα, διαμορφώνονται δύο θεωρίες: Η πρώτη περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της JNK στη σύνθεση κολλαγόνου ($JNK \rightarrow ET-1 \rightarrow c-JUN \rightarrow$ σύνθεση κολλαγόνου), ενώ σύμφωνα με τη δεύτερη, αναστολή της JNK οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή των Col1a1, Col1a2, Col3a1 και αυξημένη έκφραση της α-SMA και της καλπονίνης (Nikoloudaki et al. 2020).

Όπως αναφέρθηκε, ο καταρράκτης ERK1/2 ήταν το πρώτο μονοπάτι MAPK που αποσαφηνίστηκε και θεωρείται ως πρότυπο για τη διερεύνηση και των υπολοίπων. Διάφορες μελέτες έχουν πιστοποιήσει την ύπαρξη συνολικά 5 διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων, ERK1-5. Οι ισομορφές των ERK1 και 2 αποτελούν τα καλύτερα μελετημένα μέλη της υποοικογένειας με μοριακό βάρος 44 και 42 KDa, αντίστοιχα (Seger and Krebs 1995).

Ο καταρράκτης ERK ενεργοποιείται από μια ποικιλία εξωκυτταρικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των ορμονών και του κυτταρικού στρες (που προκαλούν κυτταρικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν κυρίως πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση), αλλά υπό ορισμένες συνθήκες και ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες. Οι εξωτερικοί παράγοντες δρουν μέσω υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTK) (Marmor, Skaria, and Yarden 2004), υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCR) (Naor, Benard, and Seger 2000), καναλιών ιόντων (Rane 1999) και άλλων. Αυτοί οι μεμβρανικοί υποδοχείς μεταδίδουν περαιτέρω τα σήματα στον καταρράκτη της ERK μέσω μιας πληθώρας διαδικασιών σηματοδότησης, οι οποίες σε πολλές περιπτώσεις περιλαμβάνουν πρόσληψη πρωτεϊνών προσαρμογής όπως οι Shc ή Grb2 στους ενεργοποιημένους υποδοχείς ή τις τελεστικές πρωτεΐνες τους (π.χ. FAK1). Με τη σειρά τους, οι προσαρμογείς κατευθύνουν τους παραγόντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) σε μικρές GTP-πρωτεΐνες που δεσμεύονται στη μεμβράνη (π.χ. RAS, RAP), καθιστώντας τις ενεργές. Με αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται η περαιτέρω μετάδοση του σήματος στα συστατικά του επιπέδου MAP3K της σηματοδότησης της ERK, οι οποίες είναι κυρίως Raf κινάσες (RAF-1, B-RAF, A-RAF) (Kyriakis et al. 1992), αλλά πιθανώς και οι TPL2, MEKK1 και MLTK που ενεργοποιούνται από στρες.

Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα για το μηχανισμό της μετάδοσης σήματος από εξωκυτταρικούς παράγοντες στον καταρράκτη ERK είναι αυτό που μεσολαβείται από υποδοχείς αυξητικού παράγοντα. Κατά τη δέσμευση των αυξητικών παραγόντων, οι υποδοχείς διμερίζονται και υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση σε πολλά κατάλοιπα τυροσίνης. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη προσαρμογέα, GRB2, προσλαμβάνεται στον υποδοχέα μέσω της περιοχής SH2, και από αυτό επιτρέπει την περαιτέρω πρόσληψη της πρωτεΐνης SOS, στη σωστή θέση της δίπλα στις πρωτεΐνες RAS, που συνδέονται με τη μεμβράνη. Η ενεργοποίηση της RAS από την SOS ακολουθείται από την πρόσληψη και την ενεργοποίηση της RAF1 και / ή B-RAF στην πλασματική μεμβράνη με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός (Wellbrock, Karasarides, and Marais 2004). Σε ορισμένες συνθήκες, η ενεργοποίηση της κινάσης RAF μπορεί να μεσολαβηθεί ή να ενισχυθεί από άλλες κινάσες Ser / Thr, όπως οι PKC (Kolch et al. 1993) και

MLK3 (Chadee and Kyriakis 2004), και επομένως αυτές μπορούν να θεωρηθούν ως MAP4K αυτού του καταρράκτη. Με την ενεργοποίηση της RAS, μια σειρά βιοχημικών και δομικών συμβάντων οδηγούν στην ενεργοποίηση της ERK, ενεργοποιούν την κυτταρική της αναδιανομή και προωθούν την επιλεκτική της σύνδεση με υποστρώματα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK (Degirmenci, Wang, and Hu 2020).

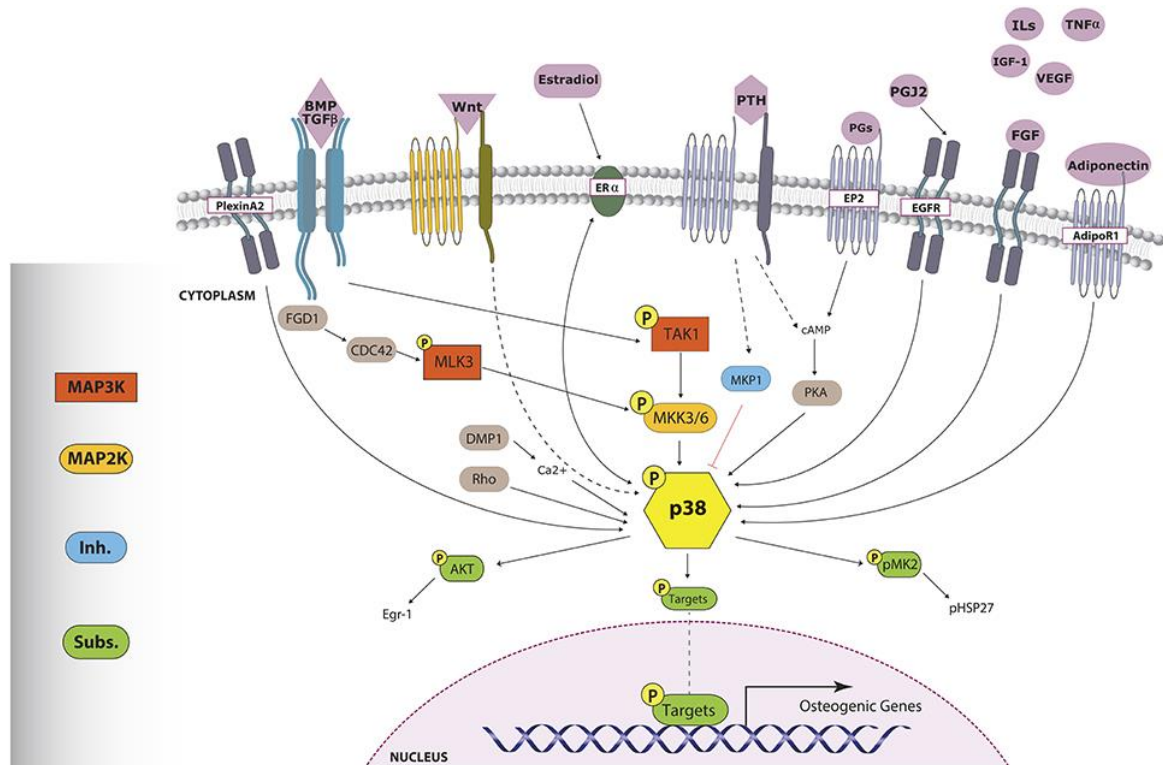
Από το επίπεδο MAP3K, το σήμα μεταδίδεται διαδοχικά μέσω των στοιχείων MAPKK (Gómez and Cohen 1991), που ονομάζονται MAPK/ERK κινάσες 1 και 2 (MEK1/2). Οι MAPKK ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης σερίνης στο τυπικό μοτίβο Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr στο βρόχο ενεργοποίησής τους. Οι ενεργοποιημένες MEK είναι κινάσες διπλής ειδικότητας, οι οποίες αποδεικνύουν μια μοναδική επιλεκτικότητα προς τις ERK στο επίπεδο MAPK. Μια εναλλακτικά ματισμένη ισομορφή της MEK1, που ονομάζεται MEK1b, αποδείχθηκε ότι ενεργεί με εξαιρετική εξειδίκευση, ενεργοποιώντας την ERK1c για τη διαμεσολάβηση κάποιων συγκεκριμένων διεργασιών, όπως η μίτωση (Shaul et al. 2009).

Η p38-MAPK ενεργοποιείται από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (π.χ. θερμικό σοκ, μεταβολές στην ωσμωτική πίεση και οξειδωτικό στρες), γενοτοξικούς και βλαπτικούς παράγοντες DNA (π.χ. σισπλατίνη, δοξορουβικίνη, υπεριώδες φως και γ-ακτινοβολία), φλεγμονώδεις κυτοκίνες, PAMPs (μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα), και DAMPs (μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με κίνδυνο). Η p38 είναι μια κινάση πολλαπλών λειτουργιών που ρυθμίζει πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της διαφοροποίησης, της απόκρισης στο στρες, της απόπτωσης, της μετανάστευσης και της επιβίωσης των κυττάρων μεταξύ άλλων, αλληλεπιδρώντας με ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (Bonney 2017; Cuenda and Rousseau 2007). Η ενεργοποίηση της p38 – MAPK οδηγεί στη φωσφορυλίωση πολλών μεταγραφικών ρυθμιστών που συντονίζουν συγκεκριμένα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης. Η εξαρτώμενη από p38 μεταγραφική απόκριση υπό συνθήκες στρες έχει παρατηρηθεί ότι εξαρτάται από το χρόνο και τη διέγερση (Ferreiro et al. 2010), υποδεικνύοντας έτσι ότι η p38 αλληλεπιδρά με επιπρόσθετες οδούς και σε συνδυασμό με παράγοντες μεταγραφής μη ρυθμιζόμενους από την p38, για να προκαλέσει διακριτές αποκρίσεις.

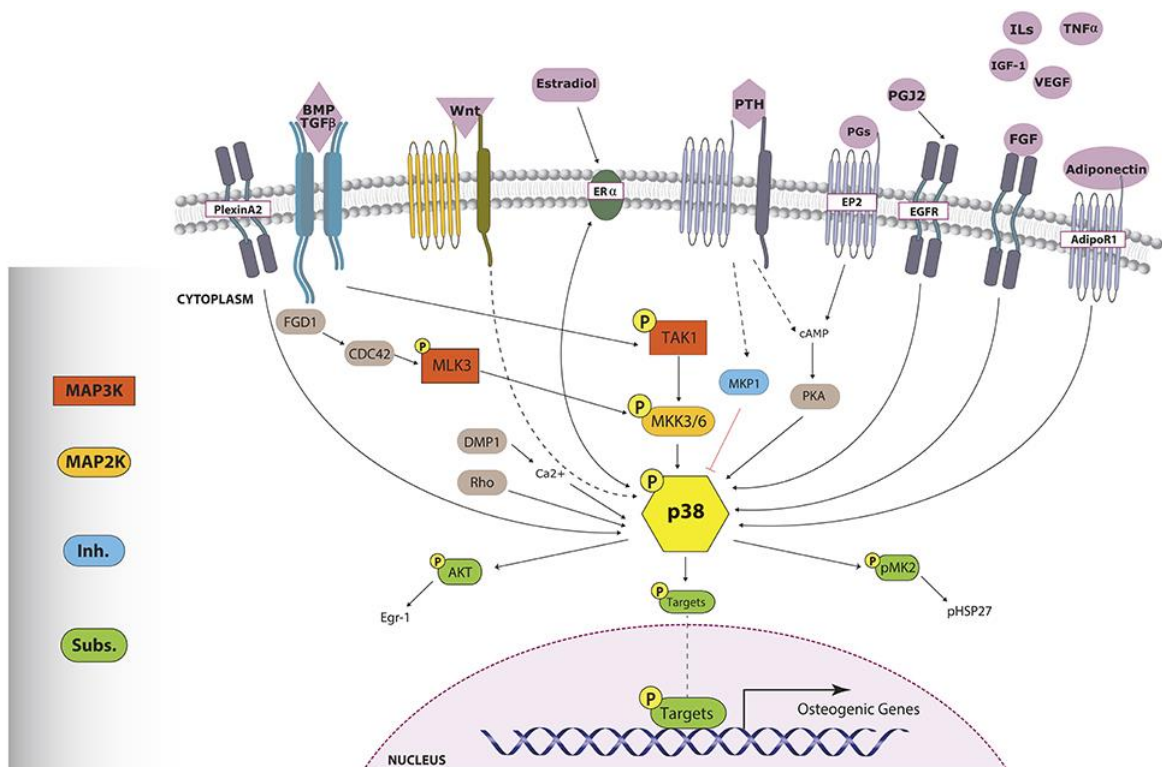
Η οικογένεια p38-MAPK αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: p38α (κωδικοποιείται από το γονίδιο *Mapk14*), p38β (*Mapk11*), p38γ (*Mapk12*) και p38δ (*Mapk13*). Τα γονίδια κωδικοποίησής τους έχουν μια διακριτή ιστική κατανομή και εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό, με το *Mapk14* να εκφράζεται περισσότερο (Cuadrado and Nebreda 2010). Οι p38 MAPK είναι υποστρώματα για τρεις MAP2K (MKK6, MKK3 και MKK4). Η συνεισφορά κάθε μίας από τις MAP2K στην ενεργοποίηση της p38-MAPK εξαρτάται από το ερέθισμα και τον τύπο των κυττάρων (Alonso et al. 2000; D Brancho 2003; Remy et al. 2010). Οι MAP3K που οδηγούν σε ενεργοποίηση των p38 MAPK είναι οι ASK1, DLK1, TAK1, TAO1, TAO2, TPL2, MLK3, MEKK3, MEKK4 και ZAK1 (Cuadrado and Nebreda 2010). Η p38α μπορεί επίσης να αυτοφωσφορυλιωθεί λόγω ενεργοποίησης μέσω των ZAP70, p56lck, και TAB1, και μειωμένης ρύθμισης της CDC47 (Cuadrado and Nebreda 2010).

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν αρκετά σύμπλοκα ικριωμάτων που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση MAPK-MAP2K ή αυξάνουν τοπικά τη συγκέντρωση των τελεστών του καταρράκτη MAPK, οδηγώντας σε χωρο-χρονική ρύθμιση. Τα πιο συχνά αναφερόμενα μόρια που σχετίζονται με αυτή τη λειτουργία ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζεται JIP (JNK interacting protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με JNK) που μπορούν να συνδέσουν την p38 και τη JNK στην ανοδική MAP2K. Οι JIP, οι οποίες έχουν τις ισομορφές JIP4 και SPAG9 (Dhanasekaran and Reddy 2008; Kelkar, Standen, and Davis 2005) και JIP2, έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση της p38 συνδέοντας

τις MKK3, MEKK3 και MKK4. Εκτός από τις πρωτεΐνες JIP, υπάρχουν και άλλα πιθανά ικρίωματα MAPK, όπως οι RACK1 (Arimoto et al. 2008), KSR-2 (Liu and Cao 2009), SEC8 (Tanaka et al 2014) και το ικρίωμα Rac-MEKK3-MKK3 που αναγνωρίζει μεταβολές στην ωσμωτική πίεση (osmosensing, OSM). Εκτός από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες, οι TAK1 και TAB1 θα μπορούσαν επίσης να θεωρηθούν ως ένα είδος πρωτεϊνών ικριωμάτων, καθώς διευκολύνουν την πρόσληψη και την ενεργοποίηση των ανάντη τελεστών της οδού ενεργοποίησης της p38 (



Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ενεργοποίηση p38-MAPK σε οστεοβλάστη (Rodríguez-Carballo, Gámez, and Ventura 2016).

Ανάμεσα στα υποστρώματα της υποοικογένειας της p38 MAPK ανήκουν διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και κινάσες. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι οι ισομορφές α και β της p38 MAPK, φωσφορυλιώνουν τις MAPKAPK 2 και 3 (MAPK-activated protein kinase), κινάσες Ser/Thr, οι οποίες επάγουν τη φωσφορυλίωση της μικρής πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP27 (McLaughlin et al. 1996; Stokoe et al. 1993). Στην ανενεργή της μορφή, η HSP27 έχει βρεθεί ότι σχηματίζει σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία λειτουργούν ως πρωτεΐνες-συνδοί (chaperones). Η φωσφορυλίωση των μορίων της HSP27 επάγει το διαχωρισμό των συμπλόκων σε μονομερή και διμερή και την ταυτόχρονη ανακατανομή τους σε διάφορα μέρη του κυτταροσκελετού. Με αυτόν τον τρόπο, οι p38α και β είναι δυνατό να επιδρούν στην κινητικότητα των κυττάρων και πιθανώς, να συντελούν στην επιδιόρθωση βλαβών του κυτταροσκελετού. Η p38-MAPK αλληλεπιδρά επίσης με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι MEF2 (myocyte enhancer factor 2), ATF2 και Elk1, οι οποίοι συνδέονται ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή στον υποκινητή διαφόρων γονιδίων. Η φωσφορυλίωση των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων από την p38-MAPK έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση είτε της ικανότητας τους για πρόσδεση στο DNA είτε των αλληλεπιδράσεων τους με άλλες πρωτεΐνες, με τελικό αποτέλεσμα την ενίσχυση ή τη μείωση της μεταγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2 προσδένεται σε 19 ακολουθίες DNA, πλούσιες σε αδερίνη και θυμίνη, οι οποίες

εντοπίζονται κυρίως σε υποκινητές μυο-ειδικών γονιδίων. Σε αντίθεση με τον MEF2, οι ATF2 και Elk1 δεν αποτελούν αποκλειστικά υποστρώματα της p38 MAPK, αφού η φωσφορυλίωση τους επιτυγχάνεται και από άλλα μέλη της οικογένειας των MAPK. Ειδικότερα, ο ATF2 ενεργοποιείται επίσης από τις JNK, ενώ ο Elk1 αποτελεί υπόστρωμα των ERK και των JNK (Kyriakis and Avruch 2001).

Οι p38-MAPK απενεργοποιούνται κυρίως μέσω αποφωσφορυλίωσης από ορισμένες φωσφατάσες που ανήκουν στην οικογένεια DUSP (dual specificity phosphatase) (Bermudez, Pagès, and Gimond 2010). Επιπλέον, η καταλυτική δραστηριότητα της p38α διαμορφώνεται ανάλογα με το πόσα και ποιά υπολείμματα θρεονίνης ή τυροσίνης φωσφορυλιώνονται στο βρόγχο ενεργοποίησης. Όπως και οποιοδήποτε άλλο σχετικό μόριο, η p38 ρυθμίζεται επίσης από μηχανισμούς όπως η ακετυλίωση, η αποικοδόμηση πρωτεϊνών και οι σταθεροποιητικοί συντελεστές και, προφανώς, αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων κωδικοποίησής τους (Cuadrado and Nebreda 2010). Η p38α εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Ο εντοπισμός της εξαρτάται από την ενεργοποίηση και από την ενεργή μεταφορά, καθώς η p38 δεν έχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Είναι γνωστό ότι βλάβες DNA ευνοούν τη φωσφορυλίωση και την πυρηνική συσσώρευση της p38α, πιθανώς απελευθερώνοντας την p38α από τις TAB1 ή MK2, καθώς δρουν ως κυτταροπλασματικές άγκυρες.

Υποοικογένεια JNK

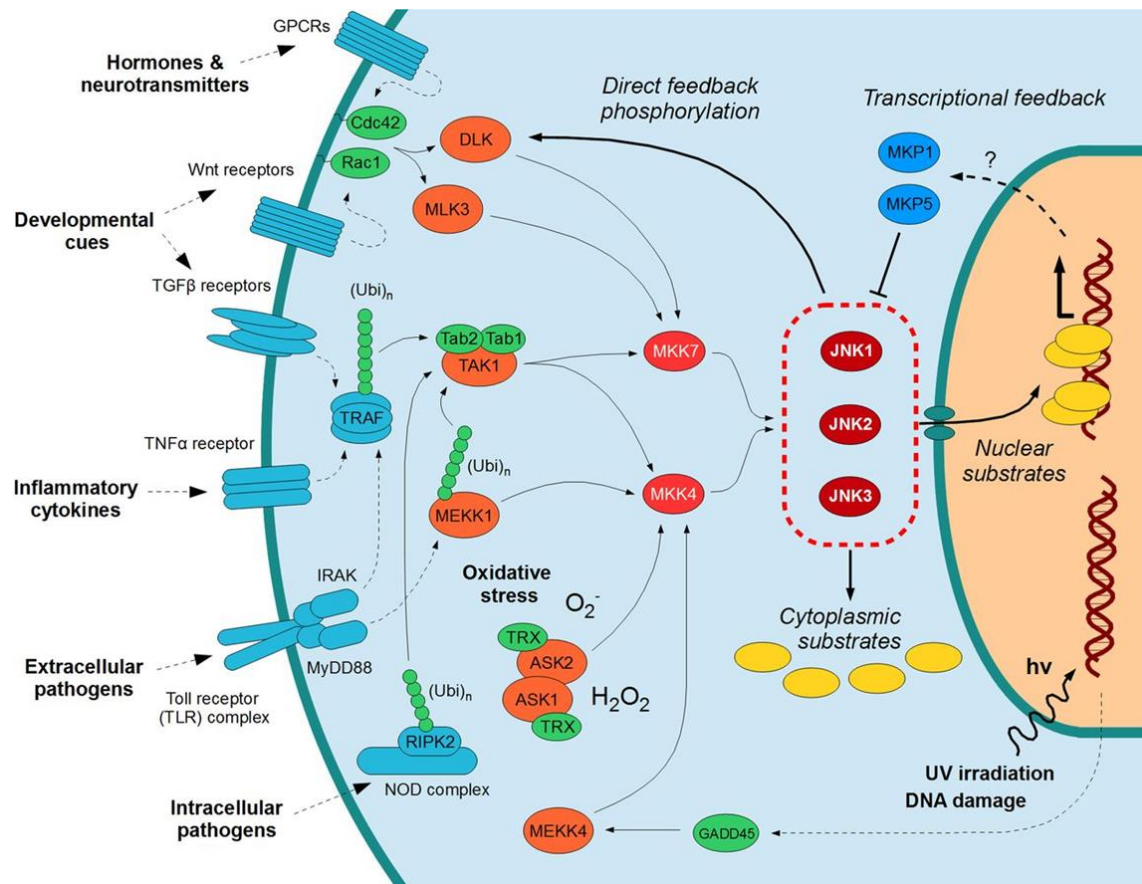
Οι κινάσες του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun (JNK), ως μέλη της οικογένειας των MAPK προκαλούν κυτταρικές αποκρίσεις σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και αβιοτικών στρες. Οι JNK ρυθμίζουν επίσης σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των νευρωνικών λειτουργιών, των ανοσολογικών δράσεων και της εμβρυϊκής ανάπτυξης, μέσω της επίδρασής τους στην έκφραση γονιδίων, τη δυναμική των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, την απόπτωση ή την επιβίωση. Παρόλο που το μονοπάτι JNK

μελετάται περίπου 30 χρόνια, η πολυπλοκότητά του εξακολουθεί να προκαλεί σύγχυση, με πολλούς πρωτεϊνικούς εταίρους των JNK, να βασίζονται στην ποικιλία των δράσεων. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι άμεσα υποστρώματα των JNK. Οι JNK έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενεργοποιούνται ως απόκριση στο στρες (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 2017), σε κυτοκίνες (Verrecchia et al. 2003), αυξητικούς παράγοντες (Barnard et al. 2016; Chang et al. 2013; Chen et al. 2013; Chen, Wong-Chong, and SundarRaj 2011; Kanazawa et al. 2010; Kimura et al. 2013; Shi et al. 2015, 2016), μόρια ECM (Kim et al. 2019), καθώς και παθογόνα (Zeke et al. 2016), όλα εκ των οποίων προκύπτουν κατά τη διάρκεια ενός τραύματος. Οι JNK εκφράζονται σε όλους τους τύπους κυττάρων, με 10 ισομορφές που προκύπτουν από την εναλλακτική σύνδεση τριών διαφορετικών γονιδίων (Yao et al. 2014). Τα JNK-1 και JNK-2 εκφράζονται σε όλο το σώμα, με μόνο το JNK-3 να δείχνει ειδική έκφραση στον εγκέφαλο, την καρδιά και τους όρχεις (Davis 2000).

Ισομορφές JNK

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει τρία στενά συνδεδεμένα γονίδια JNK: JNK1, JNK2 και JNK. Και τα τρία γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες -400-αμινοξέων που περιλαμβάνουν λίγο περισσότερο από έναν κανονικό τομέα πρωτεϊνικής κινάσης Ser / Thr. Εντός του πυρήνα κινάσης, οι JNK περιέχουν πολλά πρόσθετα δομικά χαρακτηριστικά καλά διατηρημένα μεταξύ των MAPK: το ένθετο CMGC που προεξέχει από το βρόγχο κινάσης, την έλικα μικρού κοινού συνδέσμου (CD) και την καρβοξυλική έλικα που συνδέεται πίσω στον αμινοτελικό βρόγχο. Τα περισσότερα ασπόνδυλα ζώα διαθέτουν μόνο ένα γονίδιο JNK (π.χ., το Basket στη *Drosophila*). Στα σπονδυλωτά, τα τρία γονίδια JNK (συντηρημένα από τους ιχθείς έως τα θηλαστικά) φαίνεται να έχουν προκύψει από αναδιπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος στην αρχή της εξέλιξης των σπονδυλωτών (Zeke et al. 2016).

Και τα τρία γονίδια JNK κωδικοποιούν πολλαπλές ισομορφές που δημιουργούνται από εναλλακτικό μάτισμα μεταγραφής. Μία τέτοια εναλλακτική θέση ματίσματος βρίσκεται στην ακολουθία που καθορίζει τον καρβοξυτελικό λοβό του τομέα κινάσης. Η χρήση ενός αμοιβαία αποκλειστικού ζεύγους εξονίων (το έκτο εξόνιο στα περισσότερα μετάγραφα) έχει ως αποτέλεσμα δύο παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες κινάσεις, που ονομάζονται α- και β-ισομορφές. Δυστυχώς, η ονοματολογία για αυτές τις ισομορφές δεν είναι συνεπής, με τις ισομορφές που ενσωματώνουν το εξόνιο 6α να υποδηλώνονται JNK1α και JNK3α αλλά και JNK2β, ενώ οι JNK1β, JNK3β και JNK2α περιέχουν όλες το εξόνιο 6β.



Εικόνα 24: Συνολική οργάνωση των οδών σηματοδότησης JNK. Τα μονοπάτια JNK ενεργοποιούνται από μια ποικιλία εξωκυτταρικών ερεθισμάτων (π.χ., κυτοκίνες, παθογόνα, μορφογονικούς παράγοντες, ορμόνες) καθώς και ενδοκυτταρικά ερεθίσματα (π.χ. οξειδωτικό στρες, βλάβη στο DNA), που οδηγούν σε τρεις JNK. Αυτά τα φωσφορυλιωμένα ποικίλα κυτταροπλασματικά καθώς και πυρηνικά υποστρώματα εμπλέκονται σε κυκλώματα άμεσης ανατροφοδότησης (π.χ. φωσφορυλίωσης των MAP3Ks) καθώς και έμμεσων (π.χ. έκφρασης των φωσφατασών διπλής ειδικότητας MKP1 και MKP5). Τα μέλη πρωτεϊνικής κινάσης του πυρήνα της οδού των MAPK εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ κρίσιμες πρωτεΐνες που ελέγχουν άμεσα την ενεργοποίηση MAP3K δείχνονται με πράσινο χρώμα. Οι πρωτεΐνες ανάντη της οδού είναι χρωματισμένες τυρκουάζ, οι MKP είναι μπλε και τα υποστρώματα είναι κίτρινα. Τα συνεχή βέλη δηλώνουν άμεση δέσμευση ή άμεσες ενζυματικές αντιδράσεις, ενώ τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν είτε έμμεσες, πολλαπλές αντιδράσεις ή συνδέσεις όπου ο ακριβής μηχανισμός είναι αβέβαιος (Zeke et al. 2016).

Όπως ο καταρράκτης των p38, και αυτός των JNK ανταποκρίνεται στους υποδοχείς που σχετίζονται με το στρες και την απόπτωση, σε ανεξάρτητες φυσικές πιέσεις, στους GPCR και ακόμη και στους RTK. Αυτές οι αλλαγές στη μεμβράνη, που είτε περιλαμβάνουν είτε δεν περιλαμβάνουν υποδοχείς, μεταδίδουν περαιτέρω τα σήματα σε πρωτεΐνες - προσαρμογείς που μπορούν να ενεργοποιήσουν κινάσες της κλίμακας των MAP4K και άλλοτε της κλίμακας των MAP3K του καταρράκτη των JNK (Dan, Watanabe, and Kusumi 2001). Εναλλακτικά, οι μεμβρανικοί υποδοχείς μπορούν να επάγουν ένα δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που τελικά προκαλούν είτε ενεργοποιητικές αλλαγές στις πρωτεΐνες προσαρμογής (π.χ. TRAF) ή

ενεργοποιούν μικρές GTPases (π.χ., RAC, CDC42). Αυτές οι δύο διαδικασίες μεταδίδουν στη συνέχεια το σήμα περαιτέρω, ενεργοποιώντας τις MAP4K ή απευθείας τις MAP3K. Οι κινάσες στα επίπεδα MAP4K περιλαμβάνουν τις GCK, GLK, GCKR, HPK και άλλες κινάσες τύπου Ste20 (Strange, Denton, and Nehrke 2006), οι οποίες είναι κοινές ως επί το πλείστον με τον καταρράκτη p38 και μπορούν να φωσφορυλιώσουν κινάσες στο επίπεδο MAP3K (Craig et al. 2008). Και πάλι, οι MAP3K είναι κοινές μεταξύ p38 και JNK σηματοδότησης, αν και σε αυτό το στάδιο, κάποιες MAP3Ks όπως οι ASK2, LZK1, MLK1 και MEKK4 έχουν αναφερθεί μόνο στον καταρράκτη των JNK (Keshet and Seger 2010).

Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένες MAP3K μεταδίδουν τα σήματα σε κινάσες στο επίπεδο των MAPKK, κυρίως στη MKK4 και την MKK7 (Toyoshima, Moriguchi, and Nishida 1997) αλλά μπορεί σε πολύ μικρότερο βαθμό και στις MKK3 / 6 (Dérjard et al. 1995). Είναι ενδιαφέρον ότι η MKK7 φαίνεται να εκφράζει έναν ιδιαίτερα υψηλό αριθμό (~ 6) εναλλακτικών ματισμένων ισομορφών με ξεχωριστές δράσεις που εμπλέκονται στην εξειδίκευση της απόκρισης σε ερεθίσματα στρες σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ή κυτταρικά διαμερίσματα. Όπως και οι άλλες MAPK, οι κύριες κινάσες JNK (MKK4, MKK7) ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση του τυπικού μοτίβου Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser / Thr (Ser198, Thr202 στην MKK7) και στη συνέχεια μπορούν να μεταδώσουν το σήμα περαιτέρω στο επίπεδο JNK. Ο βρόχος ενεργοποίησης των JNKs περιέχει μια προλίνη στη θέση Xaa του μοτίβου Thr-Xaa-Tyr. Μόνο μία MAPKAPK, η MAPKAPK3 (Zakowski et al. 2004) εμπλέκεται στον καταρράκτη MAPK. Μια άλλη κινάση που έχει αναφερθεί ότι δρα κατάντη των JNK είναι η RSK1, όμως, αυτή η κινάση δεν φαίνεται να είναι στόχος JNK υπό τις περισσότερες συνθήκες και ως εκ τούτου δεν θεωρείται γνήσιο συστατικό του καταρράκτη. Επιπλέον, μόνο ένας μικρός αριθμός στόχων για τις JNK έχει προσδιοριστεί στο κυτοσόλιο (Gdalyahu et al. 2004; Zhang et al. 2001), παρόλο που αυτός ο καταρράκτης φαίνεται να είναι σημαντικός ρυθμιστής πυρηνικών διεργασιών, ιδίως της μεταγραφής. Ετσι, λίγο μετά την ενεργοποίηση, όπως και οι άλλες MAPK, οι JNK μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου συνήθως συνδέονται φυσικά με τους στόχους (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες, όπως c-Jun, ATF, Elk1) και τους ενεργοποιούν.

Παρά τις έντονες ομοιότητες και τα κοινά στοιχεία που μοιράζονται, οι καταρράκτες ενεργοποίησης των JNK και p38 μεταδίδουν σαφώς διακριτά σήματα και συχνά ρυθμίζουν διακριτές κυτταρικές διεργασίες. Η ειδικότητα αυτών των καταρρακτών φαίνεται να ρυθμίζεται ιδιαίτερα από πρωτεΐνες ικρίωματος που φέρνουν σε εγγύτητα τα μόρια σηματοδότησης (Davis 2000).

1.7.4 Σηματοδοτική οδός PI3K-AKT

Συντηρημένη από τα μετάζωα έως τον άνθρωπο, η AKT γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B - PKB) – είναι μέλος της οικογένειας AGC των πρωτεϊνικών κινασών, και έχει δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Hanada, Feng, and Hemmings 2004). Η AKT παίζει ρόλο στο μεταβολισμό των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Η ενεργοποίησή της ελέγχεται από μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει την 3-κινάση φωσφοϊνοσιτόλης (PI3K). Σήμερα θεωρείται μία από τις σημαντικότερες πρωτεϊνικές κινάσες των ανώτερων ευκαρυωτών και της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας (Manning and Cantley 2007). Η ενεργοποίηση της AKT επάγει την έκφραση των COL1 και COL3, μέσω του υποδοχέα αδενোসίνης A_{2A}R. Το cAMP είναι ένας δοσοεξαρτώμενος διακόπτης για την παραγωγή κολλαγόνου μέσω μη-κανονικής σηματοδότησης, εξαρτώμενης από την AKT, και ανεξάρτητης από τη σηματοδότηση των SMAD2/3 (Perez-Aso, Mediero, and Cronstein 2013).

Το γονίδιο akt είναι το κυτταρικό ομόλογο του ογκογονιδίου v-akt που προήλθε από τον AKT8, έναν ρετροϊό σε μύες που περιγράφηκε αρχικά το 1987 (Staal 1987). Το 1991, τρεις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες κλωνοποίησαν και χαρακτήρισαν τις κινάσες AKT. Η ομάδα του Philip Tsichlis αναγνώρισε το v-akt ως το γονίδιο που μεταδόθηκε από τον ρετροϊό AKT8 (Bellacosa et al. 1991), και στη συνέχεια έδειξε ότι το κυτταρικό ομόλογό του, που ονομάστηκε τότε c-akt, κωδικοποίησε την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, κινάση σερίνης-θρεονίνης AKT, σε μύες.

Όλες οι ισομορφές AKT μοιράζονται παρόμοιες δομές, δηλαδή αποτελούνται από έναν αμινοτελικό ρυθμιστικό τομέα που περιλαμβάνει έναν τομέα ομολογίας πλεξτρίνης (pleckstrin homology (PH)), μια συνδετική περιοχή που συνδέει τον τομέα PH σε έναν τομέα κινάσης με ειδικότητα σερίνης / θρεονίνης και μια καρβοξυτελική περιοχή απαραίτητη για την επαγωγή και τη συντήρηση της δραστηριότητας κινάσης (Chan, Rittenhouse, and Tsichlis 1999). Τα κύτταρα θηλαστικών εκφράζουν τρεις ισομορφές AKT: AKT1 (PKBα), AKT2 (PKBβ) και AKT3 (PKBγ), όλες κωδικοποιημένες από διαφορετικά γονίδια. Η AKT1 είναι πανταχού παρούσα σε υψηλά επίπεδα (Coffer and Woodgett 1991). Αντιθέτως, η AKT2 εκφράζεται ιδιαίτερα σε ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς, όπως το ήπαρ, ο σκελετικός μυς και ο λιπώδης ιστός (Jones, Jakubowicz, and Hemmings 1991; Konishi et al. 1994). Η έκφραση της AKT2 αυξάνεται δραστικά κατά τη διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού και του σκελετικού μυός (Hill et al. 1999; Vandromme et al. 2001). Η AKT3 εκφράζεται σε πιο υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο και στους όρχεις και εμφανίζει

χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο εντερικό επιθήλιο και σε μυϊκούς ιστούς (Nakatani et al. 1999).

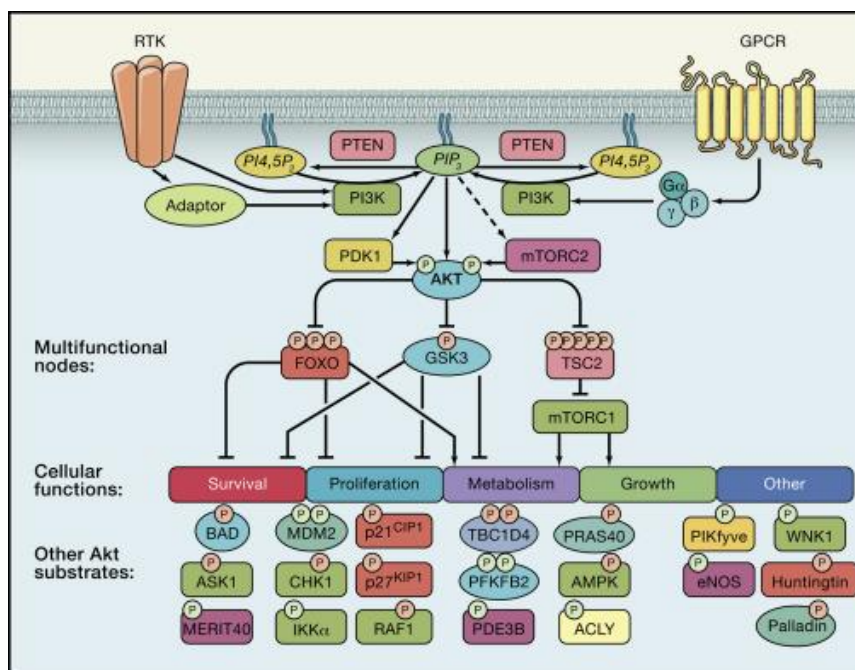
Για την κατανόηση της ρύθμισης της ενεργοποίησης της AKT ήταν κρίσιμο το εύρημα ότι η δραστικότητα της κινάσης AKT, προκαλείται μετά από ενεργοποίηση της PI3K σε καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (BMT Burgering 1995; Franke et al. 1995). Στην πλασματική μεμβράνη, η PI3K φωσφορυλιώνει φωσφοϊνοσιτίδια στη θέση 3'-OH (D3) του δακτυλίου ινσιτόλης για τη δημιουργία των δευτερογενών αγγελιοφόρων φωσφατιδυλινσιτόλη-3,4-διφωσφορικό (PI-3,4-P2) και φωσφατιδυλινσιτόλη-3,4,5-τριφωσφορικό (PIP3), χρησιμοποιώντας φωσφατιδυλινσιτόλη-4-φωσφορικό (PI-4-P) και φωσφατιδυλινσιτόλο-4,5-διφωσφορικό (PI-4,5-P2) ως υποστρώματα, αντίστοιχα (Engelman, Luo, and Cantley 2006). Αν και είχε ήδη αποδειχθεί ότι τα επίπεδα των D3-φωσφορυλιωμένων φωσφατιδυλινσιτολών μεταβάλλονται μετά από διέγερση των κυττάρων από αυξητικό παράγοντα (Auger et al. 1989), μόλις το 1992 ταυτοποιήθηκε ένα cDNA μίας κινάσης ικανής, να φωσφορυλιώνει τη φωσφατιδυλινσιτόλη (PI) στη θέση D3 (Hiles et al. 1992). Στη συνέχεια, το PI3K αποδείχθηκε ότι αποτελείται από ρυθμιστικές υπομονάδες (85 kDa) και καταλυτικές (110 kDa). Μέχρι σήμερα, τέσσερις καταλυτικές υπομονάδες που μπορούν να φωσφορυλιώσουν PI, PI-4-P και PI-4,5-P2 έχουν κλωνοποιηθεί *in vitro* (Carter et al. 1994; Stephens, Hughes, and Irvine 1991). Οι κλάσεις IA PI3K (p110α, p110β και p110δ) συνδέονται με διάφορες ρυθμιστικές υπομονάδες για το σχηματισμό ενεργών ετεροδιμερών με ξεχωριστή έκφραση και δραστικότητα (Engelman 2006).

Η ενεργοποίηση της PI3K έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση δύο βασικών καταλοίπων της AKT1, στο βρόχο ενεργοποίησης T308, ή T-βρόχο, στον πυρήνα της καταλυτικής περιοχής της κινάσης, και στη S473, σε ένα υδρόφοβο μοτίβο στο καρβοξυτελικό άκρο (Alessi et al. 1996). Η φωσφορυλίωση και των δύο καταλοίπων απαιτείται για τη μέγιστη ενεργοποίηση της κινάσης. Αυτό το πρότυπο φωσφορυλίωσης εμφανίζεται επίσης στα αντίστοιχα κατάλοιπα της AKT2 (T309 και S474) και της AKT3 (T305 και S472).

Η πρωτεϊνική κινάση 1 που εξαρτάται από φωσφοϊνοσιτίδιο (PDK1) ανακαλύφθηκε για την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει την AKT1 στο κατάλοιπο T308 (Alessi et al. 1997). Η μετακίνηση των AKT και PDK1 στη μεμβράνη, σε θέσεις σύνθεσης PIP3 ή PI3,4P2, προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές, παρέχοντας πρόσβαση της PDK1 στην AKT για τη φωσφορυλίωση του T308. Στην αδρανή διαμόρφωση, ο τομέας AKT PH είναι ανασταλτικός και αυτή η διαμόρφωση "PH-in" αλλάζει από τη δέσμευση της PI3K στον τομέα PH, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση "PH-out", που απελευθερώνει τον τομέα κινάσης και επιτρέπει τη φωσφορυλίωσή της από την PDK1 (Calleja et

al. 2007). Η PDK1 απαιτείται επίσης για τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης άλλων πρωτεϊνικών κινάσων της οικογένειας AGC, συμπεριλαμβανομένων όλων των ισομορφών των κινάσων PKC, S6K, SGK και RSK που διεγείρονται από αυξητικό παράγοντα (Mora et al. 2004). Ωστόσο, καμία από αυτές τις κινάσες δεν διαθέτει περιοχή δέσμευσης PIP3 και η AKT φαίνεται να είναι ο μόνος υποχρεωτικός στόχος της PDK1, εξαρτώμενης από την PIP3, μεταξύ αυτής της ομάδας (Collins 2003; McManus et al. 2004).

Η μέγιστη ενεργοποίηση της AKT απαιτεί φωσφορυλίωση της S473 στο υδρόφοβο μοτίβο. Η πρώτη κινάση AKT S473 είναι ο μηχανιστικός στόχος του συμπλέγματος ραπαμυκίνης 2 (mTORC2) (Sarbasov 2005). Παρόλο που AKT που στερείται φωσφορυλίωσης της S473 έχει κάποια δραστηριότητα, αν και αρκετά μειωμένη, φαίνεται πως η φωσφορυλίωση της S473 , σταθεροποιεί και τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης T308 και τελικά την ενεργοποιημένη κατάσταση της AKT (Alessi et al. 1996; Yang et al. 2002). Αναλογικά με την PDK1, το mTORC2 φωσφορυλιώνει και άλλες κινάσες AG, στα αντίστοιχα υδρόφοβα κατάλοιπα του μοτίβου τους, αν και το αντίστοιχο μοτίβο στο S6K1 (T389) στοχεύεται από το mTORC1 (Saxton and Sabatini 2017). Πέρα από τη φωσφορυλίωση, έχουν εντοπιστεί διάφορες άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις ισομορφές της AKT. Έχει τεκμηριωθεί η ακετυλίωση της λυσίνης στη θέση 14 (K14) στον τομέα AKT PH, ενώ η SIRT1 φαίνεται πως αποακετυλιώνει αυτό το κατάλοιπο. Η ακετυλίωση K14 έχει προταθεί ότι απαιτείται για δέσμευση της AKT στην PIP3 και, επομένως, στη μετατόπιση στη μεμβράνη (Sundaresan et al. 2011).



Εικόνα 25: Υποστρώματα και λειτουργίες της ενδοκυτταρικής οδού σηματοδότησης PI3K/AKT (Manning and Toker 2017).

Η ενεργοποίηση της AKT μπορεί να προάγει την επιβίωση των κυττάρων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αλλαγές στις κυτταρικές μεταβολικές οδούς μέσω των πολυάριθμων, καθοδικών της στόχων (Εικόνα 25). Ενώ η φωσφορυλίωση μέσω της AKT πολλών εκ των υποστρωμάτων της, έχει μόνο μία φυσιολογική συνέπεια, η AKT ελέγχει επίσης κόμβους σηματοδότησης που ρυθμίζουν στη συνέχεια πολλαπλούς κυτταρικούς στόχους και λειτουργίες. Στη συνέχεια επισημαίνονται τρεις από τους καλύτερα εδραιωμένους στόχους της AKT, οι οποίοι είναι επίσης βασικοί κόμβοι σηματοδότησης, που ενσωματώνουν τη σηματοδότηση AKT με πρόσθετα κυτταρικά ρυθμιστικά μονοπάτια:

1. Κινάση συνθετάσης γλυκογόνου-3 (GSK3)

Η πολυλειτουργική κινάση συνθετάσης γλυκογόνου -3 (GSK3) ήταν το πρώτο υπόστρωμα της AKT που εντοπίστηκε (Cross et al. 1995). Μέσω του σύνθετου σχηματισμού με διακριτά μόρια σηματοδότησης, η GSK3 συμμετέχει σε διαφορετικές οδούς σηματοδότησης στα κύτταρα, κυρίως στην ενδοκυτταρική οδό Wnt-β-catenin. Είναι σημαντικό ότι η ρύθμιση της GSK3 σε τέτοιες οδούς πιστεύεται ότι είναι ανεξάρτητη από τη ρύθμισή της μέσω σηματοδότησης αυξητικού παράγοντα μέσω των PI3K και AKT. Η GSK3 είναι γενικά ενεργή απουσία εξωγενών σημάτων και έτσι απενεργοποιείται έντονα κατά τη διέγερση κυττάρων με αυξητικούς παράγοντες (Manning and Toker 2017). Η GSK3 ρυθμίζει ένα μεγάλο, λειτουργικά διαφορετικό σύνολο άμεσων καθοδικών στόχων, οι περισσότεροι από τους οποίους αναστέλλονται ή αποικοδομούνται κατά τη μεσολάβηση της φωσφορυλίωσης από την GSK3 (Kaidanovich-Beilin et al. 2012).

2. Μεταγραφικοί παράγοντες FoxO

Οι μεταγραφικοί παράγοντες του Forkhead Box O (FoxO), που αποτελούνται από τους FoxO 1, 3, 4 και 6, ελέγχουν ένα διαφορετικό σύνολο γονιδίων-στόχων που, μεταξύ άλλων, εμπλέκονται στην προσαρμογή στη νηστεία και τη χαμηλή ινσουλίνη και στη σηματοδότηση του IGF1 (van der Vos and Coffey 2011; Webb and Brunet 2014). Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης PI3K/AKT οδηγεί στη μετατόπιση των πρωτεϊνών FoxO από τον πυρήνα και στην εξασθένιση του μεταγραφικού τους έργου (Brunet et al. 1999). Η εξαιρετικά συντηρημένη γενετική σχέση μεταξύ των μελών της οικογένειας AKT και των μεταγραφικών παραγόντων FoxO παρέχει ουσιαστική

απόδειξη της ζωτικής ρυθμιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της σηματοδότησης AKT και της καταστολής του μεταγραφικού προγράμματος FoxO.

3. *Tuberous Sclerosis Complex 2 & mTORC*

Οι PI3K και AKT παίζουν έναν εξελικτικά συντηρημένο ρόλο στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης ιστών και οργανισμών ως αποτέλεσμα αυξητικών παραγόντων, όπως ο IGF1. Αυτή η ρύθμιση συμβαίνει κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του συμπλόκου κινάσης ραπαμυκίνης των θηλαστικών mTORC1 από την AKT, το οποίο διεγείρει τις βιοσυνθετικές διεργασίες στις οποίες βασίζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (Saxton and Sabatini 2017). Η ενεργοποίηση του mTORC1 χρησιμεύει στην προώθηση μιας ποικιλίας αναβολικών διεργασιών, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων, ενώ αναστέλλει την καταβολική διαδικασία της αυτοφαγίας. Επιπλέον, το mTORC1 είναι βασικός καθοδικός τελεστής της σηματοδότησης PI3K-AKT και αναστολέας μονοπατιών που ασκεί ισχυρή αρνητική ανάδραση (feedback) στην ενεργοποίηση της AKT από την RTK.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανεπαρκής επούλωση πληγών μπορεί να προκαλέσει τεράστια ψυχική και σωματική επιβάρυνση στους ασθενείς. Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 15% των ηλικιωμένων ενηλίκων πάσχουν από χρόνια έλκη. Επιπλέον, κάθε 30 δευτερόλεπτα, ένα κάτω άκρο χάνεται κάπου στον κόσμο ως αποτέλεσμα λοίμωξης από πληγές (Sen 2019). Στον αντίποδα, οι υπερτροφικές ουλές ανάλογα με την τοποθεσία και το μέγεθος μπορούν να προκαλούν πόνο και κνησμό, ενώ και από κοσμητολογικής άποψης δυσχεραίνουν τη ψυχολογία του ασθενούς. Το βάρος της θεραπείας πληγών με ανεπαρκή επούλωση αυξάνεται ραγδαία λόγω του αυξανόμενου κόστους της υγειονομικής περίθαλψης, της γήρανσης του πληθυσμού και της απότομης αύξησης, παγκοσμίως, ασθενειών όπως ο διαβήτης (Olsson et al. 2019). Αυτοί οι παράγοντες επιβάλλουν μεγάλο κόστος στην κοινωνία και τονίζουν την ανάγκη για καλύτερη διαχείριση της επούλωσης ελκών.

Συνοπτικά, παρά τη σαφή, ανεκπλήρωτη κλινική ανάγκη, η έρευνα για την επούλωση πληγών έχει να αποδώσει νέες, επιστημονικά καθοδηγούμενες θεραπείες για περισσότερο από μια δεκαετία. Η πολυπαραγοντική αιτιολογία της παθολογικής επούλωσης, η μη επαρκής κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την επούλωση, οι περιορισμοί που προκύπτουν από τα προκλινικά μοντέλα και οι απαιτήσεις για πλήρη ίαση της πληγής, συμβάλλουν όλα στην αργή ανάπτυξη. Επιπρόσθετα, η πιθανότητα ανάπτυξης μονοθεραπείας που να είναι αποτελεσματική, καθίσταται ιδιαίτερος χαμηλή. Ένας τέτοιος παράγοντας θα πρέπει να έχει πλειοτροπική δράση και να δρα αναλόγως του περιβάλλοντος.

Στην **Ενότητα 1.6** παρουσιάστηκαν τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τρία θυμοσινικά πεπτίδια. Η θυμοσίνη β4 είναι ένα πεπτίδιο με προστατευτική, επιδιορθωτική και αναγεννητική δράση επί διαφόρων ιστών (Goldstein et al. 2012). Οι ιδιότητες αυτές προκύπτουν από *in vitro* δοκιμασίες σε ζωικά ή ανθρώπινα κύτταρα, αλλά και *in vivo* δοκιμασίες σε ζωικά μοντέλα σε διάφορους ιστούς. Όπως η Τβ4, έτσι και το αμινοτελικό της άκρο, το τετραπεπτίδιο AcSDKP, εμφανίζει και αυτό επουλωτικές ιδιότητες που αποδίδονται σε αντι-ινωτικές και αγγειογενετικές δράσεις. Η θυμοσίνη α1 έχει μελετηθεί ευρύτατα για την ανοσορυθμιστική και ανοσοτροποποιητική της δράση, και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αλλαγής στόχου φαρμάκου (repurposing), αφού κυκλοφορεί ήδη σε 35 χώρες για τη θεραπεία χρόνιων νοσημάτων, ενώ συνεχίζει συνεχώς να μελετάται ως προς τη θεραπεία πληθώρας νέων ασθενειών. Ως προς την επουλωτική της δράση στο δέρμα, η Τα1 έχει μελετηθεί μόνο μία φορά, το 1998, ενώ η ερευνητική ομάδα έχει καταθέσει τόσο για την Τα1 όσο και για την Τβ4 ευρασιτεχνίες ως προς την επούλωση του δέρματος.

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθίσταται σαφές, πως και τα τρία πεπτίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικούς υποψήφιους θεραπευτικούς παράγοντες στην επούλωση του δέρματος. Τα *in vivo* αποτελέσματα στο δέρμα καταδεικνύουν την καλύτερη επούλωση με αύξηση της αγγειογένεσης και περίσσεια κολλαγόνου λόγω αυξημένης μετανάστευσης ινοβλαστών. Παρόλο που η Τβ4 ενυπάρχει φυσικά στην πληγή και φαίνεται να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην επούλωση, το αποτέλεσμα των κλινικών δοκιμών δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Στο **Παράρτημα Ι** της παρούσας εργασίας παρουσιάζονται συνοπτικά οι διαφορές στο δέρμα των ανθρώπων σε σχέση με τους μύες, το πιο σύνηθες μοντέλο επούλωσης πληγών, ούτως ώστε οι αναφορές στη βιβλιογραφία να μπορέσουν να αξιολογηθούν πιο αποτελεσματικά και με γνώμονα τις ενυπάρχουσες διαφορές, το θεραπευτικό αποτέλεσμα να επιτευχθεί και στον άνθρωπο. Στην παρούσα εργασία το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επούλωσης είναι οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες. Καθίσταται σαφές ότι τα *in vitro* πειράματα έχουν αρκετούς περιορισμούς ως προς την μελέτη ενός ιδιαίτερως πολυπαραγοντικού μηχανισμού όπως είναι η επούλωση (βλ. Ενότητα .1.2). Όμως, θα πρέπει να συνυπολογισθούν τα ακόλουθα:

- i) Οι δερματικοί ινοβλάστες, ένας από τους κύριους τύπους κυττάρων στο δέρμα, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των ινωτικών παθήσεων καθώς και στην επιδιόρθωση του δέρματος, σχεδόν σε όλα τα στάδια της επούλωσης.
- ii) Οι δερματικοί ινοβλάστες διευκολύνουν την επούλωση των πληγών μέσω της ενίσχυσης της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κολλαγόνου. Το κολλαγόνο, μία από τις πιο άφθονες και πανταχού παρούσες πρωτεΐνες στο ανθρώπινο σώμα, είναι ένα κύριο συστατικό της μήτρας εξωκυττάριου συνδετικού ιστού.
- iii) Η απορρύθμιση της παραγωγής κολλαγόνου οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της ίνωσης των ιστών, καθώς και σε καθυστέρηση της επουλωτικής διαδικασίας.
- iv) Οι *in vitro* μελέτες θυμοσινικών πεπτιδίων σε δερματικούς ινοβλάστες είναι περιορισμένες και όσες υπάρχουν, αποτελούν κυρίως επέκταση των *in vivo* μελετών και συνεπώς μη ανθρώπινης προέλευσης.
- v) Η μελέτη της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων στην επούλωση έχει στραφεί περισσότερο προς την αγγειογενετική και αντι-ινωτική τους δράση, ενώ η πολυπλοκότητα ενός *in vivo* πειράματος καθιστά δυσχερέστερη την ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών που συνεισφέρουν στο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Προηγούμενα Αποτελέσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της βιολογικής δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε *in vitro* συστήματα μελέτης κυτταρικών λειτουργιών που σχετίζονται με την δερματική επούλωση. Προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης (IBE, Δημόκριτος) έδωσαν το έναυσμα για τη διέnergεια της παρούσας εργασίας) (**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II**). Πιο συγκεκριμένα, πειράματα ως προς τη δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατέδειξαν πως και τα τρία πεπτίδια διεγείρουν ελαφρώς, αλλά στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών στις τρεις ημέρες μετά την προσθήκη τους. Επιπλέον, όλα τα πεπτίδια αποδείχθηκε ότι επάγουν τη σύνθεση των μεταλλοπρωτεασών μήτρας (MMP) που εκκρίνονται από τους ινοβλάστες. Από την άλλη πλευρά, προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η Tβ4 και το AcSDKP διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου Col1α1, όπως αξιολογείται με qRT-PCR (Santorinaίου 2019). Το πιο σημαντικό εύρημα όμως είναι ότι τα τρία πεπτίδια διεγείρουν το ρυθμό σύνθεσης κολλαγόνου στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες σε επίπεδο συγκρίσιμο με αυτό που προκαλείται από τον TGF-β, όπως αναδείχθηκε από τη μέθοδο της ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης (Kikidou 2018).

Αντικειμενικοί στόχοι παρούσας εργασίας

1. Διερεύνηση της δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων (Tβ4, AcSDKP) στη διέγερση του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου.
2. Μελέτη της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που επάγεται με τη χορήγηση θυμοσινικών πεπτιδίων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεντρώσεις. Επελέγησαν καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες των κυττάρων, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας κ.α.
3. Συσχέτιση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης που διεγείρονται από τα θυμοσινικά πεπτίδια με την κολλαγονοσύνθεση, μέσω χρήσης ειδικών φαρμακολογικών αναστολέων.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπως περιγράφηκε και στην προηγούμενη ενότητα, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που διεγείρεται κατά την επώαση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών με τρία θυμοσινικά πεπτίδια. Τα προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου και ιδιαίτερα η αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης καθόρισαν σε μεγάλο βαθμό τις ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης που διερευνήθηκαν. Επιγραμματικά, η μεθοδολογία της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει την καλλιέργεια των δερματικών ινοβλαστών (Ενότητα 3.1), την επώαση των κυττάρων με τα θυμοσινικά πεπτίδια (Ενότητα 3.2), τη λύση των κυττάρων με ταυτόχρονη απομόνωση των πρωτεϊνών και τέλος, την ανάλυση Western (Ενότητα 3.4). Σε κάθε ενότητα παρουσιάζονται κάποια θεωρητικά στοιχεία της μεθόδου και ακολουθεί η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης.

3.1 Επιλογή Κυτταρικής Σειράς & Κυτταροκαλλιέργεια

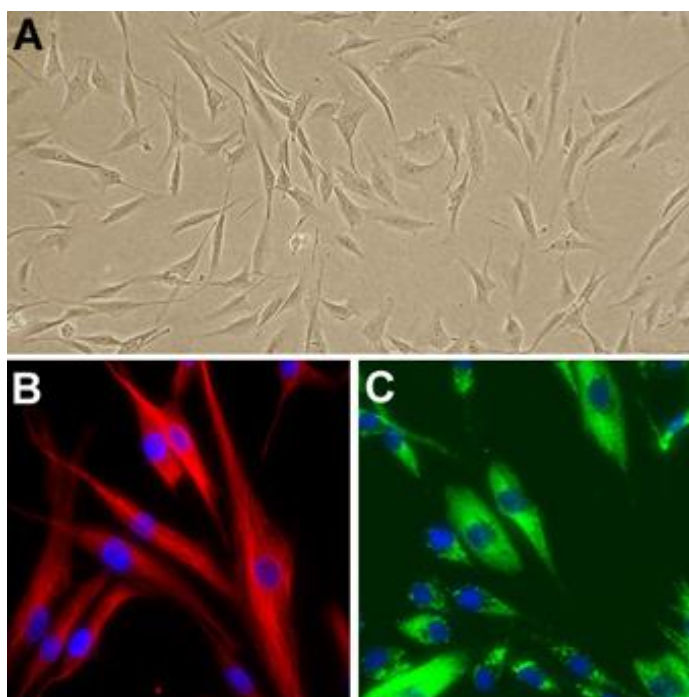
Κυτταρική Σειρά

Για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων καλλιεργήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος AG 01523 (Coriell Institute for Medical Research Camden, NJ), που προέρχεται από πρωτογενή καλλιέργεια κυττάρων δέρματος ακροποσθίου νεογέννητου άρρενος (3ημ). Η επιλογή του συγκεκριμένου κυτταρικού στελέχους βασίστηκε στην εκτεταμένη χρήση του σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, των οποίων συνέχεια αποτελεί και η παρούσα εργασία. Σε όλα τα πειράματα που διενεργήθηκαν οι ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν ήταν γενεάς 34-37 (βλ. ορισμό γενεάς, κατωτέρω). Ας σημειωθεί ότι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου αλλά και με το Coriell Institute, το στέλεχος AG 01523 εμφανίζει χαρακτηριστικά αναδιπλασιαστικής γήρανσης (replicative senescence) περίπου κατά τη γενεά 50. Το εργαστήριο διαθέτει ένα αρχείο γενεών ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών AG 01523, δεδομένης της δυνατότητας αποθήκευσής τους σε χαμηλές θερμοκρασίες εντός υγρού αζώτου (στους -196°C) και επανακαλλιέργειάς τους.

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η καλλιέργεια ιστών ως τεχνική χρησιμοποιείται για πάνω από 100 χρόνια για να διασαφηνίσει πληθώρα ερευνητικών ερωτημάτων. Η κυτταρική καλλιέργεια είναι ένα εξαιρετικά πολύτιμο εργαλείο για τους ερευνητές σε πολλά πεδία. Το ζωικό κύτταρο εισήχθη για πρώτη φορά από τον Ross Harrison, το 1907. Διευκολύνει την ανάλυση βιολογικών διεργασιών και ιδιοτήτων που δεν είναι εύκολα προσβάσιμες στο επίπεδο του οργανισμού. Τα κύτταρα για καλλιέργεια πρέπει να απομονωθούν από έναν ζωικό ιστό. Η κυτταρική καλλιέργεια διακρίνεται σε: 1) πρωτογενή, 2) δευτερογενή και 3) συνεχή. Οι πρωτογενείς και δευτερογενείς καλλιέργειες αφορούν κατά κανόνα φυσιολογικά διπλοειδή κύτταρα, ενώ συνεχείς είναι οι καλλιέργειες αθανатоποιημένων (συχνά καρκινικών) κυττάρων. Οι πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες προέρχονται απευθείας από έναν άθικτο ιστό. Οι δευτερογενείς καλλιέργειες προέρχονται από τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των πρωτογενών. Οι κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της διατήρησης της λειτουργικότητας των κυττάρων, της βιολογικής απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων κ.α.

Τα κύτταρα λαμβάνονται απευθείας από ζωντανό ιστό για την *in vitro* ανάπτυξη στην πρωτογενή κυτταρική καλλιέργεια. Έχοντας υποστεί λίγους (ή και κανέναν) κυτταρικούς αναδιπλασιασμούς, είναι πιο αντιπροσωπευτικά της λειτουργικότητας του ιστού από τον οποίο προέρχονται σε σύγκριση με τις δευτερογενείς καλλιέργειες ή τις συνεχείς κυτταρικές σειρές. Η χρήση πρωτογενών καλλιεργειών από διαφορετικά είδη επιτρέπει την ανάδειξη πιθανών διαφορών μεταξύ ανθρώπων και ζωικών ειδών που χρησιμοποιούνται σε προκλινικές μελέτες. Πριν από τις *in vivo* μελέτες, κύτταρα του προκλινικού μοντέλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν τις δόσεις και να μειώσουν τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται για την προκλινική τοξικολογία. Τα ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της προέκτασης δεδομένων από ένα ζωικό μοντέλο στον άνθρωπο. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα που προκύπτει από τη χρήση των κυτταροκαλλιεργειών είναι ο πολλαπλασιασμός του αρχικού βιολογικού υλικού, καθώς από ένα πολύ μικρό ιστοτεμάχιο μπορούν να προκύψουν εκατομμύρια κύτταρα που πολλαπλασιάζονται εκθετικά, επιτρέποντας πολλαπλούς βιολογικούς ελέγχους και πολλαπλές επαναλήψεις υπό ελεγχόμενες συνθήκες.



Εικόνα 26: Καλλιέργεια ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών χωρίς χρώση (A), με χρώση (B)&(C).

Πειραματική διαδικασία

Για την καλλιέργεια των δερματικών ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco™, Thermofisher Scientific) εμπλουτισμένο με 15% (v/v) βόειο εμβρυϊκό ορό (Gibco™, Thermofisher Scientific), L-γλουταμίνη (292,3 mg/lt), NaHCO₃ (2 g/lt), πενικιλίνη (100,000 IU/lt) και στρεπτομυκίνη (100 mg/lt) (Biochrom AG (Berlin, Germany)). Για την επίστρωση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία διαμέτρου 25cm² ή 50cm². Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε θερμοστατούμενο επωαστικό θάλαμο (37°C) σε περιβάλλον 85% υγρασίας και 5% CO₂ (Thermo Forma Series II) και διήρκεσε μέχρι την κάλυψη του πυθμένα των τρυβλίων και το σχηματισμό μιας πλήρους μονοστιβάδας (confluency). Η μονοστιβάδα για το συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο φαίνεται πως επιτυγχάνεται στις πέντε περίπου πρώτες ημέρες μετά από κάθε ανακαλλιέργεια.

Για τις ανάγκες του πειραματικού σχεδιασμού ως μέγιστο διάστημα μεταξύ κάθε ανακαλλιέργειας ορίστηκαν οι επτά ημέρες. Στο διάστημα αυτό φαίνεται πως έχει επιτευχθεί η πλήρης μονοστιβάδα, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπεται η υπέρμετρη συσσώρευση προϊόντων καταβολισμού.

Ανακαλλιέργειες

Την αναρρόφηση του παλαιού θρεπτικού μέσου ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με 3ml διαλύματος θρυψίνης- κιτρικού νατρίου (θρυψίνη 0,25% (w/v), κιτρικό νάτριο 10mM, NaCl 110mM, pH 7,2) για να διασφαλιστεί η απομάκρυνση του αναστολέα θρυψίνης που περιέχεται στα υπολείμματα ορού. Ακολουθούσε η εκ νέου προσθήκη διαλύματος θρυψίνης- κιτρικού νατρίου μέχρι πλήρους κάλυψης της κυτταρικής μονοστιβάδας και η επώαση για λίγα λεπτά στους 37°C. Κατά τη διαπίστωση, στο μικροσκόπιο, μορφολογικής αλλαγής (έναρξη απώλειας ατρακτοειδούς μορφολογίας ινοβλαστών), απομακρυνόταν η περίσσεια θρυψίνης και εφόσον κρινόταν απαραίτητο, τα κύτταρα επωάζονταν για ακόμη 1-2 λεπτά στους 37°C. Εν συνεχεία, με τη βοήθεια ήπιων κραδασμών διευκολυνόταν περαιτέρω η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου. Τελευταίο βήμα ήταν η επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο με λόγο κατανομής (split ratio) 1:2 και η καλλιέργεια αυτών μέχρι τον επανασχηματισμό μίας νέας μονοστιβάδας.

Επομένως, ο αριθμός ανακαλλιεργειών που υφίσταται μια καλλιέργεια συμπίπτει περίπου με τον αριθμό αναδιπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (Cell Population Doublings- CPD). Εφεξής, ο αριθμός CPD μιας καλλιέργειας θα αναφέρεται ως γενεά. Συνεπώς, μια καλλιέργεια της οποίας τα κύτταρα έχουν συμπληρώσει 10 CPD, θα αναφέρονται και ως «κύτταρα γενεάς 10» (δηλαδή η καλλιέργεια έχει ανακαλλιεργηθεί 10 φορές με λόγο κατανομής 1:2).

Ειδικά μέτρα αποστείρωσης και εξασφάλισης ασηπτικών συνθηκών

Η εξασφάλιση των ασηπτικών συνθηκών που απαιτούνται για την καλλιέργεια των κυττάρων και την αποφυγή επιμολύνσεων επιτεύχθηκε με τη διεκπεραίωση όλων των απαιτούμενων εργασιών μέσα σε ειδική εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8 (Bioair Instruments, Siziano, Italy). Η αποστείρωση της εστίας νηματικής ροής γινόταν τακτικά με εφαρμογή διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και με το πέρας της καθημερινής εργασίας με δώρη ακτινοβολήση με λυχνία υπεριώδους.

Ειδικές αποστειρώσεις:

Οι γυάλινες ογκομετρικές πιπέτες (5ml & 10ml) καθώς και οι γυάλινες πιπέτες Pasteur αποστειρώνονταν σε ξηρό κλίβανο (180°C / 90'). Τα υπόλοιπα σκεύη και τα ρύγχη των πιπετών αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (Tuttnauer Europe B.V., Netherlands) (120° C / 15'). Το νερό των κλιβάνων καθώς και διάφορα θερμοάντοχα διαλύματα αποστειρώνονταν σε γυάλινα δοχεία σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (120° C / 20'), ενώ το διάλυμα θρυψίνης/κιτρικού νατρίου διηθήθηκε με φίλτρο (διάμετρος πόρου 0.22 µm) με τη βοήθεια αντλίας κενού και διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία.

3.2 Θυμοσινικά Πεπτίδια

Με γνώμονα την επούλωση πληγών του δέρματος επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρία θυμοσινικά πεπτίδια, τα οποία επιδεικνύουν πλειοτροπική δράση σε μοντέλα ζώων αλλά και *in vitro* και που η μελέτη τους σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες είναι περιορισμένη (βλ. και Ενότητα 1.6). Για τα πειράματα κινητικής των θυμοσινών η συγκέντρωση, που επιλέχθηκε, ήταν 10 nM. Η συγκέντρωση αυτή ανήκει στο φυσιολογικό εύρος των ενδογενών επιπέδων, ενώ προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου επιρρώνουν περαιτέρω την επιλογή αυτή (βλ. και ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II). Ο παράγοντας συγκέντρωση όμως ελέγχθηκε περαιτέρω με τη διενέργεια πειραμάτων με συγκεντρώσεις θυμοσινικών πεπτιδίων που κυμαίνονταν από 1nM έως 1000nM. Στη συνέχεια παραθέτονται τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προσθήκη τους στο θρεπτικό υλικό των καλλιεργειών:

✓ *Thymosin α1 acetate salt (Ta1)*

Ac-SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN

(BACHEM Catalog No H-7756, Product No 40958781000)

✓ *Thymosin β₄ (human, bovine, horse, rat) acetate salt (Tβ4)*

Ac-SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNP LPSKETIEQEKQAGES

(BACHEM Catalog No H-2608, Product No 40430200001)

✓ *AcSDKP*

Ac-SDKP

(BACHEM Catalog No H-1156, Product No 4016348.0005)

Πειραματική Διαδικασία

Τα διαλυτοποιημένα θυμοσινικά πεπτίδια εγχύονται στο εθισμένο μέσο των κυτταροκαλλιιεργειών σε ανάλογο όγκο για την επίτευξη της τελικής επιθυμητής συγκέντρωσης. Η πρώτη προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την εφαρμογή των πεπτιδίων περιλάμβανε την ανακίνηση του τρυβλίου για την ομοιογενή διαλυτοποίηση του πεπτιδίου, ενώ στη συνέχεια των πειραμάτων ο χειρισμός αναθεωρήθηκε. Έτσι, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία περιλαμβάνουν μόνο πειράματα που η προσθήκη των πεπτιδίων έγινε με την ελάχιστη δυνατή παρέμβαση, χωρίς ανακίνηση, με προαραίωση των πεπτιδίων σε θρεπτικό υλικό και εφαρμογή χωρίς κραδασμούς. Η τακτική αυτή ακολουθήθηκε, γιατί, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1, η ενεργοποίηση των MAP κινασών εγείρεται και από το στρες που δέχονται τα κύτταρα (βλ. και ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III).

3.3 Θετικοί Μάρτυρες - Επαγωγικοί Παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε και στη θεωρία της επούλωσης (Ενότητα 1.3), το έναυσμα για την επούλωση της πληγής δίνεται από τους αιμοπεταλιακούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι απελευθερώνονται κατά τη ρήξη των αιμοπεταλίων. Δύο απ' αυτούς έχουν χρησιμοποιηθεί και στην παρούσα εργασία ως θετικοί μάρτυρες.

PDGF

Ως θετικός μάρτυρας της ενεργοποίησης των MAPK και της AKT επιλέχθηκε ο αυξητικός παράγοντας PDGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) σε τελική συγκέντρωση 10 ng/ml. Όμως, λόγω της έντονης ενεργοποίησης αυτών των κινασών παρουσία PDGF, στα πλαίσια αυτής της εργασίας επιλέχθηκε να μην παρουσιαστεί η στήλη του PDGF στα στυπώματα Western για τη διευκόλυνση της οπτικής παρατήρησης των υπό μελέτη χειρισμών.

TGF-β1

Ως θετικός μάρτυρας της ενεργοποίησης των SMAD αλλά και ως συμπαράγοντας με τα θυμοσινικά πεπτίδια για τη διερεύνηση της κυτταρικής σηματοδότησης επιλέχθηκε ο αυξητικός παράγοντας TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) σε τελική συγκέντρωση 2,5ng/ml.

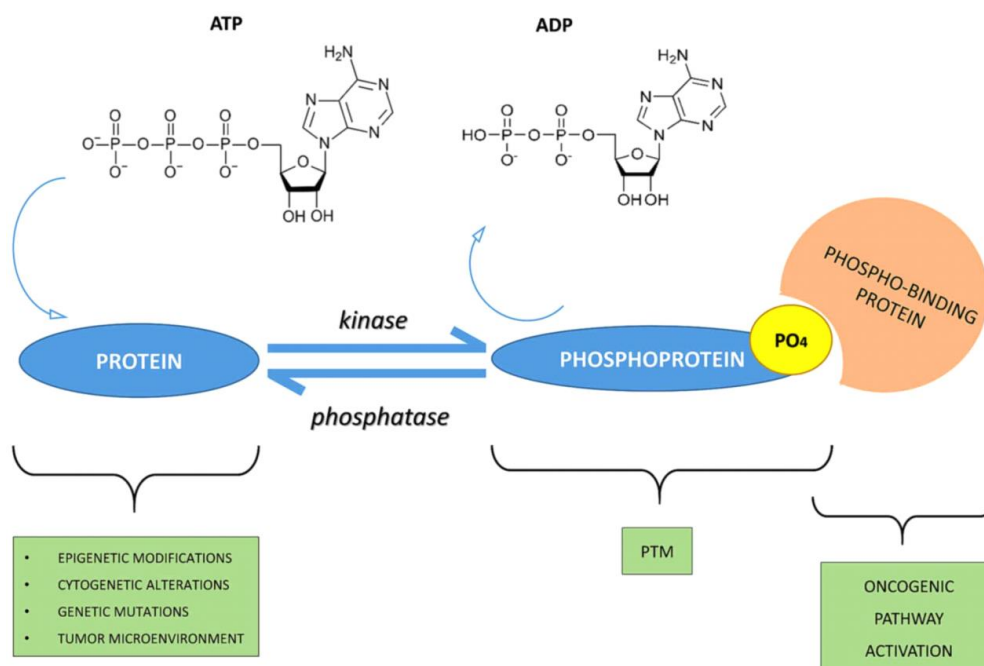
3.4 Κυτταρική σηματοδότηση

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Μόλις μια πρωτεΐνη (ορμόνη, αυξητικός παράγοντας, κυτοκίνη κτλ.) προσδεθεί στον ειδικό κυτταρικό υποδοχέα, αυτός υφίσταται κατά κανόνα αλλαγή διαμόρφωσης, η οποία με τη σειρά της ξεκινά μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων εντός του κυττάρου. Αυτές οι ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης, που ονομάζονται επίσης καταρράκτες μεταγωγής σήματος, ενισχύουν συνήθως το μήνυμα, παράγοντας πολλαπλά ενδοκυτταρικά σήματα για κάθε υποδοχέα που είναι δεσμευμένος.

Η φωσφορυλίωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από ερεθίσματα όπως επιγενετικές τροποποιήσεις, κυτταρογενετικές αλλοιώσεις, γενετικές μεταλλάξεις ή το μικρο-περιβάλλον ενός όγκου (Εικόνα 27). Κατά συνέπεια, η πρωτεΐνη δέχεται τη φωσφορική ομάδα με υδρόλυση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και λόγω της ενζυμικής δραστηριότητας της κινάσης. Αυτός είναι ο μηχανισμός δημιουργίας μίας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (post-translational modification; PTM). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία λόγω της δραστηριότητας των φωσφατασών. Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση συνιστούν ένα μοριακό διακόπτη, ο οποίος διεγείρει σειρά δευτερογενών αντιδράσεων, που ρυθμίζουν τελικά σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η μετανάστευση.

Ήδη από το 1932, με την ανακάλυψη της φωσφοσερίνης από τους Levene και Lippmann, η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών φάνηκε πως αποτελεί μία από τις πιο κεντρικές διαδικασίες ρύθμισης και σηματοδότησης στο κύτταρο. Επηρεάζοντας έως και το 30% του πρωτεώματος, και απαραίτητα στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών, τα δίκτυα φωσφορυλίωσης είναι επίσης βασικοί σκελετοί του συστήματος επικοινωνίας εντός των κυττάρων (Zolnierowicz and Bollen 2000). Η φωσφορυλίωση μπορεί να ρυθμίσει μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του υποκυτταρικού εντοπισμού, της αποδόμησης και της σταθεροποίησης των πρωτεϊνών, καθώς και των βιοχημικών δραστηριοτήτων (Ficarro et al. 2002; Manning et al. 2002).



Εικόνα 27: Φωσφο-σηματοδοτικά μονοπάτια (Ardito et al., 2017).

Για τη μελέτη της κυτταρικής σηματοδότησης, η μέθοδος που επιλέχθηκε είναι η ανοσοαποτύπωση Western. Η μέθοδος είναι ένας αποτελεσματικός και ευρέως χρησιμοποιούμενος ανοσοπροσδιορισμός που παρέχει εκλεκτική ανάλυση της έκφρασης μίας πρωτεΐνης. Το στύπωμα Western παρέχει τη δυνατότητα της μελέτης μιας μεμονωμένης πρωτεΐνης από ένα πλήθος πρωτεϊνών μέσω της αξιοποίησης της εξειδίκευσης της σύνδεσης αντιγόνου (Ag) -αντισώματος (Ab). Το στύπωμα Western βασίζεται στις αρχές του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατά μοριακό βάρος, της ηλεκτροφορητικής μεταφοράς σε κατάλληλη μεμβράνη και της ανίχνευσης αντισωμάτων με τη βοήθεια δευτερογενούς αντισώματος που διαθέτει κατάλληλη ενζυμική ενεργότητα.

3.4.1 Κυτταρική λύση απευθείας σε διάλυμα φόρτωσης

Ο τρόπος λύσης των κυττάρων είναι πολύ σημαντικός για την απομόνωση των πρωτεϊνών γιατί από αυτόν εξαρτάται η ακεραιότητά τους. Κατά την κυτταρική λύση απελευθερώνονται ενδοκυτταρικές πρωτεάσες καθώς και άλλα ένζυμα που μπορούν να αλλοιώσουν τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του κυτταρικού λύματος. Για την παρεμπόδιση αυτών των δράσεων και προκειμένου να μελετηθούν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών.

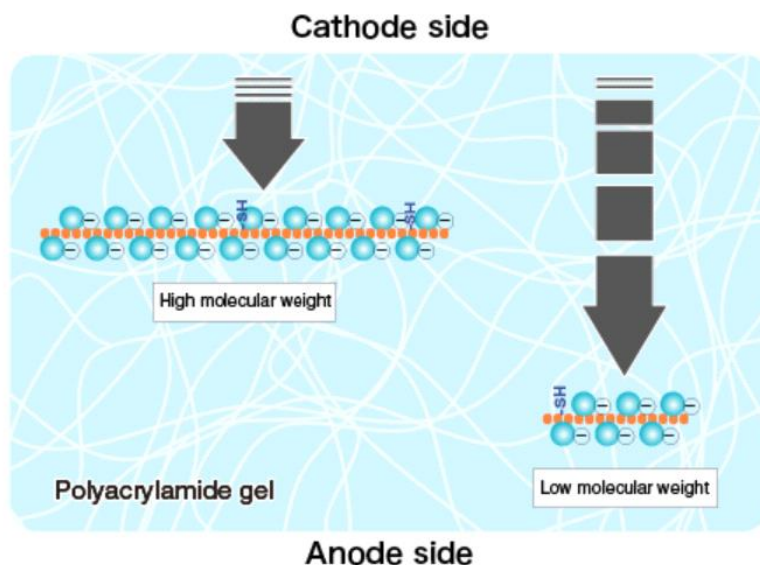
Πειραματική διαδικασία:

Τα κύτταρα λύνονταν με 420μl διαλύματος φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (O'Farell sample buffer 2X). Το συγκεκριμένο διάλυμα φόρτωσης περιέχει : 62.5 mM Tris-HCl pH 6,8 , 6% (w/v) SDS, 2% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,0125% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και διαλύματα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών στη συγκέντρωση που προτείνει ο προμηθευτής (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Το κυτταρικό λύμα συλλεγόταν με τη βοήθεια ξέστρου και μεταφερόταν αμέσως σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες. Ακολουθούσε θέρμανση στους 100°C για 3' και ομογενοποίηση στους υπερήχους για 15''. Με τη διαδικασία αυτή εξασφαλιζόταν η ρήξη των μεμβρανών, των ενδοκυτταρικών οργανιδίων και η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στα 13500rpm για 10', ώστε να απομακρυνθούν τα μεμβρανικά υπολείμματα, τα υποκυτταρικά οργανίδια και οτιδήποτε παρέμεινε αδιάλυτο στο διάλυμα λύσης. Το υπερκείμενο μοιραζόταν σε νέους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και τα δείγματα φυλάσσονταν στους -80°C μέχρι την ανάλυση τους.

3.4.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία επιφανειοδραστικών αποτελεί μια από τις συνήθεις τεχνικές διαχωρισμού των πρωτεϊνών και εφαρμόζεται ευρέως για την ανίχνευση του μοριακού βάρους πρωτεϊνών, τον έλεγχο καθαρότητας, τον βαθμό γλυκοσυλίσωσης και την περιεκτικότητα υδατανθράκων, τον αριθμό και το μοριακό βάρος υπομονάδων πρωτεϊνών.

Η μέθοδος SDS-PAGE περιλαμβάνει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών με το ανιονικό επιφανειοδραστικό δωδεκυλικό θειικό νάτριο (SDS). Μέσω ηλεκτρικού ρεύματος, οι πρωτεΐνες διέρχονται μέσω μίας πηκτής πολυακρυλαμιδίου, μιας διαδικασίας που ονομάζεται ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (PAGE). Το SDS συνδέεται ισχυρά με πρωτεΐνες, με περίπου ένα μόριο επιφανειοδραστικού να συνδέεται με δύο αμινοξέα όταν η συγκέντρωση του SDS είναι 0,1% w/v. Παρουσία SDS και ενός αναγωγικού παράγοντα που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς (2-μερκαπτοαιθανόλη), οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται σε γραμμικές αλυσίδες με αρνητικό φορτίο ανάλογο με το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η κινητικότητα μέσω της πηκτής μπορεί να επηρεαστεί από την κατάσταση της πρωτεΐνης (π.χ., φωσφορύλιωση και παρουσία πολυμερών μορίων). Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος της πρωτεΐνης, τόσο πιο γρήγορα διέρχεται μέσω των πόρων της πηκτής (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε το ασυνεχές σύστημα SDS-PAGE (Laemmli 1970), που αποτελείται από μια πηκτή συγκέντρωσης και μια πηκτή διαχωρισμού. Το πολυακρυλαμίδιο έχει την ιδιότητα να πολυμερίζεται παρουσία ελευθέρων ριζών και να δημιουργεί πηκτή από διασυνδεδεμένες αλυσίδες. Τη διασύνδεση αυτών των αλυσίδων προκαλεί το N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (N,N'-methylene bisacrylamide). Ο πολυμερισμός επιταχύνεται από την παρουσία N,N,N,N'-τετραμεθυλδιαμίνης (N,N,N,N'-tetramethylenediamine, TEMED) και απαιτεί την παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) για την έναρξη του πολυμερισμού. Το TEMED καταλύει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS), οι οποίες κατευθύνουν τον πολυμερισμό.

Η πηκτή επιστοίβαξης έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και χαμηλό pH. Το χαμηλό ποσοστό ακρυλαμιδίου επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση των πρωτεϊνών και τις βοηθά να ευθυγραμμιστούν για να εισέλθουν στο στρώμα διαχωρισμού την ίδια χρονική στιγμή. Το χαμηλότερο pH επιτρέπει στη γλυκίνη να βρίσκεται στην αμφοτερική της κατάσταση. Το ποσοστό πολυακρυλαμίδης στην πηκτή διαχωρισμού μπορεί να βελτιστοποιηθεί με βάση το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Ανάλογα με την τελική συγκέντρωση του διαλύματος ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμιδίου δημιουργούνται πηκτές με διαφορετικό μέγεθος πόρων (Πίνακας 6). Επιλέγοντας το σωστό μέγεθος πόρων επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η περιεκτικότητα ακρυλαμίδης 4–17% είναι το χρήσιμο εύρος για την SDS-PAGE.

Πίνακας 6: Διαχωριστική ικανότητα πηκτής διαχωρισμού βάσει της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη.

Συγκέντρωση* Ακρυλαμίδης (%)	Γραμμική Κλίμακα Διαχωρισμού (kDa)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-120
*Αναλογία δις-ακρυλαμίδης/ακρυλαμίδης 1:29	

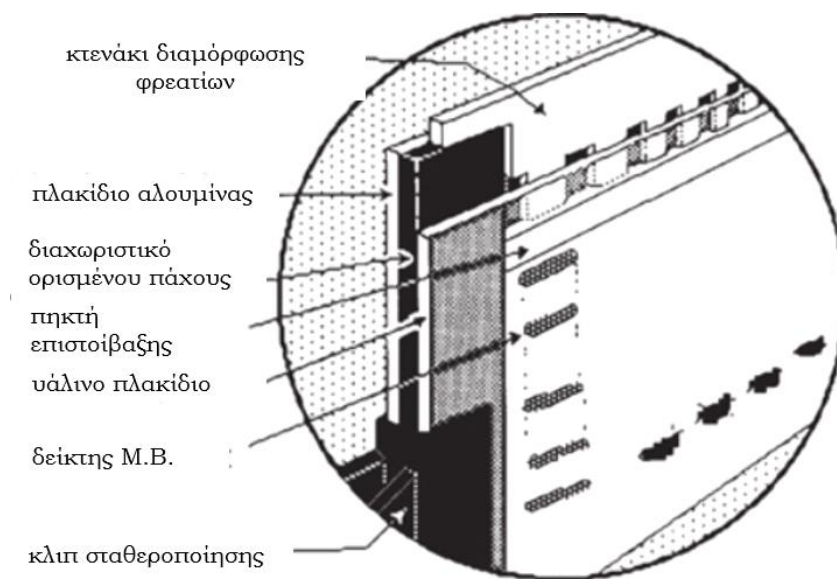
Πειραματική Διαδικασία:

Πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν η παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και η έγχυση αυτής πριν ακόμη πολυμεριστεί στο κένο μεταξύ αλουμίνας και υάλου, μιας δομής που παρουσιάζεται στην Εικόνα **33**. Ακολουθούσε η παρασκευή της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία πολυμερίζεται επάνω στην πηκτή διαχωρισμού. Η σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Η διάταξη της Εικόνα **33** τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (#SE 250 Mighty Small II, Hoefer, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Τα κυτταρικά λύματα αποψύχονταν με θέρμανση στους 95°C για 3'. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 1'. Με σύριγγα Hamilton (Sigma Aldrich) εγχυόταν ίσος όγκος κυτταρικών λυμάτων, ώστε να περιέχεται ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης ανά φρεάτιο της πηκτής επιστοίβαξης. Πέραν των δειγμάτων γινόταν φόρτωση πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών (Nippon Bluestar Markers 10-180kDa) καθώς και διάλυμα φόρτωσης ως τυφλό.

Πίνακας 7: Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης και διαχωρισμού.

Σύσταση	Πηκτή επιστοίβαξης	Πηκτή διαχωρισμού
29% w/v ακρυλαμίδιο/ 1% (w/v)N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο	4% (w/v)	9% – 12.5% (w/v)
Tris-HCl	0.125M (pH 6.8)	0.375M (pH 8.8)
SDS	0.1% (w/v)	0.1% (w/v)
APS	0.04% (w/v)	0.04% (w/v)
TEMED	0,15% (v/v)	0,05% (v/v)
H2O	πλήρωση όγκου	πλήρωση όγκου

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών γινόταν υπό σταθερή τάση (80V) όσο βρίσκονταν στην πηκτική επιστοιβάξης ενώ η τάση ρυθμιζόταν στα 120V όταν εισέρχονταν στην πηκτική διαχωρισμού (τροφοδοτικό EPS 300, Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences). Η επίτευξη κυκλώματος γινόταν με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X): 0,025M Tris, 0,25M γλυκίνη (1X) παρουσία 0,1% (w/v) SDS. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες.



Εικόνα 29: Διάταξη ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

3.4.3 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες

Η ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με τη μεταφορά τους σε μια επιφάνεια (π.χ μεμβράνη νικτροκυτταρίνης, πολυβινυλοδιφθορίου (PVDF)) και τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη καλείται «αποτύπωμα» ή «στύπωμα» και παρόλο που μπορεί να επιτευχθεί με απλή ροή του διαλύτη, συνήθως πραγματοποιείται ηλεκτροφορητικά, καθώς η μέθοδος αυτή είναι πιο γρήγορη, πιο ευαίσθητη και με καλύτερη επαναληψιμότητα. Η μεταφορά δηλαδή ακολουθεί την ίδια βασική αρχή με την ηλεκτροφόρηση μόνο που αυτή τη φορά το ρεύμα εφαρμόζεται σε γωνία 90° ως προς το πήκτωμα προκειμένου να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Με την εφαρμογή συγκεκριμένης τάσης μεταξύ των ηλεκτροδίων, το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται μετακινεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες προς την άνοδο, από την πηκτική στη μεμβράνη, ακολουθώντας το νόμο του Ohm: $V =$

$I \propto R$, όπου R η αντίσταση που δημιουργείται από τα υλικά που τοποθετούνται μεταξύ των ηλεκτροδίων.

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς λόγω της αλκαλικότητας ($pH \sim 8.3$) και του εμπλουτισμού με μεθανόλη ευνοεί τη περαιτέρω μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών. Η παρουσία μεθανόλης σε ποσοστό 0-20% (v/v) εξυπηρετεί δύο βασικούς σκοπούς: ευνοεί την απομάκρυνση του SDS από τις πρωτεΐνες και βελτιώνει τη δέσμευση των πρωτεϊνών στις μεμβράνες. Στα αρνητικά της χρήσης μεθανόλης περιλαμβάνονται η πιθανή μείωση των πόρων, η καθίζηση ορισμένων πρωτεϊνών και η μετατροπή ορισμένων βασικών πρωτεϊνών σε ουδέτερες ή ακόμα και θετικά φορτισμένες.

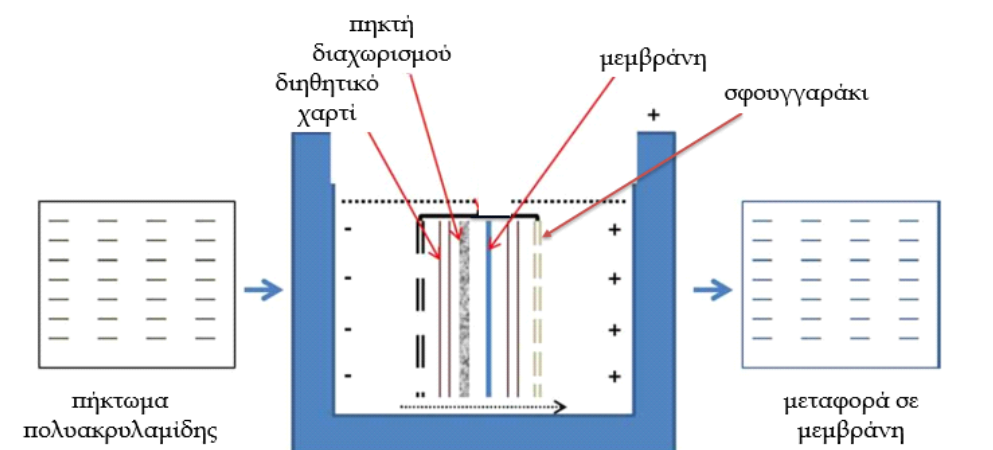
Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του στύψματος είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στη μεμβράνη σε σχέση με το πήκτωμα. Οι χρόνοι χρώσης/αποχρωματισμού αλλά και οι χρόνοι επώασης με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι πολύ πιο σύντομοι στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες είναι προσδεσμένες σε μεμβράνες, καθώς οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι επιφανειακές. Επιπρόσθετα, μία μεμβράνη μετά το στύψωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες της μιας ανοσοανιχνεύσεις. Τέλος, οι μεμβράνες είναι πιο εύχρηστες και πιο ανθεκτικές σε σχέση με τα πηκτώματα.

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκαλείται όμως κατά τη μεταφορά είναι πως οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες εκλύονται από το πήκτωμα πιο αργά σε σχέση με αυτές μικρότερου MB. Αυτό σημαίνει ότι το πρωτεϊνικό πρότυπο που θα αποτυπωθεί στη μεμβράνη μετά τη μεταφορά, πιθανόν να τροποποιείται ανάλογα με τις πρωτεΐνες που μεταφέρονται.

Πειραματική Διαδικασία

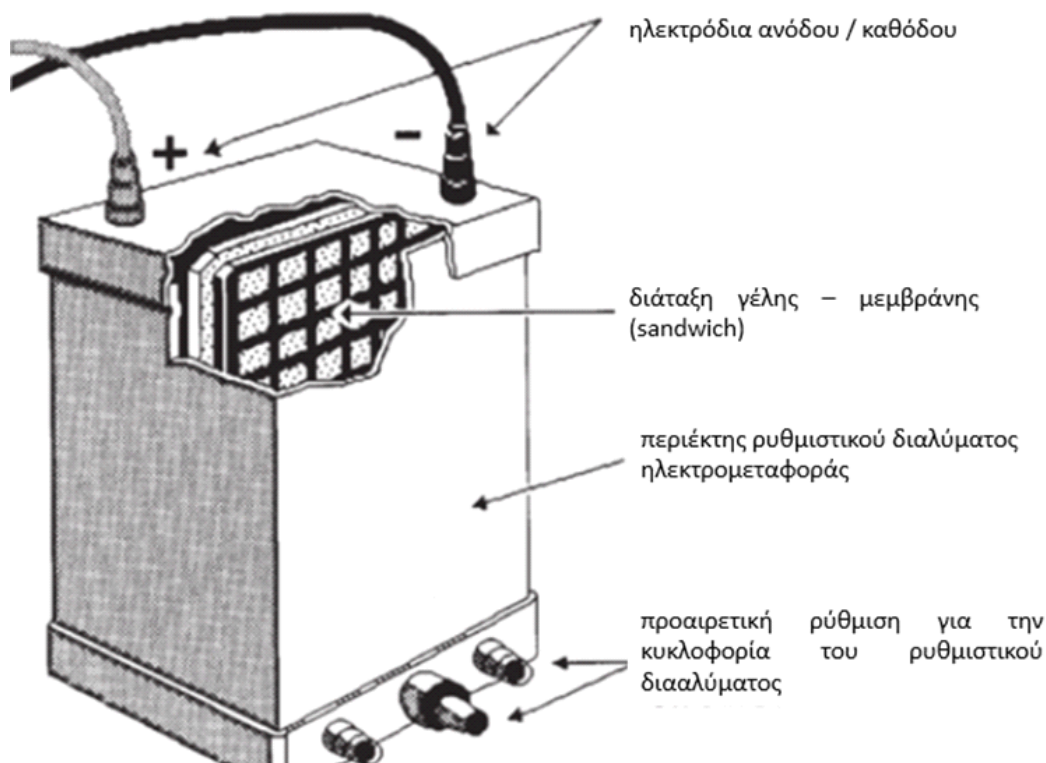
Για την επίτευξη της ηλεκτρομεταφοράς επιλέχθηκε μεμβράνη PVDF (Amersham Biosciences) έναντι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης λόγω μεγαλύτερης δεσμευτικής ικανότητας πρωτεΐνης (170-200 $\mu g/cm^2$ vs 80-100 $\mu g/cm^2$) και αυξημένης φυσικής αντοχής. Η υψηλότερη ευαισθησία επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών με χαμηλή έκφραση, είναι όμως πιο πιθανή και η αύξηση του θορύβου. Το μέγεθος της μεμβράνης PVDF προσαρμοζόταν κατά βούληση, ούτως ώστε να ταιριάζει με τις διαστάσεις της πηκτής διαχωρισμού και ενεργοποιείτο σε μεθανόλη 100%. Η ενυδάτωση της μεμβράνης αυξάνει την υδροφιλικότητά της για αποτελεσματικότερη δέσμευση πρωτεϊνών. Ακολουθούσε έκπλυση της μεμβράνης από τη μεθανόλη και εξισορρόπηση της σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς.

Σε ειδική θήκη της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς (TE 22 Mini Transfer Tank, Hoefer, Amersham Biosciences) η διάταξη πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε η πηκτή να βρίσκεται προς την άνοδο και η μεμβράνη προς την κάθοδο (Εικόνα 30). Το σύμπλοκο πηκτής - μεμβράνης μαζί με διηθητικό χαρτί εκατέρωθεν (Whatman, 3MM) εμβυθίζονται εντός συσκευής (Εικόνα 31) πληρωμένης με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (0,025M Tris, 0,25M γλυκίνη).



Εικόνα 30: Διάταξη ηλεκτρομεταφοράς σε μεμβράνη.

Το ρυθμιστικό διάλυμα εμπλουτιζόταν με μεθανόλη 15% (v/v). Η συγκεκριμένη συγκέντρωση χρησιμοποιείται ευρύτατα στο εργαστήριο, όμως επιρρώθηκε και με νέο πείραμα δεσμευτικής ικανότητας συναρτήσει περιεκτικότητας μεθανόλης και χρόνου ηλεκτρομεταφοράς. Στις συσκευές ηλεκτρομεταφοράς τύπου semi-dry, η άνοδος της θερμοκρασίας του ρυθμιστικού διαλύματος δεν είναι εύκολα διαχειρίσιμη, γι' αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται κρύο. Για το χρόνο της ηλεκτρομεταφοράς επιλέχθηκαν τα 90', ενώ ο χρόνος αυτός αυξήθηκε κατά 15' για την ανίχνευση πρωτεϊνών χαμηλότερης συγκέντρωσης (pSMAD2, pSMAD3).



Εικόνα 31: Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς.

3.4.4 Ανοσοαποτύπωση

Μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσολογικής ανίχνευσης (Immunostaining, immunoblotting). Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε αποδιαταγμένα πολυπεπίδια (που διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE) όσο και σε μη-αποδιαταγμένες πρωτεΐνες (native proteins). Καθώς η ταυτοποίηση βασίζεται στην ειδική πρόσδεση αντισωμάτων σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή αντιγόνα, είναι πολύ σημαντική η ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Οι μη-ειδικές θέσεις πρόσδεσης καλύπτονται με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού (1%-5% bovine serum albumin, BSA) ή σε διάλυμα άπαχου αποξηραμένου γάλακτος (5% non-fat dry milk, NFDm). Το άπαχο γάλα σε σκόνη προτιμάται στις περισσότερες των περιπτώσεων καθώς είναι φθινό και ευρέως διαθέσιμο. Καθώς όμως το γάλα περιέχει καζεΐνη, η οποία είναι η ίδια φωσφοπρωτεΐνη, και βιοτίνη, η χρήση του δεν ενδείκνυται σε συγκεκριμένους επιτόπους.

Τα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους της υπό μελέτη πρωτεΐνης και δεσμεύονται με ομοιοπολικούς και ιοντικούς δεσμούς, ονομάζονται **πρωτογενή**. Το πρωτογενές αντίσωμα στοχεύει στην πρωτεΐνη-στόχο. Διαλύεται συνήθως στο blocking solution(NFM) ή σε κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα (πχ. TBS) που περιέχει

ουδέτερη πρωτεΐνη (BSA, NFDM) και κάποιο επιφανειοδραστικό παράγοντα (πχ. Tween-20). Η αραιώσή που επιλέγεται είναι τέτοια ώστε να μην προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες που της μεμβράνης. Γενικά, υψηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων, μεγάλοι χρόνοι επώασης και υψηλές θερμοκρασίες δύναται να αυξήσουν το θόρυβο του πειράματος.

Δευτερογενή ονομάζονται τα αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν ως αντιγόνα, τμήματα της βαριάς αλυσίδας των πρωτογενών αντισωμάτων και δεσμεύονται με αυτά με σκοπό την ενίσχυση του σήματος. Ειδικά για τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP (Horseradish peroxidase), η ανίχνευση βασίζεται στη χημειοφωταύγεια (ECL, Enhanced ChemiLuminescence). Η φωταύγεια περιλαμβάνει εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Στη χημειοφωταύγεια, η διέγερση προκαλείται λόγω χημικής αντίδρασης. Η λουμινόλη (diacylhydrazide) οξειδώνεται παρουσία HRP/H₂O₂ σε αλκαλικές συνθήκες και διεγείρεται. Κατά την αποδιέγερση εκπέμπει ακτινοβολία (428 nm), η οποία και ανιχνεύεται.

Πειραματική διαδικασία

Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη επωαζόταν για 1h σε θερμοκρασία δωματίου είτε σε διάλυμα άπαχου γάλακτος 5% (w/v) (Regilait) σε TBS-T 0,1% (v/v) (Tween-20 σε TBS) είτε στην περίπτωση των πρωτογενών αντισωμάτων anti-phosphoSMAD σε διάλυμα BSA 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA). σε TBS-T. Ακολουθούσε ολονύχτια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα (

Πίνακας 8), αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση (για τα αντισώματα της παρούσας μελέτης 1 : 1000). Για την αραιώση των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε είτε άπαχο γάλα (Milipore, Sigma Aldrich) διαλυμένο σε ddH₂O, είτε BSA (2%) διαλυμένο σε TBS-T. Το πρωτογενές αντίσωμα απομακρυνόταν και φυλασσόταν για επαναχρησιμοποίηση. Η μεμβράνη εκπλενόταν τρεις φορές για 15' με 5% (w/v) άπαχο γάλα (Regilait) σε TBS-T υπό ήπια ανάδευση. Εν συνεχεία, η μεμβράνη επωαζόταν με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (

Πίνακας 8) (αραιώση 1 : 2000) σε 5% (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T για 1.5h - 2h υπό ήπια ανάδευση. Όπως και στην περίπτωση των πρωτογενών, η περίσσεια των δευτερογενών αντισωμάτων απομακρυνόταν με έκπλυση της μεμβράνης υπό ήπια ανάδευση (2x εκπλύσεις, 15' με 5% NFM /

1x έκπλυση, 15' με TBS-T). Τέλος, η μεμβράνη επωζόταν με ECL για 3' σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 8: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα

Πρωτογενή Αντισώματα	Προμηθευτής
phospho-SMAD2 (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Ευγενής προσφορά του καθ. Αριστείδη Μουστάκα, (Uppsala University, Sweden). Αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες Ser465 και Ser467
phospho-SMAD3 (κουνέλι, μονοκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9520) Αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες Ser423 και Ser425
SMAD2 (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Ευγενής προσφορά του καθ. Αριστείδη Μουστάκα (Uppsala University, Sweden)
phospho-ERK1/2 (ποντίκι, μονοκλωνικό)	BD Transduction Laboratories, Bedford, MA, USA (#612358) Αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες ERK1 & ERK2 στα κατάλοιπα Thr202 και Tyr204
panERK (ποντίκι, μονοκλωνικό)	BD Transduction Laboratories, Bedford, MA, USA (#610123) Αναγνωρίζει την ERK2
phospho-p38 MAPK (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9211) Αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες Thr180 και Tyr182
p38 MAPK (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9212)
phospho-SAPK/JNK (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9251) Αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες Thr183 και Tyr185
SAPK/JNK (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9252)
phospho-AKT (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9271) Αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη Ser473
AKT (κουνέλι, πολυκλωνικό)	Cell Signaling Technology (Hertfordshire, UK) (#9272)
α-SMA (ποντίκι, μονοκλωνικό, κλώνος 1 ^{A4})	DakoCytomation (Denmark) (M0851)
GAPDH (ποντίκι, μονοκλωνικό)	Sigma (St. Louis, USA)

Δευτερογενή αντισώματα	Προμηθευτής
πολυκλωνικό αντισώμα αιγός με δεσμευμένη την υπεροξειδάση αγριοραπανιού (HRP conjugated anti-rabbit IgG)	Sigma (St.Louis, USA) Αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G κουνελιού
πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός με δεσμευμένη την υπεροξειδάση αγριοραπανιού (HRP conjugated anti-mouse IgG)	Sigma (St.Louis, USA) Αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G ποντικού

Για την έκθεση της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής εικόνας LAS-4000 (Fujifilm LifeSciences, USA). Η διαδικασία περιελάμβανε σύντομες αθροιστικές εκθέσεις (30'') και εν συνεχεία μεγαλύτερες αθροιστικές εκθέσεις (3'-5'). Κάθε έκθεση αποθηκευτηκε και μετατράπηκε σε αρχείο JPEG με το λογισμικό AIDA Image Analyzer (ray-test). Για τις περιπτώσεις που πραγματοποιήθηκε πυκνομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ (SYBIL). Το πρόγραμμα της πυκνομετρικής σάρωσης συλλέγει διάφορες πληροφορίες όπως την απόσταση της ζώνης από την αρχή της μεμβράνης, το εμβαδόν της ζώνης και το άθροισμα της έντασης (φωτεινότητας) όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιλαμβάνονται σε αυτή, όπου η ελάχιστη τιμή είναι μηδέν και αντιπροσωπεύει το λευκό, η μέγιστη είναι 255 και αντιπροσωπεύει το μαύρο και οι ενδιάμεσες τιμές όλες τις διαβαθμίσεις του γκριζου.

3.4.5 Επαναχρησιμοποίηση μεμβράνης (stripping)

Πολλαπλές, διαδοχικές ανοσοανιχνεύσεις στη μεμβράνη δύναται να πραγματοποιηθούν υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Μία μεμβράνη, μετά την πρώτη αντίδραση ανοσοεντόπισης και την καταγραφή του σήματος, μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για ένα νέο κύκλο αντιδράσεων, πχ. για άλλη μορφή του ίδιου αντιγονικού επιτόπου ή μία άλλη πρωτεΐνη. Αυτό επιφέρει όχι μόνο σημαντική οικονομία χρόνου και υλικών, αλλά και δυνατότητα άμεσης σύγκρισης των σημάτων πολλαπλών πρωτεϊνών. Απαραίτητη προϋπόθεση για το νέο κύκλο ανοσοεντόπισης είναι η αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων αντισωμάτων που προσδέθηκαν στη μεμβράνη κατά τον πρώτο κύκλο. Συνήθως αυτό επιτυγχάνεται υπό θέρμανση και με παράγοντες όπως είναι το SDS και η μερκαπτοαιθανόλη. Δυστυχώς, όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν τόσο ισχυρή δράση ώστε εκτός από τους ιχνηθέτες, μπορεί να αποκολλήσουν κάποιο ποσοστό και από τις πρωτεΐνες του δείγματος από τη μεμβράνη. Γι' αυτό οι διαδοχικοί κύκλοι ανοσοεντόπισης σε μία μεμβράνη είναι συνήθως περιορισμένοι και αφορούν κατά κύριο λόγο μη φωσφορρυλιωμένες πρωτεΐνες. Σημαντικοί παράγοντες συνιστούν το υλικό της μεμβράνης, η φύση των ιχνηθετών, η αποτελεσματικότητα του διαλύματος αποκόλλησης, η ποσότητα της πρωτεΐνης-στόχου στο

δείγμα κ.ά. Για παράδειγμα οι μεμβράνες PVDF, όπως προαναφέρθηκε, είναι πιο αποδοτικές και ανθεκτικές σε σχέση με τη νιτροκυτταρίνη σε επαναλαμβανόμενα stripping.

Πειραματική διαδικασία

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η διαδικασία απομάκρυνσης αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε το μέγιστο μία φορά για κάθε μεμβράνη για τη διασφάλιση της ίσης φόρτωσης ολικής πρωτεΐνης (SMAD2, JNK, ERK, p38, AKT, GAPDDH). Χρησιμοποιήθηκε η πιο ισχυρή μέθοδος stripping. Πιο συγκεκριμένα, 100ml διαλύματος απομάκρυνσης αντισωμάτων περιέχουν 20ml SDS 10%, 12.5ml Tris HCl pH 6.8 0.5M, 67.5ml ddH₂O, 0.8ml β-μερκαπτοαιθανόλη. Η μεμβράνη εκπλενόταν αρχικά με TBS-T, και εν συνεχεία επωζόταν με το διάλυμα απομάκρυνσης των αντισωμάτων υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Ακολουθούσε έκπλυση της μεμβράνης με άφθονο απιονισμένο νερό και διαβροχή εκ νέου με μεθανόλη. Σειρά είχαν 3 ημίωρες εκπλύσεις με TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απομακρυνθεί ολοκληρωτικά το ισχυρό αναγωγικό μέσο β-μερκαπτοαιθανόλη, το οποίο και παρεμποδίζει την εκ νέου πρόσδεση των αντισωμάτων. Η μεμβράνη ήταν έτοιμη για νέα ανοσοαποτύπωση, αφού πρώτα καταλαμβάνονταν οι μη ειδικές θέσεις (blocking).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση των θυμοσινών σε κομβικά σηματοδοτικά μονοπάτια

Προκειμένου να επιτευχθούν οι συγχρονισμένες κυτταρικές αποκρίσεις που απαιτούνται για την επούλωση, είναι απαραίτητο τα κύτταρα να αναγνωρίζουν τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα και να τα μεταφράζουν σε μοριακά σήματα που ρυθμίζουν διεργασίες όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η γονιδιακή έκφραση, η διαφοροποίηση και η σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας. Το σκοπό αυτό εξυπηρετούν πολλές ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης που ουσιαστικά μεταφράζουν εξωκυτταρικά σήματα σε αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο.

Στην παρούσα εργασία εξετάζονται οι μοριακές οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τα θυμοσινικά πεπτίδια, μέσω ανοσοαποτύπωσης κομβικών πρωτεϊνών: i) TGF- β /SMAD, ii) MAPK και iii) PI3K /AKT. Πραγματοποιήθηκαν εννέα συνολικά πειράματα: Τρία πειράματα αφορούν στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών υπό την επίδραση του κάθε θυμοσινικού πεπτιδίου, ξεχωριστά, συναρτήσει του χρόνου. Ακολουθούν δύο πειράματα που διερευνούν την επίδραση της συγκέντρωσης των θυμοσινικών πεπτιδίων στην ενεργοποίηση των ανωτέρω μορίων σηματοδότησης και άλλα τρία πειράματα όπου επιχειρείται η διερεύνηση της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών ύστερα από ταυτόχρονη χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β . Τελευταίο, παρατίθεται ένα πείραμα που εξετάζει την επίδραση των θυμοσινών στην έκφραση της πρωτεΐνης α -SMA, μιας πρωτεΐνης χαρακτηριστικής των διαφοροποιημένων μυοϊνοβλαστών.

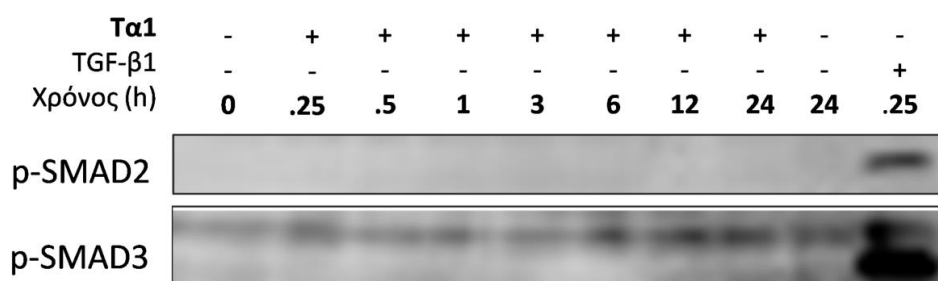
4.1 Μελέτη της επίδρασης της θυμοσίνης α1 (Τα1) στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK / ERK / p38 MAPK / AKT συναρτήσει του χρόνου

Πειραματικός σχεδιασμός: Στόχος του πειράματος είναι η διερεύνηση της βιολογικής απόκρισης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 κατά την επώαση με θυμοσίνη α1 (10nM) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Η απόκριση των κυττάρων στην Τα1 διερευνήθηκε για τα χρονικά σημεία 0.25h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Για τον έλεγχο των βασικών επιπέδων φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν παράλληλες καλλιέργειες που δεν επωάστηκαν με Τα1 και συνελέγησαν στα χρονικά σημεία 0h και 24h (αρνητικοί μάρτυρες). Ως θετικός μάρτυρας για την ενεργοποίηση των SMAD2 και SMAD3 χρησιμοποιήθηκαν δερματικοί ινοβλάστες που επωάστηκαν με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β1 (2,5ng/ml, 0.25h). Το πείραμα διενεργήθηκε εις διπλούν, όμως όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3.2, παρουσιάζεται μόνο ο χειρισμός όπου η χορήγηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε χωρίς ανακίνηση των κυτταροκαλλιεργειών. Για την επίρρωση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται, απαιτείται η διενέργεια κι άλλης επανάληψης.

Κινητική φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SMAD2 & SMAD3

Για τη μελέτη της επίδρασης της θυμοσίνης α1 στη μοριακή οδό σηματοδότησης TGF-β/SMAD χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα για τις φωσφορυλιωμένες SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 36, δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω φωσφορυλίωσης καμίας εκ των δύο R-SMAD, για τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν. Ακόμη δεν παρατηρείται κάποια διαφορά ανάμεσα στο πρότυπο έκφρασης των αρνητικών μαρτύρων (Ctrl 0h, Ctrl 24h) και των διαφορετικών χειρισμών. Εν αντιθέσει, η επώαση των δερματικών ινοβλαστών με

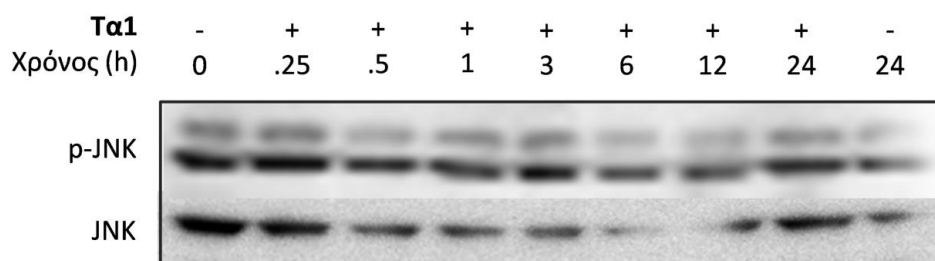
τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα (TGF- β) για 15' φαίνεται πως ενεργοποίησε έντονα τον καταρράκτη φωσφορυλίσεων, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα phosphoSMAD2 & phosphoSMAD3.



Εικόνα 32: Κινητική έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 κατά την επώαση με Tα1 (10nM). Χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνητικοί μάρτυρες στους χρόνους 0h και 24h. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE, ενώ η ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-phosphoSMAD2 και anti-phosphoSMAD3.

Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK

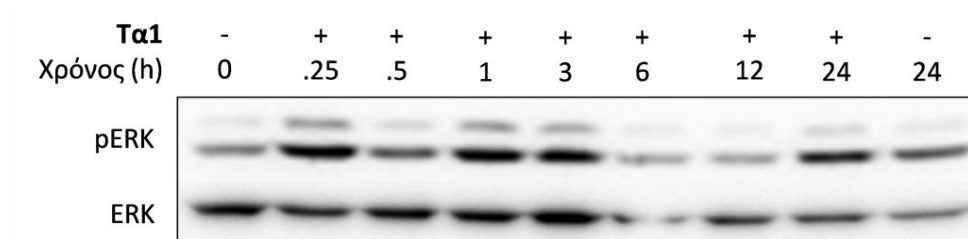
Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της JNK χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των JNK1 και JNK2 (βλ. Πίνακα 8, σελ 114). Όπως αναφέρεται και στο σχεδιασμό του πειράματος, παρουσιάζεται μόνο ο χειρισμός όπου η προσθήκη της Tα1 πραγματοποιήθηκε χωρίς ανακίνηση, δηλαδή με την ελάχιστη δυνατή παρέμβαση. Στο πείραμα αυτό, τα βασικά επίπεδα φωσφορυλιωμένης JNK είναι αυξημένα και στους αρνητικούς μάρτυρες (Εικόνα 33). Η κινητική της φωσφορυλιωμένης JNK δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διακυμάνσεις στο χρόνο: Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι αυξημένα στους μικρούς χρόνους, παρουσιάζουν μια μικρή πτώση στις 6h και 12h και αυξάνονται ξανά στις 24h.



Εικόνα 33: Επίδραση της θυμοσίνης α1 (10nM) στην κινητική της έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phospho-JNK1 & phospho-JNK2. Για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης JNK.

Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK

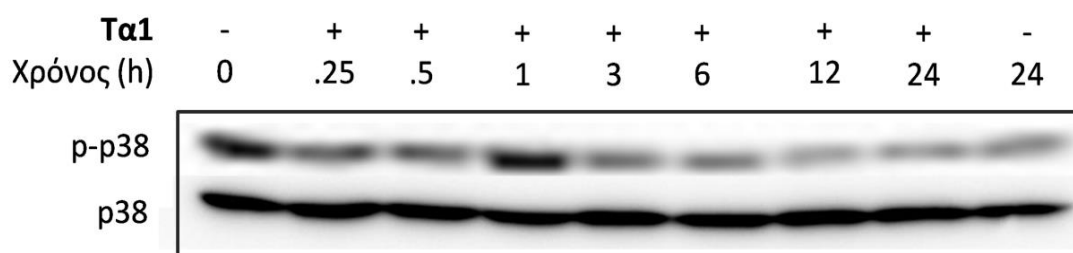
Για τη διερεύνηση της ενεργοποίησης της ERK, χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoERK1 και phosphoERK2. Λαμβάνοντας υπόψη και τα επίπεδα έκφρασης της ολικής ERK, φαίνεται πως τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης ανεβαίνουν ταχέως στους μικρούς χρόνους, διαδικασία που εξακολουθεί να συμβαίνει μέχρι τις 3h (Εικόνα 34). Εν συνεχεία παρατηρείται μείωση της φωσφορυλίωσης (6h,12h) που όμως συνάδει και με την πτώση της ολικής πρωτεΐνης και αύξηση ξανά στις 24h (ελαφρώς μεγαλύτερη του αντίστοιχου αρνητικού μάρτυρα). Παρ'όλο που οι διαφορές στη φωσφορυλίωση είναι μικρές και τα βασικά επίπεδα (basal levels) φωσφορυλίωσης σχετικώς αυξημένα (0h, 24h), παρατηρώντας τις φωσφορυλιωμένες ERK ως προς τα επίπεδα της ολικής ERK (ERK2), φαίνεται πως η θυμοσίνη α1 σε συγκέντρωση 10nM επιδρά στη σηματοδότηση της ERK. Η ενεργοποίηση είναι άμεση και διαρκεί έως και 3h, όμως το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί με μία ακόμη επανάληψη, χωρίς ανακίνηση.



Εικόνα 34: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους με Tα1 (10nM) σε επτά χρονικά σημεία. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoERK1 & phosphoERK2. Για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της μη φωσφορυλιωμένης ERK2 (panERK).

Κινητική φωσφορυλίωσης της p38-MAPK.

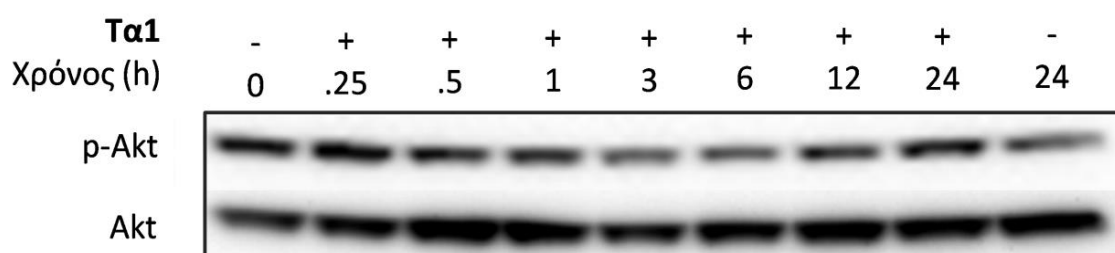
Τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι αυξημένα στην αρχή του πειράματος (0h), ενώ στις 24h έχουν μειωθεί αισθητά (Εικόνα 35). Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των χειρισμών εμφανίζονται μειωμένα, με εξαίρεση τη 1h όπου η p38 ενεργοποιείται, όχι όμως περισσότερο από τον αρνητικό μάρτυρα (0h). Φαίνεται συνεπώς πως η θυμοσίνη α1 σε αυτή τη συγκέντρωση δεν εμφανίζει κάποιο χαρακτηριστικό πρότυπο στην κινητική της σηματοδότησης της p38-MAPK.



Εικόνα 35: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης p38 ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους με θυμοσίνη α1 (10nM) για επτά χρονικά διαστήματα. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-p38. Για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής p38.

Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT

Η επίδραση της Τα1 φαίνεται πως δεν είναι τόσο ισχυρή όσον αφορά στην ενεργοποίηση της κινάσης AKT, τουλάχιστον όχι για τη συγκέντρωση και τα χρονικά διαστήματα, για τα οποία μελετήθηκε (Εικόνα 36). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AKT παραμένουν σχετικά σταθερά στο χρόνο, με μία μικρή εξαίρεση στις 24h, που είναι αυξημένα σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα.



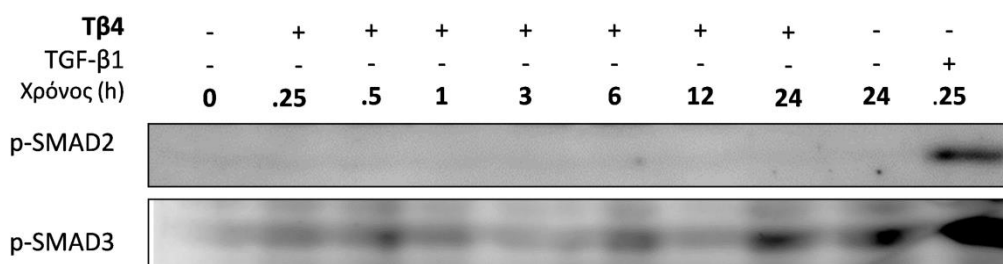
Εικόνα 36: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης Akt ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους με Τα1 (10nM) σε επτά χρονικά σημεία. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-AKT (Ser 473). Για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης AKT.

4.2 Μελέτη της επίδρασης της θυμοσίνης β4 (Tβ4) στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK / ERK / p38 MAPK / AKT συναρτήσει του χρόνου

Πειραματικός σχεδιασμός: Στόχος του πειράματος είναι η διερεύνηση της βιολογικής απόκρισης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών κατά την επώασή τους με θυμοσίνη β4 (10nM) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Η επίδραση της θυμοσίνης β4 ελέγχθηκε ως προς τη σηματοδότηση των μονοπατιών: TGF-β/SMAD, MAPK και PI3K/AKT. Ελέγχθηκαν επτά χρονικά σημεία (0.25h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h). Για τον έλεγχο των βασικών επιπέδων φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν παράλληλες καλλιέργειες που δεν επωάστηκαν με Tβ4 και συνελέγησαν στα χρονικά σημεία 0h και 24h (αρνητικοί μάρτυρες). Ως θετικός μάρτυρας για την ενεργοποίηση των SMAD2 και SMAD3 χρησιμοποιήθηκαν δερματικοί ινοβλάστες που επωάστηκαν με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β1 (2,5ng/ml, 0.25h). Για την επίρρωση των αποτελεσμάτων, το πείραμα διενεργήθηκε εις διπλούν χωρίς ανακίνηση των κυτταροκαλλιεργειών κατά την προσθήκη του πεπτιδίου.

Κινητική της φωσφορυλίωσης των SMAD2 & SMAD3

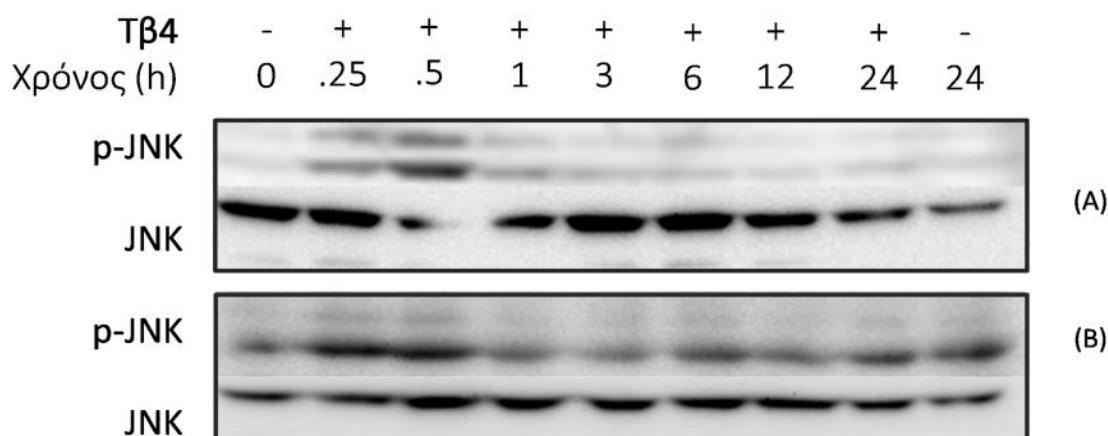
Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της οδού TGF-β/SMAD ελέγχθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 και SMAD3 (Εικόνα 37). Φαίνεται πως η θυμοσίνη β4 δεν ενεργοποιεί τις κομβικές πρωτείνες SMAD2 και SMAD3 της σηματοδοτικής οδού, όχι τουλάχιστον στη συγκεκριμένη συγκέντρωση και χρονική κλίμακα, και βάσει του κατώτατου ορίου ανίχνευσης της μεθόδου.



Εικόνα 37: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς Tβ4 (10nM) σε επτά χρονικά σημεία. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο TGF-β (2.5ng/ml, 0.25h). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-pSMAD2 και anti-pSMAD3.

Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK

Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της JNK συναρτήσει του χρόνου υπό την επίδραση της Τβ4, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των JNK1 και JNK2. Και στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος (A & B) τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι χαμηλά ενώ παρατηρείται ένα ξεκάθαρο πρότυπο ενεργοποίησης των JNK στα αρχικά χρονικά σημεία (0.25h, 0.5h), που δεν συναντάται όμως στο χρονικό διάστημα 1h-24h (Εικόνα 38). Φαίνεται συνεπώς καθαρά, πως η θυμοσίνη β4 (10nM) στους δερματικούς ινοβλάστες AG 012523 προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση των JNK, τα επίπεδα των οποίων από τη μία ώρα και έπειτα μειώνονται, πιθανώς μέσω της δράσης φωσφατασών.

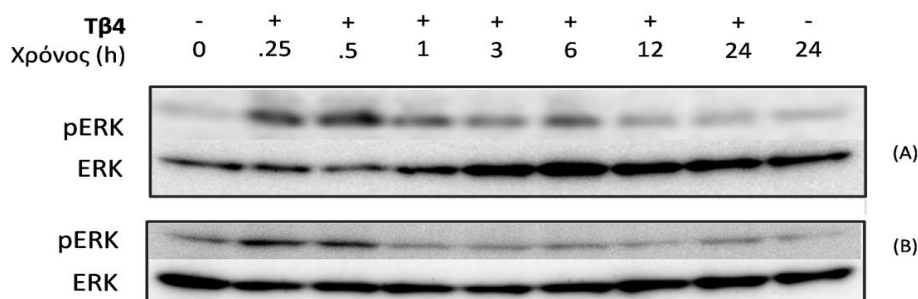


Εικόνα 38: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 012523 με ή χωρίς Τβ4 (10nM) σε επτά χρονικά σημεία, με θετικό μάρτυρα τον TGF-β (2.5ng/ml, 0.25h). Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoJNK1 & phosphoJNK2. ενώ για τη αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης JNK.

Κινητική της φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK

Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της ERK στο χρόνο κατά την επώαση των κυττάρων με Τβ4 (10nM), χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των ERK1 και ERK2. Και στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος παρατηρείται ένα ξεκάθαρο πρότυπο ενεργοποίησης στα μικρά χρονικά διαστήματα (0.25h & 0.5h), ενώ από τη 1h και μέχρι τις 24h, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι εμφανώς μειωμένα (Εικόνα 39). Τα βασικά επίπεδα για

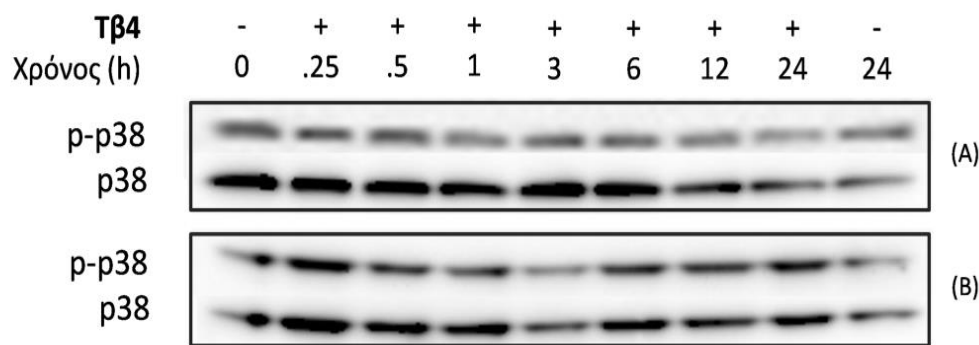
τις φωσφορυλιωμένες μορφές είναι χαμηλά και στις δύο επαναλήψεις. Φαίνεται συνεπώς, πως η θυμοσίνη β4 (10nM) επάγει στους δερματικούς ινοβλάστες AG 012523 την φωσφορυλίωση των ERK (κυρίως ERK2) σε μερικά λεπτά, ενώ από τη μία ώρα και έπειτα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης αρχίζουν να φθίνει..



Εικόνα 39: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 012523 με ή χωρίς θυμοσίνη β4 (10nM) για επτά χρονικά σημεία. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B) και τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoERK1 & phosphoERK2., ενώ για τη αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης ERK2 (panERK).

Κινητική της φωσφορυλίωσης της p38-MAPK

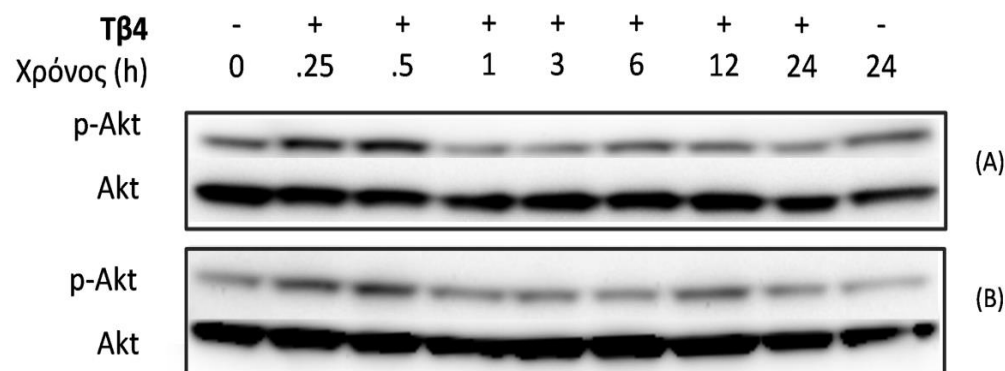
Τα πρότυπα ενεργοποίησης της p38 συναρτήσει του χρόνου είναι παρόμοια και στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις, ειδικά αν συνυπολογισθούν και τα επίπεδα της ολικής p38 (Εικόνα 40). Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης παρουσιάζουν μικρές διακυμάνσεις στην πάροδο του χρόνου, ενώ και οι αρνητικοί μάρτυρες εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα. Φαίνεται συνεπώς πως η θυμοσίνη β4 σε αυτή τη συγκέντρωση και σε αυτά τα χρονικά σημεία δεν επιδρά έντονα στην ενεργοποίηση της p38-MAPK.



Εικόνα 40: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης p38 ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς Tβ4(10nM), σε επτά χρονικά σημεία. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B), όπου τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-p38., ενώ για την αξιολόγηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης p38.

Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT

Και σε αυτή την οδό σηματοδότησης φαίνεται πως η επίδραση της Tβ4 αφορά στα μικρά χρονικά διαστήματα επώασης (Εικόνα 41). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AKT αυξάνονται στους μικρούς χρόνους, ενώ μειώνονται με την πάροδο του χρόνου (1h-24h). Συνεπώς το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K / AKT ενεργοποιείται σε επίπεδο λεπτών της ώρας κατά την επώαση των κυττάρων με θυμοσίνη β4.



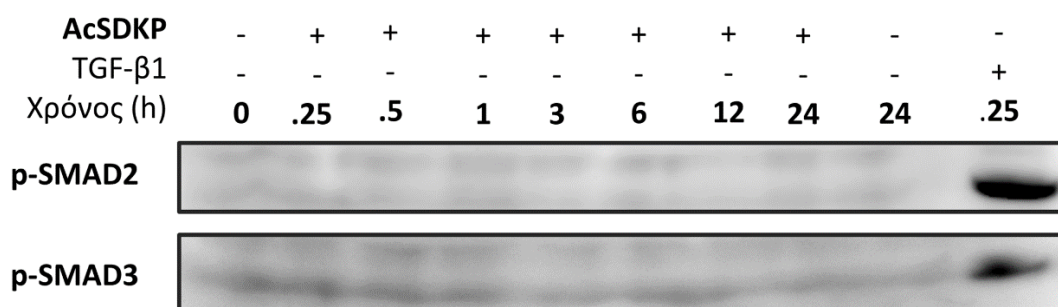
Εικόνα 41: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης AKT ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς θυμοσίνη β4 (10nM) για επτά χρονικά σημεία. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B), όπου τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-AKT (Ser473), ενώ για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης AKT.

4.3 Μελέτη της επίδρασης του θυμοσινικού πεπτιδίου AcSDKP στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 / SMAD3 / JNK / ERK / p38 MAPK/ AKT συναρτήσει του χρόνου

Πειραματικός σχεδιασμός: Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος είναι η διερεύνηση της βιολογικής απόκρισης των δερματικών ινοβλαστών κατά την επώαση τους με **AcSDKP** (10nM) για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Η απόκριση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών στην προσθήκη του θυμοσινικού πεπτιδίου AcSDKP ελέγχθηκε για τρία σηματοδοτικά μονοπάτια: TGF-β / SMAD, MAPK και PI3K/ AKT. Κατ' αναλογία με τις θυμοσίνες α1 και β4 εξετάστηκαν και σε αυτό το πείραμα κινητικής τα χρονικά σημεία 0.25h, 0,5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν παράλληλες καλλιέργειες που δεν είχαν επωασθεί με AcSDKP και συνελέγησαν στα χρονικά σημεία 0h και 24h. Ως θετικός μάρτυρας κατά την ανάλυση των πρωτεϊνών SMAD χρησίμευσαν άνθρωποι δερματικοί ινοβλάστες που επωάστηκαν με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β1 (2,5ng/ml, 0.25h). Για την επίρρωση των αποτελεσμάτων το πείραμα διενεργήθηκε εις διπλούν, με την προσθήκη του πεπτιδίου στο εθισμένο μέσο των κυτταροκαλλιιεργειών με την ελάχιστη δυνατή παρέμβαση.

Κινητική φωσφορυλίωσης SMAD2 & SMAD3

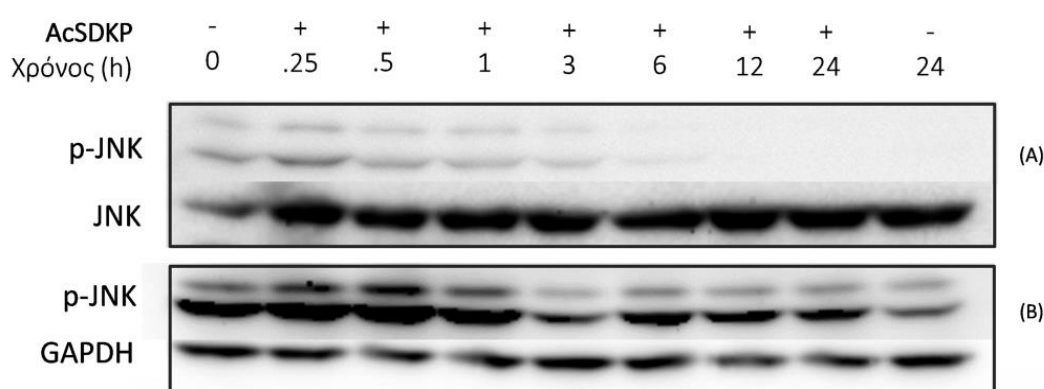
Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της οδού TGF-β/SMAD, ελέγχθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 και SMAD3 (Εικόνα 42). Φαίνεται πως το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP δεν επάγει την ενεργοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, τουλάχιστον στη συγκέντρωση και τη χρονική κλίμακα που μελετήθηκε.



Εικόνα 42: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς AcSDKP (10nM) σε επτά χρονικά σημεία. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο TGF-β (2.5ng/ml, 0.25h). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE, ενώ για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-pSMAD2 και anti-pSMAD3.

Κινητική της φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK

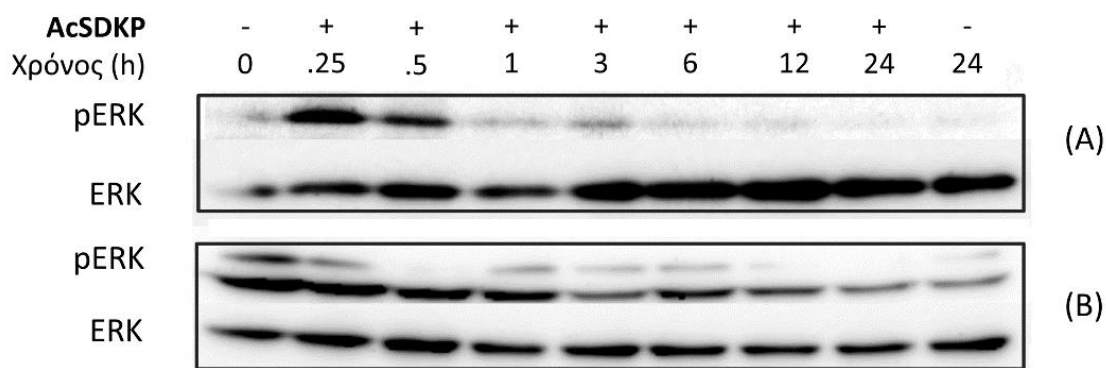
Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της JNK στο χρόνο κατά την επώαση των κυττάρων με το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των JNK1 και JNK2. Από τις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα (Εικόνα 43). Φαίνεται πως τα επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι υψηλότερα στους μικρούς χρόνους (0.25h-1h). Η ενεργοποίηση είναι πιο ισχυρή στα 15' και 30', όμως ασφαλή συμπεράσματα είναι δύσκολο να εξαχθούν καθώς και τα βασικά επίπεδα για τις φωσφορυλιωμένες JNK είναι υψηλά για τον αντίστοιχο αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 43: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων JNK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP (10nM) σε επτά χρονικά σημεία, με θετικό μάρτυρα τον TGF-β (2.5ng/ml, 0.25h). Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoJNK1 & phosphoJNK2, ενώ για τη αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης JNK (A) και το αντίσωμα έναντι της GAPDH (B).

Κινητική της φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK

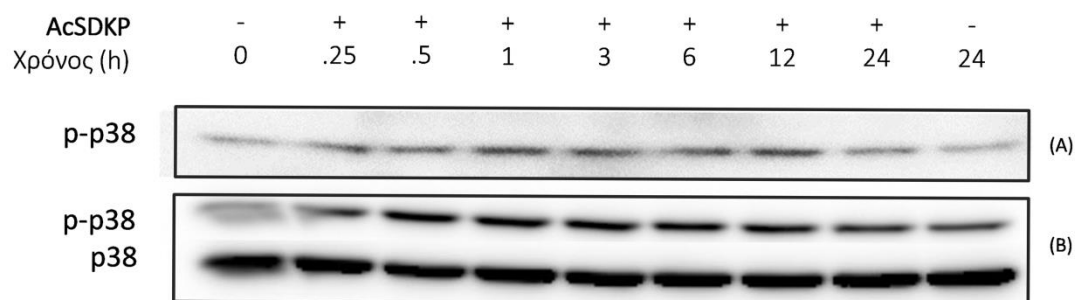
Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης της ERK στο χρόνο σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες ύστερα από επώαση με το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP (10nM), χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των ERK1 και ERK2. Οι δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις δεν μοιράζονται κοινό πρότυπο ενεργοποίησης (Εικόνα 44). Από τεχνικής άποψης φαίνεται πως η δεύτερη επανάληψη (B) είναι πιο άρτια, αφού η πρόσδεση του αντισώματος είναι πιο ισχυρή και διακρίνεται καλύτερα και η phospho-ERK1. Όμως, σε αυτήν την επανάληψη το βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης στο χρόνο 0 είναι ιδιαιτέρως υψηλά και γι' αυτό τον λόγο η ενεργοποίηση της ERK μέχρι και τις έξι ώρες ύστερα από τον χειρισμό δεν μπορεί να αξιολογηθεί με ασφάλεια.



Εικόνα 44: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP (10nM) για επτά χρονικά σημεία. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B) και τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τις phosphoERK1 & phosphoERK2, ενώ για τη αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης ERK2 (panERK).

Κινητική της φωσφορυλίωσης της p38-MAPK

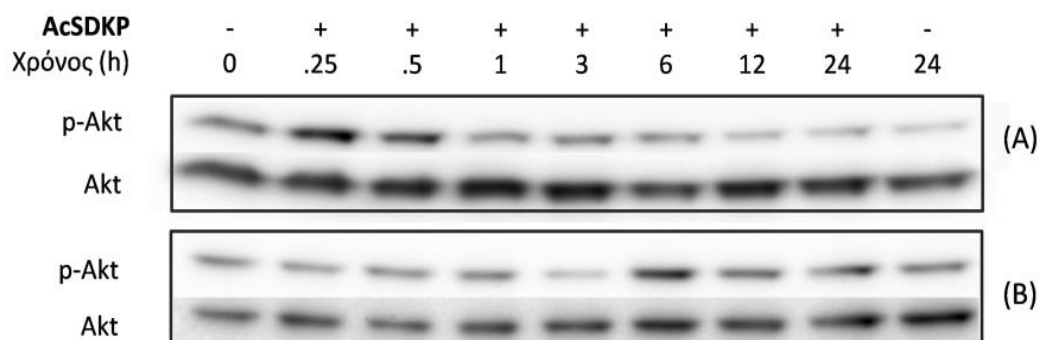
Τα πρότυπα ενεργοποίησης της p38 στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις (A & B) της κινητικής του θυμοσινικού πεπτιδίου AcSDKP παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες (Εικόνα 45). Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38 δεν εμφανίζουν διακυμάνσεις στο χρόνο, ενώ δεν διαφέρουν ιδιαίτερα και από τους αρνητικούς μάρτυρες (0, 24h). Η επίδραση συνεπώς του θυμοσινικού πεπτιδίου στη δεδομένη συγκέντρωση και για τα δεδομένα χρονικά σημεία δεν φαίνεται να είναι ισχυρή.



Εικόνα 45: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης p38 ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς AcSDKP (10nM), σε επτά χρονικά σημεία. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B), όπου τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 12.5% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-p38, ενώ για την αξιολόγηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκε ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης p38.

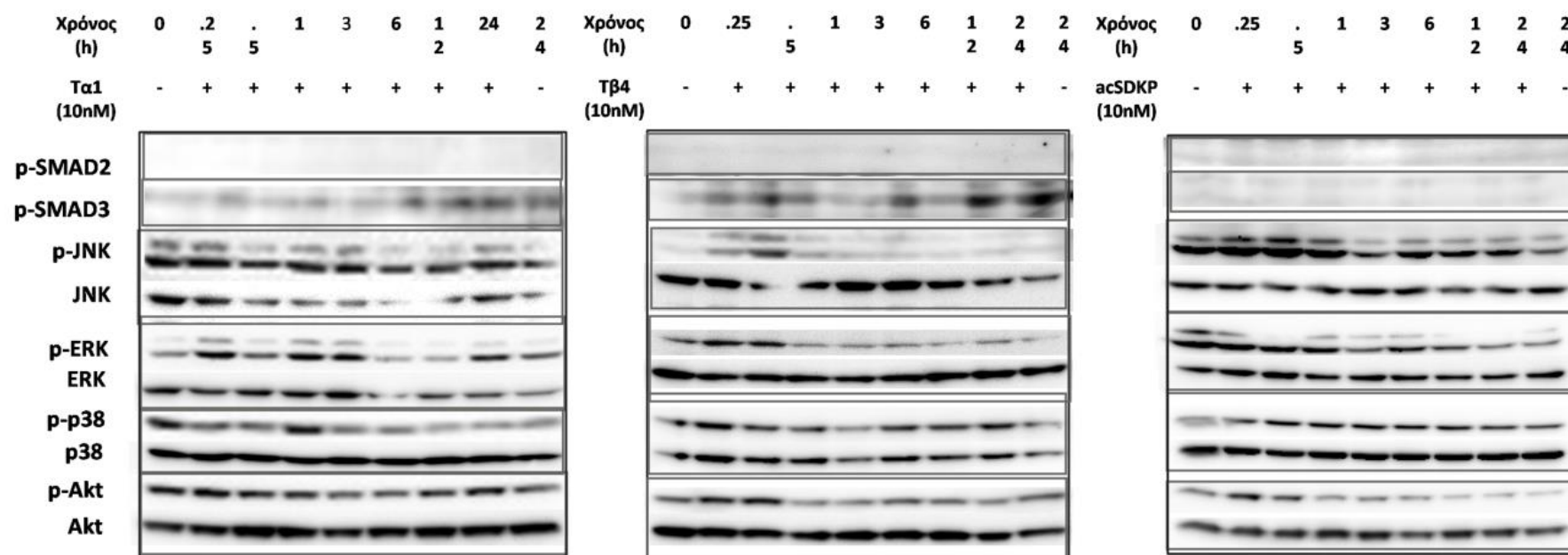
Κινητική φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT

Η ενεργοποίηση της AKT δεν παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο στις δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του AcSDKP (Εικόνα 46). Στην επανάληψη (A) παρατηρείται αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης στα μικρά χρονικά σημεία (0.25h, 0.5h) και μείωση στις 3h. Συνεπώς και σε αυτή την περίπτωση, το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT ενεργοποιείται σε επίπεδο λεπτών της ώρας με την επώαση των κυττάρων με το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP, κατ' αναλογία με το αποτέλεσμα της επώασης με τη θυμοσίνη β4 (Εικόνα 41). Στην επανάληψη (B) παρατηρείται διέγερση της φωσφορυλίωσης της AKT στις 6h. Συνεπώς, το αποτέλεσμα χρήζει επανάληψης για τη λήψη ασφαλούς συμπεράσματος.



Εικόνα 46: Επίπεδα έκφρασης φωσφορυλιωμένης Akt ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 με ή χωρίς το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP (10nM) για επτά χρονικά διαστήματα. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (A) & (B), όπου τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την phospho-AKT (Ser473), ενώ για την αξιολόγηση της φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της ολικής μη φωσφορυλιωμένης AKT.

ΣΥΝΟΨΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ



Εικόνα 47: Συνοπτική παρουσίαση πειραμάτων κινητικής συναρτήσει του χρόνου για τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και AcSDKP σε συγκέντρωση 10nM σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523.

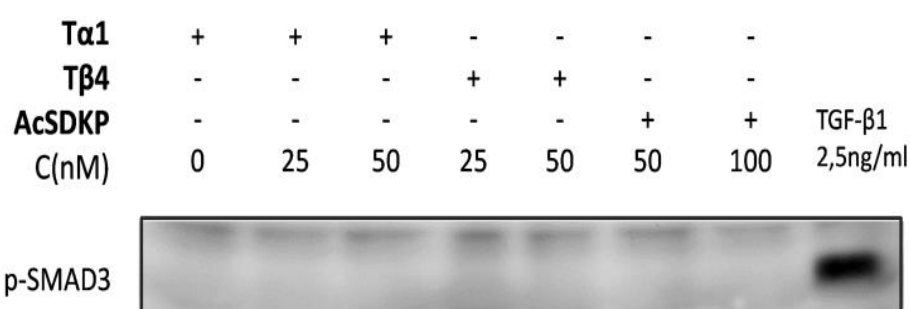
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων (Ενότητες 4.1 – 4.3) αξίζει να συνοψιστούν τα εξής ευρήματα:

- ✓ Κανένα θυμοσινικό πεπτίδιο, στη συγκέντρωση 10nM και για το εύρος χρόνου που διερευνήθηκε, (σύντομοι και μεγάλοι χρόνοι επώασης) δεν φάνηκε να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονομάτι TGF-β / SMAD.
- ✓ Η θυμοσίνη α1 φαίνεται πως ενεργοποιεί την ERK σε επίπεδο λεπτών. Η φωσφορυλίωση παραμένει υψηλή μέχρι και 3h από την προσθήκη του πεπτιδίου, στα μεσαία διαστήματα μειώνεται και ανεβαίνει ξανά στις 24h.
- ✓ Η θυμοσίνη β4 φαίνεται πως προκαλεί άμεση ενεργοποίηση δύο μελών της οικογενείας των MAP κινασών (JNK και ERK), καθώς και της κινάσης AKT.
- ✓ Το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP φαίνεται πως επιδρά στη σηματοδότηση των JNK, ERK, AKT, όμως καθώς οι δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος διαφέρουν, η εξαγωγή συμπερασμάτων είναι επισφαλής.
- ✓ Η phospho-p38 φαίνεται να διατηρεί σχετικά αυξημένα επίπεδα, χωρίς ιδιαίτερες αυξομειώσεις στο χρόνο, ιδίως για το AcSDKP και την Τβ4. Ενδεχομένως όμως να υπάρχει ενεργοποίηση που η συγκεκριμένη συγκέντρωση των θυμοσινικών πεπτιδίων να μην μπόρεσε να αναδείξει.

4.4 Μελέτη διερεύνησης της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης TGF/SMAD υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των θυμοσινικών πεπτιδίων

Πειραματικός σχεδιασμός: Βιβλιογραφικά δεδομένα πως η σηματοδοτική οδός TGF- β / SMAD εμπλέκεται στην ινοπλασία σε συνδυασμό με προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου που καταδεικνύουν τη θετική επίδραση των θυμοσινών στην κολλαγονοσύνθεση σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, έδωσαν το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της μοριακής οδού σηματοδότησης TGF- β /SMAD. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των θυμοσινικών πεπτιδίων ως προς την ενεργοποίηση (μέσω φωσφορυλίωσης) της SMAD3. Η θυμοσίνη $\alpha 1$ και η θυμοσίνη $\beta 4$ δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 25nM & 50nM, ενώ το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP στις συγκεντρώσεις 50nM & 100nM. Η συγκέντρωση δηλαδή που μελετήθηκε, ήταν τουλάχιστον πενταπλάσια της συγκέντρωσης των πειραμάτων κινητικής (ΠΑΡΑΓΡΑΦΟΙ 4.1-4.3). Ως χρόνος επώασης επελέγησαν τα 30'. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο αυξητικός παράγοντας TGF- $\beta 1$ (2,5ng/ml) με επώαση ίδιας χρονικής διάρκειας.

Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της SMAD3. Όπως καταδεικνύεται και στην Εικόνα 48 τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης SMAD3 είναι μη ανιχνεύσιμα, με εξαίρεση το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Η αύξηση συνεπώς της συγκέντρωσης των θυμοσινών δεν διαφοροποίησε τα προηγούμενα αποτελέσματα ως προς την οδό σηματοδότησης TGF- β / SMAD.

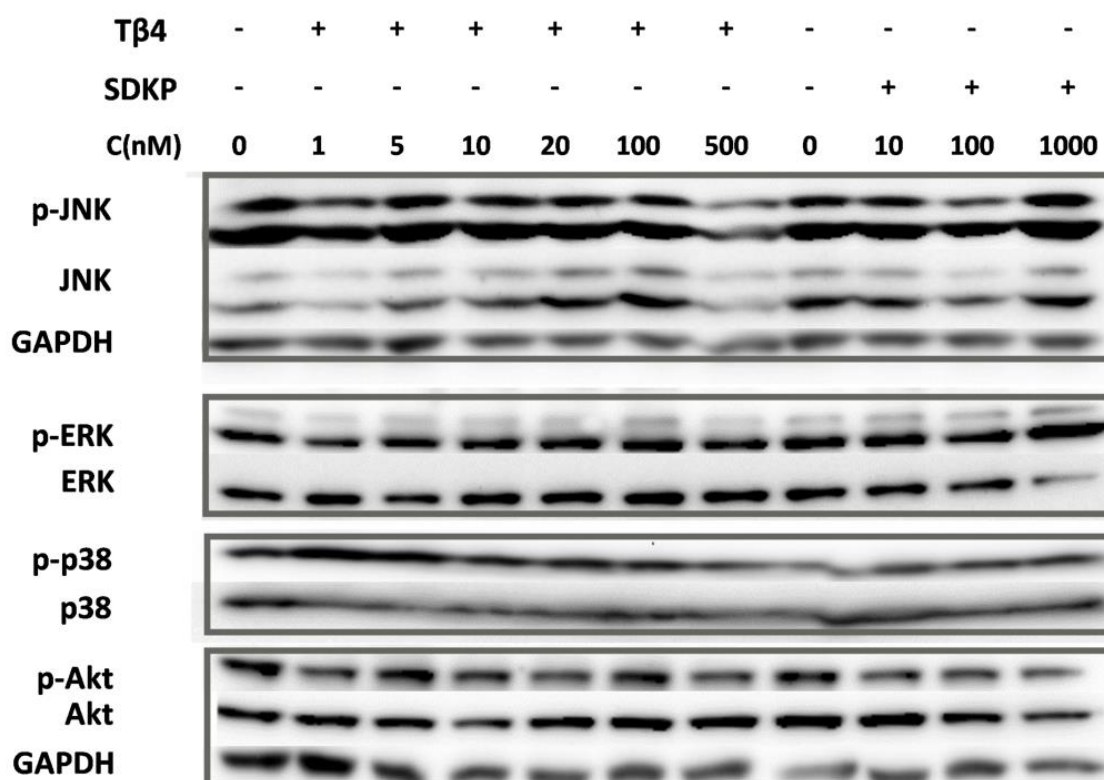


Εικόνα 48: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των θυμοσινικών πεπτιδίων για χρονικό διάστημα 0.5h. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα θυμοσινικά πεπτίδια T α 1 (25nM, 50nM), T β 4 (25nM, 50nM) και AcSDKP (50nM, 100nM). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-phosphoSMAD3.

Φαίνεται πως η θυμοσίνη α1 σε συγκεντρώσεις 10nM, 25nM & 50nM, η θυμοσίνη β4 σε συγκεντρώσεις 10nM, 25nM & 50nM και το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP σε συγκεντρώσεις 10nM, 50nM & 100nM και σε χρόνο επώασης 0,5h δεν ενεργοποιούν τη συγκεκριμένη ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523.

4.5 Μελέτη της ενεργοποίησης οδών σηματοδότησης MAPK & PI3K/AKT συναρτήσει αυξανόμενων συγκέντρωσεων Tβ4 και AcSDKP

Πειραματικός σχεδιασμός: Ακολούθησε ένα ακόμα πείραμα ελέγχου της βιολογικής απόκρισης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών σε ποικίλες συγκεντρώσεις της θυμοσίνης β4 και του αμινοτελικού της πεπτιδίου AcSDKP. Η θυμοσίνη β4 δοκιμάστηκε σε συγκεντρώσεις μέχρι 500nM, ενώ το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP σε συγκεντρώσεις έως 1000nM (Εικόνα 49). Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν δεκαπλάσια του προηγούμενου πειράματος (Πείραμα 4.4). Δεδομένου ότι τόσο στα πειράματα κινητικής όσο και στο πείραμα αυξημένων συγκεντρώσεων της προηγούμενης ενότητας δεν παρατηρήθηκε κάποια ενεργοποίηση των SMAD, στο πείραμα αυτό ελέγχθηκαν εκείνες οι κινάσες, για τις οποίες παρατηρήθηκε κάποια διέγερση (MAP κινάσες και AKT). Ως χρόνος επώασης επιλέχθηκε η 1h, ένας χρόνος που αναδεικνύει με την άμεση απόκριση των ινοβλαστών στο ερέθισμα αλλά εξασφαλίζει ταυτόχρονα πως η φωσφορυλίωση των κινασών δεν είναι απόκριση στο στρες λόγω του χειρισμού, έστω και ήπιου, κατά την προσθήκη του θυμοσινικού πεπτιδίου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο αυξητικός παράγοντας PDGF (10ng/ml) με επώαση ίδιας χρονικής διάρκειας (1h). Λόγω όμως της εντονότατης διέγερσης της φωσφορυλίωσης από τον PDGF και προς διευκόλυνση της παρατήρησης τυχόν διέγερσης από τα θυμοσινικά πεπτίδια, στα στύπωματα Western που ακολουθούν έχει παραληφθεί η στήλη του PDGF.



Εικόνα 49: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων κινασών επαγόμενων από μιτογόνα (JNK, ERK, p38) και κινάσης AKT ύστερα από επώαση σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις Tβ4 (1, 5, 10, 20, 100, 500 nM) και τρεις συγκεντρώσεις AcSDKP (10, 100, 100 nM). Χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνητικοί μάρτυρες. Μετά από αφαίρεση των φωσφορυλιωμένων αντισωμάτων, η κάθε μεμβράνη επώαστηκε με το αντίσωμα έναντι της αντίστοιχης ολικής μορφής της κινάσης. Σε περίπτωση αμφιλεγόμενου αποτελέσματος φορτώσεως πρωτεΐνης, η ίδια μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε ξανά για την ανοσοαποτύπωση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GAPDH.

Φωσφορυλίωση της κινάσης JNK υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων Tβ4 & AcSDKP

Τα βασικά επίπεδα φωσφορυλιωμένων JNK είναι υψηλά και στους δύο αρνητικούς μάρτυρες, γεγονός που δυσχεραίνει την εκτίμηση της επίδρασης της συγκέντρωσης στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού. Ελέγχοντας ταυτόχρονα και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GAPDH ούτως ώστε να συνυπολογισθεί και η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που φορτώθηκε κατά την SDS-PAGE, μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

α) η **θυμοσίνη β4**, σε συγκέντρωση 500nM φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK

b) η **θυμοσίνη β4**, στις συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20 & 100 nM, δεν φαίνεται να ασκεί σημαντική επίδραση στα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων JNK καθώς δεν διαφέρουν ιδιαίτερα με τα επίπεδα βάσης των αρνητικών μαρτύρων. Αυτό συνάδει με τις παρατηρήσεις της κινητικής της φωσφορυλίωσης της κινάσης JNK (Πείραμα 4.2) όπου η οδός JNK/SAPK ενεργοποιείτο στους χρόνους 15' και 30', και όχι στη 1h που διενεργήθηκε το παρόν πείραμα

c) το **θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP** φαίνεται να διαφοροποιεί τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της JNK μόνο στη συγκέντρωση 1000nM, όπου παρατηρούμε σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης

Φωσφορυλίωση της κινάσης ERK υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων T64 & AcSKP

Και σε αυτό το στύπωμα τα βασικά επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK είναι υψηλά και στους δύο αρνητικούς μάρτυρες, γεγονός που δυσχεραίνει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

a) Συνυπολογίζοντας και την έκφραση της ολικής ERK, φαίνεται πως το **AcSDKP** (100nM) επιδρά στη σηματοδότηση της ERK, μέσω αύξησης της φωσφορυλιωμένης της μορφής, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου. Υπάρχει επομένως συμφωνία και με το πείραμα κινητικής της ERK (Πείραμα 4.3) υπό την επίδραση AcSDKP (10nM), όπου πάλι στο διάστημα της 1h δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση των επιπέδων φωσφορυλίωσης

b) η **θυμοσίνη β4**, σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, δεν φαίνεται να διαφοροποιεί τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK. Και εδώ γίνεται αντιληπτό πως ο παράγοντας χρόνος ενδεχομένως να είναι πιο σημαντικός για τη διαφοροποίηση της φωσφορυλίωσης, αφού στο πείραμα κινητικής της φωσφορυλίωσης της ERK, η ενεργοποίηση της οδού παρατηρήθηκε μέχρι το πρώτο ημίωρο και μετά ακολούθησε πτώση των επιπέδων φωσφορυλίωσης

Φωσφορυλίωση της κινάσης p38 υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων T64 & AcSDKP

Τα βασικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p38 είναι σχετικώς πιο χαμηλά και στους δύο αρνητικούς μάρτυρες. Το πρότυπο φωσφορυλίωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης, φαίνεται πως είναι κοινό και για τη θυμοσίνη β4 αλλά και για το πεπτίδιο AcSDKP. Παρατηρείται αύξηση

της φωσφορυλίωσης ακόμα και από την πιο μικρή συγκέντρωση (1nM για την Tβ4 και 10nM για το SDKP) και εν συνεχεία σταδιακή πτώση καθώς η συγκέντρωση των θυμοσινών αυξάνει.

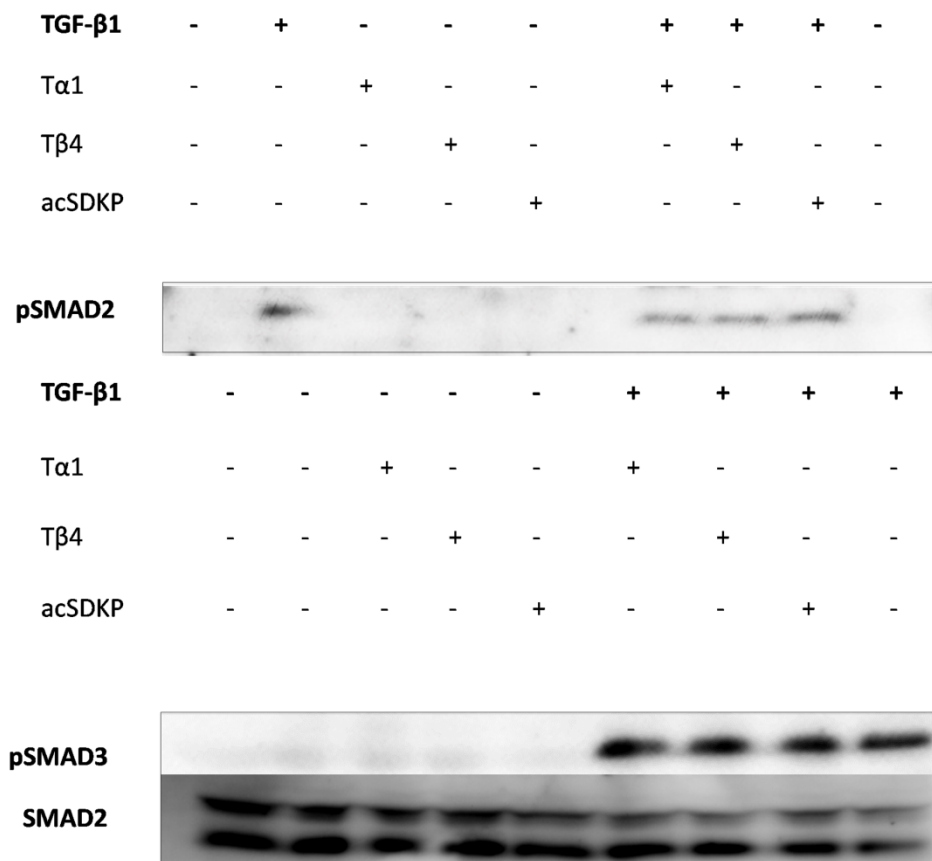
Φωσφορυλίωση της κινάσης AKT υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων Tβ4 & AcSDKP

Τα βασικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης AKT φαίνεται πως είναι υψηλά και στους δύο αρνητικούς μάρτυρες. Μάλιστα είναι τα πιο υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης που παρατηρούνται μαζί με δύο συγκεντρώσεις της Tβ4 (5nM & 100nM). Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης για τους υπόλοιπους χειρισμούς είναι πιο χαμηλά. Γίνεται αντιληπτό πως δεν είναι εύκολη η εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος ως προς την επίδραση της συγκέντρωσης των θυμοσινικών πεπτιδίων Tβ4 και AcSDKP στη φωσφορυλίωση της AKT για το χρόνο που εξετάστηκε.

4.6 Μελέτη ενεργοποίησης της μοριακής οδού σηματοδότησης TGF- β /SMAD από τα θυμοσινικά πεπτίδια T α 1, T β 4 και AcSDKP: i) μεμονωμένων ii) συνδυαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β 1

Πειραματικός σχεδιασμός: Από τα πειράματα κινητικής των phospho-SMAD2 και phospho-SMAD3 (Ενότητες 4.1-4.3) αλλά και από το πείραμα διερεύνησης του ρόλου της συγκέντρωσης των θυμοσινικών πεπτιδίων (Ενότητα 4.4), φάνηκε πως η μοριακή οδός σηματοδότησης TGF- β /SMAD δεν ενεργοποιείται, τουλάχιστον όχι στις χρονικές στιγμές και τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Για την επίρρωση της προηγούμενης παρατήρησης αλλά και για τη διερεύνηση μιας πιθανής συνέργειας μεταξύ του γνωστού επαγωγικού παράγοντα TGF- β και των θυμοσινών σχεδιάστηκε το πείραμα που εκτίθεται στην Εικόνα 50. Τα θυμοσινικά πεπτίδια εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 10nM, μόνα τους και σε συνδυασμό με τον αυξητικό παράγοντα TGF- β (2,5ng/ml). Η ίδια συγκέντρωση TGF- β απουσία θυμοσινών χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας, ενώ το δείγμα χωρίς TGF- β και θυμοσίνες συνιστά τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Ο χρόνος ελέγχου ήταν τα 15'.

Η Εικόνα 50 επαληθεύει τη διαπίστωση ότι τα θυμοσινικά πεπτίδια σε συγκέντρωση 10nM, 15' μετά την χορήγησή τους, δεν επάγουν τη φωσφορυλίωση των SMAD2 & SMAD3. Η συγχορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων με τον TGF- β επάγει την ενεργοποίηση των R-SMAD, όχι όμως περισσότερο ή λιγότερο από τη χορήγηση μόνο του TGF- β (θετικός μάρτυρας). Όπως φαίνεται, τα επίπεδα των phospho-SMAD2 και phospho-SMAD3 παρουσιάζουν αρκετή ομοιογένεια μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών: TGF- β & T α 1 / TGF- β & T β 4 / TGF- β & AcSDKP / TGF- β . Φαίνεται συνεπώς πως η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής TGF- β /SMAD οφείλεται στον αυξητικό παράγοντα TGF- β και δεν παρατηρείται συνεργιστική δράση του TGF- β με κάποιο από τα θυμοσινικά πεπτίδια.

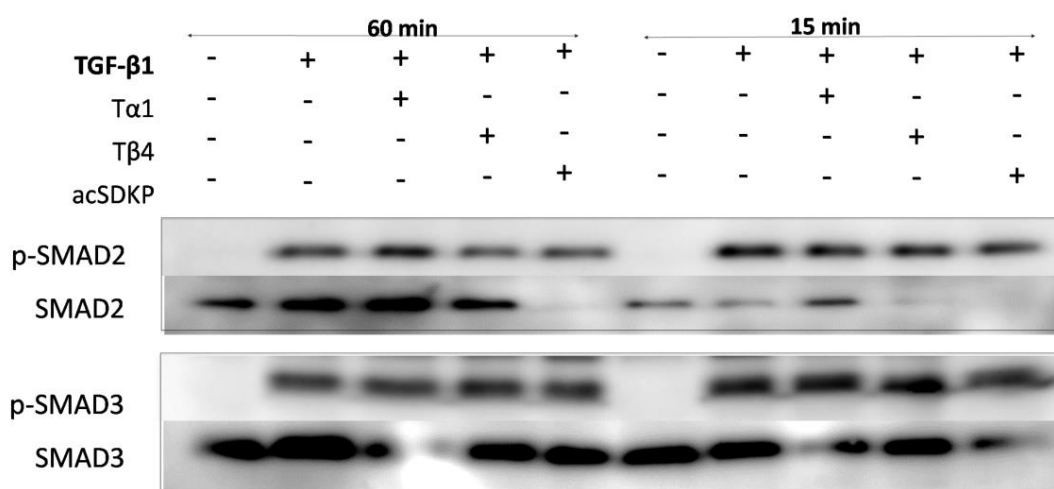


Εικόνα 50: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών SMAD ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523 ύστερα από επώαση τους για 15' με τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1(10nM), Tβ4(10nM) & AcSDKP(10nM), μόνα τους ή συνδιαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού anti-phosphoSMAD2 (πάνω) και anti-phosphoSMAD3 (κάτω). Η έκφραση της ολικής πρωτεΐνης αξιολογήθηκε με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού anti-SMAD2.

4.7 Μελέτη εκτίμησης της φωσφορυλίωσης των SMAD3 & JNK υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και AcSDKP συνδυαστικά με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β1, σε δύο χρόνους (15min & 60min)

Πειραματικός σχεδιασμός: Για την περαιτέρω διερεύνηση της απόκρισης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών στην συγχορήγηση των υπό μελέτη θυμοσινικών πεπτιδίων με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β σχεδιάστηκε το ακόλουθο πείραμα: Τα θυμοσινικά πεπτίδια (10nM) εξετάστηκαν μαζί με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml). Η ίδια συγκέντρωση TGF-β χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας, ενώ το δείγμα χωρίς TGF-β και θυμοσίνες συνιστά τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Η διερεύνηση έγινε σε 2 χρόνους επώασης, 15' και 60'. Ελέγχθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια TGF-β/SMAD (Εικόνα 51) και SAPK/JNK (Εικόνα 52).

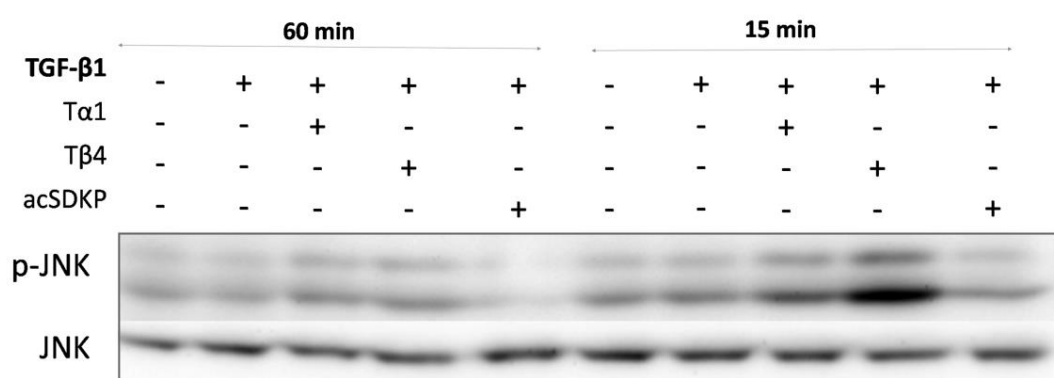
Ενεργοποίηση των SMAD2 & SMAD3



Εικόνα 51: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1(10nM), Tβ4(10nM) & AcSDKP(10nM) μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού anti-phosphoSMAD3, για την εκτίμηση της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού και anti-SMAD2, για την εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης.

Η **Error! Reference source not found.** Εικόνα 51 επαληθεύει εκ νέου το εύρημα πως η συγχορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων με τον TGF-β επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD2 & SMAD3, όχι όμως περισσότερο ή λιγότερο από τη χορήγηση μόνο του TGF-β (θετικός μάρτυρας). Τα επίπεδα των phosphoSMAD2 και phosphoSMAD3 παρουσιάζουν αρκετή ομοιογένεια μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών: TGF-β / Τα1 & TGF-β / Τβ4 & TGF-β / Τβ4 & AcSDKP. Η ίδια παρατήρηση γίνεται όχι μόνο για τα 15' αλλά και για τα 60'. Φαίνεται συνεπώς πως η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής TGF-β/SMAD οφείλεται στον αυξητικό παράγοντα και δεν παρατηρείται κάποια συνεργιστική δράση του TGF-β με κάποιο από τα θυμοσινικά πεπτίδια ως προς τη φωσφορυλίωση της SMAD3.

Ενεργοποίηση της κινάσης JNK



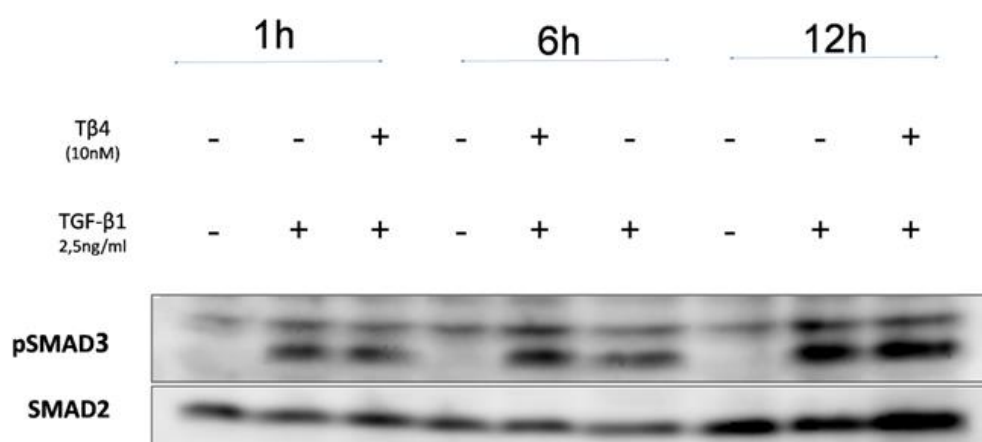
Εικόνα 52: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων JNK σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από επώαση τους για 60' και 15' με τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1(10nM), Τβ4(10nM) & AcSDKP(10nM) σε συνδυασμό με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού anti-phosphoJNK, για την εκτίμηση της ενεργοποίησης και anti-JNK, για την εκτίμηση της ολικής μη φωσφορυλιωμένης JNK.

Στην Εικόνα 52 παρουσιάζονται τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων JNK στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες. Παρατηρείται μια έντονη ενεργοποίηση της JNK στα 15', ύστερα από επώαση με θυμοσίνη β4 και TGF-β. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα 60' αλλά ούτε και με τα υπόλοιπα θυμοσινικά πεπτίδια. Ενδεχομένως, λοιπόν, η θυμοσίνη β4 σε συνδυασμό με τον TGF-β να δρουν συνεργιστικά στην ενεργοποίηση της SAPK/JNK και το γεγονός αυτό να συμβαίνει στη 1h. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης είναι απαραίτητη η επανάληψη του πειράματος.

4.8 Μελέτη ενεργοποίησης οδών σηματοδότησης TGF- β /SMAD & MAPK ύστερα από συγχορήγηση θυμοσίνης β 4 και επαγωγικού παράγοντα TGF- β 1 σε τρία χρονικά σημεία

Πειραματικός σχεδιασμός: Για τη διερεύνηση της βιολογικής απόκρισης των ινοβλαστών στη συνδυαστική δράση της θυμοσίνης β 4 και του επαγωγικού παράγοντα TGF- β 1 χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10nM και 2,5ng/ml, αντιστοίχως. Η επίδραση ελέγχθηκε σε τρία χρονικά διαστήματα επώασης (1h / 6h / 12h) ενώ για κάθε χρονικό σημείο παρουσιάζονται ο αντίστοιχος αρνητικός μάρτυρας (απουσία T β 4 & TGF- β 1), ο θετικός μάρτυρας (απουσία T β 4, παρουσία TGF- β) και ο υπό διερεύνηση χειρισμός (παρουσία T β 4 & TGF- β 1). Ελέγχθηκαν η σηματοδότηση TGF- β /SMAD (**Εικόνα 57**) και η σηματοδότηση των ERK & p38 (**Εικόνα 58**).

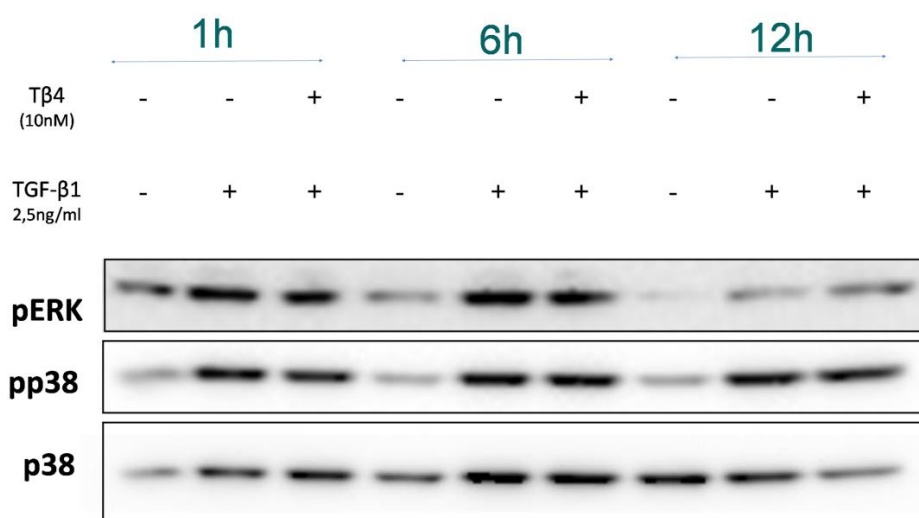
Ενεργοποίηση των SMAD2 & SMAD3



Εικόνα 53: Επίπεδα φωσφορυλιωμένης SMAD3 σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων T β 4(10nM) μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β (2,5ng/ml). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού anti-phosphoSMAD3, για την εκτίμηση της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού και anti-SMAD2, για την εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης.

Για την ανοσοαποτύπωση επιλέχθηκε αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της SMAD3. Από την ανάλυση Western, όπως παρουσιάζεται στην **Error! Reference source not found.**, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης μεταξύ του θετικού μάρτυρα (TGF-β) και του χειρισμού (TGF-β & Tβ4) σε όλες τα χρονικά σημεία που διερευνήθηκαν. Στις 12 ώρες γίνεται αντιληπτό ότι η φωσφορυλίωση της SMAD3 είναι αυξημένη, γεγονός όμως που παρατηρείται και στα επίπεδα έκφρασης της SMAD2.

Ενεργοποίηση κινασών ERK & p38-MAPK

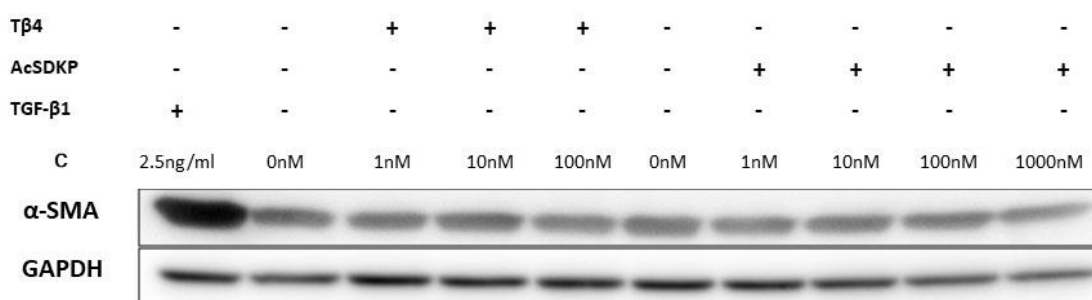


Εικόνα 54: Επίπεδα φωσφορυλιωμένων MAPK σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523 ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων Tβ4(10nM) μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β (2,5ng/ml). Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 9% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού anti-phosphoJNK, anti-phospho-p38, το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-phosphoERK, για την εκτίμηση της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού και anti-p38, για την εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης.

Για τη διερεύνηση της σηματοδότησης των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK) πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις Western της Εικόνα 54. Τόσο με τη χορήγηση του TGF-β1 όσο και με την ταυτόχρονη χορήγηση Tβ4 & TGF-β παρατηρούμε επαγωγή της φωσφορυλίωσης των ERK & p38. Δεν σημειώνονται όμως ουσιαστικές διαφορές μεταξύ τους. Η θυμοσίνη β4 (10nM) φαίνεται να μην επιδρά στα παρατηρούμενα επίπεδα φωσφορυλίωσης των JNK, ERK και p38. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί πως τα παρατηρούμενα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK στη 1h και στις 6h, μειώνονται στις 12h.

4.9 Ρύθμιση μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου

Η επίδραση της θυμοσίνης β4 (1nM, 10nM, 100nM) αλλά και του αμινοτελικού της πεπτιδίου AcSDKP (1nM, 10nM, 100nM, 1000nM) στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης α-SMA σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες αξιολογήθηκε με ανάλυση Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 55, κανένα από τα δύο θυμοσινικά πεπτίδια, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση στην οποία χορηγήθηκε, δεν διαφοροποίησε την έκφραση της α-SMA σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίθετα όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση της α-SMA αυξάνεται, κατά τη διέγερση των κυττάρων με το γνωστό επαγωγέα μυοϊνοβλαστικής διαφοροποίησης TGF-β1. Φαίνεται δηλαδή πως δεν επάγεται η διαφοροποίηση των δερματικών ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες μετά τη χορήγηση Tβ4 σε συγκέντρωση 1-100nM αλλά και AcSDKP σε συγκέντρωση 1-1000nM.



Εικόνα 55: Επίπεδα έκφρασης α-SMA στις 72h ύστερα από επώαση με Tβ4 και AcSDKP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα πρωτεϊνικά λύματα διαχωρίστηκαν με 10% (w/v) SDS-PAGE και για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα μύος anti-αSMA και anti-GAPDH για την εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ελλιπής κατανόηση της υποκείμενης μοριακής βάσης της επιδιόρθωσης ιστών και των επιπλοκών της καθώς και οι διαφορές των υπαρχόντων προκλινικών ζωικών μοντέλων από την επούλωση στον άνθρωπο έχουν περιορίσει την εύρεση νέων θεραπειών για την επιτάχυνση της επούλωσης σε οξείες πληγές και τη μείωση του σχηματισμού ουλών. Η κλινική έρευνα περιορίζεται από την πολυπλοκότητα των μηχανισμών και την ετερογένεια των ασθενών, συμβάλλοντας στην έλλειψη κλινικών δοκιμών υψηλής ποιότητας και μεγάλης κλίμακας για την ανάδειξη της αποτελεσματικότητας νέων θεραπευτικών παραγόντων. Παρά το τεράστιο μέγεθος του κλινικού προβλήματος της επούλωσης πληγών φαίνεται πως υπάρχει μια ενδογενής δυσκολία στη μετάφραση της βασικής επιστήμης σε βελτιωμένες θεραπείες που εκμεταλλεύονται συγκεκριμένους μοριακούς και κυτταρικούς στόχους. Ωστόσο, στον τομέα αυτό, υπάρχει αισιοδοξία πως οι πρόσφατες εξελίξεις θα γεφυρώσουν το χάσμα μεταξύ της βασικής επιστήμης και της κλινικής θεραπείας.

Η αποτυχία ολοκλήρωσης μίας ή περισσότερων από τις κυτταρικές διεργασίες της επούλωσης συνδέεται γενικά με μια υποκείμενη κλινική κατάσταση όπως η αγγειακή νόσος, ο διαβήτης, η γήρανση ή και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η αναζήτηση κλινικών στρατηγικών που θα μπορούσαν να βελτιώσουν τους φυσικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης θα πρέπει να βασίζεται σε ενδελεχή κατανόηση της βασικής βιολογίας του μηχανισμού της επούλωσης. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τη δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων σε παθολογικές καταστάσεις του δέρματος και άλλων ιστών, αλλά και προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II) υποστηρίζουν την εφαρμογή θυμοσινικών πεπτιδίων στην επούλωση του δέρματος. Η παρούσα εργασία επιχειρεί να διερευνήσει τους μοριακούς μηχανισμούς σηματοδότησης που πυροδοτούνται ως απόκριση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών στην επώαση με τα θυμοσινικά πεπτίδια.

Η μελέτη των μοριακών οδών σηματοδότησης υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων και η στρατηγική τους ένταξη στην αντιμετώπιση των επιπλοκών της επούλωσης, έχοντας αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς δράσης αναλόγως της υποκείμενης παθολογικής κατάστασης, αποτελεί απώτερο στόχο της έρευνας του εργαστηρίου. Στους άμεσους στόχους της παρούσας εργασίας περιλαμβάνεται η διερεύνηση της ενεργοποίησης καίριων σηματοδοτικών μονοπατιών που ενδεχομένως σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα κολλαγονοσύνθεσης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών υπό την επιδράση των θυμοσινικών πεπτιδίων, μενονωμένων ή μαζί με τον επαγωγικό παράγοντα TGF- β . Στη συνέχεια συνοψίζονται τα σημαντικότερα ευρήματα και

επιχειρείται ο συσχετισμός με άλλες ερευνητικές εργασίες. Όπως φάνηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, τα δεδομένα στην επούλωση πληγών είναι λίγα, ενώ η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι ακόμη πιο περιορισμένη. Γι' αυτό το λόγο γίνεται αναφορά τόσο σε *in vitro* μελέτες των θυμοσινικών πεπτιδίων σε διάφορα κυτταρικά στελέχη δερματικής ή άλλης προέλευσης, όσο και σε *in vivo* μελέτες ποικίλης παθολογίας.

Επίδραση θυμοσινικών πεπτιδίων στο μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διαφοροποίηση των ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες αποτελεί σημαντική διεργασία κατά την επούλωση τραυμάτων και την επιδιόρθωση ιστών. Η υψηλή συσταλτική δύναμη που παράγεται από τους μυοϊνοβλάστες είναι σημαντική για την αναδιαμόρφωση του φυσιολογικού ιστού αλλά και επιζήμια για τη λειτουργία των ιστών όταν αυτή γίνει υπερβολική, όπως στην περίπτωση των υπερτροφικών ουλών. Οι μυοϊνοβλάστες είναι μεταβολικά και μορφολογικά διακριτοί ινοβλάστες που εκφράζουν α -SMA και η ενεργοποίησή τους παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της ινωτικής απόκρισης. Στην ενεργοποιημένη κατάσταση, οι μυοϊνοβλάστες παύουν να πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να συνθέτουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών εξωκυττάριας μήτρας. Η έκφραση της α -SMA σχετίζεται με την ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών. Η κύρια πορεία μέσω της οποίας ο TGF β 1 ρυθμίζει την έκφραση α -SMA σε ινοβλάστες φαίνεται να περιλαμβάνει τη σηματοδότηση μέσω SMAD. Εναλλακτικά, ο TGF β 1 μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων ινοβλαστών ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση των SMAD (Derynck and Zhang 2003; Moustakas and Heldin 2005), καθώς η έκφραση α -SMA έχει τεκμηριωθεί σε καλλιέργεια ηπατικών βλαστοκυττάρων παρά την αποσιώπηση της SMAD3 (Schnabl 2001).

Η θυμοσίνη β 4 έχει δειχθεί ότι μειώνει το σχηματισμό μυοϊνοβλαστών και αυτή η ιδιότητα ενδεχομένως να της προσδίδει την αντι-ινωτική δράση σε παθολογικές καταστάσεις (Ehrlich and Hazard 2012). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η T β 4 ως πρωτεΐνη δέσμευσης ακτίνης φαίνεται να διαταράσσει τη δομή των μικροσωληνίσκων και με αυτόν τον τρόπο να παρεμβαίνει στη σηματοδότηση των SMAD και συνεπώς στην έκφραση του γονιδίου της α -SMA. Με αυτόν τον τρόπο, η καλλιέργεια δερματικών ινοβλαστών παρουσία T β 4 φαίνεται πως αναστέλλει τη φυσιολογική διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες. Αντίστοιχα, σε μία μελέτη σε καρδιακούς ινοβλάστες, η προεπάωση των κυττάρων με AcSDKP (0.1, 1, 10nM) και εν συνεχεία η διέγερσή τους με TGF- β 1 μείωσε την παραγωγή κολλαγόνου και τη διαφοροποίηση σε μυοϊνοβλάστες σε σχέση με τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με τον TGF- β 1 (Peng et al. 2010). Σε *in vivo* πείραμα σε μύες με έμφραγμα του μυοκαρδίου, η T β 4 δεν προκάλεσε τη διαφοροποίηση των κυττάρων του επικαρδίου (epicardium derived cells - EPDC) σε καρδιομυοκύτταρα, σε αντίθεση με την

επίδραση της Tβ4 όταν χορηγήθηκε πριν το έμφραγμα, όπου ένα υποσύνολο EPDC διαφοροποιήθηκε σε καρδιομυοκύτταρα (Zhou et al. 2012).

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν τόσο η θυμοσίνη β4 όσο και το AcSDKP ως προς τη ρύθμιση του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο TGF-β1 που ασφαλώς αύξησε τα επίπεδα έκφρασης της α-SMA, ενώ η θυμοσίνη β4 και το AcSDKP σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν διαφοροποίησαν τα επίπεδα έκφρασης της α-SMA σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Παρόλο που τα ευρήματα του εργαστηρίου περιλαμβάνουν αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης στους δερματικούς ινοβλάστες, τα θυμοσινικά πεπτίδια (Tβ4, AcSDKP) δεν φαίνεται να επάγουν τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες *in vitro*. Ένας, ενδεχομένως, ανασταλτικός ρόλος της θυμοσίνης β4 και του AcSDKP στη διαφοροποίηση, όπως αυτός που υποδεικνύεται από τη βιβλιογραφία, θα μπορούσε να διερευνηθεί με μία διαφορετική πειραματική προσέγγιση, όπου στην επαγωγή του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου από τον TGF-β ενδεχομένως να επιδρούν τα θυμοσινικά πεπτίδια μέσω προεπώασης.

Ενδοκυτταρική οδός σηματοδότησης TGF-β/SMAD

Ο TGF-β είναι κρίσιμος ρυθμιστής της απόθεσης εξωκυττάριας μήτρας καθώς όχι μόνο διεγείρει την έκφραση των συστατικών της (όπως κολλαγόνο και ελαστίνη), αλλά αναστέλλει και την έκφραση των αναστολέων πρωτεασών (PAI-1 ή TIMPs). Αυτή η συνδυαστική δράση του TGF-β, τον καθιστά βασικό αυξητικό παράγοντα στην ανάπτυξη ίνωσης. Πράγματι, η εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας είναι ένα από τα ενοποιητικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα ινωτικών διαταραχών όπως η κίρρωση του ήπατος, η νεφρική σκλήρυνση, η συστηματική σκλήρυνση και οι χηλοειδείς ουλές. Η εναπόθεση κολλαγόνου μπορεί να προκύψει είτε από αυξημένη βιοσυνθετική δραστηριότητα, είτε από μειωμένο ρυθμό αποδόμησης, είτε και από τα δύο φαινόμενα παράλληλα, με αποτέλεσμα την ανισορροπία κολλαγόνου στους ιστούς.

Ο TGF-β1 ως βασικός μεσολαβητής στη διαδικασία παραγωγής ECM μπορεί να ασκήσει τόσο φυσιολογικές όσο και παθολογικές δράσεις μέσω οδών σηματοδότησης που εξαρτώνται από τις SMAD, αλλά και ανεξάρτητα από τις SMAD. Ο μηχανισμός που εξαρτάται από τις SMAD έχει μελετηθεί καλά και θεωρείται ότι αποτελεί σημαντικό μονοπάτι σε πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες. Οι πρωτεΐνες SMAD είναι μόρια της οδού μεταγωγής σήματος του TGF-β1. Οι SMAD2 και SMAD3 μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω φωσφορυλίωσης και σχηματίζοντας με την SMAD4 ένα σύμπλοκο μεταγραφής να μετακινηθούν στον πυρήνα και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος.

- Γνωρίζοντας από τις δύο προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ότι και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια που εξετάζει η παρούσα εργασία οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων κολλαγόνου που εκκρίνονται από τους ινοβλάστες, επιχειρήσαμε να δούμε, αν η σηματοδοτική οδός των πρωτεϊνών SMAD μεσολαβεί για τα αυξημένα επίπεδα κολλαγόνου.

Από τα πειράματα κινητικής της ενεργοποίησης των SMAD2/3 φάνηκε πως κανένα από τα θυμοσινικά πεπτίδια, στη συγκέντρωση 10nM και για το εύρος χρόνου που διερευνήθηκε (0,25h – 24h), (σύντομοι και μεγάλοι χρόνοι επώασης) δεν ενεργοποίησε το σηματοδοτικό μονοπάτι των SMAD. Το σηματοδοτικό μονοπάτι δεν ενεργοποιήθηκε και με επώαση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θυμοσινικών πεπτιδίων (μέχρι και πενταπλάσια συγκέντρωση για τις θυμοσίνες Τα1 και Τβ4, έως και δεκαπλάσια για το AcSDKP) με επώαση ενός ημίωρου (0.5h).

Από τα παραπάνω πειράματα γίνεται αντιληπτό πως και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια δεν ενεργοποιούν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση των SMAD2 και SMAD3 με άμεσο ή έμμεσο τρόπο. Από τις μελέτες κινητικής της ενεργοποίησης των SMAD2/3 φαίνεται πως δεν επάγεται ενεργοποίηση ούτε άμεσα ούτε σε μεταγενέστερο χρόνο. Τα θυμοσινικά πεπτίδια φαίνεται να μην επιδρούν στην άμεση ενεργοποίηση των SMAD (πχ μέσω υποδοχέα που ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί). Φαίνεται όμως πως δεν δρούν ούτε μέσω παρακρινικής σηματοδότησης λόγω πχ αύξησης των επιπέδων έκφρασης του TGF-β, γιατί και μέχρι τις 24h, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης ήταν μη ανιχνεύσιμα. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, το παραπάνω εύρημα να οφείλεται σε ανεπαρκή συγκέντρωση των θυμοσινικών πεπτιδίων στο εθισμένο μέσο, η ενεργοποίηση των SMAD 2/3 ελέγχθηκε και ύστερα από επώαση των ινοβλαστών σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θυμοσινικών πεπτιδίων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες SMAD2 & SMAD3 δεν ενεργοποιήθηκαν μέσω φωσφορυλίωσης ούτε και με την αύξηση της συγκέντρωσης των θυμοσινικών πεπτιδίων.

- Από τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου φάνηκε πως η αύξηση των επιπέδων κολλαγόνου ήταν αθροιστική υπό την ταυτόχρονη επώαση των ινοβλαστών με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β και κάθε ένα από τα θυμοσινικά πεπτίδια. Γι' αυτό το λόγο θελήσαμε να εξετάσουμε, εάν η συγχορήγηση TGF-β και θυμοσινών ασκεί συνεργιστική δράση και ως προς την ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης TGF-β /SMAD.

Πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πειράματα για τον έλεγχο της συγκεκριμένης υπόθεσης. Αρχικά, ελέγχθηκε η άμεση ενεργοποίηση του μονοπατιού, δηλαδή εξετάστηκαν τα επίπεδα

φωσφορυλίωσης στα 15' υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων i) μεμονωμένων και ii) σε συγχορήγηση με τον TGF-β. Σε επόμενο πείραμα ελέγχθηκε μόνο η συνδυαστική δράση του παράγοντα TGF-β και των θυμοσινικών πεπτιδίων σε δύο χρόνους (15' & 60'). Και στα δύο πειράματα φάνηκε πως η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού TGF-β/SMAD επάγεται μόνο από τη δράση του TGF-β, καθώς δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στην ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης όταν τα κύτταρα επωάζονται μόνο με TGF-β ή συνεπάζονται με τα θυμοσινικά πεπτίδια και τον TGF-β. Συνεπώς, δεν φαίνεται να ασκείται κάποια συνεργιστική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β για την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού TGF-β/SMAD σε μικρούς χρόνους (15' και 60').

Με το δεύτερο πείραμα ελέγχθηκε και η κινητική της ενεργοποίησης της SMAD3 σε τρία χρονικά σημεία σε διάστημα 12 ωρών υπό την επίδραση του επαγωγικού παράγοντα TGF-β και της θυμοσίνης β4. Η θυμοσίνη β4 φαίνεται να μην επάγει κάποια διαφοροποίηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της SMAD3, σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται από την επίδραση του TGF-β, σε κανένα από τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως δεν ασκείται κάποια συνεργιστική δράση των θυμοσινών με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β ως προς την ενεργοποίηση της σηματοδότησης των μεταγραφικών παραγόντων SMAD2 & SMAD3. Επομένως, η αθροιστική δράση του TGF-β και των θυμοσινικών πεπτιδίων ως προς τη σύνθεση κολλαγόνου φαίνεται να επιτυγχάνεται μάλλον μέσω παράλληλης ενεργοποίησης και κάποιου ανεξάρτητου σηματοδοτικού μονοπατιού (πέραν της ενεργοποίησης των SMAD από τον TGF-β).

Στη βιβλιογραφία, η θυμοσίνη β4 έχει χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον για τη θεραπεία ινωτικών παθολογικών καταστάσεων, όπου η δράση της φαίνεται πως είναι αντι-ινωτική, αναστέλλοντας την έκφραση του κολλαγόνου, της α-SMA, της φμπρονεκτίνης, του TGF-β1, του TGFβR II, της SMAD2, της SMAD3 και του PDGFR. Θεωρείται δηλαδή ότι μεώνει την ίνωση μέσω των μονοπατιών του PDGF/PDGFD και TGF-β/SMAD (Chen, Li, and Wang 2020). Σε καρδιακούς ινοβλάστες, οι Peng και οι συνεργάτες παρατήρησαν μείωση της επαγόμενης από τον TGF-β1 φωσφορυλίωσης της SMAD2 όταν τα κύτταρα προεπώστηκαν με AcSDKP (1&10nM) για 30'. Σε καρδιακούς ινοβλάστες αρουραίου, μια άλλη ερευνητική ομάδα παρατήρησε πως η προεπώαση με AcSDKP για 15' προκάλεσε επίσης μείωση των επιπέδων phosphoSMAD2 που επάγονται από τον TGF-β στις 24h (Pokharel et al. 2002). Σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα, το AcSDKP ανέστειλε την επαγόμενη από TGF-β1 φωσφορυλίωση της SMAD2 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, αλλά και την πυρηνική συσσώρευση των R-SMAD (SMAD2, SMAD3) (Kanasaki et al. 2006).

In vivo, σε διαβητικούς μύες με νεφροπάθεια, το AcSDKP αναστέλλει την ενεργοποίηση μονοπατιού των πρωτεϊνών SMAD. Ακόμη, σε μοντέλο καρδιακής δυσλειτουργίας αρουραίου, το AcSDKP απέτρεψε σημαντικά την ενεργοποίηση της SMAD3 όπως αυτή προκύπτει από τη γαλεκτίνη 3, υποδηλώνοντας ότι το Ac-SDKP αποτρέπει την καρδιακή φλεγμονή, την ίνωση και τη δυσλειτουργία που προκαλείται από τη Gal-3, πιθανώς μέσω αναστολής της οδού σηματοδότησης TGF-β / SMAD3. Οι μηχανισμοί που προτείνουν οι Kanasaki και οι συνεργάτες για την ανασταλτική δράση του AcSDKP στο μονοπάτι TGF-β/SMAD περιλαμβάνουν την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της SMAD7, τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης ή τη μετατόπιση από τον πυρήνα των κυττάρων στο κυτταρόπλασμα καθώς επίσης και την αναστολή της φωσφορυλίωσης των R-SMAD από τους υποδοχείς του TGF-β, χωρίς ωστόσο οι δράσεις αυτές να έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί (Kanasaki et al. 2014).

Η διαφορά μεταξύ της βιβλιογραφίας και των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας έγκειται στο γεγονός πως οι περισσότερες μελέτες είτε ξεκινούν με παθολογικό, ινωτικό ιστό είτε ακόμη και αν ξεκινήσουν με φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, θέτουν *a priori* ως δεδομένο πως το πεπτιδίδιο AcSDKP και η θυμοσίνη β4 που το εμπεριέχει, έχουν αντι-ινωτική δράση. Υποεκτιμούν δηλαδή δεδομένα όπως πχ πως η θυμοσίνη β4 σε φυσιολογικούς πνευμονικούς ινοβλάστες επάγει την κολλαγονοσύνθεση (Conte et al 2015). Το ίδιο έχει βρεθεί και για το AcSDKP σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Hajem et al 2013). Ενδεχομένως η αντι-ινωτική δράση πράγματι να εμπεριέχει την καταστολή της σηματοδότησης μέσω TGF/SMAD, ενώ μία μελέτη υποστηρίζει την καταστολή της σηματοδότησης μέσω NOTCH και όχι μέσω TGF/SMAD (πχ Hong, Yao, and Zheng 2017).

Στην παρούσα μελέτη, ύστερα από τη διεξαγωγή πολλών ανεξάρτητων πειραμάτων, φαίνεται πως για την παρατηρούμενη αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων, που όπως έχει αναφερθεί, συνιστούν ενδογενείς παράγοντες, δεν μεσολαβεί η σηματοδοτική οδός TGF-β/SMAD. Αναζητώντας στη βιβλιογραφία άλλες ουσίες που επιδρούν στην κολλαγονοσύνθεση φαίνεται πως κάποιοι εξωγενείς παράγοντες, κυρίως φυτικής προέλευσης, επιδρούν στη σηματοδοτική οδό TGF/SMAD (Lee et al. 2006; Tsuji-Naito et al. 2010; Xin et al. 2004; Bai et al. 2015; Li et al. 2016; Liu et al. 2017), ενώ κάποιοι δεν επιδρούν σε αυτή (Suto et al. 2019)

Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν εναλλακτικές κυτταρικές οδοί σηματοδότησης που πιθανώς ενεργοποιούνται ως απόκριση στα θυμοσινικά πεπτίδια και σχετίζονται με την κολλαγονοσύνθεση. Γι'αυτόν το σκοπό, ελέγχθηκαν ακόμη η ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK) αλλά και η σηματοδότηση μέσω της κινάσης AKT. Οι MAPK διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Η κινάση AKT φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της επιβίωσης (παρεμποδίζοντας την απόπτωση), στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής της ενεργοποίησης κομβικών κινασών για κάθε πεπτίδιο ξεχωριστά, ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης, ενώ διερευνήθηκε και η σηματοδότηση αυτών των μονοπατιών με την ταυτόχρονη χορήγηση των θυμοσινικών πεπτιδίων και του επαγωγικού παράγοντα TGF-β1.

Θυμοσίνη α1

Η θυμοσίνη α1 φαίνεται να επιδρά στην ενεργοποίηση της ERK σε διάστημα λεπτών με τη φωσφορυλίωση να παραμένει υψηλή μέχρι και τις 3h από την προσθήκη του πεπτιδίου. Στα μεσαία διαστήματα μειώνεται και ανεβαίνει ξανά στις 24h. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα παρατηρείται μία άμεση ενεργοποίηση που διαρκεί μέχρι και τρεις ώρες και μια μεταγενέστερη, πιθανώς μέσω κάποιας παρακρινούς επίδρασης. Στη σηματοδότηση των κινασών JNK, p38-MAPK και AKT φαίνεται πως η θυμοσίνη α1 δεν ασκεί κάποια έντονη επίδραση, εκτός από την περίπτωση συγχορήγησης με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β, όπου και παρατηρείται ενεργοποίηση της JNK στα 15'.

Οι MAPK αντιπροσωπεύουν σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων κυτοκίνης και άλλων σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών σε μία πληθώρα κυτταρικών τύπων. Από τα λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη διερεύνηση της μοριακής σηματοδότησης που επάγεται από την Τα1, σε μία μελέτη, σε *in vitro* καλλιέργεια μακροφάγων μυών διερευνήθηκε η ενεργοποίηση των MAPK στο χρόνο και στη δόση επώασης με Τα1, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και ειδικοί φαρμακολογικοί αναστολείς (Sodhi and Paul 2002). Από τα αποτελέσματα εντοπίστηκε πως η βέλτιστη δόση της θυμοσίνης α1 για την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ERK ήταν 3.2nM, ενώ φάνηκε ακόμη πως η ενεργοποίηση ξεκινά από τα 5' και διαρκεί μέχρι τα 30'. Η ειδικότητα της φωσφορυλίωσης που προκαλείται από την

Τα1 και η ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK στα μακροφάγα επιβεβαιώθηκαν και με τον αναστολέα της κινάσης MEK, PD98059. Οι ίδιοι ερευνητές θέλησαν να διερευνήσουν και τον υποδοχέα μέσω του οποίου ξεκινά η μεταγωγή σήματος. Από βιβλιογραφικά δεδομένα ορμώμενοι, απέδειξαν με χρήση της τοξίνης του κοκκύτη (pertussis toxin, PTX), πως η μεταγωγή του σήματος της Τα1 πραγματοποιείται μέσω υποδοχέα GPCR. Κάνοντας χρήση των αναστολέων wortmanin και genistein, ανέστειλαν την ενεργοποίηση των PI3k και ERK1/2, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας ότι η PI3K και οι κινάσες τυροσίνης έχουν ουσιαστικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος που προκαλείται από την Τα1. Στο ίδιο πείραμα ελέγχθηκε και η ενεργοποίηση της p38 στα 15', που όπως και στην παρούσα μελέτη, δεν φάνηκε να εγείρεται, ενώ σε αντίθεση η JNK ενεργοποιήθηκε. Παρόμοια αποτελέσματα, αν και σε διαφορετικό τύπο κυττάρων, παρουσιάζει μία μελέτη σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος. Η θυμοσίνη α1 φαίνεται να επάγει τον πολλαπλασιασμό τους μέσω ενεργοποίησης των ERK1/2 και JNK (Li et al. 2006).

Σε μία άλλη μελέτη οι ερευνητές έδειξαν πως η Τα1 σε συγκέντρωση 130μΜ δρά με παρόμοιο τρόπο με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN σε καρκινικά κύτταρα μαστού, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της AKT του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό και επάγοντας την κυτταρική απόπτωση (Guo et al. 2015). Στους δερματικούς ινοβλάστες της παρούσας εργασίας, τα επίπεδα της phosphoAKT ήταν σε όλα τα χρονικά σημεία υψηλά και η δράση της θυμοσίνης α1 δεν φάνηκε να δρα ανασταλτικά. Βέβαια, η συγκέντρωση που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές ήταν 4 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη σε σχέση με τα κινητικά πειράματα της παρούσας εργασίας, οπότε πέραν της διαφορετικής κυτταρικής σειράς, ενδεχομένως και ο παράγοντας συγκέντρωση να ευθύνεται για τα διαφορετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης.

Θυμοσίνη β4

Η θυμοσίνη β4 παρουσίασε ένα πιο ξεκάθαρο πρότυπο ενεργοποίησης των MAPK και της AKT. Η επώαση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών με Τβ4 (10nM) έδειξε πως ενεργοποιεί άμεσα τις ERK, JNK και AK, με τη φωσφορυλίωση να ξεκινά να επανέρχεται στα βασικά επίπεδα από τη 1h. Η JNK φάνηκε να ενεργοποιείται και όταν η Τβ4 χορηγήθηκε μαζί τον αυξητικό παράγοντα TGF-β. Η κινητική της ενεργοποίησης της p38-MAPK δεν έδειξε κάποιο σαφές πρότυπο, αφού τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης ήταν σχετικά αυξημένα και οι διακυμάνσεις στο χρόνο μικρές.

Στη βιβλιογραφία, σε καλλιέργειες οδοντοβλαστών MDPC-23, η θυμοσίνη β4 σε συγκέντρωση 0,4μΜ φαίνεται πως σχετίζεται με την επαγωγή της έκκρισης της πρωντεΐνης BSP μέσω ενεργοποίησης της ERK (και της SMAD3) (Choi et al. 2018). Οι ίδιοι ερευνητές σε προηγούμενη μελέτη έδειξαν ότι η θυμοσίνη β4 (0,2μΜ) προωθεί τη διαφοροποίηση σε κύτταρα οδοντικού πολφού (HDPCs) μέσω ενεργοποίησης των p38, JNK & ERK (90'-180') (Lee et al. 2013). Ομοίως, σε

αθανатоποιημένα κύτταρα PDL (periodontal ligament) που προεπώαστηκαν με Τβ4 (0,2μM) για 24h και εν συνεχεία καλλιεργήθηκαν για 45' παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των AKT, p38-MAPK και ERK (Lee et al. 2015). Αυξημένα επίπεδα phospho-ERK παρατηρούνται και σε κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν Τβ4 και επιδεικνύουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην πακλιταξέλη (Oh et al. 2006). Η θυμοσίνη β4 φάνηκε να επιδρά στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας μέσω της οδού ERK (Moon et al. 2008). Ακόμη, η Τβ4 φαίνεται να ενισχύει την μετάσταση του καρκίνου παγκρέατος, ενώ η επώαση της καρκινικής σειράς Panc-1 με Τβ4 σε συγκέντρωση 2nM φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης JNK, με τη μέγιστη ενεργοποίηση να παρατηρείται στα 10' (Zhang et al. 2008). Σε μελέτη που διερευνά την αντι-αποπτωτική δράση της Τβ4 (0,2μM) σε ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται πως η AKT εμφανίζει το μέγιστο της φωσφορυλίωσης στα 60', ενώ και οι MAPK (ERK, JNK, p38) φαίνεται να ενεργοποιούνται, με το μέγιστο να εμφανίζεται στα 15'-30'.

Σε μία *in vivo* μελέτη, σε μύες (MTK) που υπερεκφράζουν τη θυμοσίνη β4, οι ερευνητές παρατηρήσαν και σε αυτήν την περίπτωση ενεργοποίηση των p38-MAPK, AKT και ERK, κάνοντας την υπόθεση ότι αυτή η ενεργοποίηση σχετίζεται με τη διεργασία της αγγειογένεσης που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη νέων τριχών (Gao et al. 2015a).

Αντίθετα, όταν λόγω κάποιου στρεσογόνου παράγοντα οι MAPK είναι ενεργοποιημένες, η θυμοσίνη β4 φαίνεται να αμβλύνει αυτήν την ενεργοποίηση. Σε μία μελέτη παρατηρήθηκε πως η αιθανόλη επάγει την ενεργοποίηση των MAPK και της AKT σε μικρογλοιακά κύτταρα, ενώ αν τα κύτταρα προεπωαστούν με θυμοσίνη β4 (0.2μM για 1h) πριν την έκθεση σε αιθανόλη, τα επίπεδα της ενεργοποίησης αυτών των κινασών είναι πιο μειωμένα (Zhang et al. 2016). Ομοίως, σε αθανатоποιημένα κύτταρα PDL (70% confluent) που προεπώαστηκαν με Τβ4 (0.1μM, 0.2μM, 1μM) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂, η Τβ4 φαίνεται πως αναστέλλει την ενεργοποίηση των ERK και JNK με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Lee et al. 2016).

Συμπερασματικά, παρόλο που δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέλετες που να διερευνούν τη δράση της Τβ4 στην ενεργοποίηση των MAPK και της AKT σε δερματικούς ινοβλάστες, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ενεργοποίησης αυτών των μονοπατιών. Η ενεργοποίηση μπορεί να εμπλέκεται σε ποικίλες διεργασίες των κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η αγγειογένεση, ενώ κάποιες από τις μελέτες επίρρωσαν τα αποτελέσματά τους και με χρήση ειδικών φαρμακολογικών αναστολέων.

AcSDKP

Στην παρούσα εργασία το θυμοσινικό πεπτίδιο AcSDKP φαίνεται πως ενεργοποιεί τις JNK, ERK, AKT στη συγκέντρωση 10nM, όμως καθώς οι δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος διαφέρουν, είναι απαραίτητη και τρίτη επανάληψη του πειράματος.

Σύμφωνα με *in vitro* ερευνητικά αποτελέσματα, το AcSDKP αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρδιακών ινοβλαστών, τη σύνθεση κολλαγόνου και την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της ERK, εμφανίζοντας ένα διφασικό φαινόμενο, δηλαδή έχει ανασταλτικό ρόλο στις μικρές συγκεντρώσεις και η αναστολή αυτή χάνεται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10nM) (Rhaleb et al. 2001). Παρόλο που το πείραμα έχει διαφορετικό σχεδιασμό και η ενεργοποίηση της ERK μελετάται ύστερα από διέγερση με ορό (10% FCS, 5'), φαίνεται πως η ενεργοποίηση της ERK στα 10nM AcSDKP, που είναι άλλωστε και η συγκέντρωση του πειράματος κινητικής της παρούσας εργασίας, ισοσταθμίζεται με τα επίπεδα ενεργοποίησης του αρνητικού μάρτυρα. Σε μεταγενέστερη εργασία, πάλι σε καρδιακούς ινοβλάστες αρουραίου, η διέγερση με PDGF επάγει τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση κολλαγόνου μέσω ενεργοποίησης της σηματοδότησης των ERK1/2 και JNK. Η δράση του AcSDKP φαίνεται συγκρίσιμη με αυτή των αναστολέων PD98059 και SP600125, οπότε οι ερευνητές καταλήγουν πως το AcSDKP αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση κολλαγόνου που διεγείρεται από τον PDGF μέσω του αποκλεισμού της σηματοδότησης των ERK1/2 και JNK (Zhang et al. 2011).

Ακόμη, το AcSDKP σε συγκέντρωση 100nM ανέστειλε την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, εν μέρει μειώνοντας την ενεργοποίηση της σηματοδότησης MEK-ERK στα 5' και 15' μετά την επώαση με τον TNF-α (Yingying Shi et al. 2020). Ωστόσο, το AcSDKP σε συγκέντρωση 10nM δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη από TNF-α φωσφορυλίωση της ERK σε ενδοθηλιακά κύτταρα (HCAEC) και η αντιφλεγμονώδης δράση του AcSDKP αποδόθηκε σε άλλη ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης (Zhu et al. 2016). Σε μείωση της ενεργοποίησης της ERK ύστερα από διέγερση καρδιακών ινοβλαστών με τον επαγωγικό παράγοντα TGF-β οδήγησε και η προεπώαση τους με AcSDKP με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Peng et al. 2010). Αντίθετα στη δική μας μελέτη, η συνεπώαση του AcSDKP με τον TGF-β δεν διαφοροποίησε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των MAPK σε σχέση με εκείνα υπό την επίδραση μόνο του TGF-β. Στην επίδραση στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων καταλήγει μία άλλη έρευνα, όπου η αυξημένη ενδογενής συγκέντρωση AcSDKP φαίνεται να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό μέσω της ενεργοποίησης του ενδοκυτταρικού μονοπατιού PI3K/AKT (Hu et al. 2013).

Προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι η θυμοσίνη $\alpha 1$, η θυμοσίνη $\beta 4$ και το αμινοτελικό της άκρο, AcSDKP προκαλούν σε διαφορετικό βαθμό αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG 01523. Για να αναδειχθεί ο ακριβής μηχανισμός, η παρούσα μελέτη διερεύνησε το κομβικό σηματοδοτικό μονοπάτι των TGF- β /SMAD, που ήδη πολλές μελέτες έχουν παρατηρήσει πως η καταστολή του μεσολαβεί για την αντι-ινωτική δράση της θυμοσίνης $\beta 4$ και του AcSDKP. Όμως, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν πως η επαγόμενη από τα θυμοσινικά πεπτίδια κολλαγονοσύνθεση δεν διενεργείται μέσω διέγερσης της φωσφορυλίωσης των SMAD. Γι' αυτό το λόγο εξετάστηκαν εναλλακτικές ενδοκυτταρικές οδοί και πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκε η φωσφορυλίωση των MAPK και της AKT. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια διεγείρουν την ενεργοποίηση της ERK. Η θυμοσίνη $\beta 4$ και το AcSDKP, παρουσιάζοντας παρεμφερές πρότυπο σηματοδότησης, ενεργοποιούν επιπρόσθετα τις κινάσες JNK και AKT σχετικά άμεσα και για μικρό χρονικό διάστημα.

Έχει αναφερθεί ότι ο TGF- β προωθεί τη σύνθεση κολλαγόνου, ενεργοποιώντας και την ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης PI3K / AKT. (Zhang 2017). Ακόμη, η φαρμακολογική αναστολή της AKT σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες μείωσε τη σύνθεση κολλαγόνου και αύξησε την MMP-1. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ακόμη ότι οι c-jun και c-fos, οι πρωταρχικοί τελεστές των οδών σηματοδότησης ERK 1/2 και JNK, είναι απαραίτητοι για τη ρύθμιση της έκφρασης του col1a2 από τον TGF- β (Ghosh 2002; Ponticos et al. 2009).

Είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση των PI3K / AKT, MAPK / ERK και MAPK / JNK μεσολαβεί στη ρύθμιση πληθώρας διεργασιών των κυττάρων και όχι μόνο στη ρύθμιση της σύνθεσης κολλαγόνου. Το επόμενο βήμα που αποτελούσε και στόχο της παρούσας εργασίας, το οποίο όμως λόγω της πανδημίας δεν επιτεύχθηκε, είναι η εξέταση της κολλαγονοσύνθεσης υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων παρουσία και απουσία φαρμακολογικών αναστολέων, ειδικών για τις κινάσες που φαίνονται πως ενεργοποιούνται, ώστε να ταυτοποιηθούν οι κινάσες που διαμεσολαβούν τη διέγερση της σύνθεσης κολλαγόνου. Σε περίπτωση που δεν διευκρινιστεί η κύρια οδός που ενεργοποιείται για τη σηματοδότηση της αύξησης της σύνθεσης κολλαγόνου, θα μπορούσαν να ελεγχθούν εναλλακτικές οδοί σηματοδοτικές οδοί όπως η σηματοδότηση μέσω NOTCH και NF κ B. Ακόμη με δεδομένο ότι οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία υποδεικνύουν την αντι-ινωτική δράση της θυμοσίνης $\beta 4$ και του AcSDKP, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η δράση αυτών των παραγόντων σε παθολογικούς ινοβλάστες, απομονωμένους πχ από υπερτροφικές ουλές, χηλοειδή ή ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση.

Τέλος, όσον αφορά στη ρύθμιση του μυοϊνοβλαστικού φαινοτύπου, φαίνεται πως η επαγόμενη από τα θυμοσινικά πεπτίδια αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης δεν διενεργείται λόγω διαφοροποίησης των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarabi, Shahram, Michael T. Longaker, and Geoffrey C. Gurtner. 2007. "Hypertrophic Scar Formation Following Burns and Trauma: New Approaches to Treatment." *PLoS Medicine* 4(9):e234.
- Adler, N. R. D., A. K. Aung, E. N. Ergen, J. Trubiano, M. S. Y. Goh, and E. J. Phillips. 2017. "Recent Advances in the Understanding of Severe Cutaneous Adverse Reactions *." 1234–47.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings. 1996. "Mechanism of Activation of Protein Kinase B by Insulin and IGF-1." *The EMBO Journal* 15(23):6541–51.
- Alessi, Dario R., Stephen R. James, C. Peter Downes, Andrew B. Holmes, Piers R. J. Gaffney, Colin B. Reese, and Philip Cohen. 1997. "Characterization of a 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase Which Phosphorylates and Activates Protein Kinase B α ." *Current Biology* 7(4):261–69.
- Alonso, G., C. Ambrosino, M. Jones, and A. R. Nebreda. 2000. "Differential Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Isoforms Depending on Signal Strength." *Journal of Biological Chemistry* 275(51):40641–48.
- Andreone, P., A. Gramenzi, C. Cursaro, F. Felling, E. Loggi, A. D'Errico, M. Spinosa, S. Lorenzini, M. Biselli, and M. Bernardi. 2004. "Thymosin- α 1 plus Interferon- α for Naive Patients with Chronic Hepatitis C: Results of a Randomized Controlled Pilot Trial." *Journal of Viral Hepatitis* 11(1):69–73.
- Annes, Justin P., Yan Chen, John S. Munger, and Daniel B. Rifkin. 2004. "Integrin $\text{Av}\beta 6$ -Mediated Activation of Latent TGF- β Requires the Latent TGF- β Binding Protein-1." *Journal of Cell Biology* 165(5):723–34.
- Anon. n.d. "Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing - ScienceDirect." Retrieved September 19, 2020 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15333820>).
- Arimoto, Kyoko, Hiroyuki Fukuda, Shinobu Imajoh-Ohmi, Haruo Saito, and Mutsuhiro Takekawa. 2008. "Formation of Stress Granules Inhibits Apoptosis by Suppressing Stress-Responsive MAPK Pathways." *Nature Cell Biology* 10(11):1324–32.
- Auger, Kurt R., Leslie A. Serunian, Stephen P. Soltoff, Peter Libby, and Lewis C. Cantley. 1989. "PDGF-Dependent Tyrosine Phosphorylation Stimulates Production of Novel Polyphosphoinositides in Intact Cells." *Cell* 57(1):167–75.
- Avruch, Joseph. 2007. "MAP Kinase Pathways: The First Twenty Years." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773(8):1150–60.
- Badamchian, Mahnaz, Ali A. Damavandy, Hadi Damavandy, Sonal D. Wadhwa, Barrett Katz, and Allan L. Goldstein. 2007. "Identification and Quantification of Thymosin $\beta 4$ in Human Saliva and Tears." Pp. 458–65 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1112. Blackwell Publishing Inc.

- Bai, Xiaozhi, Ting He, Jiaqi Liu, Yunchuan Wang, Lei Fan, Ke Tao, Jihong Shi, Chaowu Tang, Linlin Su, and Dahai Hu. 2015. "Loureirin B Inhibits Fibroblast Proliferation and Extracellular Matrix Deposition in Hypertrophic Scar via TGF- β /Smad Pathway." *Experimental Dermatology* 24(5):355–60.
- Barnard, Emma, Baochen Shi, Dezhi Kang, Noah Craft, and Huiying Li. 2016. "The Balance of Metagenomic Elements Shapes the Skin Microbiome in Acne and Health." *Scientific Reports* 6.
- Barnes, Leandra A., Clement D. Marshall, Tripp Leavitt, Michael S. Hu, Alessandra L. Moore, Jennifer G. Gonzalez, Michael T. Longaker, and Geoffrey C. Gurtner. 2018. "Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing: Emerging Therapies to Minimize Scar Formation." *Advances in Wound Care* 7(2):47–56.
- Bayat, Ardeshir and Duncan Angus McGrouther. 2005. "Clinical Management of Skin Scarring." *Skinmed* 4(3):165–73.
- Bellacosa, A., Testa, S. Staal, and P. Tsichlis. 1991. "A Retroviral Oncogene, Akt, Encoding a Serine-Threonine Kinase Containing an SH2-like Region." *Science* 254(5029):274–77.
- Bermudez, O., G. Pagès, and C. Gimond. 2010. "The Dual-Specificity MAP Kinase Phosphatases: Critical Roles in Development and Cancer." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299(2).
- Bielefeld, Kirsten A., Saeid Amini-Nik, and Benjamin A. Alman. 2013. "Cutaneous Wound Healing: Recruiting Developmental Pathways for Regeneration." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(12):2059–81.
- BMT Burgering, PJ Coffey. 1995. "Protein Kinase B (c-Akt) in Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Signal Transduction." *Nature* 376:599–602.
- Bock-Marquette, Ildiko, Ankur Saxena, Michael D. White, J. Michael DiMaio, and Deepak Srivastava. 2004. "Thymosin B4 Activates Integrin-Linked Kinase and Promotes Cardiac Cell Migration, Survival and Cardiac Repair." *Nature* 432(7016):466–72.
- Bonney, Elizabeth A. 2017. "Mapping out P38MAPK." in *American Journal of Reproductive Immunology*. Vol. 77. Blackwell Publishing Ltd.
- Boudreau, Nancy J. and Peter Lloyd Jones. 1999. "Extracellular Matrix and Integrin Signalling: The Shape of Things to Come." *Biochemical Journal* 339(3):481–88.
- Brancato, Samielle K. and Jorge E. Albina. 2011. "Wound Macrophages as Key Regulators of Repair: Origin, Phenotype, and Function." *American Journal of Pathology* 178(1):19–25.
- Brunet, Anne, Azad Bonni, Michael J. Zigmund, Michael Z. Lin, Peter Juo, Linda S. Hu, Michael J. Anderson, Karen C. Arden, John Blenis, and Michael E. Greenberg. 1999. "Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor." *Cell* 96(6):857–68.
- Caiado, Francisco, Carla Real, Tânia Carvalho, and Sérgio Dias. 2008. "Notch Pathway Modulation on Bone Marrow-Derived Vascular Precursor Cells Regulates Their Angiogenic and Wound Healing Potential." *PLoS ONE* 3(11).

- Calleja, Véronique, Damien Alcor, Michel Laguerre, Jongsun Park, Borivoj Vojnovic, Brian A. Hemmings, Julian Downward, Peter J. Parker, and Banafshé Larijani. 2007. "Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation in Vivo." *PLoS Biology* 5(4):780–91.
- Carraro, G., A. Naso, E. Montomoli, R. Gasparini, R. Camerini, D. Panatto, M. C. Tineo, L. De Giorgi, S. Piccirella, B. Khadang, M. Ceracchi, and A. De Rosa. 2012. "Thymosin-Alpha 1 (Zadaxin™) Enhances the Immunogenicity of an Adjuvated Pandemic H1N1v Influenza Vaccine (Focetria™) in Hemodialyzed Patients: A Pilot Study." *Vaccine* 30(6):1170–80.
- Carswell, Lindsey and Judith Borger. 2019. *Hypertrophic Scarring Keloids*. StatPearls Publishing.
- Carter, A. N., R. Huang, A. Sorisky, C. P. Downes, and S. E. Rittenhouse. 1994. "Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Is Formed from Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Thrombin-Stimulated Platelets." *Biochemical Journal* 301(2):415–20.
- Castoldi, G., C. R. T. Di Gioia, C. Bombardi, C. Prezioso, M. Leopizzi, S. Maestroni, B. Corradi, G. Zerbini, and A. Stella. 2013. "Renal Antifibrotic Effect of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline in Diabetic Rats." *American Journal of Nephrology* 37(1):65–73.
- Castoldi, Giovanna, Cira R. T. di Gioia, Camila Bombardi, Carla Perego, Lucia Perego, Massimiliano Mancini, Martini Leopizzi, Barbara Gorradi, Stefano Perlini, Gianpaolo Zerbini, and Andrea Stella. 2010. "Prevention of Myocardial Fibrosis by N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline in Diabetic Rats." *Clinical Science* 118(3):211–20.
- Cavasin, Maria A. 2006. "Therapeutic Potential of Thymosin-B4 and Its Derivative N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline (Ac-SDKP) in Cardiac Healing after Infarction." *American Journal of Cardiovascular Drugs* 6(5):305–11.
- Cavasin, Maria A., Tang Dong Liao, Xiao Ping Yang, James J. Yang, and Oscar A. Carretero. 2007. "Decreased Endogenous Levels of Ac-SDKP Promote Organ Fibrosis." *Hypertension* 50(1):130–36.
- Cavasin, Maria A., Nour Eddine Rhaleb, Xiao Ping Yang, and Oscar A. Carretero. 2004. "Prolyl Oligopeptidase Is Involved in Release of the Antifibrotic Peptide Ac-SDKP." *Hypertension* 43(5):1140–45.
- Cha, Hee Jae, Deborah Philp, Soo Hyun Lee, Hye Sung Moon, Hynda K. Kleinman, and Takashi Nakamura. 2010. "Over-Expression of Thymosin β 4 Promotes Abnormal Tooth Development and Stimulation of Hair Growth." *International Journal of Developmental Biology* 54(1):135–40.
- Chadee, Deborah N. and John M. Kyriakis. 2004. "MLK3 Is Required for Mitogen Activation of B-Raf, ERK and Cell Proliferation." *Nature Cell Biology* 6(8):770–76.
- Chan, Gary C. W., Wai Han Yiu, Hao Jia Wu, Dickson W. L. Wong, Miao Lin, Xiao Ru Huang, Hui Yao Lan, and Sydney C. W. Tang. 2015. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Alleviates Renal Fibrosis Induced by Unilateral Ureteric Obstruction in BALB/C Mice." *Mediators of Inflammation* 2015.
- Chan, Tung O., Susan E. Rittenhouse, and Philip N. Tsichlis. 1999. "AKT/PKB and Other

- D3 Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation." *Annual Review of Biochemistry* 68(1):965–1014.
- Chang, Jenny Zwi Chieng, Wan Hsien Yang, Yi Ting Deng, Hsin Ming Chen, and Mark Yen Ping Kuo. 2013. "EGCG Blocks TGFβ1-Induced CCN2 by Suppressing JNK and P38 in Buccal Fibroblasts." *Clinical Oral Investigations* 17(2):455–61.
- Chao, Clare Y. L. and Gladys L. Y. Cheing. 2009. "Microvascular Dysfunction in Diabetic Foot Disease and Ulceration." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 25(7):604–14.
- Chartier, Matthieu, Thierry Chénard, Jonathan Barker, and Rafael Najmanovich. 2013. "Kinome Render: A Stand-Alone and Web-Accessible Tool to Annotate the Human Protein Kinome Tree." *PeerJ* 1:e126.
- Chen, Cai, Xiankui Li, and Lei Wang. 2020. "Thymosinβ4 Alleviates Cholestatic Liver Fibrosis in Mice through Downregulating PDGF/PDGFR and TGFβ/Smad Pathways." *Digestive and Liver Disease* 52(3):324–30.
- Chen, Hai-hua, Xian-long Zhou, Yu-lu Shi, and Jiong Yang. 2013. "Roles of P38 MAPK and JNK in TGF-B1-Induced Human Alveolar Epithelial to Mesenchymal Transition." *Archives of Medical Research* 44(2):93–98.
- Chen, Jian, Julie Wong-Chong, and Nirmala SundarRaj. 2011. "FGF-2– and TGF-B1– Induced Downregulation of Lumican and Keratocan in Activated Corneal Keratocytes by JNK Signaling Pathway." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(12):8957.
- Cheng, Peng, Fang Kuang, Haifeng Zhang, Gong Ju, and Jian Wang. 2014. "Beneficial Effects of Thymosin β4 on Spinal Cord Injury in the Rat." *Neuropharmacology* 85:408–16.
- Cheon, Sophia, Raymond Poon, Chunying Yu, Michael Khoury, Rob Shenker, Joel Fish, and Benjamin A. Alman. 2005. "Prolonged β-Catenin Stabilization and Tcf-Dependent Transcriptional Activation in Hyperplastic Cutaneous Wounds." *Laboratory Investigation* 85(3):416–25.
- Cheon, Sophia S., Alexander Y. L. Cheah, Stefanie Turley, Puvindran Nadesan, Raymond Poon, Hans Clevers, and Benjamin A. Alman. 2002. "β-Catenin Stabilization Dysregulates Mesenchymal Cell Proliferation, Motility, and Invasiveness and Causes Aggressive Fibromatosis and Hyperplastic Cutaneous Wounds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10):6973–78.
- Cheon, Sophia S., Qingxia Wei, Ananta Gurung, Andrew Youn, Tamara Bright, Raymond Poon, Heather Whetstone, Abhijit Guha, and Benjamin A. Alman. 2006. "Beta-catenin Regulates Wound Size and Mediates the Effect of TGF-beta in Cutaneous Healing." *The FASEB Journal* 20(6):692–701.
- Chigurupati, Srinivasulu, Thiruma V. Arumugam, Tae Gen Son, Justin D. Lathia, Shafaq Jameel, Mohamed R. Mughal, Sung Chun Tang, Dong Gyu Jo, Simonetta Camandola, Marialuisa Giunta, Irina Rakova, Nazli McDonnell, Lucio Miele, Mark P. Mattson, and Suresh Poosala. 2007. "Involvement of Notch Signalling in Wound Healing." *PLoS ONE* 2(11):e1167–e1167.

- Choi, Baik-Dong, Hee-Jung Lim, Seung-Yeon Lee, Myoung-Hwa Lee, Ki-Sung Kil, Do-Seon Lim, Soon-Jeong Jeong, and Moon-Jin Jeong. 2018. "Thymosin B4 Is Associated with Bone Sialoprotein Expression via ERK and Smad3 Signaling Pathways in MDPC-23 Odontoblastic Cells." *International Journal of Molecular Medicine*.
- Choudhry, Hani and Adrian L. Harris. 2018. "Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology." *Cell Metabolism* 27(2):281–98.
- Coffer, Paul J. and James R. Woodgett. 1991. "Molecular Cloning and Characterisation of a Novel Putative Protein-Serine Kinase Related to the CAMP-Dependent and Protein Kinase C Families." *European Journal of Biochemistry* 201(2):475–81.
- Collins, B. J. 2003. "In Vivo Role of the PIF-Binding Docking Site of PDK1 Defined by Knock-in Mutation." *The EMBO Journal* 22(16):4202–11.
- Conte, Enrico, Maria Iemmolo, Mary Fruciano, Evelina Fagone, Elisa Gili, Tiziana Genovese, Emanuela Esposito, Salvatore Cuzzocrea, and Carlo Vancheri. 2015a. "Effects of Thymosin β 4 and Its N-Terminal Fragment Ac-SDKP on TGF- β -Treated Human Lung Fibroblasts and in the Mouse Model of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis." *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(sup1):211–21.
- Conte, Enrico, Maria Iemmolo, Mary Fruciano, Evelina Fagone, Elisa Gili, Tiziana Genovese, Emanuela Esposito, Salvatore Cuzzocrea, and Carlo Vancheri. 2015b. "Effects of Thymosin B4 and Its N-Terminal Fragment AC-SDKP on TGF- β -Treated Human Lung Fibroblasts and in the Mouse Model of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis." *Expert Opinion on Biological Therapy* 15:211–21.
- Craig, Evisabel A., Mark V. Stevens, Richard R. Vaillancourt, and Todd D. Camenisch. 2008. "MAP3Ks as Central Regulators of Cell Fate during Development." *Developmental Dynamics* 237(11):3102–14.
- Cross, Darren A. E., Dario R. Alessi, Philip Cohen, Mirjana Andjelkovich, and Brian A. Hemmings. 1995. "Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Insulin Mediated by Protein Kinase B." *Nature* 378(6559):785–89.
- Cuadrado, Ana and Angel R. Nebreda. 2010. "Mechanisms and Functions of P38 MAPK Signalling." *Biochemical Journal* 429(3):403–17.
- Cuenda, Ana and Simon Rousseau. 2007. "P38 MAP-Kinases Pathway Regulation, Function and Role in Human Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773(8):1358–75.
- Cuevas, B. D., A. N. Abell, and G. L. Johnson. 2007. "Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases in Signal Integration." *Oncogene* 26(22):3159–71.
- D'Agostini, Cartesio, Anna Teresa Palamara, Cartesio Favalli, Mariliana Sivilia, Giuseppe Febbraro, Cristina Bue', and Enrico Garaci. 1996. "Efficacy of Combination Therapy with Amantadine, Thymosin α 1 and α β Interferon in Mice Infected with Influenza A Virus." *International Journal of Immunopharmacology* 18(2):95–102.
- D Brancho, N. Tanaka, A. Jaeschke. 2003. "Mechanism of P38 MAP Kinase Activation in Vivo." *Genes Dev* 17:1969–78.
- Dan, Ippeita, Norinobu M. Watanabe, and Akihiro Kusumi. 2001. "The Ste20 Group Kinases as Regulators of MAP Kinase Cascades." *Trends in Cell Biology* 11(5):220–

- Davis, Roger J. 2000. "Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases." *Cell* 103(2):239–52.
- Degirmenci, Ufuk, Mei Wang, and Jiancheng Hu. 2020. "Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy." *Cells* 9(1):198.
- Delavary, Babak Mahdavian, Willem M. van der Veer, Marjolein van Egmond, Frank B. Niessen, and Robert H. J. Beelen. 2011. "Macrophages in Skin Injury and Repair." *Immunobiology* 216(7):753–62.
- Denton, Christopher P., Korsa Khan, Rachel K. Hoyles, X. Shiwen, Patricia Leoni, Yunliang Chen, Mark Eastwood, and David J. Abraham. 2009. "Inducible Lineage-Specific Deletion of TbetaRII in Fibroblasts Defines a Pivotal Regulatory Role during Adult Skin Wound Healing." *The Journal of Investigative Dermatology* 129(1):194–204.
- Dérijard, Benoit, Joël Raingeaud, Tamera Barrett, I. Huan Wu, Jiahuai Han, Richard J. Ulevitch, and Roger J. Davis. 1995. "Independent Human MAP Kinase Signal Transduction Pathways Defined by MEK and MKK Isoforms." *Science* 267(5198):682–85.
- Derynck, Rik and Ying E. Zhang. 2003. "Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF- β Family Signalling." *Nature* 425(6958):577–84.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. "Transforming Growth Factor-B1 Induces α -Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts." *Journal of Cell Biology* 122(1):103–11.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy. 2008. "JNK Signaling in Apoptosis." *Oncogene* 27(48):6245–51.
- Dhanasekaran, Danny N. and E. Premkumar Reddy. 2017. "JNK-Signaling: A Multiplexing Hub in Programmed Cell Death." *Genes and Cancer* 8(9–10):682–94.
- Donovan, Johanna, Xu Shiwen, Jill Norman, and David Abraham. 2013. "Platelet-Derived Growth Factor Alpha and Beta Receptors Have Overlapping Functional Activities towards Fibroblasts." *Fibrogenesis and Tissue Repair* 6(1).
- Ebenezer, Gigi and Michael Polydefkis. 2014. "Epidermal Innervation in Diabetes." Pp. 261–74 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 126. Elsevier B.V.
- Eckes, Beate, Manon C. Zweers, Zhi Gang Zhang, Ralf Hallinger, Cornelia Mauch, Monique Aumailley, and Thomas Krieg. 2006. "Mechanical Tension and Integrin A2 β 1 Regulate Fibroblast Functions." Pp. 66–72 in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol. 11.
- Ehrlich, H. Paul and Sprague W. Hazard. 2010. "Thymosin B4 Enhances Repair by Organizing Connective Tissue and Preventing the Appearance of Myofibroblasts." Pp. 118–24 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1194. Blackwell Publishing Inc.
- Ehrlich, H. Paul and Sprague W. Hazard. 2012. "Thymosin B4 Affecting the Cytoskeleton Organization of the Myofibroblasts." *Annals of the New York Academy of Sciences*

1269(1):74–78.

- Eming, Sabine A., Matthias Hammerschmidt, Thomas Krieg, and Axel Roers. 2009. "Interrelation of Immunity and Tissue Repair or Regeneration." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20(5):517–27.
- Engelman, Jeffrey A., Ji Luo, and Lewis C. Cantley. 2006. "The Evolution of Phosphatidylinositol 3-Kinases as Regulators of Growth and Metabolism." *Nature Reviews Genetics* 7(8):606–19.
- Ferreiro, Isabel, Manel Joaquin, Abul Islam, Gonzalo Gomez-Lopez, Montserrat Barragan, Luís Lombardía, Orlando Domínguez, David G. Pisano, Nuria Lopez-Bigas, Angel R. Nebreda, and Francesc Posas. 2010. "Whole Genome Analysis of P38 SAPK-Mediated Gene Expression upon Stress." *BMC Genomics* 11(1).
- Ficarro, Scott B., Mark L. McClelland, P. Todd Stukenberg, Daniel J. Burke, Mark M. Ross, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, and Forest M. White. 2002. "Phosphoproteome Analysis by Mass Spectrometry and Its Application to *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nature Biotechnology* 20(3):301–5.
- Di Francesco, Paolo, Francesca Pica, Stefano Marini, Cartesio Favalli, and Enrico Garaci. 1992. "Thymosin Alpha One Restores Murine T-Cell-Mediated Responses Inhibited by In Vivo Cocaine Administration." *International Journal of Immunopharmacology* 14(1):1–9.
- Franke, Thomas F., Sung-Il Yang, Tung O. Chan, Ketaki Datta, Andrius Kazlauskas, Deborah K. Morrison, David R. Kaplan, and Philip N. Tsichlis. 1995. "The Protein Kinase Encoded by the Akt Proto-Oncogene Is a Target of the PDGF-Activated Phosphatidylinositol 3-Kinase." *Cell* 81(5):727–36.
- Fromm M, Gunne H, and Bergman AC. 1996. "Biochemical and Antibacterial Analysis of Human Wound and Blister Fluid." 237:86–92.
- Funaba, Masayuki, Cole M. Zimmerman, and Lawrence S. Mathews. 2002. "Modulation of Smad2-Mediated Signaling by Extracellular Signal-Regulated Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 277(44):41361–68.
- Furukawa, Fukiko, Koichi Matsuzaki, Shigeo Mori, Yoshiya Tahashi, Katsunori Yoshida, Yasushi Sugano, Hideo Yamagata, Masanori Matsushita, Toshihito Seki, Yutaka Inagaki, Mikio Nishizawa, Junichi Fujisawa, and Kyoichi Inoue. 2003. "P38 MAPK Mediates Fibrogenic Signal through Smad3 Phosphorylation in Rat Myofibroblasts." *Hepatology* 38(4):879–89.
- Gao, Xiaoyu, Hao Liang, Fang Hou, Zhipeng Zhang, Mingtu Nuo, Xudong Guo, and Dongjun Liu. 2015a. "Thymosin Beta-4 Induces Mouse Hair Growth." *PLoS ONE* 10(6).
- Gao, Xiaoyu, Hao Liang, Fang Hou, Zhipeng Zhang, Mingtu Nuo, Xudong Guo, and Dongjun Liu. 2015b. "Thymosin Beta-4 Induces Mouse Hair Growth" edited by C. D. Andl. *PLOS ONE* 10(6):e0130040.
- Gdalyahu, Amos, Indraneel Ghosh, Talia Levy, Tamar Sapir, Sivan Sapoznik, Yael Fishler, David Azoulai, and Orly Reiner. 2004. "DCX, a New Mediator of the JNK Pathway." *EMBO Journal* 23(4):823–32.

- Ghosh, AK. 2002. "Factors Involved in the Regulation of Type I Collagen Gene Expression: Implication in Fibrosis." *Exp Biol Med (Maywood)* 227.
- Goldstein, A. L., A. Guha, M. M. Zatz, M. A. Hardy, and A. White. 1972. "Purification and Biological Activity of Thymosin, a Hormone of the Thymus Gland." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(7):1800–1803.
- Goldstein, A. L., F. D. Slater, and A. White. 1966. "Preparation, Assay, and Partial Purification of a Thymic Lymphocytopoietic Factor (Thymosin)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56(3):1010–17.
- Goldstein, Allan L. 2007. "History of the Discovery of the Thymosins." 13:1–13.
- Goldstein, Allan L. and Mahnaz Badamchian. 2004. "Thymosins: Chemistry and Biological Properties in Health and Disease." *Expert Opinion on Biological Therapy* 4(4):559–73.
- Goldstein, Allan L., Ewald Hannappel, Gabriel Sosne, and Hynda K. Kleinman. 2012. "Thymosin β 4: A Multi-Functional Regenerative Peptide. Basic Properties and Clinical Applications." *Expert Opinion on Biological Therapy* 12(1):37–51.
- Goldstein, Allan L. and Hynda K. Kleinman. 2015. "Advances in the Basic and Clinical Applications of Thymosin β 4." *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(sup1):139–45.
- Goldstein, Allan L and Adam L Goldstein. 2009. "From Lab to Bedside: Emerging Clinical Applications of Thymosin α 1." *Expert Opinion on Biological Therapy* 9(5):593–608.
- Gómez, Néstor and Philip Cohen. 1991. "Dissection of the Protein Kinase Cascade by Which Nerve Growth Factor Activates MAP Kinases." *Nature* 353(6340):170–73.
- González, Germán E., Nour Eddine Rhaleb, Pablo Nakagawa, Tang Dong Liao, Yunhe Liu, Pablo Leung, Xiangguo Dai, Xiao Ping Yang, and Oscar A. Carretero. 2014. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Reduces Cardiac Collagen Cross-Linking and Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertensive Rats." *Clinical Science* 126(1):85–94.
- Goumans, MJ. 2002. "Balancing the Activation State of the Endothelium via Two Distinct TGF- β Type I Receptors." *EMBO J.* 21:1743–53.
- Grant, D. S., J. L. Kinsella, M. C. Kibbey, S. LaFlamme, P. D. Burbelo, A. L. Goldstein, and H. K. Kleinman. 1995. "Matrigel Induces Thymosin B4 Gene in Differentiating Endothelial Cells." *Journal of Cell Science* 108(12):3685–94.
- Greaves, Nicholas S., Kevin J. Ashcroft, Mohamed Baguneid, and Ardeshir Bayat. 2013. "Current Understanding of Molecular and Cellular Mechanisms in Fibroplasia and Angiogenesis during Acute Wound Healing." *Journal of Dermatological Science* 72(3):206–17.
- Greenhalgh, David G. 1998. "The Role of Apoptosis in Wound Healing." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30(9):1019–30.
- Grottesi, Alessandro, Marco Sette, Anna Teresa Palamara, Giuseppe Rotilio, Enrico

- Garaci, and Maurizio Paci. 1998. "The Conformation of Peptide Thymosin A1 in Solution and in a Membrane- like Environment by Circular Dichroism and NMR Spectroscopy. A Possible Model for Its Interaction with the Lymphocyte Membrane." *Peptides* 19(10):1731–38.
- Guo, S. and L. A. DiPietro. 2010. "Critical Review in Oral Biology & Medicine: Factors Affecting Wound Healing." *Journal of Dental Research* 89(3):219–29.
- Guo, Yan, Hui Chang, Jing Li, Xin Yuan Xu, Lan Shen, Zhi Bin Yu, and Wen Chao Liu. 2015. "Thymosin Alpha 1 Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells through PTEN-Mediated Inhibition of PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway." *Apoptosis* 20(8):1109–21.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and Michael T. Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *Nature* 453(7193):314–21.
- Hadden, J. W., A. Saha, M. Sosa, and E. M. Hadden. 1995. "Immunotherapy with Natural Interleukins and/or Thymosin α 1 Potently Augments T-Lymphocyte Responses of Hydrocortisone-Treated Aged Mice." *International Journal of Immunopharmacology* 17(10):821–28.
- Hajem, N., A. Chapelle, J. Bignon, A. Pinault, J. M. Liu, N. Salah-Mohellibi, E. Lati, and J. Wdzieczak-Bakala. 2013. "The Regulatory Role of the Tetrapeptide AcSDKP in Skin and Hair Physiology and the Prevention of Ageing Effects in These Tissues - a Potential Cosmetic Role." *International Journal of Cosmetic Science* 35(3):286–98.
- Hameedaldeen, Alhassan, Jian Liu, Angelika Batres, Gabrielle Graves, and Dana Graves. 2014. "FOXO1, TGF- β Regulation and Wound Healing." *International Journal of Molecular Sciences* 15(9):16257–69.
- Hamilton Outtz, Hasina, June K. Wu, Xing Wang, and Jan Kitajewski. 2010. "Notch1 Deficiency Results in Decreased Inflammation during Wound Healing and Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Inflammatory Cytokine Expression in Macrophages." *The Journal of Immunology* 185(7):4363–73.
- Hanada, Masahito, Jianhua Feng, and Brian A. Hemmings. 2004. "Structure, Regulation and Function of PKB/AKT—a Major Therapeutic Target." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1697(1–2):3–16.
- Hannapel, Ewald and Michael van Kampen. 1987. "Determination of Thymosin B4 in Human Blood Cells and Serum." *Journal of Chromatography A* 397:279–85.
- Hannappel, E. 2010. "Thymosin B4 and Its Posttranslational Modifications." Pp. 27–35 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1194. Blackwell Publishing Inc.
- Haritos, A. A., G. J. Goodall, and B. L. Horecker. 1984. "Prothymosin α : Isolation and Properties of the Major Immunoreactive Form of Thymosin α 1 in Rat Thymus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(41):1008–11.
- Heldin, Carl Henrik and Aristidis Moustakas. 2016. "Signaling Receptors for TGF- β Family Members." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(8).
- Hiles, Ian D., Masayuki Otsu, Stefano Volinia, Michael J. Fry, Ivan Gout, Ritu Dhand, George Panayotou, Fernanda Ruiz-Larrea, Andrew Thompson, Nicholas F. Totty, J.

- Justi. Hsuan, Sara A. Courtneidge, Peter J. Parker, and Michael D. Waterfield. 1992. "Phosphatidylinositol 3-Kinase: Structure and Expression of the 110 Kd Catalytic Subunit." *Cell* 70(3):419–29.
- Hill, Michelle M., Sharon F. Clark, David F. Tucker, Morris J. Birnbaum, David E. James, and S. Lance Macaulay. 1999. "A Role for Protein Kinase B β /Akt2 in Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes." *Molecular and Cellular Biology* 19(11):7771–81.
- Hinkel, Rabea, Chiraz El-Aouni, Tonia Olson, Jan Horstkotte, Stefan Mayer, Sebastian Müller, Michael Willhauck, Christine Spitzweg, Franz Josef Gildehaus, Wolfgang Münzing, Ewald Hannappel, Ildiko Bock-Marquette, J. Michael DiMaio, Antonis K. Hatzopoulos, Peter Boekstegers, and Christian Kupatt. 2008. "Thymosin B4 Is an Essential Paracrine Factor of Embryonic Endothelial Progenitor Cell-Mediated Cardioprotection." *Circulation* 117(17):2232–40.
- Hinz, Boris. 2007. "Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair." *Journal of Investigative Dermatology* 127(3):526–37.
- Ho, J. H. C., K. C. Tseng, W. H. Ma, K. H. Chen, K. S. Lee, and Y. Su. 2008. "Thymosin Beta-4 Upregulates Anti-Oxidative Enzymes and Protects Human Cornea Epithelial Cells against Oxidative Damage." *British Journal of Ophthalmology* 92(7):992–97.
- Hong, Yuheng, Qingbin Yao, and Lina Zheng. 2017. "Biochemical and Biophysical Research Communications Thymosin b 4 Attenuates Liver Fibrosis via Suppressing Notch Signaling." 493:1396–1401.
- Hu, Ping, Bin Li, Wenhua Zhang, Yijian Li, Guang Li, Xinnong Jiang, Joanna Wdzieczak-Bakala, and Jianmiao Liu. 2013. "AcSDKP Regulates Cell Proliferation through the PI3KCA/Akt Signaling Pathway." *PLoS ONE* 8(11).
- Huang, Chenyu, George F. Murphy, Satoshi Akaishi, and Rei Ogawa. 2013. "Keloids and Hypertrophic Scars." *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 1(4):e25.
- Huang, Chun Ming, Chao Cheng Wang, Stephen Barnes, and Craig A. Elmetts. 2006. "In Vivo Detection of Secreted Proteins from Wounded Skin Using Capillary Ultrafiltration Probes and Mass Spectrometric Proteomics." *Proteomics* 6(21):5805–14.
- Huff, Thomas, Angela M. Otto, Christian S. G. Müller, Markus Meier, and Ewald Hannappel. 2002. "Thymosin β 4 Is Released from Human Blood Platelets and Attached by Factor XIIIa (Transglutaminase) to Fibrin and Collagen." *The FASEB Journal* 16(7):691–96.
- Ito, M. 2007. "Wnt-Dependent de Novo Hair Follicle Regeneration in Adult Mouse Skin after Wounding." *Nature* 447:316–20.
- Jain, Anshu K., Scott M. Moore, Kiyoshi Yamaguchi, Thomas E. Eling, and Seung Joon Baek. 2004. "Selective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Thymosin β -4 and Alter Actin Cytoskeletal Organization in Human Colorectal Cancer Cells." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311(3):885–91.
- Jo, Jin Ok, Su Ryun Kim, Moon Kyung Bae, Yun Jeong Kang, Mee Sun Ock, Hynda K. Kleinman, and Hee Jae Cha. 2010. "Thymosin β 4 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in a Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-

- 1 α -Dependent Manner." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803(11):1244–51.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, and B. A. Hemmings. 1991. "Molecular Cloning of a Second Form of Rac Protein Kinase." *Cell Regulation* 2(12):1001–9.
- Kaidanovich-Beilin, Oksana, Jean-Martin Beaulieu, Richard Scott Jope, and James Robert Woodgett. 2012. "Neurological Functions of the Masterswitch Protein Kinase – Gsk-3." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5.
- Kanasaki, Keizo. 2020a. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Is a Valuable Endogenous Antifibrotic Peptide for Kidney Fibrosis in Diabetes: An Update and Translational Aspects." *Journal of Diabetes Investigation* 11(3):516–26.
- Kanasaki, Keizo. 2020b. "N -Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Is a Valuable Endogenous Anti Fi Brotic Peptide for Kidney Fi Brosis in Diabetes : An Update and Translational Aspects."
- Kanasaki, Keizo, Masakazu Haneda, Toshiro Sugimoto, Kazuyuki Shibuya, Motohide Isono, Keiji Isshiki, Shin-ichi Araki, Takashi Uzu, Atsunori Kashiwagi, and Daisuke Koya. 2006. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Inhibits DNA Synthesis in Human Mesangial Cells via up-Regulation of Cell Cycle Modulators." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342(3):758–65.
- Kanasaki, Keizo, Takako Nagai, Kyoko Nitta, Munehiro Kitada, and Daisuke Koya. 2014. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline: A Valuable Endogenous Anti-Fibrotic Peptide for Combating Kidney Fibrosis in Diabetes." *Frontiers in Pharmacology* 5.
- Kanazawa, Shigeyuki, Toshihiro Fujiwara, Shinsuke Matsuzaki, Kenta Shingaki, Manabu Taniguchi, Shingo Miyata, Masaya Tohyama, Yasuo Sakai, Kenji Yano, Ko Hosokawa, and Tateki Kubo. 2010. "BFGF Regulates PI3-Kinase-Rac1-JNK Pathway and Promotes Fibroblast Migration in Wound Healing" edited by J. Z. Rappoport. *PLoS ONE* 5(8):e12228.
- Kelkar, Nyaya, Claire L. Standen, and Roger J. Davis. 2005. "Role of the JIP4 Scaffold Protein in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways." *Molecular and Cellular Biology* 25(7):2733–43.
- Keshet, Yonat and Rony Seger. 2010. "The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 661:3–38.
- Kieran, Ingrid, Amanda Knock, James Bush, Karen So, Anthony Metcalfe, Rosalind Hobson, Tracey Mason, Sharon O’Kane, and Mark Ferguson. 2013. "Interleukin-10 Reduces Scar Formation in Both Animal and Human Cutaneous Wounds: Results of Two Preclinical and Phase II Randomized Control Studies." *Wound Repair and Regeneration* 21(3):428–36.
- Kikidou, Eleni. 2018. "Πεπτιδια Των Θυμοσινων Με Πιθανη Επουλωτικη Δραση." *Master Thesis, Faculty of Pharmacy, NKUA* 1–91.
- Kim, Shawna S., Georgia E. Nikoloudaki, Sarah Michelsons, Kendal Creber, and Douglas W. Hamilton. 2019. "Fibronectin Synthesis, but Not α -Smooth Muscle Expression, Is Regulated by Periostin in Gingival Healing through FAK/JNK Signaling." *Scientific Reports* 9(1).

- Kim, Sokho and Jungkee Kwon. 2014. "Thymosin Beta 4 Improves Dermal Burn Wound Healing via Downregulation of Receptor of Advanced Glycation End Products in Db/Db Mice." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1840(12):3452–59.
- Kim, Sokho and Jungkee Kwon. 2015. "Molecular and Cellular Endocrinology Effect of Thymosin Beta 4 in the Presence of Up-Regulation of the Insulin-like Growth Factor-1 Signaling Pathway on High-Glucose- Exposed Vascular Endothelial Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 401:238–47.
- Kimura, Hitomichi, Naoto Okubo, Naoyuki Chosa, Seiko Kyakumoto, Masaharu Kamo, Hiroyuki Miura, and Akira Ishisaki. 2013. "EGF Positively Regulates the Proliferation and Migration, and Negatively Regulates the Myofibroblast Differentiation of Periodontal Ligament-Derived Endothelial Progenitor Cells through MEK/ERK-and JNK-Dependent Signals." *Cellular Physiology and Biochemistry* 32(4):899–914.
- King, R. and C. Tuthill. 2016. *Immune Modulation with Thymosin Alpha 1 Treatment*. Vol. 102. 1st ed. Elsevier Inc.
- Kleinman, H. K. and G. Sosne. 2016. "Thymosin B4 Promotes Dermal Healing." Pp. 251–75 in *Vitamins and Hormones*. Vol. 102. Academic Press Inc.
- Kleinman, H K and G. Sosne. 2016. *Thymosin B4 Promotes Dermal Healing*. Vol. 102. 1st ed. Elsevier Inc.
- Kolch, Walter, Gisela Heidecker, Georg Kochs, Richard Hummel, Haleh Vahidi, Harald Mischak, Günter Finkenzeller, Dieter Marmé, and Ulf R. Rapp. 1993. "Protein Kinase C α Activates RAF-1 by Direct Phosphorylation." *Nature* 364(6434):249–52.
- Königová, R. and V. Rychterová. 2000. "Marjolin's Ulcer." *Acta Chirurgiae Plasticae* 42(3):91–94.
- Konishi, H., T. Shinomura, S. Kuroda, Y. Ono, and U. Kikkawa. 1994. "Molecular Cloning of Rat RAC Protein Kinase α and β and Their Association with Protein Kinase C ζ ." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205(1):817–25.
- Kretzschmar, Marcus, Jacqueline Doody, Inna Timokhina, and Joan Massagué. 1999. "A Mechanism of Repression of TGF β /Smad Signaling by Oncogenic Ras." *Genes and Development* 13(7):804–16.
- Kumar, Nitin, Pablo Nakagawa, Branislava Janic, Cesar A. Romero, Morel E. Worou, Sumit R. Monu, Edward L. Peterson, Jiajiu Shaw, Frederick Valeriote, Elimelda M. Onger, Jean Marie V. Niyitegeka, Nour Eddine Rhaleb, and Oscar A. Carretero. 2016. "The Anti-Inflammatory Peptide Ac-SDKP Is Released from Thymosin-B4 by Renal Meprin- α and Prolyl Oligopeptidase." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 310(10):F1026–34.
- Kumar, Sandeep and Sudhiranjan Gupta. 2011. "Thymosin Beta 4 Prevents Oxidative Stress by Targeting Antioxidant and Anti-Apoptotic Genes in Cardiac Fibroblasts." *PLoS ONE* 6(10).
- Kumar, Vathan, Young Sik Jung, and Po Huang Liang. 2013. "Anti-SARS Coronavirus Agents: A Patent Review (2008-Present)." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(10):1337–48.
- Kupatt, Christian, Ildiko Bock-Marquette, and Peter Boekstegers. 2008. "Embryonic

- Endothelial Progenitor Cell-Mediated Cardioprotection Requires Thymosin β 4." *Trends in Cardiovascular Medicine* 18(6):205–10.
- Kupper, Thomas S. and Robert C. Fuhlbrigge. 2004. "Immune Surveillance in the Skin: Mechanisms and Clinical Consequences." *Nature Reviews Immunology* 4(3):211–22.
- Kyriakis, John M., Harald App, Xian Feng Zhang, Papia Banerjee, David L. Brautigan, Ulf R. Rapp, and Joseph Avruch. 1992. "Raf-1 Activates MAP Kinase-Kinase." *Nature* 358(6385):417–21.
- Kyriakis, John M. and Joseph Avruch. 2001. "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation." *Physiological Reviews* 81(2):807–69.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680–85.
- Larson, Barrett J., Michael T. Longaker, and H. Peter Lorenz. 2010. "Scarless Fetal Wound Healing: A Basic Science Review." *Plastic and Reconstructive Surgery* 126(4):1172–80.
- Laurens, N., P. Koolwijk, and M. P. de Maat. 2006. "Fibrin Structure and Wound Healing." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 4(5):932–39.
- Lavoie, Hugo, Jessica Gagnon, and Marc Therrien. 2020. "ERK Signalling: A Master Regulator of Cell Behaviour, Life and Fate." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(10):607–32.
- Le, Huong, Rebecca Kleinerman, Oren Z. Lerman, Daniel Brown, Robert Galiano, Geoffrey C. Gurtner, Stephen M. Warren, Jamie P. Levine, and Pierre B. Saadeh. 2008. "Hedgehog Signaling Is Essential for Normal Wound Healing." *Wound Repair and Regeneration* 16(6):768–73.
- Lee, Jongsung, Eunsun Jung, Youngji Kim, Junho Park, Jinil Park, Sungtaek Hong, Jieun Kim, Changgu Hyun, Yeong Shik Kim, and Deokhoon Park. 2006. "Asiaticoside Induces Human Collagen I Synthesis through TGF β Receptor I Kinase (T β RI Kinase)-Independent Smad Signaling." *Planta Medica* 72(4):324–28.
- Lee, Sang-Im, Duck-Su Kim, Hwa-Jeong Lee, Hee-Jae Cha, and Eun-Cheol Kim. 2013. "The Role of Thymosin Beta 4 on Odontogenic Differentiation in Human Dental Pulp Cells" edited by I. Kerkis. *PLoS ONE* 8(4):e61960.
- Lee, Sang-Im, Deok-Won Lee, Hyung-Mun Yun, Hee-Jae Cha, Cheol-Hyeon Bae, Eui-Sic Cho, and Eun-Cheol Kim. 2015. "Expression of Thymosin Beta-4 in Human Periodontal Ligament Cells and Mouse Periodontal Tissue and Its Role in Osteoblastic/Cementoblastic Differentiation." *Differentiation* 90(1–3):16–26.
- Lee, Sang Im, Jin Kyu Yi, Won Jung Bae, Soojung Lee, Hee Jae Cha, and Eun Cheol Kim. 2016. "Thymosin Beta-4 Suppresses Osteoclastic Differentiation and Inflammatory Responses in Human Periodontal Ligament Cells." *PLoS ONE* 11(1).
- Li, Hongwei, Liu Yang, Yuebing Zhang, and Zhigang Gao. 2016. "Kaempferol Inhibits Fibroblast Collagen Synthesis, Proliferation and Activation in Hypertrophic Scar via Targeting TGF- β Receptor Type I." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 83:967–74.

- Li, Jie, Yan Ping Zhang, and Robert S. Kirsner. 2003. "Angiogenesis in Wound Repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix." *Microscopy Research and Technique* 60(1):107–14.
- Li, M., L. Feurino, F. Li, W. E. Fisher, C. Chen, and Q. Yao. 2006. "Thymosin Alpha 1 Stimulates Cell Proliferation by Activating ERK1/2 and JNK and Increasing Cytokine Secretion in Human Pancreatic Cancer Cells." *Journal of Surgical Research* 130(2):264.
- Li, Xiankui, Lishu Zheng, Fuwang Peng, Chengyu Qi, Xiaoguang Zhang, Anguang Zhou, Zhewei Liu, and Shuhua Wu. 2007. "Recombinant Thymosin Beta 4 Can Promote Full-Thickness Cutaneous Wound Healing." *Protein Expression and Purification* 56(2):229–36.
- Liao, Tang Dong, Pablo Nakagawa, Branislava Janic, Martin D'Ambrosio, Morel E. Worou, Edward L. Peterson, Nour Eddine Rhaleb, Xiao Ping Yang, and Oscar A. Carretero. 2015. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline: Mechanisms of Renal Protection in Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 308(10):F1146–54.
- Liao, Tang Dong, Xiao Ping Yang, Martin D'Ambrosio, Yanlu Zhang, Nour Eddine Rhaleb, and Oscar A. Carretero. 2010. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Attenuates Renal Injury and Dysfunction in Hypertensive Rats with Reduced Renal Mass Council for High Blood Pressure Research." Pp. 459–67 in *Hypertension*. Vol. 55.
- Lichtman, Michael K., Marta Otero-Vinas, and Vincent Falanga. 2016. "Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Isoforms in Wound Healing and Fibrosis." *Wound Repair and Regeneration* 24(2):215–22.
- Lin, Chun Xia, Nour Eddine Rhaleb, Xiao Ping Yang, Tang Dong Liao, Martin A. D'Ambrosio, and Oscar A. Carretero. 2008. "Prevention of Aortic Fibrosis by N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline in Angiotensin II-Induced Hypertension." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 295(3).
- Lin, Yuting, Bin Lin, Dingsheng Lin, Guiqian Huang, and Bin Cao. 2015. "Effect of Thymosin β 4 on the Survival of Random Skin Flaps in Rats." *Journal of Reconstructive Microsurgery* 31(6):464–70.
- Liu, Jian Miao, Françoise Lawrence, Milica Kovacevic, Jérôme Bignon, Evangelia Papadimitriou, Jean Yves Lallemand, Panagiotis Katsoris, Pierre Potier, Yves Fromes, and Joanna Wdzieczak-Bakala. 2003. "The Tetrapeptide AcSDKP, an Inhibitor of Primitive Hematopoietic Cell Proliferation, Induces Angiogenesis in Vitro and in Vivo." *Blood* 101(8):3014–20.
- Liu, Jin-cheng, Feng Wang, Mei-lin Xie, Zong-qi Cheng, Qiong Qin, Lin Chen, and Rong Chen. 2017. "Osthole Inhibits the Expressions of Collagen I and III through Smad Signaling Pathway after Treatment with TGF- β 1 in Mouse Cardiac Fi Broblasts." *International Journal of Cardiology* 228:388–93.
- Liu, Yueping, Yue Pang, Zhenhong Hu, Ming Wu, Chenhui Wang, Zeqing Feng, Congzheng Mao, Yingjun Tan, Ying Liu, Li Chen, Min Li, Gang Wang, Zilin Yuan, Bo Diao, Yuzhang Wu, and Yongwen Chen. 2020. "Thymosin Alpha 1 (T α 1) Reduces the Mortality of Severe COVID-19 by Restoration of Lymphocytopenia and Reversion of Exhausted T Cells." *Clinical Infectious Diseases*.

- Liu, Yun He, Martin D'Ambrosio, Tang Dong Liao, Hongmei Peng, Nour Eddine Rhaleb, Umesh Sharma, Sabine Andre, Hans J. Gabius, and Oscar A. Carretero. 2009. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Prevents Cardiac Remodeling and Dysfunction Induced by Galectin-3, a Mammalian Adhesion/Growth-Regulatory Lectin." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 296(2).
- Liu, Zhenqi and Wenhong Cao. 2009. "P38 Mitogen-Activated Protein Kinase: A Critical Node Linking Insulin Resistance and Cardiovascular Diseases in Type 2 Diabetes Mellitus." *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 9(1):38–46.
- Lo, David D., Andrew S. Zimmermann, Allison Nauta, Michael T. Longaker, and H. Peter Lorenz. 2012. "Scarless Fetal Skin Wound Healing Update." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 96(3):237–47.
- Lo, R. S. 1998. "The L3 Loop: A Structural Motif Determining Specific Interactions between SMAD Proteins and TGF-Beta Receptors." *The EMBO Journal* 17(4):996–1005.
- Lorenz, H. Peter. 2003. "Fetal Wound Healing." *Frontiers in Bioscience* 8(6):1183.
- Low, Teresa L. K. and Allan L. Goldstein. 1985. "[15] Thymosin α 1 and Polypeptide β 1." *Methods in Enzymology* 116(C):233–48.
- Ma, Xiaowen, Yuan Yuan, Zhao Zhang, Yingqi Zhang, and Meng Li. 2014. "An Analog of Ac-SDKP Improves Heart Functions after Myocardial Infarction by Suppressing Alternative Activation (M2) of Macrophages." *International Journal of Cardiology* 175(2):376–78.
- Macconi, Daniela, Giuseppe Remuzzi, and Ariela Benigni. 2014. "Key Fibrogenic Mediators: Old Players. Renin–Angiotensin System." *Kidney International Supplements* 4(1):58–64.
- Malinda, Katherine M., Allan L. Goldstein, and Hynda K. Kleinman. 1997. "Thymosin β 4 Stimulates Directional Migration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells ." *The FASEB Journal* 11(6):474–81.
- Malinda, Katherine M., Hynda K. Kleinman, Gurmel S. Sidhu, Haresh Mani, Krishna Banaudha, Radha K. Maheshwari, and Allan L. Goldstein. 1999. "Thymosin B4 Accelerates Wound Healing." *Journal of Investigative Dermatology* 113(3):364–68.
- Malinda, Katherine M., Gurmel S. Sidhu, Krishna K. Banaudha, Jaya P. Gaddipati, Radha K. Maheshwari, Allan L. Goldstein, and Hynda K. Kleinman. 1998. "Thymosin A1 Stimulates Endothelial Cell Migration, Angiogenesis, and Wound Healing." *The Journal of Immunology* 160(2).
- Manning, Brendan D. and Lewis C. Cantley. 2007. "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream." *Cell* 129(7):1261–74.
- Manning, Brendan D. and Alex Toker. 2017. "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." *Cell* 169(3):381–405.
- Manning, Gerard, Gregory D. Plowman, Tony Hunter, and Sucha Sudarsanam. 2002. "Evolution of Protein Kinase Signaling from Yeast to Man." *Trends in Biochemical Sciences* 27(10):514–20.

- Marmor, Mina D., Kochupurakkal Bose Skaria, and Yosef Yarden. 2004. "Signal Transduction and Oncogenesis by ErbB/HER Receptors." Pp. 903–13 in *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Vol. 58. Elsevier Inc.
- Marshall, Clement D., Michael S. Hu, Tripp Leavitt, Leandra A. Barnes, H. Peter Lorenz, and Michael T. Longaker. 2018. "Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions." *Advances in Wound Care* 7(2):29–45.
- Martinez-Ferrer, Magaly, Ali Reza Afshar-Sherif, Consolate Uwamariya, Benoit De Crombrughe, Jeffrey M. Davidson, and Neil A. Bhowmick. 2010. "Dermal Transforming Growth Factor- β Responsiveness Mediates Wound Contraction and Epithelial Closure." *American Journal of Pathology* 176(1):98–107.
- Massagué, Joan. 2000. "How Cells Read TGF-Beta Signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169–78.
- Massagué, Joan. 2012. "TGF β Signalling in Context." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(10):616–30.
- Massagué, Joan, Stacy W. Blain, and Roger S. Lo. 2000. "TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders." *Cell* 103(2):295–309.
- Mastino, Antonio, Cartesio Favalli, Sandro Grelli, Guido Rasi, Francesca Pica, Allan L. Goldstein, and Enrico Garaci. 1992. "Combination Therapy with Thymosin A1 Potentiates the Anti-tumor Activity of Interleukin-2 with Cyclophosphamide in the Treatment of the Lewis Lung Carcinoma in Mice." *International Journal of Cancer* 50(3):493–99.
- McLaughlin, Megan M., Sanjay Kumar, Peter C. McDonnell, Stephanie Van Horn, John C. Lee, George P. Livi, and Peter R. Young. 1996. "Identification of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase-Activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP P38 MAP Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 271(14):8488–92.
- McManus, Edward J., Barry J. Collins, Peter R. Ashby, Alan R. Prescott, Victoria Murray-Tait, Laura J. Armit, J. Simon C. Arthur, and Dario R. Alessi. 2004. "The in Vivo Role of PtdIns(3,4,5)P₃ Binding to PDK1 PH Domain Defined by Knockin Mutation." *The EMBO Journal* 23(10):2071–82.
- Moore, Alessandra L., Clement D. Marshall, Leandra A. Barnes, Matthew P. Murphy, Ryan C. Ransom, and Michael T. Longaker. 2018. "Scarless Wound Healing: Transitioning from Fetal Research to Regenerative Healing." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 7(2):e309.
- Mora, Alfonso, David Komander, Daan M. F. van Aalten, and Dario R. Alessi. 2004. "PDK1, the Master Regulator of AGC Kinase Signal Transduction." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15(2):161–70.
- Morris, D. C., M. Chopp, L. Zhang, M. Lu, and Z. G. Zhang. 2010. "Thymosin β 4 Improves Functional Neurological Outcome in a Rat Model of Embolic Stroke." *Neuroscience* 169(2):674–82.
- Moustakas, Aristidis and Carl Henrik Heldin. 2005. "Non-Smad TGF- β Signals." *Journal of Cell Science* 118(16):3573–84.
- Moustakas, Aristidis and Carl Henrik Heldin. 2009. "The Regulation of TGF β Signal

- Transduction." *Development* 136(22):3699–3714.
- Nagai, Takako, Megumi Kanasaki, Swayam Prakash Srivastava, Yuka Nakamura, Yasuhito Ishigaki, Munehiro Kitada, Sen Shi, Keizo Kanasaki, and Daisuke Koya. 2014. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Inhibits Diabetes-Associated Kidney Fibrosis and Endothelial-Mesenchymal Transition." *BioMed Research International* 2014.
- Nakagawa, Pablo, Yunhe Liu, Tang Dong Liao, Xiaojuan Chen, Germán E. González, Kevin R. Bobbitt, Derek Smolarek, Ed L. Peterson, Ross Kedl, Xiao Ping Yang, Nour Eddine Rhaleb, and Oscar A. Carretero. 2012. "Treatment with N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Prevents Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 303(9).
- Nakagawa, Pablo, Juan X. Masjoan-Juncos, Heba Basha, Branislava Janic, Morel E. Worou, Tang Dong Liao, Cesar A. Romero, Edward L. Peterson, and Oscar A. Carretero. 2017. "Effects of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline on Blood Pressure, Renal Damage, and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus." *Physiological Reports* 5(2).
- Nakagawa, Pablo, Cesar A. Romero, Xu Jiang, Martin D. Ambrosio, Ginette Bordcoch, Edward L. Peterson, Pamela Harding, Xiao Ping Yang, and Oscar A. Carretero. 2018. "Ac-SDKP Decreases Mortality and Cardiac Rupture after Acute Myocardial Infarction." *PLoS ONE* 13(1).
- Nakatani, Kaname, Hiroshi Sakaue, Devon A. Thompson, Ronald J. Weigel, and Richard A. Roth. 1999. "Identification of a Human Akt3 (Protein Kinase B γ) Which Contains the Regulatory Serine Phosphorylation Site." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257(3):906–10.
- Naor, Zvi, Outhiriaradjou Benard, and Rony Seger. 2000. "Activation of MAPK Cascades by G-Protein-Coupled Receptors: The Case of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11(3):91–99.
- Nie, Fang-fei, Jiang-qun Wu, and Ze-lian Qin. 2005. "[Expression of Thymosin Beta 4 mRNA Expression in Keloid Tissues and Fibroblasts Cultured from Keloid and Its Significance]." *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue = Chinese Critical Care Medicine = Zhongguo Weizhongbing Jijiuyixue* 17(2):80–83.
- Nikoloudaki, Georgia, Sarah Brooks, Alexander P. Peidl, Dylan Tinney, and Douglas W. Hamilton. 2020. "JNK Signaling as a Key Modulator of Soft Connective Tissue Physiology, Pathology, and Healing." *International Journal of Molecular Sciences* 21(3).
- Nishizuka, Y. 2003. "Discovery and Prospect of Protein Kinase C Research: Epilogue." *Journal of Biochemistry* 133(2):155–58.
- Nitta, Kyoko, Sen Shi, Takako Nagai, Megumi Kanasaki, Munehiro Kitada, Swayam Prakash Srivastava, Masakazu Haneda, Keizo Kanasaki, and Daisuke Koya. 2016. "Oral Administration of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Ameliorates Kidney Disease in Both Type 1 and Type 2 Diabetic Mice via a Therapeutic Regimen." *BioMed Research International* 2016.
- Novak, Margaret L. and Timothy J. Koh. 2013. "Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair." *American Journal of Pathology* 183(5):1352–63.

- Nurgazieva, Dinara, Amanda Mickley, Kondaiah Moganti, Wen Ming, Illya Ovsyi, Anna Popova, Sachindra, Kareem Awad, Nan Wang, Karen Bieback, Sergij Goerdts, Julia Kzhyshkowska, and Alexei Gratchev. 2015. "TGF-B1, but Not Bone Morphogenetic Proteins, Activates Smad1/5 Pathway in Primary Human Macrophages and Induces Expression of Proatherogenic Genes." *The Journal of Immunology* 194(2):709–18.
- Oates, Karen K. and Michael Erdos. 1989. "Biochemical Identification of Thymosin Alpha-1: Its Phylogenetic Distribution and Evolutionary Implications." *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And* 94(4):759–63.
- Oh, Su-Young, Ji-Hee Song, Jung-Eun Gil, Jeong-Hee Kim, Young-Il Yeom, and Eun-Yi Moon. 2006. "ERK Activation by Thymosin-Beta-4 (TB4) Overexpression Induces Paclitaxel-Resistance." *Experimental Cell Research* 312(9):1651–57.
- Olsson, Maja, Krister Järbrink, Ushashree Divakar, and Ram Bajpai. 2019. "The Humanistic and Economic Burden of Chronic Wounds : A Systematic Review." 5–7.
- Omata, Mitsugu, Hajime Taniguchi, Daisuke Koya, Keizo Kanasaki, Rumiko Sho, Yoshimi Kato, Ryoji Kojima, Masakazu Haneda, and Norio Inomata. 2006. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Ameliorates the Progression of Renal Dysfunction and Fibrosis in WKY Rats with Established Anti-Glomerular Basement Membrane Nephritis." *Journal of the American Society of Nephrology* 17(3):674–85.
- Pasparakis, Manolis, Ingo Haase, and Frank O. Nestle. 2014. "Mechanisms Regulating Skin Immunity and Inflammation." *Nature Reviews Immunology* 14(5):289–301.
- Pastar, Irena, Olivera Stojadinovic, Natalie C. Yin, Horacio Ramirez, Aron G. Nusbaum, Andrew Sawaya, Shailee B. Patel, Laiqua Khalid, Rivkah R. Isseroff, and Marjana Tomic-Canic. 2014. "Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review." *Advances in Wound Care* 3(7):445–64.
- Pei, Fei, Xiangdong Guan, and Jianfeng Wu. 2018. "Thymosin Alpha 1 Treatment for Patients with Sepsis." *Expert Opinion on Biological Therapy* 18:71–76.
- Peng, Hongmei, Oscar A. Carretero, Edward L. Peterson, and Nour-Eddine Rhaleb. 2010. "Ac-SDKP Inhibits Transforming Growth Factor- β 1-Induced Differentiation of Human Cardiac Fibroblasts into Myofibroblasts." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298(5):H1357--H1364.
- Peng, Hongmei, Oscar A. Carretero, Edward L. Peterson, Xiao Ping Yang, Kastuv Santra, and Nour Eddine Rhaleb. 2012. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Inhibits ET-1-Induced Collagen Production by Preserving Src Homology 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2 Activity in Cardiac Fibroblasts." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 464(4):415–23.
- Perez-Aso, Miguel, Aránzazu Mediero, and Bruce N. Cronstein. 2013. "Adenosine A2A Receptor (A2AR) Is a Fine-Tune Regulator of the Collagen1:Collagen3 Balance." *Purinergic Signalling* 9(4):573–83.
- Philp, Deborah, Mahnaz Badamchian, Brooke Scheremeta, Mychi Nguyen, Allan L. Goldstein, and Hynda K. Kleinman. 2003. "Thymosin B4 and a Synthetic Peptide Containing Its Actin-Binding Domain Promote Dermal Wound Repair in Db/Db Diabetic Mice and in Aged Mice." *Wound Repair and Regeneration* 11(1):19–24.
- Philp, Deborah, Thomas Huff, Yong Song Gho, Ewald Hannappel, and Hynda K. Kleinman.

2003. "The Actin Binding Site on Thymosin Beta4 Promotes Angiogenesis." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(14):2103–5.
- Philp, Deborah and Hynda K. Kleinman. 2010. "Animal Studies with Thymosin β 4, a Multifunctional Tissue Repair and Regeneration Peptide." Pp. 81–86 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1194. Blackwell Publishing Inc.
- Philp, Deborah, Mychi Nguyen, Brooke Scheremeta, Sharleen St-Surin, Ana M. Villa, Adam Orgel, Hynda K. Kleinman, and Michael Elkin. 2004. "Thymosin Beta4 Increases Hair Growth by Activation of Hair Follicle Stem Cells." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(2):385–87.
- Philp, Deborah, Brooke Scheremeta, Kedesha Sibliss, Min Zhou, Esther L. Fine, Mychi Nguyen, Larry Wahl, Matthew P. Hoffman, and Hynda K. Kleinman. 2006. "Thymosin β 4 Promotes Matrix Metalloproteinase Expression during Wound Repair." *Journal of Cellular Physiology* 208(1):195–200.
- Pica, Francesca, Roberta Gaziano, Ida Antonia Casalinuovo, Gabriella Moroni, Cristina Buè, Dolores Limongi, Cartesio D'Agostini, Carlo Tomino, Roberto Perricone, Anna Teresa Palamara, Paola Sinibaldi Vallebona, and Enrico Garaci. 2018. "Serum Thymosin Alpha 1 Levels in Normal and Pathological Conditions." *Expert Opinion on Biological Therapy* 18:13–21.
- Pokharel, Saraswati, Saman Rasoul, Anton J. M. Roks, Rick E. W. Van Leeuwen, Marja J. A. Van Luyn, Leo E. Deelman, Jos F. Smits, Oscar Carretero, Wiek H. Van Gilst, and Yigal M. Pinto. 2002. "N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro Inhibits Phosphorylation of Smad2 in Cardiac Fibroblasts." *Hypertension* 40(2):155–61.
- Ponticos, Markella, Clare Harvey, Tetsuro Ikeda, David Abraham, and George Bou-Gharios. 2009. "JunB Mediates Enhancer/Promoter Activity of COL1A2 Following TGF- β Induction." *Nucleic Acids Research* 37(16):5378–89.
- Poon, Raymond, Saeid Amini Nik, Jessica Ahn, Laura Slade, and Benjamin A. Alman. 2009. " β -Catenin and Transforming Growth Factor β Have Distinct Roles Regulating Fibroblast Cell Motility and the Induction of Collagen Lattice Contraction." *BMC Cell Biology* 10.
- Popoli, Patrizia, Rita Peponi, Alberto Martire, Monica Armida, Antonella Pèzzola, Mariangela Galluzzo, M. Rosaria Domenici, Rosa Luisa Potenza, M. Teresa Tebano, Cristiana Mollinari, Daniela Merlo, and Enrico Garaci. 2007. "Neuroprotective Effects of Thymosin B4 in Experimental Models of Excitotoxicity." Pp. 219–24 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1112. Blackwell Publishing Inc.
- Pratsinis, Harris, Lena Kikidou, Anna Grammatikaki, Stefania Santorinaïou, Evangelia Livaniou, and Dimitris Kletsas. 2018. "RESPONSES OF HUMAN SKIN FIBROBLASTS TO THYMOSINIC PEPTIDES RELATED TO WOUND REPAIR." *69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology*.
- Pratsinis, Harris, Eleni Mavrogonatou, and Dimitris Kletsas. 2017. "TGF- β in Development and Ageing." Pp. 127–48 in. Springer, Cham.
- Pratsinis, Harris, Eleni Mavrogonatou, and Dimitris Kletsas. 2019. "Scarless Wound

- Healing: From Development to Senescence." *Advanced Drug Delivery Reviews* 146:325–43.
- Qing, Chun. 2017. "The Molecular Biology in Wound Healing & Non-Healing Wound." *Chinese Journal of Traumatology - English Edition* 20(4):189–93.
- Rahimi, Rod A. and Edward B. Leof. 2007. "TGF- β Signaling: A Tale of Two Responses." *Journal of Cellular Biochemistry* 102(3):593–608.
- Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb. 2007. "Differential Regulation and Properties of MAPKs." *Oncogene* 26(22):3100–3112.
- Rane, S. G. 1999. "Ion Channels as Physiological Effectors for Growth Factor Receptor and Ras/ERK Signaling Pathways." *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 33:107–27.
- Rasoul, Saman, Oscar A. Carretero, Hongmei Peng, Maria A. Cavasin, Jialong Zhuo, Alicia Sanchez-Mendoza, David R. Brigstock, and Nour Eddine Rhaleb. 2004. "Antifibrotic Effect of Ac-SDKP and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Hypertension." *Journal of Hypertension* 22(3):593–603.
- Ray, L. B. and T. W. Sturgill. 1987. "Rapid Stimulation by Insulin of a Serine/Threonine Kinase in 3T3-L1 Adipocytes That Phosphorylates Microtubule-Associated Protein 2 in Vitro (Ribosomal Protein S6 Kinase/Phosphatase Inhibitors)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(6):1502–6.
- Ray, L. B. and T. W. Sturgill. 1988. "Insulin-Stimulated Microtubule-Associated Protein Kinase Is Phosphorylated on Tyrosine and Threonine in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(11):3753–57.
- Reinke, J. M. and H. Sorg. 2012. "Wound Repair and Regeneration." *European Surgical Research* 49(1):35–43.
- Remy, Gaëlle, Ana M. Risco, Francisco A. Iñesta-Vaquera, Bárbara González-Terán, Guadalupe Sabio, Roger J. Davis, and Ana Cuenda. 2010. "Differential Activation of P38MAPK Isoforms by MKK6 and MKK3." *Cellular Signalling* 22(4):660–67.
- Rhaleb, Nour-Eddine, Hongmei Peng, Pamela Harding, Mahmoud Tayeh, Margot C. LaPointe, and Oscar A. Carretero. 2001. "Effect of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline on DNA and Collagen Synthesis in Rat Cardiac Fibroblasts." *Hypertension* 37(3):827–32.
- Rhaleb, Nour-Eddine, Saraswati Pokharel, Umesh C. Sharma, Hongmei Peng, Edward Peterson, Pamela Harding, Xiao-Ping Yang, and Oscar A. Carretero. 2013. "N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro Inhibits Interleukin-1 β -Mediated Matrix Metalloproteinase Activation in Cardiac Fibroblasts." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465(10):1487–95.
- Rhaleb, Nour Eddine, Saraswati Pokharel, Umesh Sharma, and Oscar A. Carretero. 2011. "Renal Protective Effects of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Mice." *Journal of Hypertension* 29(2):330–38.
- Robertson, Ian B. and Daniel B. Rifkin. 2016. "Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(6).

- Rodríguez-Carballo, Eddie, Beatriz Gámez, and Francesc Ventura. 2016. "P38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4.
- Romani, Luigina, Silvia Moretti, Francesca Fallarino, Silvia Bozza, Loredana Ruggeri, Andrea Casagrande, Franco Aversa, Francesco Bistoni, Andrea Velardi, and Enrico Garaci. 2012. "Jack of All Trades: Thymosin A1 and Its Pleiotropy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1269(1):1–6.
- Romani, Luigina, Vasilis Oikonomou, Silvia Moretti, Rossana G. Iannitti, Maria Cristina D'Adamo, Valeria R. Vilella, Marilena Pariano, Luigi Sforza, Monica Borghi, Marina M. Bellet, Francesca Fallarino, Maria Teresa Pallotta, Giuseppe Servillo, Eleonora Ferrari, Paolo Puccetti, Guido Kroemer, Mauro Pessia, Luigi Maiuri, Allan L. Goldstein, and Enrico Garaci. 2017. "Thymosin A1 Represents a Potential Potent Single-Molecule-Based Therapy for Cystic Fibrosis." *Nature Medicine* 23(5):590–600.
- Rosa, A. C. and R. Fantozzi. 2013. "The Role of Histamine in Neurogenic Inflammation." *British Journal of Pharmacology* 170(1):38–45.
- Santorinaiou, Anna. 2019. "Επίδραση Θυμοσινικών Πεπτιδίων Σε Ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες in Vitro Για Τη Ρύθμιση Κυτταρικών Λειτουργιών Σχετικών Με Την Επούλωση ." *Master Thesis, Faculty of Pharmacy, NKUA*.
- Sarandeses, Concepción S., Guillermo Covelo, Cristina Díaz-Jullien, and Manuel Freire. 2003. "Prothymosin α Is Processed to Thymosin A1 and Thymosin A11 by a Lysosomal Asparaginyl Endopeptidase." *Journal of Biological Chemistry* 278(15):13286–93.
- Sarbassov, D. D. 2005. "Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex." *Science* 307(5712):1098–1101.
- Sato, Madoka, Daniel Shegogue, Elizabeth A. Gore, Edwin A. Smith, Paul J. McDermott, and Maria Trojanowska. 2002. "Role of P38 MAPK in Transforming Growth Factor β Stimulation of Collagen Production by Scleroderma and Healthy Dermal Fibroblasts." *Journal of Investigative Dermatology* 118(4):704–11.
- Saxton, Robert A. and David M. Sabatini. 2017. "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* 168(6):960–76.
- Schäfer, Matthias and Sabine Werner. 2007. "Transcriptional Control of Wound Repair." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23(1):69–92.
- Schenk, Paul W. and B. Ew. Snaar-Jagalska. 1999. "Signal Perception and Transduction: The Role of Protein Kinases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1449(1):1–24.
- Schiller, Meinhard, Delphine Javelaud, and Alain Mauviel. 2004. "TGF- β -Induced SMAD Signaling and Gene Regulation: Consequences for Extracellular Matrix Remodeling and Wound Healing." *Journal of Dermatological Science* 35(2):83–92.
- Schnabl, B. 2001. "The Role of Smad3 in Mediating Mouse Hepatic Stellate Cell Activation." *Hepatology* 34(1):89–100.
- Schulof, Richard S. n.d. "THYMIC PEPTIDE HORMONES: BASIC PROPERTIES AND CLINICAL

APPLICATIONS IN CANCER.” 3(4).

- Seger, Rony and Edwin G. Krebs. 1995. “The MAPK Signaling Cascade.” *The FASEB Journal* 9(9):726–35.
- Sen, Chandan K. 2019. “Human Wounds and Its Burden : An Updated Compendium of Estimates.” 8(2):39–48.
- Shaul, Yoav D., Gilad Gibor, Alexander Plotnikov, and Rony Seger. 2009. “Specific Phosphorylation and Activation of ERK1c by MEK1b: A Unique Route in the ERK Cascade.” *Genes and Development* 23(15):1779–90.
- Sheikholeslam, Mohammadali, Meghan E. E. Wright, Marc G. Jeschke, and Saeid Amini-Nik. 2018. “Biomaterials for Skin Substitutes.” *Advanced Healthcare Materials* 7(5).
- Shi, Hongxue, Yi Cheng, Jingjing Ye, Pingtao Cai, Jinjing Zhang, Rui Li, Ying Yang, Zhouguang Wang, Hongyu Zhang, Cai Lin, Xianghong Lu, Liping Jiang, Aiping Hu, Xinbo Zhu, Qiqiang Zeng, Xiaobing Fu, Xiaokun Li, and Jian Xiao. 2015. “BFGF Promotes the Migration of Human Dermal Fibroblasts under Diabetic Conditions through Reactive Oxygen Species Production via the PI3K/Akt-Rac1- JNK Pathways.” *International Journal of Biological Sciences* 11(7):845–59.
- Shi, Hongxue, Beibei Lin, Yan Huang, Jiang Wu, Hongyu Zhang, Cai Lin, Zhouguang Wang, Jingjing Zhu, Yingzhen Zhao, Xiaobing Fu, Zhencai Lou, Xiaokun Li, and Jian Xiao. 2016. “Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Melanocyte Migration via Activating PI3K/Akt-Rac1-FAK-JNK and ERK Signaling Pathways.” *IUBMB Life* 68(9):735–47.
- Shi, Yingying, Mingxia Zhou, Junkai Yan, Zizhen Gong, Jin Wu, Yuanwen Chen, and Yingwei Chen. 2020. “N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Mitigates Experimental Colitis Through Inhibition of Intestinal Mucosal Inflammatory Responses via MEK-ERK Signaling.” *Frontiers in Pharmacology* 11:593.
- Shi, Yufang, Ying Wang, Changshun Shao, Jianan Huang, Jianhe Gan, Xiaoping Huang, Enrico Bucci, Mauro Piacentini, Giuseppe Ippolito, and Gerry Melino. 2020. “COVID-19 Infection: The Perspectives on Immune Responses.” *Cell Death and Differentiation* 27(5):1451–54.
- Shibuya, Kazuyuki, Keizo Kanasaki, Motohide Isono, Haruhisa Sato, Mitsugu Omata, Toshiro Sugimoto, Shin Ichi Araki, Keiji Isshiki, Atsunori Kashiwagi, Masakazu Haneda, and Daisuke Koya. 2005. “N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Prevents Renal Insufficiency and Mesangial Matrix Expansion in Diabetic Db/Db Mice.” *Diabetes* 54(3):838–45.
- Singer, Adam J. and Richard A. F. Clark. 1999. “Cutaneous Wound Healing.” *New England Journal of Medicine* 341(10):738–46.
- Smart, Nicola, Sveva Bollini, Karina N. Dubé, Joaquim M. Vieira, Bin Zhou, Sean Davidson, Derek Yellon, Johannes Riegler, Anthony N. Price, Mark F. Lythgoe, William T. Pu, and Paul R. Riley. 2011. “De Novo Cardiomyocytes from within the Activated Adult Heart after Injury.” *Nature* 474(7353):640–44.
- Smart, Nicola, Catherine A. Risebro, Athalie A. D. Melville, Kelvin Moses, Robert J. Schwartz, Kenneth R. Chien, and Paul R. Riley. 2007. “Thymosin β_4 Induces Adult Epicardial Progenitor Mobilization and Neovascularization.” *Nature*

445(7124):177–82.

- So, Karen, Duncan A. McGrouther, James A. Bush, Piyush Durani, Lisa Taylor, Gaynor Skotny, Tracey Mason, Anthony Metcalfe, Sharon O’Kane, and Mark W. J. Ferguson. 2011. “Avotermin for Scar Improvement Following Scar Revision Surgery: A Randomized, Double-Blind, Within-Patient, Placebo-Controlled, Phase II Clinical Trial.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 128(1):163–72.
- Sodhi, Ajit and Saki Paul. 2002. “Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Signal Transduction Pathway of Bone Marrow-Derived Macrophage Activation in Response to in Vitro Treatment with Thymosin Alpha 1.” *International Immunopharmacology* 2(1):47–58.
- Sopko, Nikolai, Yilu Qin, Amanda Finan, Alisher Dadabayev, Sravanthi Chigurupati, Jun Qin, Marc S. Penn, and Sudhiranjan Gupta. 2011. “Significance of Thymosin β 4 and Implication of PINCH-1-ILK- α -Parvin (PIP) Complex in Human Dilated Cardiomyopathy.” *PLoS ONE* 6(5).
- Sorrentino, Simona, Jan Dirk Studt, Ohad Medalia, and K. Tanuj Sapra. 2015. “Roll, Adhere, Spread and Contract: Structural Mechanics of Platelet Function.” *European Journal of Cell Biology* 94(3–4):129–38.
- Sosne, Gabriel, Patricia L. Christopherson, Ronald P. Barrett, and Rafael Fridman. 2005. “Thymosin-B4 Modulates Corneal Matrix Metalloproteinase Levels and Polymorphonuclear Cell Infiltration after Alkali Injury.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46(7):2388–95.
- Sosne, Gabriel, Ping Qiu, Patricia L. Christopherson, and Michelle Kurpakus Wheeler. 2007. “Thymosin Beta 4 Suppression of Corneal NF κ B: A Potential Anti-Inflammatory Pathway.” *Experimental Eye Research* 84(4):663–69.
- Sosne, Gabriel, Ping Qiu, Allan L. Goldstein, and Michelle Wheeler. 2010. “Biological Activities of Thymosin β 4 Defined by Active Sites in Short Peptide Sequences.” *The FASEB Journal* 24(7):2144–51.
- Sosne, Gabriel, Elizabeth A. Szliter, Ronald Barrett, Karen A. Kernacki, Hynda Kleinman, and Linda D. Hazlett. 2002. “Thymosin Beta 4 Promotes Corneal Wound Healing and Decreases Inflammation in Vivo Following Alkali Injury.” *Experimental Eye Research* 74(2):293–99.
- Sosne, Gabriel, Lihua Xu, Lisa Prach, Linda K. Mrock, Hynda K. Kleinman, John J. Letterio, Linda D. Hazlett, and Michelle Kurpakus-Wheeler. 2004. “Thymosin Beta 4 Stimulates Laminin-5 Production Independent of TGF-Beta.” *Experimental Cell Research* 293(1):175–83.
- Staal, S. P. 1987. “Molecular Cloning of the Akt Oncogene and Its Human Homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a Primary Human Gastric Adenocarcinoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(14):5034–37.
- Stephens, L. R., K. T. Hughes, and R. F. Irvine. 1991. “Pathway of Phosphatidylinositol(3,4,5)-Trisphosphate Synthesis in Activated Neutrophils.” *Nature* 351(6321):33–39.
- Stokoe, D., B. Caudwell, P. T. W. Cohen, and P. Cohen. 1993. “The Substrate Specificity

- and Structure of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase-Activated Protein Kinase-2." *Biochemical Journal* 296(3):843–49.
- Strange, Kevin, Jerod Denton, and Keith Nehrke. 2006. "Ste20-Type Kinases: Evolutionarily Conserved Regulators of Ion Transport and Cell Volume." *Physiology* 21(1):61–68.
- Sundaresan, N. R., V. B. Pillai, D. Wolfgeher, S. Samant, P. Vasudevan, V. Parekh, H. Raghuraman, J. M. Cunningham, M. Gupta, and M. P. Gupta. 2011. "The Deacetylase SIRT1 Promotes Membrane Localization and Activation of Akt and PDK1 During Tumorigenesis and Cardiac Hypertrophy." *Science Signaling* 4(182):ra46–ra46.
- Suto, Mari, Hirofumi Masutomi, Katsuyuki Ishihara, and Hitoshi Masaki. 2019. "A Potato Peel Extract Stimulates Type I Collagen Synthesis via Akt and ERK Signaling in Normal Human Dermal Fibroblasts." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 42(9):1510–16.
- Takehara, Kazuhiko. 2000. "Growth Regulation of Skin Fibroblasts." *Journal of Dermatological Science* 24(SUPPL. 1).
- Tan, Hechang, Jijun Zhao, Shuang Wang, Lili Zhang, Hongyue Wang, Bin Huang, Yingjie Liang, Xueqing Yu, and Niansheng Yang. 2012. "Ac-SDKP Ameliorates the Progression of Lupus Nephritis in MRL/Lpr Mice." *International Immunopharmacology* 14(4):401–9.
- Thomas, Susan N., Nathan A. Rohner, and Erin E. Edwards. 2016. "Implications of Lymphatic Transport to Lymph Nodes in Immunity and Immunotherapy." *Annual Review of Biomedical Engineering* 18:207–33.
- Ti, Dongdong, Haojie Hao, Lei Xia, Chuan Tong, Jiejie Liu, Liang Dong, Shenjun Xu, Yali Zhao, Huiling Liu, Xiaobing Fu, and Weidong Han. 2015. "Controlled Release of Thymosin Beta 4 Using a Collagen-Chitosan Sponge Scaffold Augments Cutaneous Wound Healing and Increases Angiogenesis in Diabetic Rats with Hindlimb Ischemia." *Tissue Engineering - Part A* 21(3–4):541–49.
- Toyoshima, Fumiko, Tetsuo Moriguchi, and Eisuke Nishida. 1997. "Fas Induces Cytoplasmic Apoptotic Responses and Activation of the MKK7- JNK/SAPK and MKK6-P38 Pathways Independent of CPP32-like Proteases." *Journal of Cell Biology* 139(4):1005–15.
- Tracy, Lauren E., Raquel A. Minasian, and E. J. Caterson. 2016. "Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound." *Advances in Wound Care* 5(3):119–36.
- Treadwell, Terry, Hynda K. Kleinman, David Crockford, Mark A. Hardy, Giorgio T. Guarnera, and Allan L. Goldstein. 2012. "The Regenerative Peptide Thymosin B4 Accelerates the Rate of Dermal Healing in Preclinical Animal Models and in Patients." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1270(1):37–44.
- Trent, Jennifer T. and Robert S. Kirsner. 2003. "Wounds and Malignancy." *Advances in Skin & Wound Care* 16(1):31–34.
- Tsuji-Naito, Kentaro, Seiko Ishikura, Mitsugu Akagawa, and Hiroshi Saeki. 2010. "α-Lipoic Acid Induces Collagen Biosynthesis Involving Prolyl Hydroxylase Expression via

- Activation of TGF- β -Smad Signaling in Human Dermal Fibroblasts." *Connective Tissue Research* 51(5):378–87.
- Vandromme, Marie, Anne Rochat, Roger Meier, Gilles Carnac, Daniel Besser, Brian A. Hemmings, Anne Fernandez, and Ned J. C. Lamb. 2001. "Protein Kinase B β /Akt2 Plays a Specific Role in Muscle Differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 276(11):8173–79.
- Vaughan, Melville B., Eric W. Howard, and James J. Tomasek. 2000. "Transforming Growth Factor-B1 Promotes the Morphological and Functional Differentiation of the Myofibroblast." *Experimental Cell Research* 257(1):180–89.
- Velnar, Tomaz, T. Bailey, and V. Smrkolj. 2009. "The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms." *Journal of International Medical Research* 37(5):1528–42.
- Verrecchia, Franck, Charlotte Tacheau, Erwin F. Wagner, and Alain Mauviel. 2003. "A Central Role for the JNK Pathway in Mediating the Antagonistic Activity of Pro-Inflammatory Cytokines against Transforming Growth Factor- β -Driven SMAD3/4-Specific Gene Expression." *Journal of Biological Chemistry* 278(3):1585–93.
- van der Vos, Kristan E. and Paul J. Coffey. 2011. "The Extending Network of FOXO Transcriptional Target Genes." *Antioxidants & Redox Signaling* 14(4):579–92.
- Wang, Dahai, Oscar A. Carretero, Xiao Yi Yang, Nour Eddine Rhaleb, Yun He Liu, Tang Dong Liao, and Xiao Ping Yang. 2004. "N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Stimulates Angiogenesis in Vitro and in Vivo." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287(5 56-5).
- Wang, S. S., R. Makofske, A. Bach, and R. B. Merrifield. 1980. "AUTOMATED SOLID PHASE SYNTHESIS OF THYMOSIN A1." *International Journal of Peptide and Protein Research* 15(1):1–4.
- Webb, Ashley E. and Anne Brunet. 2014. "FOXO Transcription Factors: Key Regulators of Cellular Quality Control." *Trends in Biochemical Sciences* 39(4):159–69.
- Wei, Chuanyu, Il Kwon Kim, Li Li, Liling Wu, and Sudhiranjan Gupta. 2014. "Thymosin Beta 4 Protects Mice from Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy." *PLoS ONE* 9(11).
- Wei, Chuanyu, Sandeep Kumar, Il Kwon Kim, and Sudhiranjan Gupta. 2012. "Thymosin Beta 4 Protects Cardiomyocytes from Oxidative Stress by Targeting Anti-Oxidative Enzymes and Anti-Apoptotic Genes." *PLoS ONE* 7(8).
- Wellbrock, Claudia, Maria Karasarides, and Richard Marais. 2004. "The RAF Proteins Take Centre Stage." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(11):875–85.
- Worou, Morel, M. D'Ambrosio, T-D Liao, P. Nakagawa, E. Peterson, B. Janic, N-E Rhaleb, and Oscar Carretero. n.d. "Renoprotective Effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) in Dahl Salt-Sensitive Rats." *The FASEB Journal* 29.
- Wynn, T. A. 2008. "Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis." *Journal of Pathology* 214(2):199–210.
- Wynn, Thomas A. and Kevin M. Vannella. 2016. "Macrophages in Tissue Repair,

- Regeneration, and Fibrosis." *Immunity* 44(3):450–62.
- Xiang, Xiao Song, Ning Li, Yun Zhao Zhao, Qiu Rong Li, and Jie Shou Li. 2014. "Combination Therapy with Thymosin Alpha1 and Dexamethasone Helps Mice Survive Sepsis." *Inflammation* 37(2):402–16.
- Xin, Cuiyan, Shuyu Ren, Burkhardt Kleuser, Soheyla Shabahang, Wolfgang Eberhardt, Heinfried Radeke, Monika Schäfer-Korting, Josef Pfeilschifter, and Andrea Huwiler. 2004. "Sphingosine 1-Phosphate Cross-Activates the Smad Signaling Cascade and Mimics Transforming Growth Factor- β -Induced Cell Responses." *Journal of Biological Chemistry* 279(34):35255–62.
- Xiong, Ye, Asim Mahmood, Yuling Meng, Yanlu Zhang, Zheng Gang Zhang, Daniel C. Morris, and Michael Chopp. 2011. "Treatment of Traumatic Brain Injury with Thymosin B4 in Rats: Laboratory Investigation." *Journal of Neurosurgery* 114(1):102–15.
- Xu, Bo, Mowen Yang, Zhaozhu Li, Yubo Zhang, Zhitao Jiang, Shengyang Guan, and Dapeng Jiang. 2013. "Regulatory Peptides Thymosin β 4 Enhances the Healing of Medial Collateral Ligament Injury in Rat." 184:1–5.
- Xu, Hong, Fang Yang, Ying Sun, Yuan Yuan, Hua Cheng, Zhongqiu Wei, Shuyu Li, Tan Cheng, Darrell Brann, and Ruimin Wang. 2012. "A New Antifibrotic Target of Ac-SDKP: Inhibition of Myofibroblast Differentiation in Rat Lung with Silicosis." *PLoS ONE* 7(7).
- Xu, Tian Jiao, Qi Wang, Xiao Wen Ma, Zhen Zhang, Wei Zhang, Xiao Chang Xue, Cun Zhang, Qiang Hao, Wei Na Li, Ying Qi Zhang, and Meng Li. 2013. "A Novel Dimeric Thymosin Beta 4 with Enhanced Activities Accelerates the Rate of Wound Healing." *Drug Design, Development and Therapy* 7:1075–88.
- Xue, Meilang and Christopher J. Jackson. 2015. "Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring." *Advances in Wound Care* 4(3):119–36.
- Yang, Fang, Xiao Ping Yang, Yun He Liu, Jiang Xu, Oscar Cingolani, Nour Eddine Rhaleb, and Oscar A. Carretero. 2004. "Ac-SDKP Reverses Inflammation and Fibrosis in Rats with Heart Failure after Myocardial Infarction." *Hypertension* 43(2 Pt 2):229–36.
- Yang, Jing, Peter Cron, Valerie M. Good, Vivienne Thompson, Brian A. Hemmings, and David Barford. 2002. "Crystal Structure of an Activated Akt/Protein Kinase B Ternary Complex with GSK3-Peptide and AMP-PNP." *Nature Structural Biology* 9(12):940–44.
- Yao, William, Meredith Frie, Jeffrey Pan, Kwang Pak, Nicholas Webster, Stephen I. Wasserman, and Allen F. Ryan. 2014. "C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Isoforms Play Differing Roles in Otitis Media." *BMC Immunology* 15(1).
- Yates, Cecelia C., Richard Bodnar, and Alan Wells. 2011. "Matrix Control of Scarring." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(11):1871–81.
- You, Jing, Lin Zhuang, Hong Ying Cheng, Shou Ming Yan, Lan Yu, Jun Hua Huang, Bao Zhang Tang, Meng Ling Huang, Yong Liang Ma, Virasakdi Chongsuvivatwong, Hutcha Scriplung, Alan Geater, Yao Wei Qiao, and Rong Xue Wu. 2006. "Efficacy of Thymosin Alpha-1 and Interferon Alpha in Treatment of Chronic Viral Hepatitis B: A

- Randomized Controlled Study." *World Journal of Gastroenterology* 12(41):6715–21.
- Zakowski, Vera, Georgios Keramas, Karin Kilian, Ulf R. Rapp, and Stephan Ludwig. 2004. "Mitogen-Activated 3p Kinase Is Active in the Nucleus." *Experimental Cell Research* 299(1):101–9.
- Zeke, András, Mariya Misheva, Attila Reményi, and Marie A. Bogoyevitch. 2016. "JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3):793–835.
- Zhang, Jianfeng, Junfeng Wu, Weichen Zeng, Kai Yao, Hengbing Zu, and Yongfei Zhao. 2016. "Function of Thymosin Beta-4 in Ethanol-Induced Microglial Activation." *Cellular Physiology and Biochemistry* 38(6):2230–38.
- Zhang, Lijuan, Fang Yang, Qian Li, Xiaoming Zhang, and Ruimin Wang. 2011. "AcSDKP Inhibits the Proliferation and Collagen Expression of Cardiac Fibroblasts Induced by PDGF through Blocking the ERK1/2 and JNK Pathway Activation." *Proceedings 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, HHBE 2011* (5):916–19.
- Zhang, Yanlu, Zheng Gang Zhang, Michael Chopp, Yuling Meng, Li Zhang, Asim Mahmood, and Ye Xiong. 2017. "Treatment of Traumatic Brain Injury in Rats with N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline." *Journal of Neurosurgery* 126(3):782–95.
- Zhang, Yiguo, Shuping Zhong, Ziming Dong, Nanyue Chen, Ann M. Bode, Wei Ya Ma, and Zigang Dong. 2001. "UVA Induces Ser381 Phosphorylation of P90 RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 276(18):14572–80.
- Zhang, Ying E. 2017. "Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9(2):a022129.
- Zhang, Yuqing, Louis W. Feurino, Qihui Zhai, Hao Wang, William E. Fisher, Changyi Chen, Qizhi Yao, and Min Li. 2008. "Thymosin Beta 4 Is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer Cells and Stimulates Proinflammatory Cytokine Secretion and JNK Activation." *Cancer Biology & Therapy* 7(3):419–23.
- Zhiming, Deng, Zhao Xibin, Jianghong Zheng, Deng Chenliang, Ding Zhi, Mao Guangyu, Wang Huidong, and Yang Songlin. 2009. "Effects of AcSDKP on TGF-B1 Expression in Human Dermal Fibroblasts." *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery* 5(4):195.
- Zhou, Bin, Leah B. Honor, Qing Ma, Jin-Hee Oh, Ruei-Zeng Lin, Juan M. Melero-Martin, Alexander von Gise, Pingzhu Zhou, Tianyuan Hu, Lingjuan He, Kai Hong Wu, Hui Zhang, Yuebo Zhang, and William T. Pu. 2012. "Thymosin Beta 4 Treatment after Myocardial Infarction Does Not Reprogram Epicardial Cells into Cardiomyocytes." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52(1):43–47.
- Zhu, Liping, Xiao-Ping Yang, Branislava Janic, Nour-Eddine Rhaleb, Pamela Harding, Pablo Nakagawa, Edward L. Peterson, and Oscar A. Carretero. 2016. "Ac-SDKP Suppresses TNF- α -Induced ICAM-1 Expression in Endothelial Cells via Inhibition of I κ B Kinase and NF-KB Activation." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 310(9):H1176–83.
- Zolnierowicz, Stanislaw and Mathieu Bollen. 2000. "Protein Phosphorylation and Protein

Phosphatases De Panne, Belgium, September 19–24, 1999.” *The EMBO Journal* 19(4):483–88.

Zomer, Helena D. and Andrea G. Trentin. 2018. “Skin Wound Healing in Humans and Mice: Challenges in Translational Research.” *Journal of Dermatological Science* 90(1):3–12.

Zuo, Yiqin, Bongkwon Chun, Sebastian A. Potthoff, Naj Kazi, Tyler J. Brolin, Diclehan Orhan, Hai-chun Yang, Li-jun Ma, Valentina Kon, Timo Myöhänen, Nour-eddine Rhaleb, Oscar A. Carretero, and Agnes B. Fogo. 2013. “Thymosin B4 and Its Degradation Product, Ac-SDKP, Are Novel Reparative Factors in Renal Fibrosis.” *Kidney International* 84(6):1166–75.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Διαφορές στη δομή του δέρματος και στην ίαση των πληγών σε ανθρώπους και σε μύες. Σύνοψη μορφολειτουργικών, ανοσολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών στην ίαση του δέρματος και των πληγών σε ανθρώπους και σε μύες .

Περιγραφή (Χαρακτηριστικά)	Άνθρωποι	Μύες	Συνέπειες
-------------------------------	----------	------	-----------

Μορφο-λειτουργικές διαφορές

Πάχος δέρματος	< 100 μm	> 25 μm	Επίδραση στη βιο-μηχανική
Επιδερμικά στρώματα	5 - 10	2 -3	Επίδραση στη διαδερμική απορρόφηση
Προσκόλληση στους υποκείμενους ιστούς	Ναι	Όχι	Επίδραση στη βιο-μηχανική
<i>ranniculus carnosus</i>	Σχεδόν απόν	Παρόν	Ενισχυμένη συστολή
Κλείσιμο πληγών	Σχηματισμός κοκκιώδους ιστού	Κυρίως με συστολή	Προσοχή στην ανάλυση των αποτελεσμάτων
Επιδερμικές κορυφογραμμές	Παρούσες	Απούσες	Άγνωστες
Ελαστικές ίνες	Απούσες στις ουλές	Παρούσες στις ουλές	Ελαστικότητα ιστών
Τριχοθυλάκια	Εξαρτάται από τη θέση , κυρίως αραιά	Υψηλή πυκνότητα	Επίδραση των βλαστοκυττάρων των τριχοθυλακίων στην αποκατάσταση πληγών
Επιδερμικά βλαστοκύτταρα	Ασαφές	Πρόδρομα στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας και μη διαφοροποιημένα	Επίδραση των επιδερμικών τριχοθυλακίων στην αποκατάσταση πληγών

		βλαστοκύτταρα κοντά στα τριχοθυλάκια	
Ιδρωτοποιοί αδένες	+	-	Επίδραση των βλαστοκυττάρων των ιδρωτοποιών αδένων στην αποκατάσταση πληγών

- **Ανοσολογικές διαφορές**

Περιφερικά λευκοκύτταρα	50 – 70% ουδετερόφιλα και 30 – 50% λεμφοκύτταρα	10 – 25% ουδετερόφιλα και 75 – 90% λεμφοκύτταρα	Ασαφείς
F4/80 γλυκοπρωτεΐνη προσκόλλησης	Δείκτης ηωσινόφιλων	Δείκτης μακροφάγων	Προσοχή στην ανίχνευση φλεγμονής
Υποδοχέας μαννόσης μακροφάγων	Δερματικοί ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα	M2 μακροφάγοι	Προσοχή στην ανίχνευση φλεγμονής
γδ DETCs	-	+	Νεογένεση τριχοθυλακίων
Ντιφενσίνες των ουδετερόφιλων	-	+	Επίδραση στην είσοδο παθογόνων και διέγερση κερατινοκυττάρων
Απόκριση στην IL- 1	Παραγωγή IL-8	Χημειοκίνη προερχόμενη από κερατινοκύτταρα	Προσοχή στην ανάλυση των αποτελεσμάτων
IL-8	+	-	Επίδραση στην επανεπιθηλίωση, την αναδιαμόρφωση των ιστών και την αγγειογένεση
CXCL-7	+	-	Επίδραση στην επανεπιθηλίωση, την

			αναδιαμόρφωση των ιστών και την αγγειογένεση
CXCL-11	+	-	Επίδραση στην επανεπιθηλίωση, την αναδιαμόρφωση των ιστών και την αγγειογένεση
Χημειοτακτικός παράγοντας μονοκύτταρων	+	-	Επίδραση στην επανεπιθηλίωση, την αναδιαμόρφωση των ιστών και την αγγειογένεση
CCL-13	+	-	Άγνωστες
CCL-14	+	-	Άγνωστες
CCL-15	+	-	Άγνωστες
CCL-18	+	-	Άγνωστες
CCL-6	-	+	Άγνωστες
CCL-9	-	+	Άγνωστες
CXCL-15	-	+	Άγνωστες
CXCL-14	-	+	Άγνωστες
CCL-12	-	+	Άγνωστες

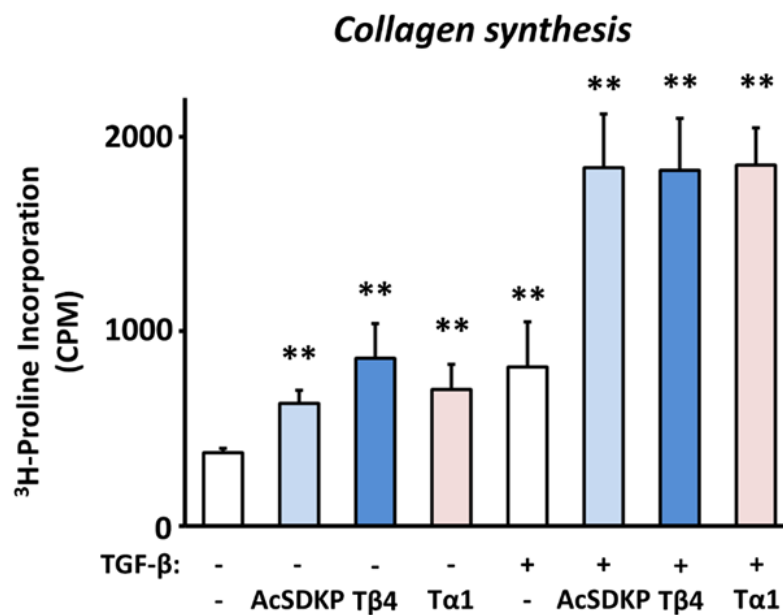
- Γενετικές διαφορές

WNT-4	Εκφράζεται	Δεν εκφράζεται	Επίδραση στις επιθηλιακές μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις
WNT-16	Εκφράζεται	Δεν εκφράζεται	Επίδραση στην κερατινοκυτταρική διαφοροποίηση
EGFR	Εκφράζεται	Δεν εκφράζεται	Επίδραση στην ομοίωση, τη φλεγμονώδη και αντιμικροβιακή απόκριση και τη λειτουργία του φραγμού

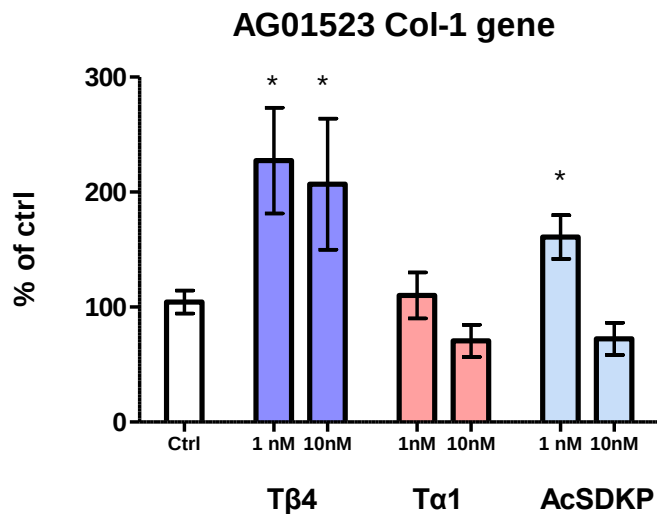
Δερμικιδίνη	Εκφράζεται	Δεν εκφράζεται	Επίδραση στην άμυνα έναντι παθογόνων
IL-37	Εκφράζεται	Δεν εκφράζεται	Επίδραση στην άμυνα έναντι παθογόνων
Γονίδια skint	Δεν εκφράζεται	Εκφράζεται	Παρουσία των γδ DECTs στο δέρμα των μυών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

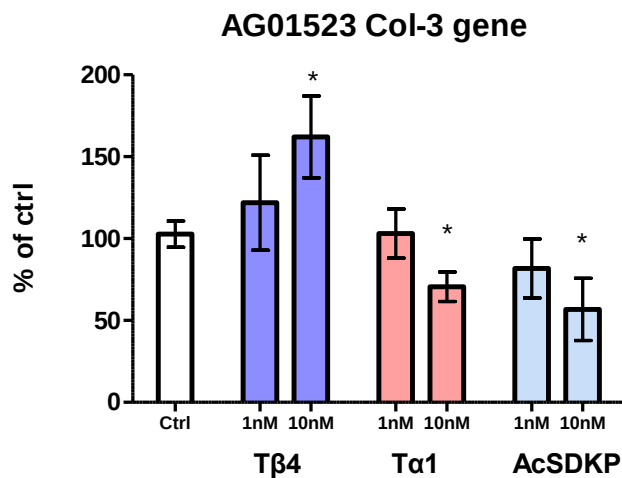
Σημαντικά Προηγούμενα Αποτελέσματα Εργαστηρίου
Κυτταρικής Γήρανσης και Πολλαπλασιασμού (ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ)



Εικόνα 56: Διάγραμμα ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης στο υπερκείμενο καλλιιεργειών ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών AG01523 υπό την επίδραση θυμοσινικών πεπτιδίων (1nM) ή/και TGF-β (5 ng/ml) με τη μέθοδο της ελεύθερης πρωτεασών κολλαγενάσης (Pratsinis et al. 2018).

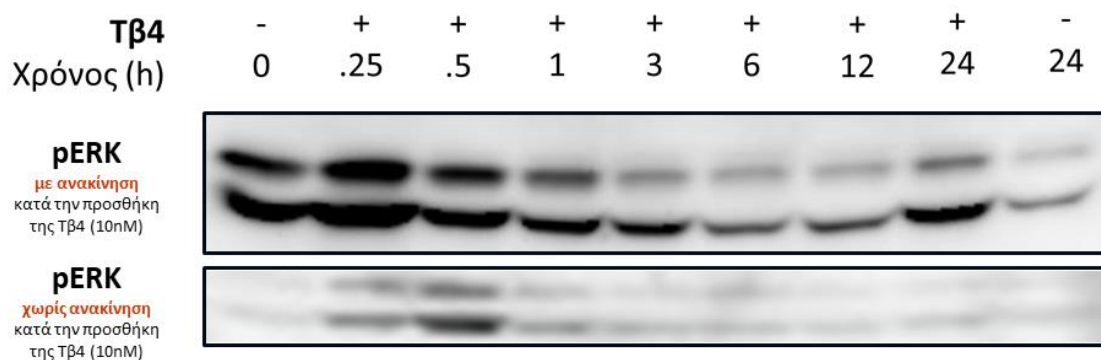


Εικόνα 57: Μελέτη της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 & AcSDKP σε συγκέντρωση 1nM & 10nM στη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Col1α1 μέσω qRT-PCR. Παραρηρείται η διεγερτική δράση της Tβ4 (1 nM & 10nM) και του Ac-SDKP (1nM) (Pratsinis et al. 2018; Santorinaiou 2019).



Εικόνα 58: Μελέτη της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 & AcSDKP σε συγκέντρωση 1nM & 10nM στη μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου Col3α1 μέσω qRT-PCR. Ανασταλτική δράση της Tα1 & του AcSDKP (10nM). Διέγερση σύνθεσης μεταγράφου απο την Tβ4. (1nM & 10nM) (Pratsinis et al. 2018; Santorinaiou et al. 2019).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



Εικόνα 59: Παρουσίαση στυπώματος Western επανάληψης πειράματος με διαφορετικό χειρισμό κατά την προσθήκη της θυμοσίνης β4 στο εθισμένο μέσο καλλιιεργειών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG 01523. Στο πείραμα όπου η προσθήκη του πεπτιδίου έγινε με έντονη ανάδευση, παρατηρούμε ισχυρή ενεργοποίηση της ERK στον αρνητικό μάρτυρα (0h) αλλά και στα επόμενα χρονικά σημεία, η οποία φθίνει με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα με την προσθήκη χωρίς ανακίνηση, η ενεργοποίηση της ERK στους αρνητικούς μάρτυρες φαίνεται αμελητέα, ενώ η πιο έντονη ενεργοποίηση παρατηρείται στο χρονικό σημείο 0.5h.