

# Καββαδάς Παναγιώτης

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

**Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής, Φυσιολογία Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιολογική Χημεία Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Χαρώνης Αριστείδης:** Ερευνητής Β', Ιστολογία, Τομέας Ιστολογίας, ΙΙΒΕΑΑ

### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής, Φυσιολογία Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Σταθόπουλος Κωνσταντίνος:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιολογική Χημεία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

**Χαρώνης Αριστείδης:** Ερευνητής Β', Τομέας Ιστολογίας, ΙΙΒΕΑΑ

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μαμούρης Ζήσης:** Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος:** Καθηγητής, Πνευμολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δανιήλ Ζωή:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Πνευμολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ίνωση είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή και τη μειωμένη αποικοδόμηση συστατικών του

εξωκυττάριου στρώματος, κυρίως κολλαγόνου. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου, και επομένως έχουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της ινωγένεσης, είναι οι μυοϊνοβλάστες. Από άποψη μοριακού μηχανισμού, η ίνωση παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το μηχανισμό επούλωσης τραυμάτων. Ο μηχανισμός επούλωσης περιλαμβάνει μια αρχική φάση φλεγμονής, μια φάση πολλαπλασιασμού των μυοϊνοβλαστών και αύξησης της παραγωγής κολλαγόνου και τέλος την αναγέννηση του ιστού που συνοδεύεται από την απόπτωση των μυοϊνοβλαστών και την αποικοδόμηση της περίσσειας του κολλαγόνου. Στην ίνωση, οι μυοϊνοβλάστες παραμένουν ενεργοί και η παραγωγή κολλαγόνου συνεχίζεται με αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής και τελικά την απώλεια της λειτουργικότητας του ιστού.

Ίνωση μπορεί πρακτικά να εκδηλωθεί σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Κατά συνέπεια, αν και υπάρχουν ινωτικοί μηχανισμοί που είναι κοινοί για όλους τους ιστούς, υπάρχουν ταυτόχρονα σημαντικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν ιστοεξειδίκευση. Τα τελευταία χρόνια, η προέλευση των μυοϊνοβλαστών είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που έχει αρχίσει να θεωρείται ότι παρουσιάζει ιστοεξειδίκευση αφού πιθανές πηγές των μυοϊνοβλαστών έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να είναι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί όπως το επιθήλιο, το ενδοθήλιο, κύτταρα του μυελού των οστών, προϋπάρχοντες ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, λιποαποταμιευτικά κύτταρα κλπ.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην ίνωση του πνευμονικού ιστού αφού η ίνωση του πνεύμονα αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών, των νόσων του διάμεσου πνευμονικού χώρου. Η συνηθέστερη από τις ασθένειες αυτές είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση για την οποία δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ενώ και οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την εκδήλωση και την εξέλιξη της νόσου παραμένουν άγνωστοι. Στα άγνωστα στοιχεία σχετικά με την πνευμονική ίνωση συμπεριλαμβάνεται και η προέλευση των ινοβλαστών αφού μέχρι στιγμής υπάρχουν αλληλοσυγκρουόμενα στοιχεία που εμπλέκουν, σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, διάφορες πηγές όπως το επιθήλιο, το ενδοθήλιο, τους ήδη υπάρχοντες ινοβλάστες καθώς και κύτταρα από το μυελό των οστών. Ο ακριβής προσδιορισμός της πηγής ή του ποσοστού συμμετοχής της κάθε πηγής των

μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου.

Η ιντεγκρινοσυνδεόμενη κινάση (integrin-linked kinase, ILK) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, λόγω της αλληλεπίδρασής της με το κυτταροπλασματικό τμήμα των  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ -υπομονάδων των ιντεγκρινών, η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση λειτουργιών όπως η κίνηση, η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, η αντοχή στις μηχανικές πιέσεις και η διατήρηση της συνοχής του ιστού. Παράλληλα, έχει προταθεί ότι η ILK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (Akt) καθώς και ότι φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 $\beta$  κάτι που σημαίνει ότι, έστω και έμμεσα, η ILK εμπλέκεται στη ρύθμιση και άλλων κυτταρικών λειτουργιών όπως η απόπτωση και η αγγειογένεση.

Στην ίνωση, η ILK έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα νεφρά και σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ. Και στις δύο περιπτώσεις εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την παραγωγή μυοϊνοβλαστών. Στη νεφρική ίνωση, η ILK μεσολαβεί, σε απόκριση στον TGF- $\beta$ , την έναρξη της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT), μιας διαδικασίας μέσω της οποίας επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες. Στην ηπατική ίνωση, μεσολαβεί μια παρόμοια διαδικασία μέσω της οποίας λιποαποταμιευτικά κύτταρα μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες. Στην πνευμονική ίνωση, ο ρόλος της ILK δεν είχε μελετηθεί μέχρι τώρα.

Για να μελετήσουμε το ρόλο της ILK στην πνευμονική ίνωση διεξάγαμε τόσο μια *in vitro* όσο και μια *in vivo* προσέγγιση. Για την *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα της σειράς A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο TGF- $\beta$  ώστε να επαχθούν ινωτικά χαρακτηριστικά και EMT. Αρχικά, δείξαμε ότι η ILK αυξάνεται σε απόκριση στον TGF- $\beta$  μέσω ενός smad-εξαρτώμενου μηχανισμού. Ακολούθως, για να προσδιορίσουμε το ρόλο της ILK στο κυψελιδικό EMT χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του siRNA. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, σε αντίθεση με τη

νεφρική ίνωση, η ILK δεν εμπλέκεται στην έναρξη του EMT αλλά σε μεταγενέστερα στάδια όπως αυτό της έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών και πιθανώς σε αυτό της κυτταρικής μετανάστευσης. Παράλληλα, με την τεχνική του siRNA μελετήσαμε και το κατά πόσο η ILK εμπλέκεται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ILK εμπλέκεται στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, στην επέκταση των επιθηλιακών κυττάρων και στην κυτταρική μετανάστευση. Τέλος, σε αντίθεση με ότι ισχύει σε άλλους κυτταρικούς τύπους, δεν εμπλέκεται στην προστασία από την απόπτωση.

Για την *in vivo* μελέτη χρησιμοποιήσαμε αρχικά το μοντέλο υπερέκφρασης του TGF- $\beta$  μέσω αδenoϊών από το οποίο δεν προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της μπλεομυκίνης στο οποίο δείξαμε ότι μετά από μια αρχική αύξηση, η ILK μειώνεται στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα και ξανααυξάνεται κατά τα τελευταία χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Για να αποσαφηνίσουμε τους λόγους της αυξομείωσης της ILK προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας και διπλού ανοσοφθορισμού ώστε να προσδιορίσουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν την ILK στα διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μείωση της ILK στα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα οφείλεται στη νέκρωση/απόπτωση διαφόρων επιθηλιακών πληθυσμών ενώ η μεταγενέστερη αύξηση στην εισροή κυττάρων που εκφράζουν την ILK όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και ένας υποπληθυσμός μυοϊνοβλαστών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ILK είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που μπορεί να έχει διαφορετικούς ρόλους στην ινωτική απόκριση ανάλογα με τον εκάστοτε ιστό. Πιστεύουμε ότι η διαπίστωση αυτή ενισχύει την άποψη ότι τα μόρια κλειδιά και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ινωτική απόκριση πρέπει να εξετάζονται ξεχωριστά για κάθε ιστό.