

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Ε.ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη των φαινοτυπικών αλλαγών κυττάρων του
νεφρικού παρεγχύματος κατά την ανάπτυξη της
νεφρικής ίνωσης**

ΜΥΡΤΩ ΡΙΖΟΥ

Χημικός

Αθήνα 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χαρίκλεια Γακιοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
Α΄Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Αριστείδης Χαρώνης, Ερευνητής Α΄

Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Δημήτριος Βλαχάκος, Καθηγητής

Β΄Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπούμπας Δημήτριος, Καθηγητής

Βλαχάκος Δημήτριος, Καθηγητής

Μπολέτης Ιωάννης, Καθηγητής

Γακιοπούλου Χαρίκλεια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Χαρώνης Αριστείδης, Ερευνητής Α΄

Δροσοπούλου Γαρυφαλιά, Ερευνήτρια Γ΄

Πολίτης Παναγιώτης, Ερευνητής Γ΄

Ημερομηνία αίτησης για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 1/10/2012

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 13/12/2012

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1/2/2013

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 18/7/2018

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃ. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήϊς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τάναντία τουτέων.

CURRICULUM VITAE

MYRTO RIZOU

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: 16 January 1986

Place of birth: Athens

Address: 77 Polytechniou Str. 14121, Neo Iraklio, Attiki, Greece

Phone: +30 2102823991/+30 6947774313

Email: mrizou86@gmail.com

EDUCATION

2012 - 2018 **PhD candidate**

Faculty of Medicine, National and Kapodestrian University of Athens

2009 - 2011 **MSc in Clinical Chemistry**

Department of Chemistry, National and Kapodestrian University of Athens

2003 - 2009 **BSc in Chemistry**

Department of Chemistry University of Patras

RESEARCH EXPERIENCE

12/2012 - 9/2018 **PhD candidate**

Centre of Clinical, Experimental Surgery, & Translational Research, Biomedical Research Foundation of Academy of Athens

Research project: "Study of phenotypic changes of renal parenchyma cells during the development of renal fibrosis" under the supervision of Dr Aristidis Charonis.

09/2010 - 09/2011. MSc Thesis

Department of Hygiene and Epidemiology, Faculty of Medicine, National and Kapodestrian University of Athens.

Research project: "Analysis of genetic heterogeneity of HIV-1 strains: Recombination study" under the supervision of Dr. Demetrios Paraskevis.

06/2010 - 09/2010 Internship

As part of "Clinical Chemistry" Masters Program at the Biochemistry Laboratory of "Agios Savvas" Cancer Hospital under the supervision of Dr. Aggela Ferderigou.

05/2009 - 09/2012 Research Assistant

Hormone Laboratory, "Aretaieion" University Hospital.

Research project: "Study of biochemical markers for the prediction of adverse pregnancy outcomes" under the supervision of Dr. Demetrios Rizos.

09/2007 - 09/2008 BSc Thesis.

Biochemistry Division, Department of Chemistry, University of Patras.

Research project: "Development of Capillary Electrophoresis method for the detection of the binding region of chondroitin sulfate in proteins" under the supervision of Prof. Nikos Karamanos.

TEACHING EXPERIENCE

2010 - 2011 Assistant in laboratory training of undergraduate students in the courses of Analytical Chemistry and Clinical Chemistry in the Department of Chemistry, National and Kapodestrian University of Athens.

2012 – 2018 Participation in the High School outreach program of BRFAA

PUBLICATIONS

1. Rizou M, Frangou E, Marineli F, Prakoura N, Zoidakis J, Gakiopoulou H, Liapis G, Kavvadas P, Chatziantoniou C, Makridakis M, Vlahou A, Boletis J, Vlahakos D, Goumenos D, Daphnis E, Iatrou C, Charonis AC. **The family of 14-3-3 proteins and specifically 14-3-3 σ are upregulated during the development of renal pathologies.** J Cell Mol Med. 2018 Sep;22(9):4139-4149
2. Karampas G, Eleftheriades M, Panoulis K, Rizou M, Haliassos A, Metallinou D, Mastorakos G, Rizos D. **Prediction of pre-eclampsia combining NGAL and other biochemical markers with Doppler in the first and/or second trimester of pregnancy. A pilot study.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. (2016). Oct;205:153-7.
3. Karampas G, Eleftheriades M, Panoulis K, Rizou M, Haliassos A, Hassiakos D, Vitoratos N, Rizos D. **Maternal serum levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in pregnancies with preeclampsia and those with a small for gestational age neonate: a longitudinal study.** Prenat Diagn. (2014) Aug;34(8):726-33.
4. Rizos D, Eleftheriades M, Karampas G, Rizou M, Haliassos A, Hassiakos D, Vitoratos N. **Placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 are useful markers for the prediction of preeclampsia but not for small for gestational age neonates: a longitudinal study.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. (2013). Dec;171(2):225-30.
5. Rizos D, Eleftheriades M, Batakis E, Rizou M, Haliassos A, Hassiakos D, Botsis D. **Levels of asymmetric dimethylarginine throughout normal pregnancy and in pregnancies complicated with preeclampsia or had a small for gestational age baby.** J Matern Fetal Neonatal Med. (2012). 25(8):1311-1315.

CONFERENCE ABSTRACTS

Participation in 22 national and international conferences with oral or poster presentations.

AWARDS AND FELLOWSHIPS

1. EMBO Short Term Fellowship (number 7050)

For research carried out in the laboratory of Dr. Christos Chatziantoniou (4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France) from 8 May to 7 July 2017. Research project: "The role of calreticulin and the family of 14-3-3 proteins during the development of renal fibrosis".

2. 2nd BALKAN AWARD in Laboratory Medicine for Young Scientists 2011

E. Batakis, M. Rizou, M. Eleftheriades, A. Haliassos, D. Rizos. **Evaluation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) throughout normal pregnancy, in pregnancies with small for gestational age infants and in preeclampsia.** Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Meeting, 21-24 September 2011, Bucharest, Romania

3. Alexopoulos Prize

E. Frangou, M. Rizou, N. Prakoura, J. Zoidakis, N. Mpoletis, D. Vlastakos, N. Afentakis, C. Iatrou, E. Dafnis, D. Goumenos, G. Liapis, H. Gakiopoulou, A. Charonis. **Upregulation of 14-3-3 proteins during the development of renal pathologies: from basic research to clinical applications.** 18 Panhellenic Congress of Nephrology 13-17 May 2014, Alexandroupolis, Greece

LANGUAGES

English: Certificate of Proficiency, Michigan University

French: Certificate of DELF I

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	15
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	16
ABSTRACT	17
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	18
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 Δομή των νεφρών	21
1.2 Λειτουργία των νεφρών.....	23
1.3 Χρόνια νεφρική νόσος	24
1.4 Σπειραματονεφρίτιδες.....	26
1.4.1 IgA Νεφροπάθεια.....	26
1.4.2 Μεμβρανώδης Νεφροπάθεια	27
1.4.3 Νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου	28
1.4.4 ANCA Σπειραματονεφρίτιδα.....	29
1.5 Ίνωση.....	29
1.5.1 Νεφρική Ίνωση.....	31
1.6 Μοριακοί μηχανισμοί Χρόνιας Νεφρικής Νόσου	32
1.6.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του ER stress	33
1.6.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της υποξίας	35
1.6.3 Αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών ER stress και υποξίας στην Χρόνια Νεφρική Νόσο	37

1.7 Εφαρμογές της Βιολογίας Συστημάτων στην μελέτη της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου	39
1.8 Η πρωτεΐνη calreticulin	41
1.9 Οι πρωτεΐνες 14-3-3.....	42
1.9.1 Δομή των 14-3-3 πρωτεϊνών.....	44
1.9.2 Μηχανισμός δράσης 14-3-3 πρωτεϊνών.....	46
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	49
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	51
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.1 Καλλιέργειες κυττάρων.....	51
2.1.1 Κυτταρική σειρά Human Kidney 2 (HK-2).....	51
2.1.2 Κυτταρική σειρά Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T).....	52
2.1.2.1 Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του γονιδίου HIF1α	52
2.1.3 Πρωτογενή νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα	54
2.1.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων pTECs σε συνθήκες υποξίας.....	54
2.2 Πρωτεωμική ανάλυση	55
2.2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος	55
2.2.2 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός	56
2.2.3 Ανάλυση 2D-πηκτωμάτων και ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	58
2.2.4 Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνών- Δημιουργία πρωτεϊνικών δικτύων	59
2.3 Ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων	60
2.3.1 Μοντέλο μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης	60
2.3.2 Μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	63

2.3.3 Μοντέλο χορήγησης νεφροτοξικού ορού	64
2.4 Απομόνωση RNA - Σύνθεση cDNA.....	65
2.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου .	67
2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	69
2.6.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών	70
2.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	70
2.6.3 Ανοσοαποτύπωση.....	71
2.7 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης.....	74
2.7.1 Προετοιμασία χρωματίνης	75
2.7.2 Αντίδραση ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης.....	76
2.8 Ανοσοϊστοχημεία – Ανοσοφθορισμός.....	79
2.9 Στατιστική ανάλυση	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	82
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	82
3.1 Η υπερέκφραση της calreticulin επηρεάζει το πρωτεωμικό προφίλ των νεφρικών σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων	82
3.2 Μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών <i>in vitro</i>	88
3.3 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται <i>in vivo</i> στο μοντέλο UUO.....	91
3.4 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται <i>in vivo</i> σε άλλα ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων.....	96
3.5 Η υποξία επηρεάζει την έκφραση της 14-3-3σ στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα <i>in vitro</i>	98
3.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1α αλληλεπιδρά με το υποκινητή της 14-3-3σ <i>in vivo</i> στο μοντέλο UUO	100
3.7 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται σε ανθρώπινες νεφροπάθειες	102

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	104
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	110
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του αριστερού νεφρού	22
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δομής του σπειράματος και της συνολικής δομής του νεφρώνα	23
Εικόνα 3: Πρόγνωση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου από το GFR και την αλβουμινουρία	25
Εικόνα 4: Πιθανά αποτελέσματα της διαδικασίας επούλωσης τραύματος: αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού ή ανάπτυξη ίνωσης.....	31
Εικόνα 5: Οι τρεις διαφορετικοί κλάδοι του UPR που επάγονται από την ενεργοποίηση των αντίστοιχων διαμεμβρανικών υποδοχέων	35
Εικόνα 6: Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του οξυγόνου	37
Εικόνα 7: Υποθετικό δίκτυο αλληλεπίδρασης υποξίας και ER stress κατά την πρόοδο της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου	38
Εικόνα 8: Προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και οι αντίστοιχες κυτταρικές διεργασίες που μελετούν	43
Εικόνα 9: Οι ρόλοι της calreticulin στο κύτταρο ως πρωτεΐνη-συνοδός (αριστερά) και ρυθμιστής της ομοιοστασίας του ασβεστίου (δεξιά).....	42
Εικόνα 10: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση των 14-3-3 ισομορφών στον άνθρωπο.	44
Εικόνα 11: Δομή των 14-3-3 πρωτεϊνών.	46
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των πιο γνωστών λειτουργιών της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών	48
Εικόνα 13: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης του HIF1α.....	53

Εικόνα 14: Στάδια ανάπτυξης αποφρακτικής νεφροπάθειας κατά το μοντέλο UUO.....	62
Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση διάταξης για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στο western blot.	72
Εικόνα 16: Διάγραμμα ροής τεχνικής ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.....	75
Εικόνα 17: Η υπερέκφραση της calreticulin επηρεάζει το πρωτεωμικό προφίλ των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων.	85
Εικόνα 18: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 1.	86
Εικόνα 19: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 2.	86
Εικόνα 20: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 3.	87
Εικόνα 21: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 4.	87
Εικόνα 22: Οι πρωτεΐνες 14-3-3 υπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin	89
Εικόνα 23: Οι πρωτεΐνες 14-3-3 υποεκφράζονται σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA σε κυτταρικές σειρές σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων με μειωμένη έκφραση calreticulin.	90
Εικόνα 24: Η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών υπερεκφράζεται in vivo στο μοντέλο UUO στα κύτταρα των επιθηλιακών κυττάρων και συνεντοπίζεται με την calreticulin σε αυτά	92
Εικόνα 25: Σχετική έκφραση των mRNA των 14-3-3 ισομορφών στο μοντέλο UUO.....	93
Εικόνα 26: Έκφραση της ισομορφής 14-3-3σ στο μοντέλο UUO.....	95
Εικόνα 27: Το μοτίβο έκφρασης των 14-3-3 ισομορφών σε άλλα ζωικά μοντέλα νεφρικών ασθενειών έδειξε μεγάλη ομοιότητα με το μοντέλο UUO97	
Εικόνα 28: Η υποξία επάγει την έκφραση της 14-3-3σ in vitro.	99

Εικόνα 29: Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α σε κυτταρικές σειρές οδήγησε σε επαγωγή έκφρασης αποκλειστικά της ισομορφής 14-3-3σ.....	99
Εικόνα 30: Ανοσοκατακρημνιση χρωματίνης στο μοντέλο UUO	101
Εικόνα 31: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών και για την ισομορφή 14-3-3σ σε δείγματα βιοψιών ασθενών με νεφροπάθειες ποικίλης αιτιολογίας.	103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εκκινητές για τα ανθρώπινα γονίδια που μελετήθηκαν με RT-qPCR.	68
Πίνακας 2: Εκκινητές για τα γονίδια ποντικού που μελετήθηκαν με RT-qPCR.	69
Πίνακας 3: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο western blot.	73
Πίνακας 4: Εκκινητές για επιλεγμένες περιοχές στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3σ.	79
Πίνακας 5: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημεία.....	81
Πίνακας I: Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τις διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες μεταξύ κυτταρικών σειρών ελέγχου και κυτταρικών σειρών που υπερέκφραζαν calreticulin.....	120

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος, το τελικό αποτέλεσμα των περισσότερων νεφρικών και ορισμένων συστηματικών παθήσεων, είναι μια κατάσταση στην οποία υπάρχει έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας οφειλόμενη κυρίως στην ίνωση. Κατά την ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης, η calreticulin, μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη-συνοδός του ενδοπλασματικού δικτύου υπερεκφράζεται στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η πρωτεωμική ανάλυση σε κυτταρική σειρά σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin οδήγησε στην ταυτοποίηση της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών. Η έκφραση της πλειοψηφίας των μελών της οικογένειας αυτής βρέθηκε αυξημένη σε τρία διαφορετικά ζωικά πρότυπα νεφρικών παθήσεων: το μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης, το μοντέλο της χορήγησης νεφροτοξικού ορού και το μοντέλο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Σε όλα τα μοντέλα, η ισομορφή 14-3-3σ (γνωστή και ως stratifin) είχε την μεγαλύτερη υπερέκφραση. Καθώς σε όλα τα μοντέλα που μελετήθηκαν η υποξία είναι κοινός παρανομαστής δείξαμε ότι ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF1α προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3σ *in vivo*. Τέλος, αξιολογήσαμε την έκφραση της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών καθώς και της ισομορφής 14-3-3σ σε βιοψίες από ασθενείς με σπειραματονεφριτίδες ποικίλης αιτιολογίας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν εμπλοκή της 14-3-3σ στην νεφρική παθολογία και παρέχουν για πρώτη φορά στοιχεία ότι η υποξία μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αλλαγή στην έκφρασή της.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease, the end result of most renal and some systemic diseases, is a common condition where renal function is compromised mainly due to fibrosis. During renal fibrosis, calreticulin, a multifunctional chaperone of the endoplasmic reticulum (ER) is upregulated in tubular epithelial cells (TECs) both *in vitro* and *in vivo*. Proteomic analysis of cultured TECs overexpressing calreticulin led to the identification of the family of 14-3-3 proteins as key proteins overexpressed as well. Furthermore, an increased expression in the majority of 14-3-3 family members was observed in three different animal models of renal pathologies: the unilateral ureteric obstruction, the nephrotoxic serum administration and the ischemia-reperfusion. In all these models, the 14-3-3 σ isoform (also known as stratifin) was predominantly overexpressed. Since in all these models ischemia is a common denominator, we showed that the ischemia-induced transcription factor HIF1 α is specifically associated with the promoter region of the 14-3-3 σ gene. Finally, we evaluated the expression of the family of 14-3-3 proteins and specifically 14-3-3 σ in biopsies from patients with glomerulopathies of various etiologies. These results establish an involvement of 14-3-3 σ in renal pathology and provide evidence for the first time, that hypoxia may be responsible for its altered expression.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Μέρος της εκπονήθηκε στο Εργαστήριο INSERM UMRS 1155 στο Νοσοκομείο Tenon στο Παρίσι.

Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα Αριστεία #2681 από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας του Υπουργείου Εκπαίδευσης στον Α. Χαρώνη, και από την υποτροφία EMBO Short-Term Fellowship 7050.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Χαρίκλεια Γακιοπούλου για την εποπτεία της μελέτης, τις συμβουλές της και το ενδιαφέρον της και τον Καθηγητή Δημήτριο Βλαχάκο για την αξιολόγηση της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Αριστείδη Χαρώνη για την ανάθεση αυτής της μελέτης και την υποστήριξη σε όλη της διάρκειά της, για την ευκαιρία να εργαστώ και να εκπαιδευτώ στο εργαστήριο του αλλά πάνω απ' όλα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στις δυνατότητες μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την αξιολόγηση της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Χρήστο Χατζηαντωνίου, Διευθυντή Έρευνας στο Εργαστήριο INSERM UMRS 1155 για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω μέρος της διατριβής μου στο εργαστήριο του και κυρίως γιατί με βοήθησε να δω την έρευνα από μια διαφορετική οπτική.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την διευθύντρια της Ερευνητικής Μονάδας Πρωτεωμικής στο ΙΙΒΕΑΑ Δρ. Αντωνία Βλάχου και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές κ. Ιερώνυμο Ζωιδάκη και κ. Μανούσο Μακριδάκη για την εξαιρετική συνεργασία και τη συμβολή τους στην παρούσα διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Νεφρολογίας Δημήτριο Γούμενο και Ιωάννη Μπολέτη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νεφρολογίας Ευγένιο Δαφνή, τον Διευθυντή της Νεφρολογικής Κλινικής του Κρατικού της Νίκαιας κ. Χρήστο Ιατρού και τον Επιμελητή Α΄ του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής κ. Γεώργιο Λιάπη για τα δείγματα βιοψιών νεφρού που μου παραχώρησαν.

Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Παναγιώτη Πολίτη για τις πολύτιμες συμβουλές του και την Τεχνικό των Εργαστηρίων των Δρ. Χαρώνη και Δρ. Πολίτη κ. Βαλέρια Καλτεζιώτη για την υποστήριξη της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα μέλη των εργαστηρίων των Δρ. Χαρώνη και Δρ. Πολίτη με τα οποία συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια. Κυρίως όμως ευχαριστώ τον «Πυρήνα», την Άρτεμις, τη Δάφνη, τη Νίκη, τον Γιώργο, τον Δημήτρη και το Νίκο γιατί δημιούργησαν το ωραιότερο εργαστηριακό περιβάλλον μέσα στο οποίο θα μπορούσα να εργαστώ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους φίλους μου για την στήριξή τους και την ψυχραιμία τους, τον Μανώλη για την στήριξη του, την κατανόηση του και την απεριόριστη υπομονή του όλα αυτά τα χρόνια μα πάνω απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδελφή μου γιατί χωρίς αυτούς τίποτα δεν θα ήταν δυνατό.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

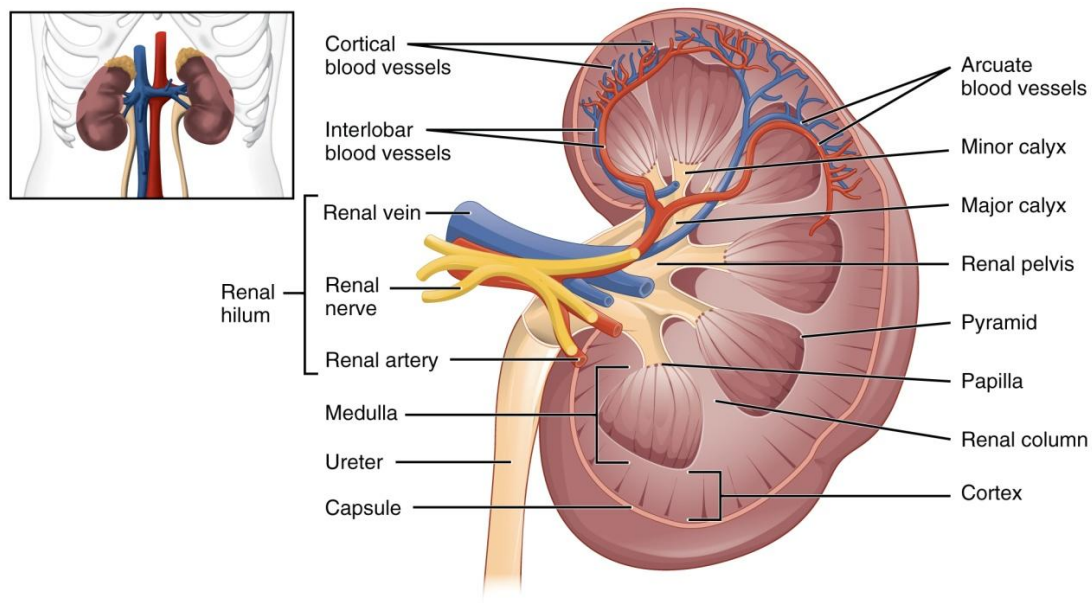
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή των νεφρών

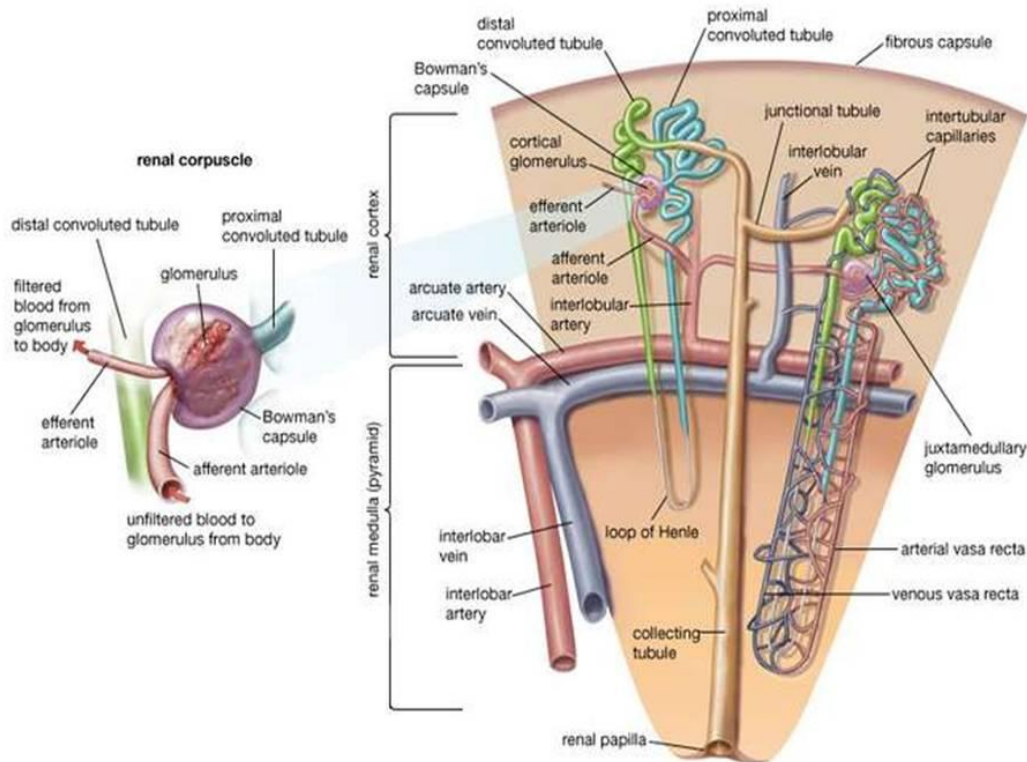
Οι νεφροί, δεξιός και αριστερός, είναι όργανα που έχουν σχήμα φασολιού και εδράζονται οπισθοπεριτοναϊκά, στο άνω οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα εκατέρωθεν της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Ο κάθε νεφρός έχει βάρος στον άνθρωπο 120-300g και καταλαμβάνει έκταση 2.5 σπονδύλων. Σε ποσοστό 65% ο δεξιός νεφρός βρίσκεται κατά μισό σπόνδυλο χαμηλότερα από τον αριστερό. Κάθε νεφρός εμφανίζει δυο επιφάνειες, την πρόσθια και την οπίσθια, δυο χείλη, το έσω και το έξω και δυο πόλους. Το έσω χείλος (renal hilum) παρουσιάζει ένα άνοιγμα, την πύλη, από την οποία εισέρχονται οι κλάδοι της νεφρικής αρτηρίας και τα νεύρα και εξέρχονται οι κλάδοι της νεφρικής φλέβας και ο ουρητήρας. Οι νεφροί καλύπτονται από μια ινώδη κάψα που αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό και βοηθά στην διατήρηση του σχήματος και της θέσης τους.

Σε εγκάρσια διατομή, το παρέγχυμα διαιρείται σε 2 ζώνες, την φλοιώδη και την μυελώδη. Η μυελώδης ζώνη αποτελείται από αρκετούς νεφρικούς λοβούς καθένας από τους οποίους σχηματίζει μια πυραμίδα (renal pyramid). Οι κορυφές των πυραμίδων ονομάζονται νεφρικές θηλές (renal papillae) και είναι δέσμες σωληναρίων που μεταφέρουν τα ούρα που παράγονται στους νεφρικούς κάλυκες (renal calyces) ώστε να απεκκριθούν. Από τη βάση της πυραμίδας προβάλλουν ακτινωτά προς τη φλοιώδη ζώνη οι μυελώδεις ακτίνες και ανάμεσά τους προβάλλουν προεξοχές της φλοιώδους ουσίας, οι νεφρικοί στύλοι. Οι νεφρικοί στύλοι παρέχουν ένα υποστηρικτικό πλαίσιο για τα αγγεία που εισέρχονται και εξέρχονται από τον φλοιό (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του αριστερού νεφρού. Από βιβλιογραφική αναφορά (1).

Το νεφρικό παρέγχυμα αποτελείται από τους νεφρώνες, τα αθροιστικά σωληνάρια και ένα εκτεταμένο δίκτυο τριχοειδών. Ο νεφρώνας, είναι η λειτουργική μονάδα του νεφρού και αποτελείται από το σπείραμα και το σωληνάριο. Ο κάθε νεφρός έχει περίπου 1.000.000 νεφρώνες. Το σπείραμα αποτελείται από ένα σύμπλεγμα τριχοειδών που επικάθονται στα μεσαγγειακά κύτταρα και περιβάλλονται από την κάψα του Bowman. Τα τριχοειδή και το μεσάγγειο καλύπτονται από τα ποδοκύτταρα τα οποία είναι ένα είδος επιθηλιακών κυττάρων. Το κάθε νεφρικό σωληνάριο έχει μήκος περίπου 5 cm και χωρίζεται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο. Από τις δομές του νεφρώνα, τα σπειράματα, το μεγαλύτερο τμήμα των εγγύς σωληναρίων και τμήμα των άπω σωληναρίων βρίσκονται στην φλοιώδη ζώνη του νεφρού. Η μυελώδης ζώνη περιλαμβάνει κυρίως τις αγκύλες του Henle και τα αθροιστικά σωληνάρια (Εικόνα 2) (1,2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δομής του σπειράματος και της συνολικής δομής του νεφρώνα (Από ιστοσελίδα: <https://www.britannica.com/science/nephron>)

1.2 Λειτουργία των νεφρών

Οι νεφροί είναι οι κύριοι ρυθμιστές του εσωτερικού περιβάλλοντος του σώματος. Οι κύριες λειτουργίες τους συνοψίζονται παρακάτω:

1. Διατήρηση του όγκου και της σύστασης των υγρών του οργανισμού. Οι νεφροί είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση του όγκου και της οσμωτικότητας των υγρών του οργανισμού καθώς και της οξεοβασικής και ηλεκτρολυτικής ισορροπίας του. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης των ποσοτήτων του νερού και των ιόντων που εκκρίνονται στα ούρα. Ανάμεσα στους ηλεκτρολύτες που ρυθμίζονται κατά την ουρική απέκκριση είναι το νάτριο, το κάλιο, το χλώριο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο φώσφορος.
2. Αποβολή των τελικών άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και των ξένων ουσιών.

3. Παραγωγή και έκκριση ενζύμων και ορμονών. Οι νεφροί μέσω της παραγωγής και της έκκρισης ερυθροποιητίνης, ρενίνης, 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 και άλλων ορμονών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, στην ερυθροποίηση και στον μεταβολισμό των οστών (1,3).

1.3 Χρόνια νεφρική νόσος

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (XNN) είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Η XNN προκύπτει από πολλές διαφορετικές παθολογικές οδούς που μεταβάλλουν μη αναστρέψιμα τη λειτουργία και τη δομή του νεφρού (4).

Μέχρι αυτή τη στιγμή, ο καλύτερος διαθέσιμος δείκτης για τη παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας και τη διάγνωση της XNN είναι ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) που ισούται με τη συνολική ποσότητα αίματος που καθαρίζεται από όλους τους λειτουργικούς νεφρώνες ανά μονάδα χρόνου. Αν και ο ορισμός και η ταξινόμηση της XNN έχουν εξελιχθεί με την πάροδο των χρόνων, οι τρέχουσες διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ορίζουν ως XNN τη μειωμένη λειτουργία των νεφρών που εμφανίζεται με GFR μικρότερο των 60 ml/min ανά 1,73 m² ή με δείκτες νεφρικής βλάβης ή και τα δυο, με διάρκεια τουλάχιστον 3 μηνών ανεξάρτητα από την υποκείμενη αιτία. Επιπροσθέτως του GFR, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αλβουμινουρίας και της εξέλιξης της νόσου (5,6). Με βάση τα παραπάνω, η XNN κατατάσσεται σε 5 στάδια (Εικόνα 3). Το τελικό στάδιο, το οποίο ορίζεται από GFR μικρότερο των 15 ml/min ανά 1,73 m² ονομάζεται Νεφρική Νόσος Τελικού Σταδίου (NNTΣ) και δεν είναι συμβατό με τη ζωή. Οι ασθενείς με NNTΣ χρήζουν θεραπείας υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας η οποία γίνεται είτε με αιμοκάθαρση είτε με μεταμόσχευση νεφρού (7,8).

				Albuminuria stages, description, and range (mg/g)				
				A1		A2	A3	
				Optimum and high-normal		High	Very high and nephrotic	
				<10	10-29	30-299	300-1999	≥2000
GFR stages, description, and range (mL/min per 1.73m ²)	G1	High and optimum	>105					
			90-104					
	G2	Mild	75-89					
			60-74					
	G3a	Mild-moderate	45-59					
	G3b	Moderate-severe	30-44					
	G4	Severe	15-29					
G5	Kidney failure	<15						

Εικόνα 3: Πρόγνωση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου από το GFR και την αλβουμινουρία. Από βιβλιογραφική αναφορά (9).

Η πραγματική συχνότητα της ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια καθώς τα αρχικά στάδια της νόσου είναι ασυμπτωματικά και το GFR συχνά υπολογίζεται με διαφορετικές μεθοδολογίες και τύπους. Παρά αυτούς τους περιορισμούς, ο επιπολασμός της ΧΝΝ αναφέρεται σταθερά στο 11% στις αναπτυγμένες χώρες. Το κόστος θεραπείας των ασθενών με ΧΝΝ είναι τεράστιο. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής δαπανώνται περισσότερα από 48 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο για θεραπεία. Ακόμα πιο σημαντικό από το κόστος είναι το γεγονός ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες η θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη με αποτέλεσμα η ΝΝΤΣ να ισοδυναμεί με το θάνατο.

Οι δυο κύριες αιτίες της ΧΝΝ είναι ο διαβήτης και η υπέρταση και ευθύνονται για τα 2/3 των περιπτώσεων παγκοσμίως ενώ η τρίτη κατά σειρά αιτία της ΧΝΝ είναι οι σπειραματοπάθειες. Άλλες καταστάσεις που επηρεάζουν τους νεφρούς και τη λειτουργία τους είναι οι κληρονομικές ασθένειες, όπως η

πολυκυστική νόσος των νεφρών, αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, οι πέτρες στους νεφρούς και οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.(4,9).

1.4 Σπειραματονεφρίτιδες

Σπειραματονεφρίτιδα ονομάζεται η φλεγμονή των σπειραμάτων που οδηγεί σε διαταραχές της λειτουργίας τους. Η σπειραματική νόσος μπορεί να είναι πρωτοπαθής που σημαίνει ότι προσβάλλει το νεφρό, χωρίς συμμετοχή άλλων οργάνων, αλλά και δευτεροπαθής στα πλαίσια συστηματικής πάθησης όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και ο ερυθηματώδης λύκος.

Οι κλινικές εκδηλώσεις των διαφόρων σπειραματονεφρίτιδων ποικίλουν και μπορεί να περιλαμβάνουν πρωτεϊνουρία που προκαλείται από την αλλοιωμένη διαπερατότητα των τοιχωμάτων των σπειραματικών τριχοειδών, αιματουρία που προκαλείται από την διάρρηξη των τοιχωμάτων των σπειραματικών τριχοειδών, αζωθαιμία που προκαλείται από την διαταραχή της διήθησης των αζωτούχων μεταβολιτών, ολιγουρία ή ανουρία, οίδημα και υπέρταση. Η φύση και η σοβαρότητα της νόσου σε έναν ασθενή υπαγορεύεται από τη φύση και τη σοβαρότητα της σπειραματικής βλάβης (10).

1.4.1 IgA Νεφροπάθεια

Η IgA νεφροπάθεια είναι μια από τις πιο συχνές μορφές σπειραματονεφρίτιδας στον κόσμο. Χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση της ανοσοσφαιρίνης IgA στο μεσάγγειο η οποία παράλληλα μπορεί να συνυπάρχει και με άλλες ανοσοσφαιρίνες όπως IgG ή IgM. Αν και θεωρείται η συχνότερη πρωτοπαθής σπειραματονεφρίτιδα παγκοσμίως ο επιπολασμός της δεν δύναται να υπολογιστεί καθώς ένας σημαντικός αριθμός ασθενών δεν υποβάλλεται σε βιοψία νεφρού λόγω της ήπιας κλινικής εικόνας που εμφανίζει. Αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, η εκδήλωσή

της είναι συχνότερη στην δεύτερη και τρίτη δεκαετία της ζωής, με επικράτηση στο άρρεν φύλο.

Οι δύο συνηθέστεροι τρόποι κλινικής εκδήλωσης της IgA νεφροπάθειας είναι η παρουσία επεισοδίων μακροσκοπικής αιματουρίας κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά από μια λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, εκδήλωση η οποία παρατηρείται συνηθέστερα σε νεότερης ηλικίας άτομα και η ασυμπτωματική μικροσκοπική αιματουρία που συχνότερα παρατηρείται σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα. Συχνά συνυπάρχει πρωτεϊνουρία, η οποία μπορεί να είναι στα όρια του νεφρωσικού συνδρόμου (παρουσία πρωτεϊνουρίας $>3,5\text{g}/\text{ημέρα}/1,73\text{m}^2$, υπολευκωματιναιμία, υπερλιπιδαιμία και οίδημα) ή μπορεί να εμφανιστεί αργότερα κατά την πορεία της νόσου (11).

1.4.2 Μεμβρανώδης Νεφροπάθεια

Η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα ή νεφροπάθεια είναι υπεύθυνη για το ένα τρίτο των περιπτώσεων νεφρωσικού συνδρόμου στους ενήλικες, και αποτελεί την συχνότερη αιτία νεφρωσικού συνδρόμου σε άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών (12). Η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα στο 80% των περιπτώσεων χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής ενώ στο υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων οφείλεται σε αυτοάνοσα νοσήματα, κακοήθη νοσήματα, λοιμώξεις και φάρμακα (13).

Η παθογένεια της νόσου σχετίζεται με εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται είτε στη συστηματική κυκλοφορία είτε *in situ* στην υποεπιθηλιακή επιφάνεια της βασικής μεμβράνης από αντιγόνα τα οποία μπορεί να είναι εξωγενή ή ενδογενή. Ο μηχανισμός πρόκλησης της σπειραματικής βλάβης, με βάση διάφορα πειραματικά μοντέλα της νόσου, σχετίζεται με ενεργοποίηση του συμπληρώματος (14).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνουν πέρα από το νεφρωσικό σύνδρομο που παρουσιάζεται στην πλειονότητα των ασθενών και

τη μικροσκοπική αιματουρία η οποία εμφανίζεται περίπου στο 50% των ασθενών. Η παρουσία αρτηριακής υπέρτασης δεν είναι συνήθης ενώ η νεφρική λειτουργία κατά την αρχική διάγνωση είναι συνήθως φυσιολογική (15).

1.4.3 Νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου

Ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) είναι ένα αυτοάνοσο πολυσυστηματικό νόσημα με πολύπλοκη παθογένεια. Χαρακτηρίζεται από προσβολή πολλαπλών οργάνων του ανθρώπινου σώματος όπως το δέρμα, οι αρθρώσεις, ο εγκέφαλος ενώ ανάμεσα στα όργανα που προσβάλλονται είναι και οι νεφροί. Η νεφρίτιδα αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Η νεφρική συμμετοχή είναι συχνή και επηρεάζει έως και τα 2/3 των ασθενών στην πορεία της νόσου, ενώ ποσοστό 10-25% εμφανίζει τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής νόσου.

Τα συνηθέστερα αντισώματα στο λύκο είναι τα anti-dsDNA που στρέφονται εναντίον της διπλής έλικας του DNA και στοχεύουν το νουκλεόσωμα. Αποτέλεσμα της εναπόθεσης των ανοσοσυμπλεγμάτων είναι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η κινητοποίηση μηχανισμών φλεγμονής που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο νεφρό. Η νεφρική βλάβη καθορίζεται από την θέση σχηματισμού των ανοσοεναποθέσεων οι οποίες στη νεφρίτιδα του λύκου βρίσκονται σε τρία βασικά σημεία: στο μεσάγγειο και υποενδοθηλιακά ή υποεπιθηλιακά στο σπείραμα.

Στα κλινικά συμπτώματα της νόσου η πιο συχνή διαταραχή που παρατηρείται είναι η πρωτεϊνουρία. Η νόσος μπορεί να καταλήξει σε νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική ανεπάρκεια ή να περιορίζεται σε ασήμαντη λευκωματουρία ή μικροσκοπική αιματουρία (16).

1.4.4 ANCA Σπειραματονεφρίτιδα

Οι αγγειίτιδες που σχετίζονται με τα αυτοαντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA), στις οποίες συγκαταλέγονται κυρίως η κοκκιωμάτωση Wegener και η μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα, προσβάλλουν τους νεφρούς αρκετά συχνά. Η ANCA σπειραματονεφρίτιδα είναι η πλέον συχνή αιτία επιθετικής σπειραματονεφρίτιδας και είναι συχνότερη σε μεγαλύτερες ηλικίες, με παρόμοια κατανομή μεταξύ των δύο φύλων.

Η χαρακτηριστική ιστοπαθολογική βλάβη της ANCA σπειραματονεφρίτιδας, είναι οι μηνοειδείς σχηματισμοί και η ινιδοειδής νέκρωση. Χαρακτηρίζεται στον ανοσοφθορισμό από μικρή ή μηδενική εναπόθεση ανοσοσφαιρινών ή συμπληρώματος στο σπείραμα ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρούνται υποενδοθηλιακό οίδημα, μικροθρομβώσεις και αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων.

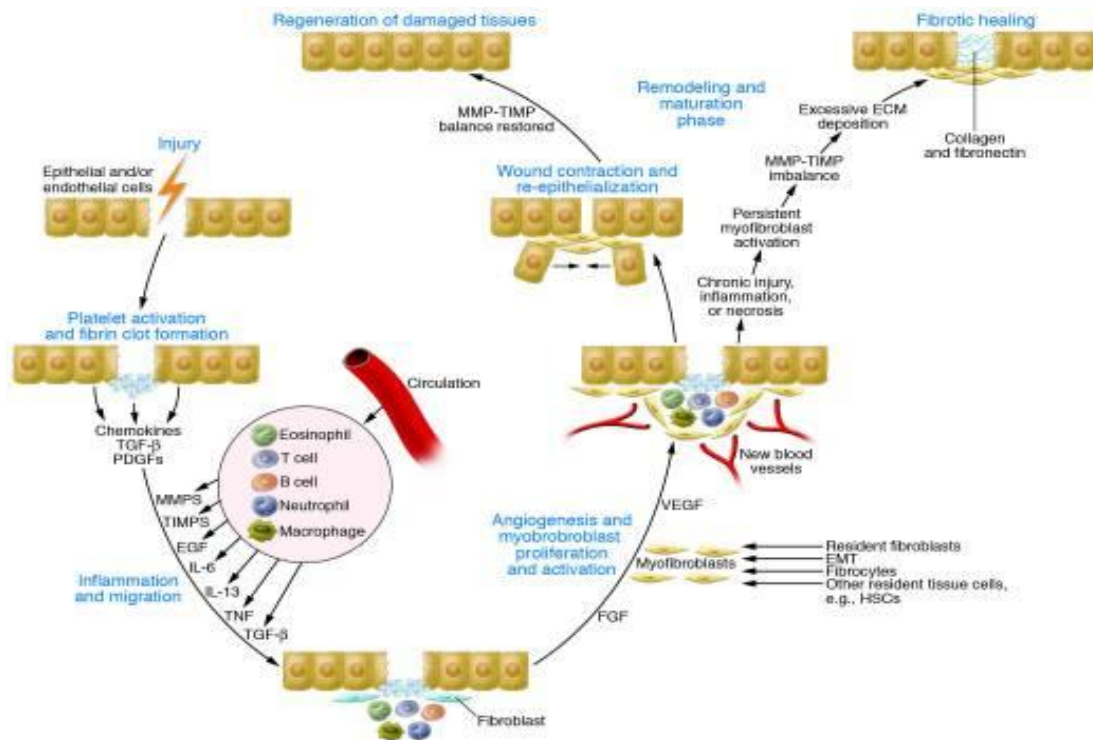
Η ANCA σπειραματονεφρίτιδα μπορεί να εκδηλωθεί με ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, από ασυμπτωματική μικροσκοπική αιματοουρία έως πολύ σοβαρές μορφές σπειραματονεφρίτιδας. Ένα τυπικό εύρημα είναι το ενεργό ίζημα ούρων, το οποίο κατά τη μικροσκοπική ανάλυση των ούρων αναδεικνύει τα χαρακτηριστικά δύσμορφα ερυθρά αιμοσφαίρια, που έχουν υποστεί παραμόρφωση του σχήματός τους εξ αιτίας της διόδου τους από σπειραματικά τριχοειδή, τα οποία εμφανίζουν φλεγμονώδεις βλάβες ως αποτέλεσμα προσβολής από την αγγειίτιδα (17).

1.5 Ίνωση

Ίνωση (Fibrosis) ορίζεται ως η διαδικασία επούλωσης τραύματος η οποία έχει βγει εκτός ελέγχου. Αποτελεί μια μακροχρόνια διεργασία καταστροφής των ιστών που χαρακτηρίζει μεγάλο εύρος ασθενειών σε πολλά οργανικά συστήματα και μπορεί να οφείλεται σε οξεία ή χρόνια ερεθίσματα. Η διαδικασία επούλωσης περιλαμβάνει 2 στάδια, τη φάση αναγέννησης κατά

την οποία τα τραυματισμένα κύτταρα αντικαθίστανται από κύτταρα ίδιου τύπου και τη φάση της ινοπλασίας ή ίνωσης κατά την οποία συνδετικός ιστός αντικαθιστά τον φυσιολογικό ιστό του παρεγχύματος. Αν και αρχικά ωφέλιμη, η διαδικασία της ίνωσης εξελίσσεται σε παθογόνο αν συνεχιστεί ανεξέλεγκτα.

Κατά τον γενικό μηχανισμό της ίνωσης, μετά την πρόκληση βλάβης ή τραυματισμού στους ιστούς, τα επιθηλιακά κύτταρα που υπέστησαν τη βλάβη εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες που πυροδοτούν τη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ξεκινώντας την πρώτη φάση επούλωσης του τραύματος. Τα κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν επίσης μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (Matrix Metalloproteinases, MMPs) που μεσολαβούν τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης του ιστού, ώστε να επιτραπεί η πρόσβαση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή του τραύματος. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν με τη σειρά τους κυτταροκίνες, ενισχύοντας τη φλεγμονώδη απόκριση και ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα για το σχηματισμό νέων αγγείων. Κάποια από τα εκκρινόμενα μόρια, όπως οι προ-ινωτικοί παράγοντες IL-13 και TGF- β , διεγείρουν επίσης την ενεργοποίηση των ινοβλαστών για την παραγωγή εξωκυττάριας στρώματος που θα συμβάλλει στην επούλωση του τραύματος. Η φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης ολοκληρώνεται με τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Ωστόσο, σε περίπτωση χρόνιων τραυματισμών παρατηρείται συνεχής φλεγμονώδης αντίδραση και ενεργοποίηση των ινοβλαστών που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας και ανάπτυξη ίνωσης (Εικόνα 4). Σε ορισμένες περιπτώσεις η ίνωση μπορεί τελικά να οδηγήσει σε οργανική ανεπάρκεια και θάνατο (18).



Εικόνα 4: Πιθανά αποτελέσματα της διαδικασίας επούλωσης τραύματος: αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού ή ανάπτυξη ίνωσης. Από βιβλιογραφική αναφορά (18).

1.5.1 Νεφρική Ίνωση

Η νεφρική ίνωση (Renal Fibrosis) αποτελεί το κοινό ανατομικό χαρακτηριστικό πολλών καταστάσεων και ασθενειών είτε πρόκειται για νεφρικές παθήσεις, είτε πρόκειται για συστηματικές νόσους με νεφρική συμμετοχή. Παρά τις διαφορές στην αιτιολογία και στον παθογενετικό μηχανισμό αυτών των ασθενειών, όλες έχουν σαν κοινό παρανομαστή την ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης και τη σταδιακή ανάπτυξη της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου. Η νεφρική ίνωση εμφανίζεται και στα δυο κύρια διαμερίσματα του νεφρικού παρεγχύματος, τα σπειράματα (σπειραματοσκλήρυνση) και τα σωληνάκια (σωληναροδιάμεση ίνωση) (4,19). Η σπειραματοσκλήρυνση προκαλείται από αυξημένη ενδοτριχοειδική πίεση που οδηγεί σε βλάβη και δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων, καταστροφή των ποδοκυττάρων και διαταραχή στην αλληλεπίδραση τους με την σπειραματική

βασική μεμβράνη. Οι προφλεγμονώδεις και προϋνωτικοί μεσολαβητές που δημιουργούνται στο παθολογικό σπείραμα, φτάνουν στα περισωληναριακά τριχοειδικά συστήματα όπου ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και δημιουργούν έμμεσα, φλεγμονώδη αντίδραση και στο σωληναριοδιάμεσο χώρο (4,20).

Κατά την σωληναροδιάμεση ίνωση τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα διεγείρονται από το μη ομαλά φιλτραρισμένο διήθημα του σπειράματος με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η φλεγμονώδης αντίδραση τους αλλά και η αλληλεπίδραση τους με τους ενεργοποιημένους ινοβλάστες. Καθώς το βλαπτικό ερέθισμα εμμένει και η ίνωση εξελίσσεται, τα τραυματισμένα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την ικανότητα τους να αναγεννώνται οπότε οδηγούνται σε απόπτωση η οποία δημιουργεί σωληναριακή ατροφία και μη λειτουργικά σπειράματα (20,21).

Συνολικά, παρά το ότι η φλεγμονώδης διήθηση του σπειράματος, η μεσαγγειακή υπερπλασία και η σπειραματοσκλήρυνση διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της χρόνιας νεφρικής νόσου, η ίνωση του σωληναριοδιάμεσου χώρου και η ατροφία των σωληναρίων είναι αυτές που αποδεδειγμένα συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη νεφρική λειτουργία και τη νεφρική επιβίωση.

1.6 Μοριακοί μηχανισμοί Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του παθογενετικού μηχανισμού της της ΧΝΝ είναι η σπειραματοσκλήρυνση, η σωληναριακή ατροφία, η φλεγμονή και η ίνωση. Ανεξάρτητα από το αρχικό αίτιο, η εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου βασίζεται σε 4 κύριες κυτταρικές αποκρίσεις στο νεφρό: την σωληναροδιάμεση φλεγμονώδη αντίδραση, την εμφάνιση του πληθυσμού των μυοϊνοβλαστών οι οποίοι είναι η πηγή των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, την απώλεια της δυνατότητας αναγέννησης των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων και

τέλος την εμφάνιση ενός φαύλου κύκλου υποξίας-στρες στα επιθηλιακά κύτταρα λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου στον ιστό (22,23).

Η υποξία και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic reticulum stress, ER stress) είναι δυο σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται σε παθολογικά περιβάλλοντα. Αν και τα μονοπάτια αυτά είναι πολύ καλά μελετημένα ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία στη βιβλιογραφία ότι σε παθολογικές καταστάσεις αλληλεπιδρούν και έχουν κοινά γονίδια-στόχους (24,25).

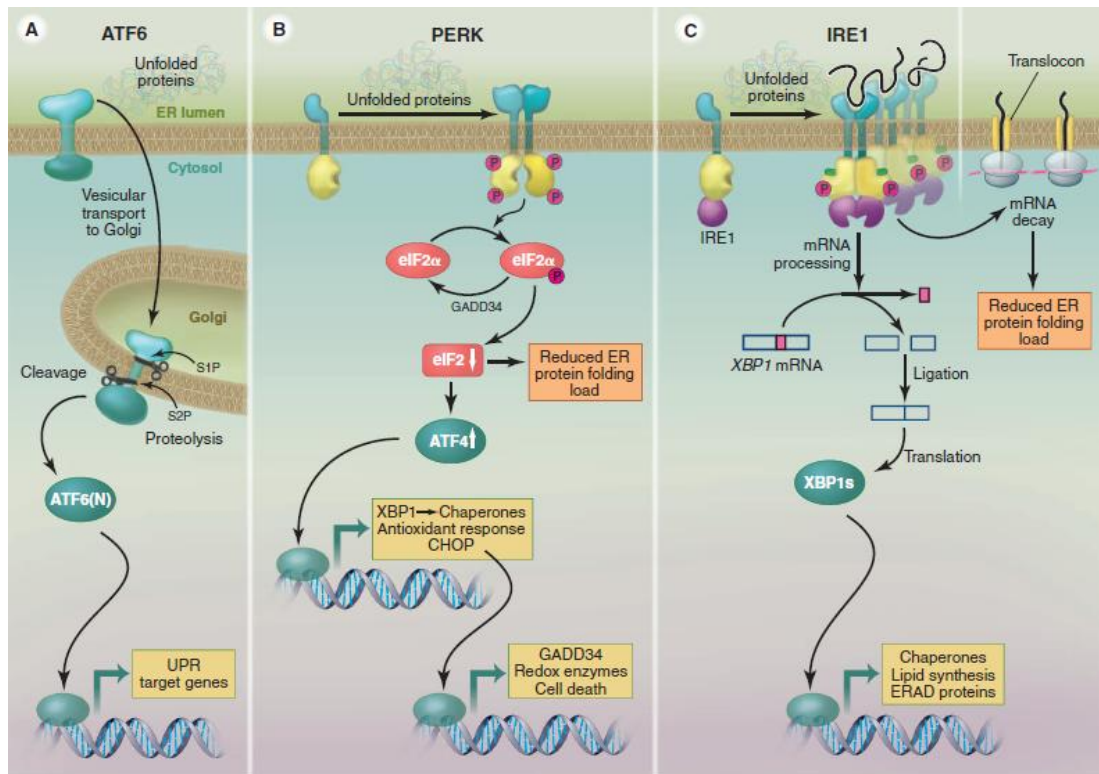
1.6.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του ER stress

Η συντριπτική πλειοψηφία των πρωτεϊνών που ένα κύτταρο εκκρίνει η εμφανίζει στην επιφάνειά του εισέρχονται πρώτα στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου τροποποιούνται και αναδιπλώνονται. Η διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου, οδηγεί στην παρεμπόδιση της εκκριτικής ικανότητας του οργανιδίου καθώς και της ορθής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την συσσώρευση μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσα στον αυλό και τη δημιουργία μιας κατάστασης γνωστή ως στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic reticulum stress). Το ER stress ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο και πολύπλευρο ενδοκυτταρικό μηχανισμό σηματοδότησης που είναι σχεδιασμένος για την επαναφορά της φυσιολογικής ομοιόστασης του οργανιδίου που μπορεί να αποδοθεί ως απόκριση των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR) (26).

Το UPR αποτελείται από τρεις κύριους μηχανισμούς: την αναστολή της μεταφραστικής μηχανής του κυττάρου για να περιοριστεί το βιοσυνθετικό φορτίο μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τη μεταγραφική ενεργοποίηση κυτταροπροστατευτικών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες συνοδούς του ενδοπλασματικού δικτύου με σκοπό την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσής του και την αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης των

συσσωρευόμενων μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αν για οποιοδήποτε λόγο οι μηχανισμοί αυτοί αποτύχουν να επαναφέρουν την ομοιόσταση του ενδοπλασματικού δικτύου, τότε το ER stress επάγει την πρόκληση κυτταρικού θανάτου (26,27).

Σε μοριακό επίπεδο, το UPR χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των PERK (Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) και ATF6 (Activating Transcription Factor 6) που είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς του ενδοπλασματικού δικτύου (28). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι υποδοχείς αυτοί είναι ανενεργοί και συνδεδεμένοι με την πρωτεΐνη συνοδό GRP78 (Glucose Regulated Protein 78) η οποία είναι αισθητήρας του UPR. Όταν κάτω από παθολογικές καταστάσεις, η λειτουργία του ER μειώνεται και συσσωρεύονται μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσα στον αυλό του, η GRP78 διαχωρίζεται από τους τρεις υποδοχείς και συνδέεται με τις πρωτεΐνες ώστε να τις αναδιπλώσει. Οι PERK, IRE1 και ATF6 με τη σειρά τους ενεργοποιούνται, διμερίζονται, μετακινούνται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα όπου προκαλούν τη μετακίνηση μεταγραφικών παραγόντων μέσα στον πυρήνα και την επαγωγή γονιδίων στόχων του UPR (27,29) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Οι τρεις διαφορετικοί κλάδοι του UPR που επάγονται από την ενεργοποίηση των αντίστοιχων διαμεμβρανικών υποδοχών. Από βιβλιογραφική αναφορά (27).

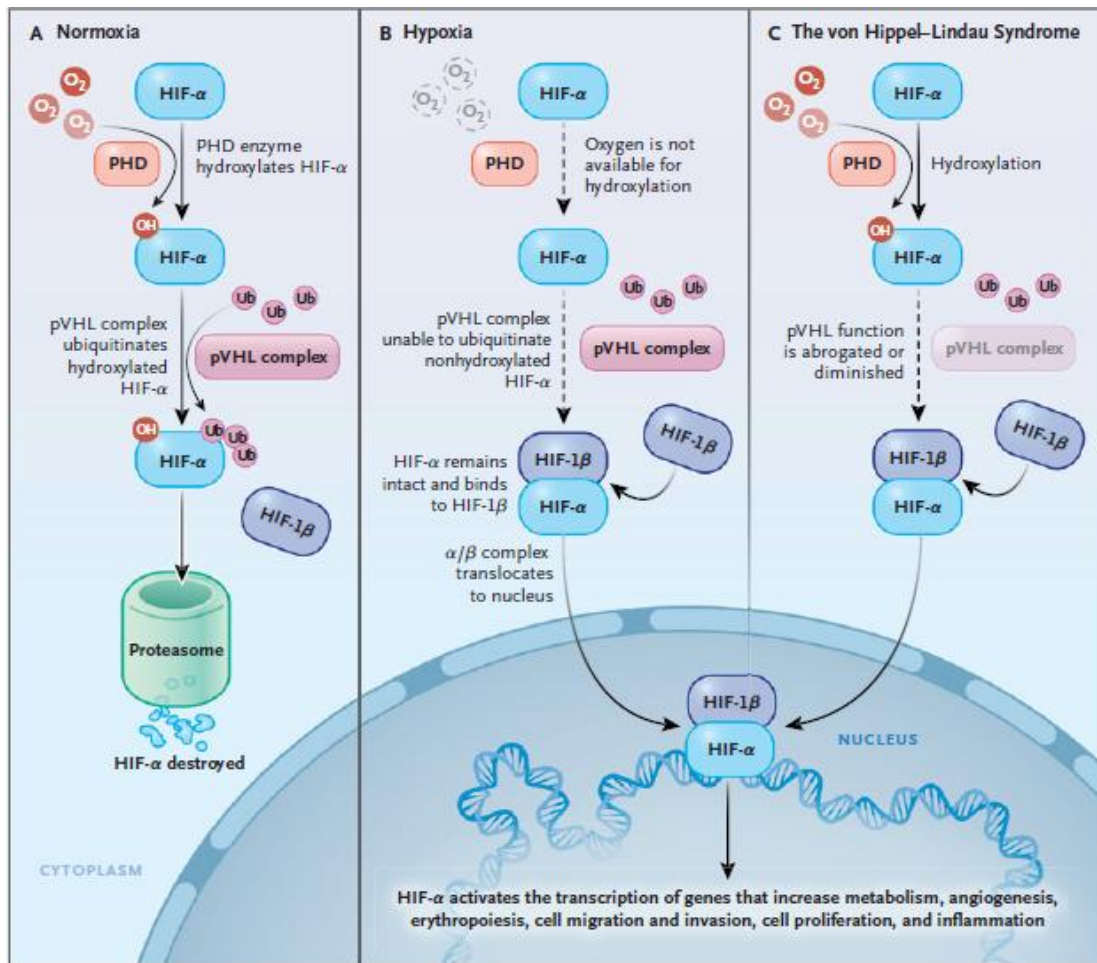
1.6.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της υποξίας

Οι μεταβολές στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι ένα κρίσιμο φυσιολογικό ερέθισμα για όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς στην προσπάθεια τους να αντιστοιχίσουν την διαθέσιμη παροχή οξυγόνου με τις απαιτήσεις των ιστών. Η έλλειψη οξυγόνου ή υποξία στους ιστούς μπορεί να οφείλεται σε πληθώρα καταστάσεων όπως διαταραχές της καρδιάς, των πνευμόνων, της αιμοποίησης ή του κυκλοφορικού συστήματος. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της κατάστασης οι βλάβες στα κύτταρα και τους ιστούς μπορεί να είναι μόνιμες (30). Η υποξία ενεργοποιεί έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για την κυτταρική και ιστική προσαρμογή στις χαμηλές συνθήκες οξυγόνου. Εάν η απόκριση αυτή δεν είναι επιτυχής τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση.

Κεντρικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ομοιοστάση του οξυγόνου έχει ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1 (Hypoxia-Inducible

Factor 1). Ο HIF1 είναι ετεροδιμερές και έχει τρεις υπότυπους. Αποτελείται από την υπομονάδα α η οποία έχει 3 ισομορφές (HIF1α, HIF2α, HIF3α) και την υπομονάδα β (HIF1β). Οι κύριοι υπότυποι που μεσολαβούν την απάντηση στην υποξία είναι οι HIF1α και HIF2α οι οποίοι είναι κατά 48% δομικά όμοιοι και έχουν διακριτούς παθοφυσιολογικούς ρόλους και διαφορετικά μοτίβα έκφρασης (31). Ο HIF1α εκφράζεται σε όλα τα όργανα και στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και ρυθμίζει την αρχική απόκριση του οργανισμού στην υποξία ενώ ο HIF2α εντοπίζεται σε όργανα και ιστούς με έντονη αγγείωση και η έκφραση του αυξάνει σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας (32). Τα γονίδια-στόχοι του HIF1 συμβάλλουν στην προσαρμογή στις αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου μέσω της συμμετοχής τους σε τέσσερις βασικές διεργασίες: τον έλεγχο του αγγειακού συστήματος, την ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τον μεταβολισμό και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (33).

Σε μοριακό επίπεδο, σε συνθήκες αφθονίας οξυγόνου η υπομονάδα α του HIF1 υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης με αποτέλεσμα την αναγνώριση της από το σύμπλοκο pVHL (von Hippel–Lindau protein)-λιγασών ουβικιτίνης και την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης οξυγόνου, μειώνεται και η υδροξυλίωση της υπομονάδας α με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ουβικιτινωθεί και να αποικοδομηθεί. Αντίθετα η υπομονάδα α συνδέεται με την υπομονάδα β προς σχηματισμό του ετεροδιμερούς το οποίο μετακινείται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση πληθώρας γονιδίων στόχων. Το σύμπλοκο των 2 υπομονάδων του HIF1 εντοπίζεται και σε ασθενείς με σύνδρομο von Hippel–Lindau το οποίο προκαλείται από απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης pVHL (34). (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του οξυγόνου. Από βιβλιογραφική αναφορά (34).

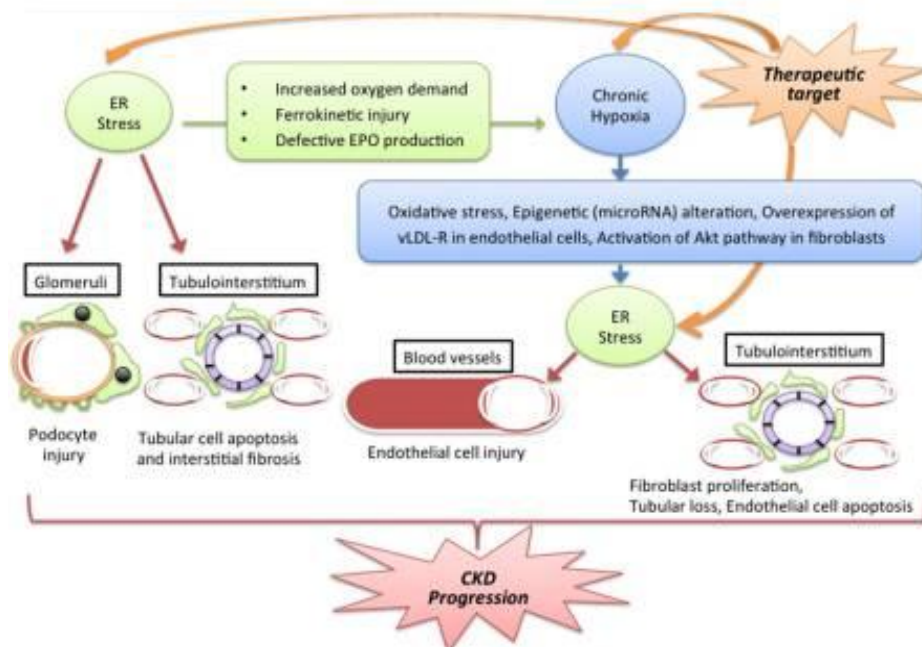
1.6.3 Αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών ER stress και υποξίας στην Χρόνια Νεφρική Νόσο

Η χρόνια υποξία είναι ένας κοινός παθογενετικός παράγοντας της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου ο οποίος ενεργοποιεί άλλες παθολογικές εκδηλώσεις όπως το οξειδωτικό στρες και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (35).

Το προκαλούμενο από την υποξία κυτταρικό στρες οδηγεί τα κύτταρα σε παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και οξειδωτικό στρες. Οι ROS παράγονται σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου συμπεριλαμβανομένου και του ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι η αλλαγή της ομοιόστασης του οξυγόνου στο οργανίδιο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ER stress. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υποξία οδηγεί σε

ενεργοποίηση του άξονα PERK/eIF2α/ATF4 του UPR μέσω της κινάσης Akt (36). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η «συνομιλία» μεταξύ των 2 αυτών μονοπατιών ρυθμίζεται και επιγενετικά καθώς το microRNA miR-205 που εκφράζεται κυρίως στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα διατηρεί την ομοιοστασία τους ρυθμίζοντας την έκφραση του επαγόμενου από την υποξία PHD1 (Prolyl hydroxylase 1) ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζει αρνητικά τον HIF1α και τον ATF4 (37) (Εικόνα 7).

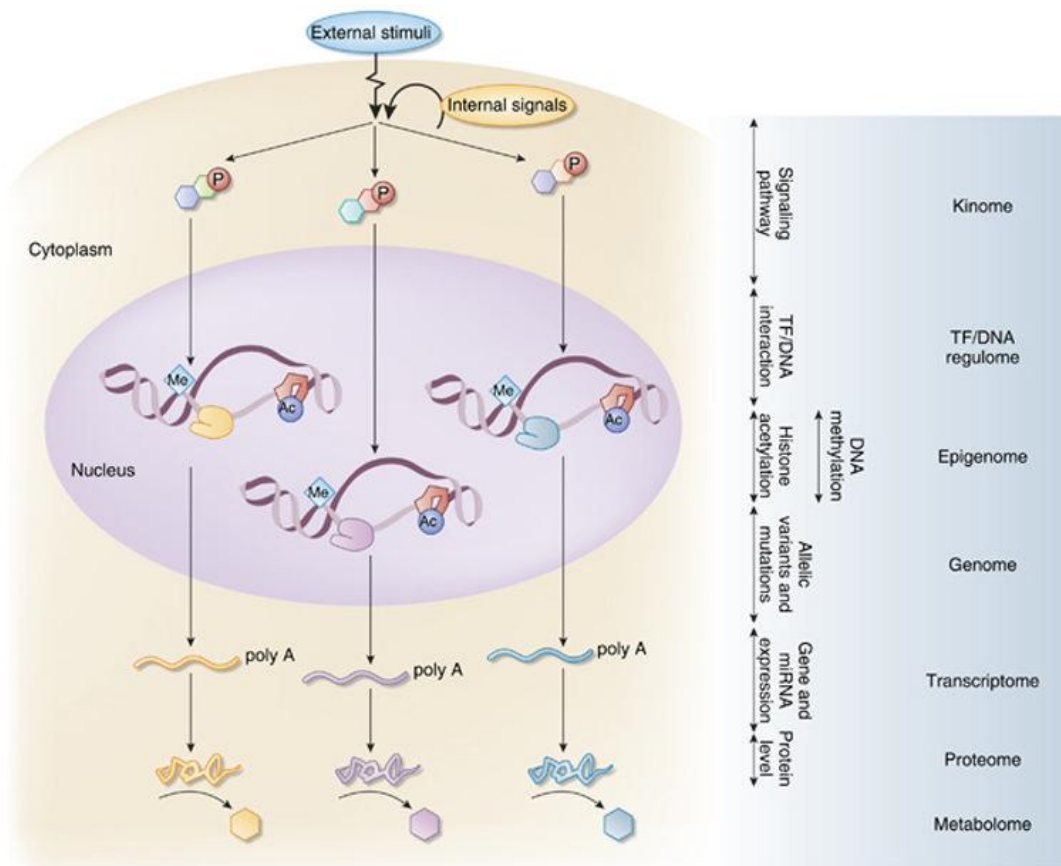
Από την άλλη πλευρά, έρευνες έχουν δείξει ότι το ER stress καταστέλλει την παραγωγή της ορμόνης ερυθροποιητίνης (Erythropoietin, EPO) η οποία ρυθμίζεται από τον HIF1α και συμβάλλει στην αλλαγή της κινητικής του σιδήρου μέσω επαγωγής της εψιδίνης μιας σιδηρορυθμιστικής ορμόνης η οποία ρυθμίζεται από την φλεγμονώδη απόκριση (38,39) (Εικόνα 7). Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι το ER stress σχετίζεται με την αιμοποίηση και τον μεταβολισμό του σιδήρου άρα και με την υποξία μεσολαβώντας τη δημιουργία αναιμίας χρόνιας νόσου.



Εικόνα 7: Υποθετικό δίκτυο αλληλεπίδρασης υποξίας και ER stress κατά την πρόοδο της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου. Από βιβλιογραφική αναφορά (35).

1.7 Εφαρμογές της Βιολογίας Συστημάτων στη μελέτη της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Η Βιολογία Συστημάτων είναι η μελέτη της βιολογίας ως ολοκληρωμένο σύστημα γενετικών, πρωτεϊνικών, μεταβολικών και βιοσυνθετικών δράσεων, οι οποίες βρίσκονται σε αλληλεξάρτηση και συνδιακύμανση. Σημαντικά πεδία της βιολογίας συστημάτων είναι η γονιδιωματική (Genomics) που μελετά το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού, η μεταγραφωματική (Transcriptomics) που είναι η μελέτη του συνόλου των mRNA τα οποία παράγονται σε ένα κύτταρο ή είδος κυττάρων ή οργανισμό και η πρωτεωμική (Proteomics) που μελετά το σύνολο των πρωτεϊνών και πεπτιδίων τα οποία κωδικοποιούνται και παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού (40) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων και οι αντίστοιχες κυτταρικές διεργασίες που μελετούν. Από βιβλιογραφική αναφορά (41).

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική πάθηση με επιδημιολογία που ποικίλλει και συμπτώματα τα οποία πολλές φορές εμφανίζονται μόνο στα πολύ εξελιγμένα στάδια της νόσου. Εξαιτίας αυτού, είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση της νόσου αλλά και αποτελεσματικών θεραπειών (19,42).

Πολλές παθήσεις των νεφρών όπως η διαβητική νεφροπάθεια, η IgA νεφροπάθεια, η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, η νεφρίτιδα του λύκου αλλά και η νεφρική ίνωση έχουν μελετηθεί με προσεγγίσεις βιολογίας συστημάτων τόσο σε δείγματα ανθρώπων όσο και σε ζωικά μοντέλα για τις παθήσεις αυτές. Ειδικά η πρωτεωμική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για την εύρεση βιοδεικτών τόσο για την χρόνια όσο και για την οξεία νεφρική νόσο και έχει εφαρμοστεί σε ιστό, ούρα αλλά και εξωσώματα των ούρων (41,43).

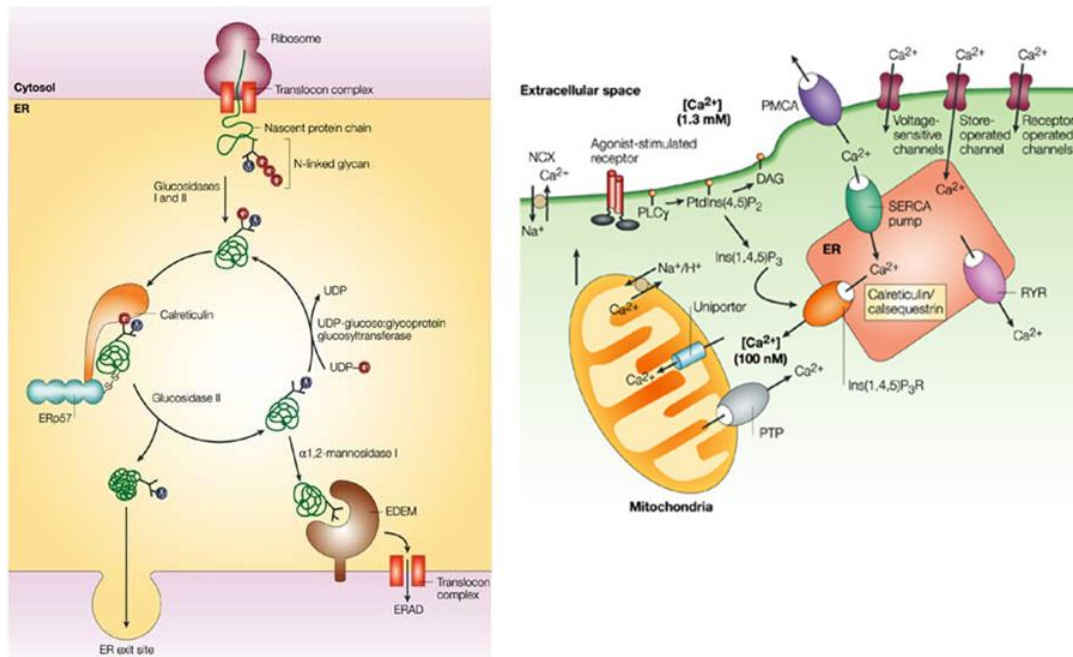
Στα πλαίσια της κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις νεφρικές παθήσεις στο εργαστήριο μας έχει εφαρμοστεί πρωτεωμική και μεταγραφωματική ανάλυση στο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης του ουρητήρα (Unilateral Ureteric Obstruction, UUO). Η πρωτεωμική ανάλυση εφαρμόστηκε σε νεφρικό φλοιό αρουραίων που είχαν υποστεί UUO και οδήγησε στην ταυτοποίηση της calreticulin ως μόριο που συμμετέχει στην εξέλιξη της ίνωσης (44) ενώ η μεταγραφωματική ανάλυση στο ίδιο μοντέλο αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές αλλαγές τόσο σε mRNAs που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες αλλά και σε μη κωδικά RNA (Long Non Coding RNAs) (45). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σε μια προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης της calreticulin και των πρωτεϊνών που αυτή επηρεάζει παρουσιάζονται μεταξύ άλλων και αποτελέσματα από την πρωτεωμική ανάλυση που εφαρμόστηκε σε κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν calreticulin.

1.8 Η πρωτεΐνη calreticulin

Η calreticulin, με μοριακό βάρος 46 kDa, είναι μια πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου η οποία δεσμεύει το ασβέστιο και δρα σαν πρωτεΐνη-συνοδός (chaperone). Αν και η calreticulin διαθέτει μια ειδική πεπτιδική αλληλουχία υπεύθυνη για την παραμονή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, έχει βρεθεί στην επιφάνεια μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων.

Σαν πρωτεΐνη-συνοδός, δεσμεύεται στις πρωτεΐνες που μόλις συνετέθησαν συμμετέχοντας στη σωστή αναδίπλωσή τους και προλαμβάνοντας τη συσσώρευσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Σαν ρυθμιστής της ομοιόστασης του ασβεστίου, δεσμεύει μεγάλες ποσότητες ασβεστίου, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του ER και επιδρά στην ικανότητα του ER για αναδίπλωση των πρωτεϊνών (46) (Εικόνα 9).

Η αποκάλυψη του σημαντικού ρόλου και των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών της calreticulin προήλθε από την κατασκευή κυτταρικών σειρών και ζώων με έλλειψη της πρωτεΐνης. Η κατασκευή knockout ποντικού για το γονίδιο της calreticulin αποτέλεσε την πρώτη αναφορά απάλειψης μιας πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου σε ζωντανό οργανισμό. Το πιο αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό των ποντικών αυτών είναι ότι πεθαίνουν κατά το εμβρυϊκό στάδιο λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, γεγονός που υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία της calreticulin για την ανάπτυξη της καρδιάς (47). Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην καρδιά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ενώ η έκφρασή της στην ώριμη καρδιά μετά τη γέννηση μειώνεται αισθητά. Σε επίπεδο κυτταρικών σειρών η έλλειψη της πρωτεΐνης έχει λιγότερο σοβαρές συνέπειες, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιζήσουν και να μεγαλώνουν με κανονικούς ρυθμούς ανάπτυξης. Ωστόσο, η απάλειψη ή υπερέκφραση της calreticulin σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει συσχετίσει την πρωτεΐνη με τη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η απόπτωση, η ανοσολογική απόκριση, η κυτταρική προσκόλληση και η μετανάστευση (48–52).



Εικόνα 9: Οι ρόλοι της calreticulin στο κύτταρο ως πρωτεΐνη-συνοδός (αριστερά) και ρυθμιστής της ομοιόστασης του ασβεστίου (δεξιά). Από βιβλιογραφική αναφορά (52).

1.9 Οι πρωτεΐνες 14-3-3

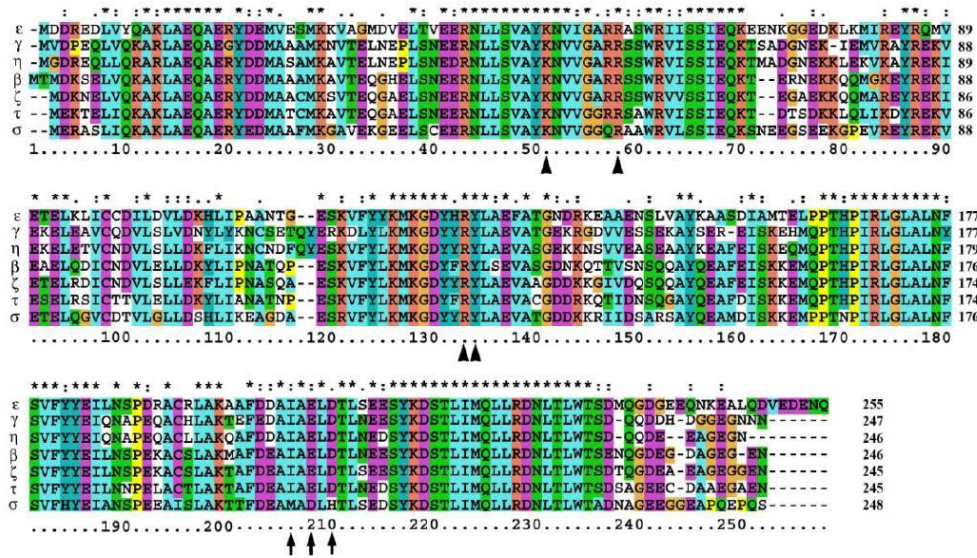
Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι μία οικογένεια, συντηρημένων κατά την εξέλιξη, όξινων πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 28-33 kDa που εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το όνομά τους προέρχεται από το πρότυπο μετανάστευσής τους στη χρωματογραφία DEAE (διαιθυλαιθανολαμίνη) - κυτταρίνης και την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αμύλου. Εκλούνται από το 14ο κλάσμα ομογενοποιημένου βόειου εγκεφάλου και βρίσκονται στις θέσεις 3.3 στην ηλεκτροφόρηση (53).

Στα θηλαστικά η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών αποτελείται από επτά ισομορφές οι οποίες κωδικοποιούνται από επτά διαφορετικά γονίδια και συμβολίζονται με τα γράμματα β, γ, ε, ζ, η, σ και τ με τα γονίδια τους να συμβολίζονται ως YWHAB, YWHAG, YWHAΕ, YWHAZ, YWHAH, YWHAS και YWHAQ αντίστοιχα. Τα γονίδια πήραν την ονομασία τους από τις υδροξυλάσες της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης (Tyrosin and Tryptophan Hydroxylase Activators, YWHA) που ήταν οι πρώτοι πρωτεϊνικοί στόχοι των

14-3-3 που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία (54). Η ισομορφή σ ονομάζεται επίσης και stratifin ενώ οι φωσφορυλιωμένες μορφές των ισομορφών συμβολίζονται και με τα γράμματα α και δ αντίστοιχα. Στα φυτά έχουν περιγραφεί έως και 15 ισομορφές ενώ 2 ισομορφές έχουν βρεθεί στη ζύμη, στη *Drosophila melanogaster*, και στην *Caenorhabditis elegans* (55–57).

Όλες οι 14-3-3 πρωτεΐνες είναι υψηλά συντηρημένες με ομολογία στην αλληλουχία τους σχεδόν 50% τόσο μεταξύ ίδιων όσο και μεταξύ διαφορετικών οργανισμών (Εικόνα 10). Δεν είναι πλήρως κατανοητό γιατί τα κύτταρα χρειάζονται τόσες ισομορφές μιας πρωτεΐνης με τόσο υψηλή ομοιότητα και ο υποκείμενος μηχανισμός μέσω του οποίου εκφράζονται διαφορετικά οι ισομορφές δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Η έκφραση των ισομορφών στα κύτταρα, στους ιστούς και στα όργανα διαφέρει και οι υποκείμενοι μηχανισμοί ρύθμισης των επιπέδων τους στα κύτταρα εξακολουθούν να είναι ελάχιστα κατανοητοί. Μέχρι σήμερα, δεν έχει μελετηθεί στα θηλαστικά η συνολική απάλειψη όλων των μελών της οικογένειας, παρά μόνο στη ζύμη όπου το knock out και των 2 ισομορφών των πρωτεϊνών 14-3-3 έχει θνησιγενές αποτέλεσμα (58,59). Ωστόσο, απάλειψη ορισμένων μόνο ισομορφών ή συνδυασμών τους σε ποντίκια έχουν δώσει φαινότυπους που σχετίζονται με ελλιπή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και αλλαγές στη λειτουργία των μελανοκυττάρων. (60–62).

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα πρωτεϊνικών στόχων, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και να δημιουργούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Περισσότερες από 200 πρωτεΐνες έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία ως προσδέτες των 14-3-3. Εξαιτίας της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, ο κυτταρικός μεταβολισμός και η απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA (63).

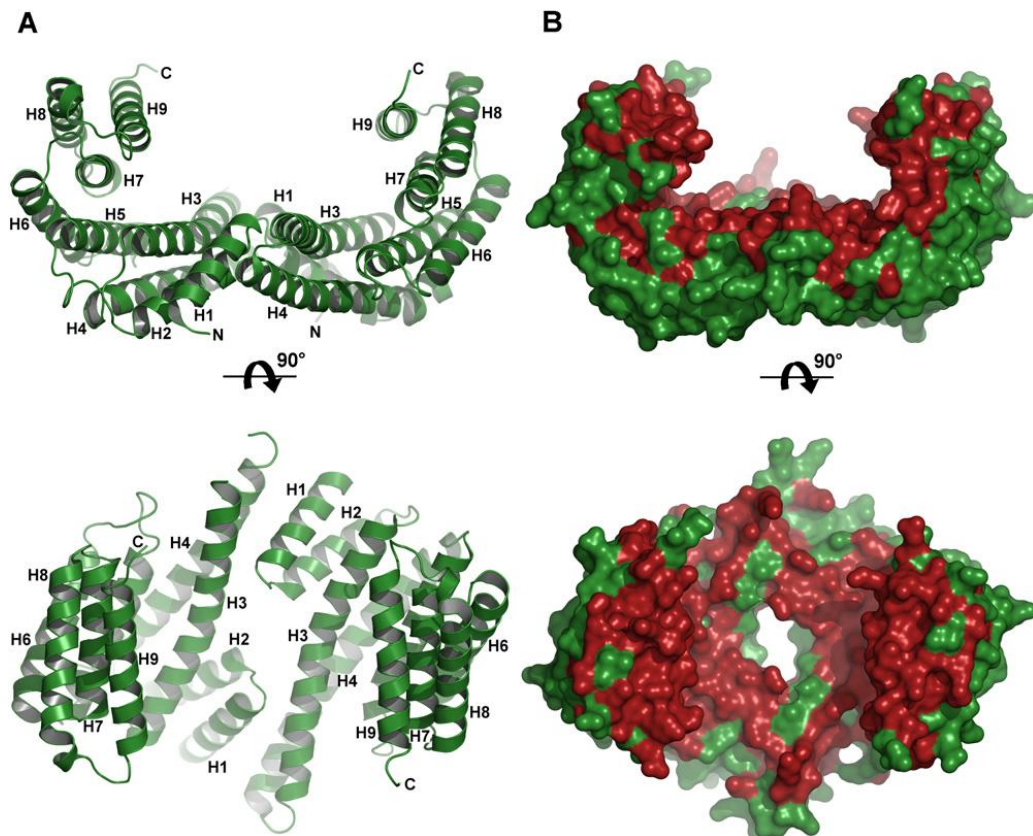


Εικόνα 10: Ευθυγράμμιση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση των 14-3-3 ισομορφών στον άνθρωπο. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι παρόντα σε όλες τις ισομορφές, οι κεφαλές των βελών δείχνουν τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στη σύνδεση των 14-3-3 με τους προσδέτες τους ενώ τα βέλη δείχνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι παρόντα μόνο στην ισομορφή 14-3-3σ. Από βιβλιογραφική αναφορά (64).

1.9.1 Δομή των 14-3-3 πρωτεϊνών

Οι 14-3-3 είναι διμερείς και ιδιαίτερα ελικοειδείς πρωτεΐνες. Το κάθε μονομερές αποτελείται από 9 αντιπαράλληλες α-έλικες (H1-H9). Η κοίλη επιφάνεια του μονομερούς, που σχηματίζεται από τις α-έλικες H3, H5, H7 και H9, εμφανίζει μία αύλακα μέσα στην οποία δεσμεύεται ο πρωτεϊνικός στόχος. Οι 14-3-3 πρωτεΐνες σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή, με εξαίρεση τη ισομορφή σ που σχηματίζει μόνο ομοδιμερή. Το διμερές μόριο

έχει άκαμπτο κυπελλοειδές σχήμα με ένα μεγάλο κεντρικό κανάλι. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που συνθέτουν το κανάλι αυτό εμφανίζουν υψηλή συντήρηση μεταξύ των ισομορφών (Εικόνα 11). Στα διμερή μόρια των 14-3-3 τα αμινοξικά κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου δεν εμφανίζουν υψηλή συντήρηση μεταξύ των ισομορφών και είναι υπεύθυνα για τον διμερισμό των 14-3-3 πρωτεϊνών. Ομοίως, τα καρβοξυτελικά άκρα εμφανίζουν και αυτά μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ισομορφών και λειτουργούν ως αναστολείς της αλληλεπίδρασης με ακατάλληλο πρωτεϊνικό στόχο (63,65,66). Για την επίτευξη των βιολογικών τους δράσεων, οι πρωτεΐνες 14-3-3 αναγνωρίζουν μοτίβα του πρωτεϊνικού στόχου πάνω στα οποία δεσμεύονται. Τα μοτίβα δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι τα RSXpSXP και RXXXpSXP όπου R είναι η αργινίνη, S η σερίνη, X οποιοδήποτε αμινοξύ, pS η φωσφοσερίνη η οποία μπορεί να αντικατασταθεί και από φωσφοθρεονίνη (pT) και P η προλίνη. Πολλές πρωτεΐνες-στόχοι των 14-3-3 εμφανίζουν δυο μοτίβα δέσμευσης με αποτέλεσμα η συγγένεια τους με τις 14-3-3 να αυξάνει έως και 30 φορές σε σχέση με τις πρωτεΐνες με ένα μοτίβο δέσμευσης. Στην περίπτωση αυτή, το ένα μοτίβο λειτουργεί ως επικρατούσα θέση ρύθμισης που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση στις πρωτεΐνες 14-3-3 και το άλλο λειτουργεί ως δευτερογενής θέση, μικρότερης συγγένειας που είναι απαραίτητη για την πλήρη βιολογική δραστικότητα. Εκτός από την δέσμευση φωσφοπεπτιδίων έχει τεκμηριωθεί σύνδεση των 14-3-3 πρωτεϊνών και με μη φωσφορυλιωμένους στόχους οι οποίοι προσδέονται στην ίδια θέση με τα φωσφοπεπτίδια εμφανίζοντας πολλές φορές ανταγωνιστική δράση (63,67).



Εικόνα 11: Δομή των 14-3-3 πρωτεϊνών. Α. Αναπαράσταση δομής α -ελίκων Β. Αναπαράσταση δομής επιφάνειας. Τα συντηρημένα αμινοξέα εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Από βιβλιογραφική αναφορά (63).

1.9.2 Μηχανισμός δράσης 14-3-3 πρωτεϊνών

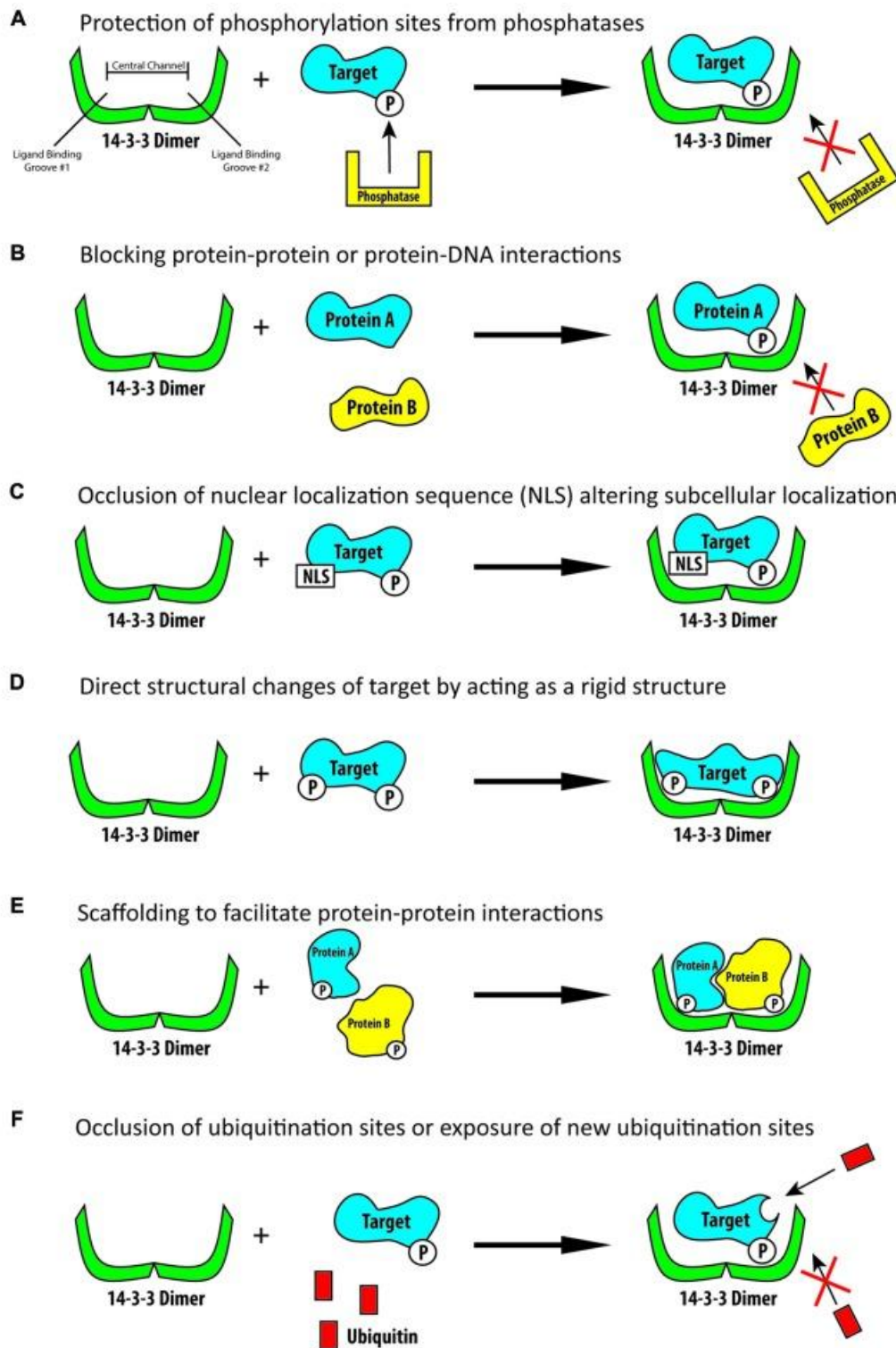
Οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών δράσης οι οποίοι ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου, αποκλεισμός αλληλουχιών ή δομικών χαρακτηριστικών του πρωτεϊνικού στόχου και διευκόλυνση της γειννίας και της αλληλεπίδρασης δυο πρωτεϊνικών στόχων (63).

Ένας από τους πιο γνωστούς ρυθμιστικούς ρόλους των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η ικανότητα τους να καλύπτουν φυσικά τις φωσφορυλιωμένες θέσεις των στόχων τους εμποδίζοντας έτσι τη δράση των φωσφατασών και την αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών-στόχων (Εικόνα 12Α). Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι επίσης σε θέση να μπλοκάρουν φυσικά συγκεκριμένες αλληλουχίες ή

δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών-στόχων τους όπως για παράδειγμα θέσεις αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών ή θέσεις αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών (Εικόνα 12B). Μια άλλη δυνατότητα των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η αλλαγή του υποκυτταρικού εντοπισμού των προσδετών τους (Εικόνα 12C). Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αυτής της λειτουργίας είναι η δέσμευση του ενζύμου CDC25C που είναι σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Μέσω της δέσμευσης αυτής, έχει βρεθεί ότι οι 14-3-3 μπορούν να περιορίσουν το CDC25C στο κυτταρόπλασμα διακόπτοντας έτσι τη λειτουργία του και μεταβάλλοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (68). Οι πρωτεΐνες 14-3-3 μπορούν επίσης να τροποποιήσουν τη δομή του πρωτεϊνικού στόχου τους δρώντας ως «μοριακοί άκμονες» καθώς οι ίδιες κατά την αλληλεπίδραση αυτή παραμένουν άκαμπτες. Η αναδιοργάνωση του πρωτεϊνικού στόχου επιτρέπει την σύνδεση του με τρίτες πρωτεΐνες αυξάνοντας τη συγγένειά του με αυτές (Εικόνα 12D). Με παρόμοιο τρόπο οι πρωτεΐνες 14-3-3 μπορούν να δράσουν ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες οι δύο πρωτεϊνικοί στόχοι πλησιάζουν ο ένας τον άλλο (Εικόνα 12E). Ένας τρόπος με τον οποίο είναι σε θέση να το επιτύχουν αυτό είναι η σύνδεση καθενός από τους δυο πρωτεϊνικούς στόχους πάνω σε ένα μονομερές. Μια άλλη διεργασία που είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από τις 14-3-3 είναι η ουβικιτινίωση και επομένως η επακόλουθη αποικοδόμηση των στόχων τους (Εικόνα 12F). Οι 14-3-3 μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν την ουβικιτινίωση των στόχων τους είτε με παρεμπόδιση των αντίστοιχων θέσεων, είτε με από-ουβικιτινίωση των στόχων τους, είτε με αλλαγή της διαμόρφωσης του στόχου ώστε να αποκαλυφθούν περισσότερες θέσεις ουβικιτινίωσης (63,66).

Εξαιτίας, της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών και σε απάντηση σε διαφορετικά

ερεθίσματα, ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των πιο γνωστών λειτουργιών της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών. Από βιβλιογραφική αναφορά (66).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος είναι το τελικό αποτέλεσμα των περισσότερων νεφρικών και ορισμένων συστηματικών παθήσεων και η εξέλιξη της οφείλεται κυρίως ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης. Καθώς η Χρόνια Νεφρική Νόσος είναι μια πολυπαραγοντική διεργασία θα πρέπει να μελετάται με προσεγγίσεις Βιολογίας Συστημάτων οι οποίες επιτρέπουν μια ολιστική μελέτη των παραγόντων, μακρομορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου.

Η πρωτεωμική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας του ΙΙΒΕΑΑ στο μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης του ουρητήρα οδήγησε στην ταυτοποίηση της calreticulin η οποία είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η calreticulin υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της ινωτικής διεργασίας κυρίως στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα (44). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα επάγει την απόκτηση προ-ινωτικού φαινοτύπου από τα κύτταρα αυτά. (51).

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση του πρωτεωμικού προφίλ των κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin, η ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία ανάπτυξης της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου και η εξέταση των πιθανών βιολογικών οδών μέσω των οποίων λαμβάνουν χώρα τα φαινόμενα αυτά.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργειες κυττάρων

2.1.1 Κυτταρική σειρά Human Kidney 2 (HK-2)

Η κυτταρική σειρά HK-2 (American Type Culture Collection) είναι μια σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων εγγύς σωληναρίου φυσιολογικού ενήλικου ατόμου. Τα κύτταρα αυτά διατηρούν το φαινότυπο και τα περισσότερα λειτουργικά χαρακτηριστικά καλά διαφοροποιημένων εγγύς σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι από κυτταρικές σειρές HK-2 με σταθερή υπερέκφραση ή υποέκφραση calretuculin οι οποίες δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφική αναφορά (51). Συνοπτικά, η κυτταρική σειρά HK-2 καλλιεργήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό το οποίο αποτελούνταν από DMEM περιεκτικότητας 4.5% σε γλυκόζη, αναμειγμένο με ίση ποσότητα F12 και συμπληρωμένο με 10% FBS, 2mM L-glutamine και 100 mg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό συμπληρωνόταν επίσης με 100 mg/mL υγρομυκίνη στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς με υπερέκφραση calreticulin ή 2 mg/mL πουρομυκίνη στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς με υποέκφραση calreticulin.

Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm², σε συνολικό όγκο θρεπτικού υλικού 7 ml, ενώ ανακαλλιεργήθηκαν όταν ο κυτταρικός πληθυσμός κάλυψε την επιφάνεια της φλάσκας σε ποσοστό περίπου 80%. Για την ανακαλλιέργεια, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 1-2 ml διαλύματος θρυψίνης στους 37°C για 3-5 λεπτά, ώστε να ξεκολλήσουν από την επιφάνειά της. Ακολούθησε προσθήκη διπλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού με FBS για την

απενεργοποίηση της θρυψίνης, μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε falcon των 15 ml και φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκε σε νέες φλάσκες.

2.1.2 Κυτταρική σειρά Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T)

Η κυτταρική σειρά HEK293T (American Type Culture Collection) είναι μια σειρά ανθρώπινων εμβρυικών επιθηλιακών κυττάρων η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ρετροϊών, την έκφραση γονιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών.

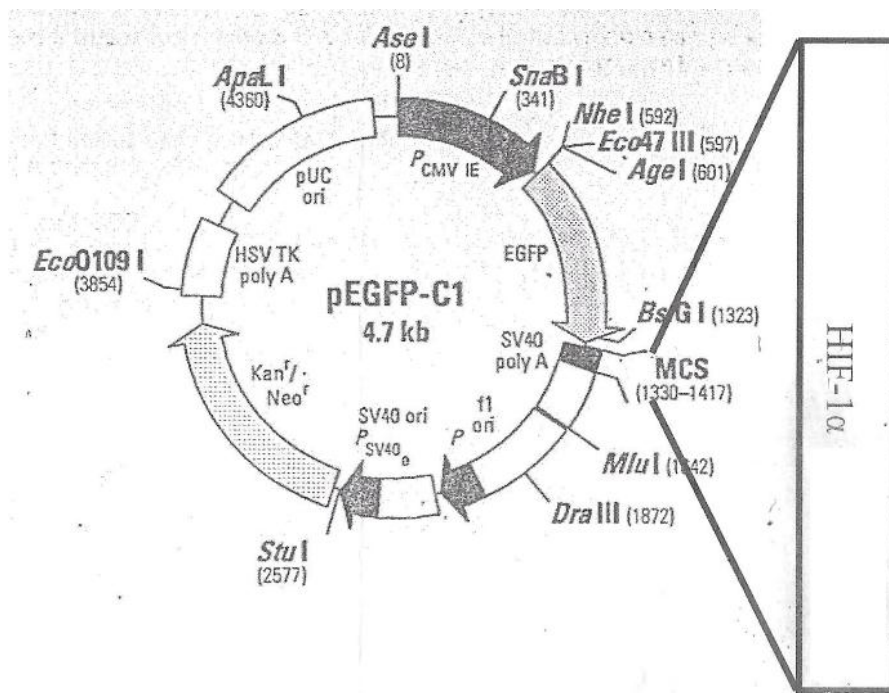
Η κυτταρική σειρά HEK293T καλλιεργήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό το οποίο αποτελούνταν από DMEM περιεκτικότητας 4.5% σε γλυκόζη και συμπληρωμένο με 10% FBS, 2mM L-glutamine και 100 mg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm², σε συνολικό όγκο θρεπτικού υλικού 7 ml, ενώ ανακαλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.

2.1.2.1 Διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του γονιδίου HIF1α

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης του HIF1α (Εικόνα 13) μας χορηγήθηκε από τον Καθηγητή Γεώργιο Σίμο (Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293T πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Πριν τη διαδικασία της διαμόλυνσης, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειας σε πιάτο των 6 θέσεων και καλλιεργήθηκαν για 16-20 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1.

Το προς διαμόλυνση πλασμιδιακό DNA αναμείχθηκε με 100 μl Optimem (Invitrogen) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Επιπλέον, 2 μl λιποφεκταμίνης αναμείχθηκαν με 100 μl Optimem και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, το μείγμα του DNA προστέθηκε, σταδιακά στο μείγμα της λιποφεκταμίνης και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με 500 μl Optimem/well και μετά την προσθήκη 800 μl Optimem σε κάθε well, προστέθηκε το σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4-5 ώρες στους 37°C σε 5% CO₂ ώστε να προσλάβουν το πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό διαμόλυνσης αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε με το θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς HEK293T. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες στις συνθήκες ανάπτυξής τους και στη συνέχεια συλλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 13: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης του HIF1α

2.1.3 Πρωτογενή νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα

Τα πρωτογενή νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα (Primary Tubular Epithelial Cells, pTECs) απομονώθηκαν από νεφρά αρσενικών C57BL/6 ποντικών ηλικίας 8-12 εβδομάδων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην βιβλιογραφική αναφορά (69) κατάλληλα τροποποιημένο. Εν συντομία, απομονώθηκαν ολόκληροι οι νεφροί από τα ζώα και αφαιρέθηκε η ινώδης κάψουλα. Στη συνέχεια ο ιστός τεμαχίστηκε και επώαστηκε σε 1 mg/ml κολλαγενάσης (Invitrogen) για 3 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως, ο ιστός φορτώθηκε σε φίλτρο κυττάρων 70 μm (Fisherscientific), έσπασε με τη βοήθεια ενός εμβόλου σύριγγας και ξεπλύθηκε από το φίλτρο με πλήρες θρεπτικό υλικό (RPMI 1640, συμπληρωμένο με 10% FBS και 100 mg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) σε falcon των 15ml. Το κυτταρικό μίγμα που περιείχε σωληνάρια και σπειράματα ανακινήθηκε ήπια και διήλθε μέσω φίλτρου κυττάρων 40 μm (Fisherscientific) το οποίο παρεμπόδισε την διέλευση των σπειραμάτων και επέτρεψε τη διέλευση των σωληναρίων. Το νέο κυτταρικό μίγμα φυγοκεντρήθηκε, επαναδιαλύθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm². Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως 1 εβδομάδα με αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού κάθε 3 ημέρες.

2.1.3.1 Καλλιέργεια κυττάρων pTECs σε συνθήκες υποξίας

Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειας σε πιάτο των 6 θέσεων και καλλιεργήθηκαν για 16-20 ώρες. Πριν την επαγωγή της υποξίας τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 2% FBS (RPMI 1640, 2% FBS, 100 mg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) για 2 ώρες. Για την επαγωγή της υποξίας τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 75% v/v ορυκτέλαιο (mineral oil) για 1 ώρα. Ακολούθως ξεπλύθηκαν με θρεπτικό υλικό για την απομάκρυνση της περίσσειας του ορυκτελαίου και

συλλέχθηκαν για περαιτέρω αναλύσεις. Ως αρνητικός μάρτυρας μελετήθηκαν κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

2.2 Πρωτεωμική ανάλυση

Πρωτεωμική ανάλυση ονομάζεται η μεγάλης κλίμακας μελέτη της έκφρασης, της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα οργανισμό, σε ένα όργανο, σε μια κυτταρική σειρά ή σε ένα βιολογικό υλικό σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Η μελέτη του πρωτεώματος περιλαμβάνει επίσης τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που λαμβάνουν χώρα με την πάροδο του χρόνου καθώς και το κατά πόσο αυτές επηρεάζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μιας παθολογικής διαδικασίας (70).

2.2.1 Απομόνωση και προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος

Η απομόνωση πρωτεϊνών για την πρωτεωμική ανάλυση έγινε από δύο ξεχωριστούς κλώνους ελέγχου (control) και δυο κλώνους που υπερέκφραζαν σταθερά calreticulin σε παρόμοια επίπεδα. Από κάθε κλώνο αναλύθηκαν δυο βιολογικές και δυο τεχνικές επαναλήψεις.

Τα κύτταρα, ομογενοποιήθηκαν με προσθήκη διαλύματος λύσης (sample buffer, SB) το οποίο περιελάμβανε 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 1%DTE, 2% Bio-Lyte 3/10 Ampholytes και διπλά απιονισμένο νερό. Σε κάθε κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 250 μL διαλύματος λύσης μαζί με μείγμα αναστολέων πρωτεασών σε αναλογία 1:25 προς το διάλυμα λύσης. Το μίγμα διαλυτοποιήθηκε με διαδοχικές αναρροφήσεις της πιπέτας και με έντονη ανατάραξη. Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων με υπέρηχους για 15 λεπτά και, στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 rpm, στους 4°C.

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής

Coomassie Brilliant Blue G-250 από τα 465 nm στα 595 nm όταν δεσμεύεται σε πρωτεΐνες σε όξινο διάλυμα. Αρχικά κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με βάση διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης BSA. Στη συνέχεια από κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα άγνωστης συγκέντρωσης λήφθηκαν 2μL, τοποθετήθηκαν σε κυβέττα που περιείχε 1 mL 1x διαλύματος χρωστικής BIORAD protein assay και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 595 nm στο φωτόμετρο SmartSpec Plus (BioRad). Η συγκέντρωση τους υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη. Για τον πρωτεϊνικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από το κάθε δείγμα.

2.2.2 Πρωτεϊνικός Διαχωρισμός

Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός έγινε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2 dimensional electrophoresis, 2-DE) η οποία περιελάμβανε στην πρώτη διάσταση την ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric Focusing, IEF) και, στη δεύτερη την ηλεκτροφόρηση βάσει μοριακού βάρους.

Η IEF έγινε με τη χρήση ταινιών ακινητοποιημένης κλίσης pH 3-10, 7cm (Immobilized pH Gradient, IPG), οι οποίες διατηρούνταν στους -20°C. Η κάθε ταινία τοποθετήθηκε σε ειδικό σκαφίδιο στο οποίο φορτώθηκε ολικός όγκος διαλύματος 125 μL. Το διάλυμα αυτό περιείχε όγκο δείγματος που αντιστοιχούσε σε 100 μg συμπληρωμένο με διάλυμα λύσης. Η ταινία τοποθετήθηκε στο ειδικό σκαφίδιο με τη θετική άκρη της να βρίσκεται στο θετικό πόλο του σκαφιδίου. Στη συνέχεια, το σκαφίδιο τοποθετήθηκε στο μηχάνημα BIORAD PROTEAN IEF cell και εφαρμόστηκε το πρόγραμμα: χωρίς ενυδάτωση, θερμοκρασία εστίασης 20°C, βήμα 1/5: 50V-rapid-12 ώρες, βήμα 2/5: 300V-rapid-3 ώρες, βήμα 3/5: 4000V-linear-5 ώρες, βήμα 4/5: 4000V-rapid-12500Vhr, βήμα 5/5: 100V-rapid-48 ώρες, μΑ όριο/gel: 99. Στα τριάντα λεπτά από την έναρξη της IEF, τα δείγματα καλύφθηκαν με λάδι παραφίνης ώστε να μην εξατμιστούν. Στις 12 ώρες, κάτω από τα σημεία επαφής της κάθε ταινίας με τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν υγρά χαρτάκια για να αποφευχθεί η

συσσώρευση αλάτων και κρυστάλλων ουρίας στα ηλεκτρόδια. Οι ταινίες παρέμειναν στο IEF μηχάνημα για 20045 Vhr με μέγιστη τάση $V=2600V$.

Μετά την IEF ακολούθησε η διαδικασία εξισορρόπησης των ταινιών. Κατά τη διαδικασία αυτή, έγινε αναγωγή των πρωτεϊνών με το πρώτο διάλυμα εξισορρόπησης και, αλκυλίωση με το δεύτερο. Το πρώτο διάλυμα εξισορρόπησης αποτελούνταν από 6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, γλυκερόλη 30%(v/v), SDS 2%(v/v) και DTE 0,5%(w/v) (30mM). Το δεύτερο διάλυμα εξισορρόπησης καθώς είναι φωτοευαίσθητο, ετοιμάστηκε και χρησιμοποιήθηκε στο σκοτάδι και αποτελούνταν από 6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, γλυκερόλη 30%(v/v), SDS 2%(v/v) και ιωδοακεταμίδιο IOA 4,32% (w/v) (230mM). Η επώαση των ταινιών στα διαλύματα εξισορρόπησης έγινε με 10 ml από το καθένα, για 10 λεπτά, υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση.

Ο διαχωρισμός βάσει μοριακού βάρους πραγματοποιήθηκε σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου, περιεκτικότητας 12% σε πολυακρυλαμίδιο. Η κάθε ταινία τοποθετήθηκε πάνω από ένα πηκτώμα και, στην κορυφή εφαρμόστηκε αγαρόζη 0.5% σε 1x TGS, η οποία περιείχε κυανό της βρωμοφαινόλης, ώστε να παρακολουθείται το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης κατά την πορεία της. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBS. Έγινε ηλεκτροφόρηση στα 80V για 10 λεπτά και στη συνέχεια στα 180V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα αφαιρέθηκαν και επώαστηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης κατά τη διάρκεια της νύχτας υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση. Το διάλυμα μονιμοποίησης αποτελείται από 30% methanol, 10% acetic acid και 60% διπλά απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε από τα πηκτώματα το διάλυμα μονιμοποίησης και, τα πηκτώματα ξεπλύθηκαν 4 φορές με διπλά απιονισμένο νερό, για 10 λεπτά την κάθε φορά. Τα πηκτώματα εμβαπτίστηκαν το κάθε ένα σε 50 ml χρωστικής Coomassie Colloidal Blue για 2-3 ώρες. Ακολούθησε αποχρωματισμός με διπλά απιονισμένο νερό. Τα δισδιάστατα πηκτώματα σαρώθηκαν με τον σαρωτή BioRad GS800 Calibrated

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

2.2.3 Ανάλυση 2D-πηκτωμάτων και ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Τα πηκτώματα αναλύθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα PDQuest 8 Image Processing Software. Όλα τα πηκτώματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους, έγινε αντιστοίχιση όλων των πρωτεϊνικών κηλίδων και, αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσίαζαν ποσοτική διαφορά 2 φορές, 5 φορές και 10 φορές.

Οι διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες αφαιρέθηκαν από τα πηκτώματα με το χέρι, με τη χρήση ειδικής σύριγγας γεμάτης με διπλά απιονισμένο νερό. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες τοποθετήθηκαν σε δίσκο 96 κυψελίδων (96-well plate) και, σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 200 μl διαλύματος αποχρωματισμού (destain). Το διάλυμα αποχρωματισμού αποτελείται από 30% ACN και 50mM NH_4HCO_3 . Μετά τον αποχρωματισμό, οι κηλίδες ξεπλύθηκαν με 200 μl διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά, επί δύο φορές, σε ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε αναγωγή με 200 μl DTE (15ml ammonium bicarbonate 10mM, 0.023g DTE) για 10 λεπτά, σε ελαφρά ανάδευση και, αλκυλίωση με 200 μl IOA (15ml ammonium bicarbonate 10mM, 0.150g IOA) στο σκοτάδι, σε ελαφρά ανάδευση, για 10 λεπτά. Τα πηκτώματα ξεπλύθηκαν με 200μl διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για αφυδάτωση στο μηχάνημα MAXI DRY PLUS στους 45°C για 20 λεπτά. Στην κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 3μl θρυψίνης 10 ng/μl και ο δίσκος 96 κυψελίδων, αφού πρώτα καλύφθηκε με ταινία παραφίνης (parafilm), τοποθετήθηκε σε υγρό πλαστικό δοχείο για τη

διάρκεια της νύκτας, σε θερμοκρασία δωματίου. Για να προετοιμαστούν οι πρωτεϊνικές κηλίδες για το φασματογράφο μάζας, μετά την ολονύκτια θρυψινοποίηση, προστέθηκαν στην κάθε μια 10 μL διαλύματος εκχύλισης (extraction solution), το οποίο αποτελείται από 50% ακετυλονιτρίλιο και 0.1% TFA για τουλάχιστον 30 λεπτά, σε ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η τεχνική της «ξηράς σταγόνας» (dry droplet technique) κατά την οποία, 1 μl πεπτιδίου από το την κάθε κηλίδα αναμειχθηκε πάνω σε ειδική επιφάνεια (plate, chip) με 1 μL διάλυμα μήτρας (matrix solution) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Το matrix solution περιέχει διάλυμα εκχύλισης, 0.8% α-cyano-4-hydroxycinnamic acid 0.025% (v/v) και για ρύθμιση (calibration) του φασματογράφου, θραύσμα βραδυκινίνης (904 Da) και θραύσμα φλοιοεπινεφριδιοκορτικοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH) (2465 Da). Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας MALDI-TOF/TOF. Στο φασματογράφο μάζας, τα πεπτίδια ιονίστηκαν με Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) και για αναλυτής μάζας χρησιμοποιήθηκε αναλυτής που μετρά το χρόνο πτήσης των ιόντων (time-of-flight, TOF). Οι μάζες των πεπτιδίων μετρήθηκαν αυτόματα, συγκρίθηκαν με τις θεωρητικές μάζες όλων των πρωτεϊνών από όλες τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων και για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος MASCOT. Τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν σε διακομιστή (server) ώστε να είναι διαθέσιμα για μελέτη και επεξεργασία.

2.2.4 Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνών- Δημιουργία πρωτεϊνικών δικτύων

Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε κατηγορίες με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος UniProt (Universal Protein Resource) (71). Έγινε αναζήτηση της κάθε πρωτεΐνης βάσει του κωδικού πρόσβασης (accession) που δόθηκε από το MALDI-TOF/TOF και, αξιολογήθηκαν, κυρίως, οι

λειτουργίες της κάθε πρωτεΐνης και η οντολογία των γονιδίων τους (Gene Ontology).

Για τη δημιουργία πρωτεϊνικών δικτύων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (72) στο οποίο καταχωρήθηκαν ταυτόχρονα όλες οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες με τον κωδικό πρόσβασής τους.

2.3 Ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων

Η χρήση ζωικών προτύπων στην έρευνα είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της φυσιολογίας, της παθοφυσιολογίας και την ανάπτυξη θεραπειών. Η έρευνα σε ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων και χρόνιας νεφρικής νόσου βοήθησε στην κατανόηση θεμελιωδών εννοιών της βιολογίας των νεφρών καθώς και στη μελέτη των παθήσεων των νεφρών αλλά και των νεφρικών εκδηλώσεων συστηματικών νοσημάτων. Σε επίπεδο βασικής έρευνας, τα ζωικά μοντέλα χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση νέων μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών ανάπτυξης ασθενειών αλλά και για την δοκιμή πιθανών νέων θεραπειών.

Η ηθική χρήση των ζώων απαιτεί λεπτομερή κατανόηση των δυνατοτήτων και των περιορισμών κάθε είδους και μοντέλου νόσου και τον τρόπο με τον οποίο τα ευρήματα μπορούν να μεταφραστούν στον άνθρωπο (73).

2.3.1 Μοντέλο μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης

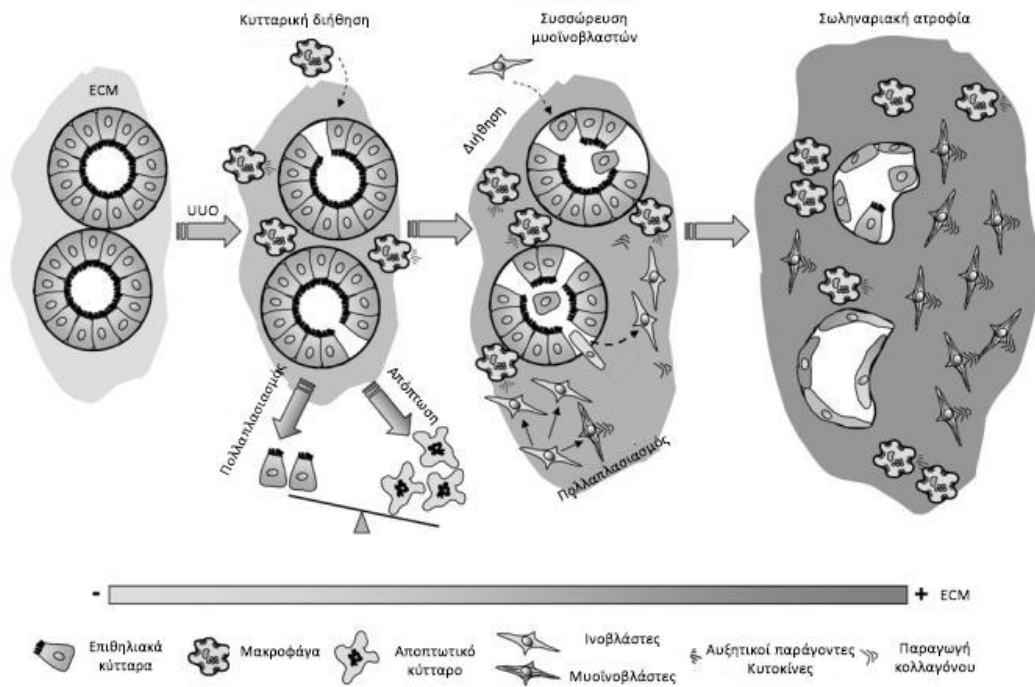
Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα για τη μελέτη κυρίως της νεφρικής ίνωσης είναι το μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα (Unilateral Ureteric Obstruction, UUO). Χαρακτηρίζεται από οξεία και πλήρη απόφραξη του ουρητήρα η οποία έχει ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτες μεταβολικές και αιμοδυναμικές μεταβολές που οδηγούν σωληναριακή βλάβη και κυτταρικό θάνατο (73). Η κατάσταση αυτή συναντάται σπάνια στους

ανθρώπους αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι μιμείται σε σύντομο χρονικό διάστημα τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης (74).

Η πειραματική ουρητηρική απόφραξη προκαλεί μέσα σε λίγες ώρες διήθηση του σωληναροδιάμεσου χώρου από φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά, εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προκαλούν διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των νεφρικών κυττάρων καθώς και συσσώρευση και ενεργοποίηση των ινοβλαστών.

Οι ενεργοποιημένοι (μυο)ινοβλάστες παράγουν εξωκυττάρια ουσία (Extracellular Matrix, ECM) η οποία συσσωρεύεται στον σωληναροδιάμεσο χώρο. Καθώς το βλαπτικό ερέθισμα της απόφραξης είναι συνεχές και η συσσώρευση της εξωκυττάριας ουσίας είναι μαζική, δημιουργείται ανισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμησή της η οποία σε συνδυασμό με την ανεξέλεγκτη απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων οδηγούν σε ατροφία των σωληναρίων και νεφρική ίνωση (Εικόνα 14).

Τα πλεονεκτήματα του μοντέλου UUO είναι η καλή αναπαραγωγιμότητα, η σύντομη χρονική διάρκεια και η ευκολία στην πραγματοποίησή του. Τα μειονεκτήματα περιλαμβάνουν κυρίως την αδυναμία να μετρηθούν με ακρίβεια οι αλλαγές στη νεφρική λειτουργία λόγω της αντιστάθμισης της απώλειας κατά ένα μεγάλο μέρος από τον μη αποφραγμένο νεφρό. Αυτό έχει σαν συνέπεια οι αλλαγές που παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις κρεατινίνης και ουρίας ορού να μην είναι σημαντικές ενώ δεν μπορεί να γίνει εύκολα συλλογή ούρων από τον απολινωμένο νεφρό. Ένα εξίσου σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι η ανάπτυξη της ίνωσης είναι τόσο γρήγορη, σοβαρή και μη αναστρέψιμη ώστε περιορίζεται η δυνατότητα δοκιμής θεραπευτικών σκευασμάτων. (74,75)



Εικόνα 14: Στάδια ανάπτυξης αποφρακτικής νεφροπάθειας κατά το μοντέλο UO. Από βιβλιογραφική αναφορά (74).

Στην παρούσα διατριβή το μοντέλο UO εφαρμόστηκε σε 9 αρσενικά C57BL/6 ποντίκια ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Για την χειρουργική επέμβαση, η οποία πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με εισπνοή ισοφλουρανίου και διατηρήθηκαν υπό αναισθησία καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η πρόσβαση στο ουροποιητικό σύστημα των ζώων έγινε με μέση κοιλιακή τομή και η απολίνωση του δεξιού ουρητήρα έγινε περίπου 1 cm χαμηλότερα από τη νεφρική πύελο. Ακολούθησε ράψιμο της τομής και μετά την ανάνηψή τους, τα ζώα τοποθετήθηκαν στους κλωβούς τους.

Τα ποντίκια χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: την ομάδα ελέγχου (sham), τα ζώα της οποίας υπέστησαν τη διαδικασία της επέμβασης χωρίς να γίνει απολίνωση του ουρητήρα τους και τις ομάδες των 2 (2 days) και 8 ημερών (8 days) στις οποίες έγινε απολίνωση του ουρητήρα και τα ζώα θυσιάστηκαν 2 ή 8 ημέρες μετά την επέμβαση. Τα χρονικά αυτά διαστήματα επιλέχθηκαν

καθώς στις 2 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη έχουν αρχίσει ήδη να δημιουργούνται βιοχημικές αλλοιώσεις παρά το ότι δεν υπάρχει συσσώρευση ινωτικού ιστού στο παρέγχυμα ενώ στις 8 ημέρες η συσσώρευση ινωτικού ιστού είναι πλέον εκτεταμένη.

Μετά την παρέλευση των κατάλληλων χρονικών διαστημάτων, οι νεφροί συλλέχθηκαν, ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBS και χωρίστηκαν σε δυο κομμάτια. Το ένα κομμάτι μονιμοποιήθηκε για 24 ώρες σε διάλυμα 10% φορμαλίνης και εγκλείστηκε σε παραφίνη και το δεύτερο κομμάτι πάγωσε στιγμιαία σε υγρό άζωτο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση πρωτεϊνών και RNA.

2.3.2 Μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Οξεία νεφρική βλάβη (Acute Kidney Injury, AKI) ονομάζεται η αιφνίδια έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και είναι μια νόσος που σχετίζεται με υψηλή θνησιμότητα. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες καθώς και στοιχεία από μελέτες βασικής έρευνας έχουν δείξει ότι η AKI είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΝΝ. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην εξέλιξη της οξείας σε χρόνια νεφρική βλάβη.

Η νεφρική ισχαιμία-επαναιμάτωση (Ischemia-Reperfusion, IR) είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα για τη μελέτη της AKI, έχει ωστόσο χρησιμοποιηθεί σε πολύ λίγες μελέτες για την διερεύνηση των μακροπροθέσμων συνεπειών της. Προκαλείται από αιφνίδια και προσωρινή διακοπή της ροής του αίματος προς το νεφρό. Συνήθως εφαρμόζεται θερμή ισχαιμία είτε στον έναν (Unilateral ischemia-reperfusion, URI) είτε και στους δυο νεφρούς (Bilateral ischemia-reperfusion, BIR). Στην περίπτωση της μονόπλευρης ισχαιμίας μπορεί ταυτόχρονα να πραγματοποιηθεί και νεφρεκτομή του αντίθετου νεφρού ο οποίος συνήθως χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

Η παθοφυσιολογία της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στο νεφρό είναι σύνθετη καθώς εμπλέκονται σε αυτή πολλές παθολογικές οδοί, όπως η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, η απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως μόρια προσκόλλησης και κυτοκίνες (76,77).

Για το μοντέλο της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης χρησιμοποιήθηκαν 6 αρσενικά FVB ποντίκια ηλικίας 8-10 εβδομάδων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στη βιβλιογραφική αναφορά (69). Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κεταμίνης (100 mg/kg)/ξυλαζίνης (10 mg/kg) και υπέστησαν δεξιά νεφρεκτομή. Οι δεξιοί νεφροί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύσφιξη της αριστερής νεφρικής αρτηρίας για 35 λεπτά θερμής ισχαιμίας στους 37°C την οποία διαδέχθηκαν 24 ή 72 ώρες επαναιμάτωσης.

Μετά το πέρας της διαδικασίας τα ζώα θυσιάστηκαν και ο νεφρικός ιστός συλλέχθηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

2.3.3 Μοντέλο χορήγησης νεφροτοξικού ορού

Η νόσος anti-GBM (anti-Glomerular Basement Membrane) ανήκει στα αυτοάνοσα νοσήματα και είναι το αποτέλεσμα βλάβης στα τριχοειδή αγγεία των νεφρών και των πνευμόνων η οποία προκαλείται από αυτοαντισώματα που προσβάλλουν τα τοιχώματα των αγγείων αυτών. Εάν η νόσος προσβάλλει μόνο τους νεφρούς ονομάζεται anti-GBM σπειραματονεφρίτιδα ενώ εάν προσβάλλονται και οι πνεύμονες η νόσος ονομάζεται σύνδρομο Goodpasture.

Τόσο η πνευμονική όσο και η σπειραματική βλάβη, προκαλούνται από καθήλωση των anti-GBM αντισωμάτων στην αντίστοιχη βασική μεμβράνη τα οποία προσελκύουν και ενεργοποιούν λευκά αιμοσφαίρια, κυρίως ουδετερόφιλα, τα οποία με τη σειρά τους επιτίθενται στα τοιχώματα των αγγείων και προκαλούν την ιστική βλάβη. Στόχος των anti-GBM αντισωμάτων

είναι η α3 αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου IV και συγκεκριμένα η μη κολλαγονική περιοχή I στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης [περιοχή α3(IV)NCI].

Η διερεύνηση των παθογόνων μηχανισμών στην νόσο anti-GBM έχει ωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από τα κατάλληλα ζωικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Η anti-GBM σπειραματονεφρίτιδα μπορεί να προκληθεί είτε με ανοσοποίηση με την περιοχή α3(IV)NCI, είτε παθητικά με μεταφορά αυτοαντισωμάτων. Το τελευταίο ονομάζεται και μοντέλο χορήγησης νεφροτοξικού ορού (Nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis, NTS) (78).

Στην παρούσα διατριβή, το μοντέλο NTS εφαρμόστηκε σε 6 αρσενικά SV129 ποντίκια ηλικίας 8-10 εβδομάδων σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναφορά (69). Η ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα (crescentic glomerulonephritis) προκλήθηκε με ενδοφλέβιες ενέσεις NTS (12μl/g βάρους σώματος) για δυο συνεχόμενες ημέρες ενώ στα ποντίκια της ομάδας ελέγχου έγιναν ενέσεις με PBS. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν 9 ημέρες μετά την πρώτη ένεση και ο νεφρικός ιστός συλλέχθηκε για περαιτέρω αναλύσεις.

2.4 Απομόνωση RNA - Σύνθεση cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε από κυτταρικές σειρές ή νεφρικό ιστό με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI Reagent (Invitrogen). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό υπό άσηπτες συνθήκες.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6 well plates) και επώαστηκαν στις συνθήκες ανάπτυξής τους μέχρι να καλύψουν το 80% περίπου της επιφάνειας καλλιέργειας. Η λύση των κυττάρων έγινε στα 6 well plates με την προσθήκη 1 ml διαλύματος Trizol σε κάθε θέση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην περίπτωση απομόνωσης RNA από νεφρικό ιστό, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του ιστού και λύση των

κυττάρων σε 1 ml Trizol μέσα σε γυάλινο σωλήνα με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου (Wheaton dounce homogenizer 5ml).

Σε κάθε μια από τις δυο περιπτώσεις μετά την λύση, το δείγμα συλλέχθηκε σε 1,5 ml erpendorfs και προστέθηκαν σε αυτό 100 μl 1-bromo-3-chloropropan (BCP). Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός υδατικής και οργανικής φάσης. Το διαφανές υπερκείμενο που περιείχε το RNA μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf, σε αυτό προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλη και έγινε καλή ανάμιξη. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα του RNA ξηπλύθηκε με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις 7500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Τέλος το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα για μερικά λεπτά και επαναδιαλύθηκε σε 40 μl νερό ελεύθερο RNAσών.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητάς τους τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στο φωτόμετρο ThermoSpectronic (Biomate). Η καθαρότητα των δειγμάτων προσδιορίστηκε βάσει του λόγου απορροφήσεων 260/280 nm και η συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε βάσει της απορρόφησης τους από τον τύπο: $[RNA_{\mu g/\mu l}] = A_{260} \times 40 \times \text{αραιώση διαλύματος} / 1000$.

Προκειμένου να γίνει αποικοδόμηση των υπολειμμάτων DNA τα δείγματα κατεργάστηκαν με το ένζυμο DNaseI (Promega). Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 5 μg RNA, 3 μl 10x διάλυμα αντίδρασης, 3 μl DNaseI και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 30 μl. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα, στη συνέχεια προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1 μl DNase Stop Solution για τον τερματισμό της αντίδρασης και έγινε επώαση στους 65°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ακολούθησε νέα φωτομέτρηση των δειγμάτων.

Η σύνθεση του cDNA έγινε με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης με τη χρήση του ενζύμου MMLV (Promega). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε eppendorfs των 200 μl. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 1 μg RNA, 1 μl μίγματος τυχαίων εκκινητών (random primers) συγκέντρωσης 0.5 μg/μl και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 13 μl. Το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 5 λεπτά στους 70°C και για 5 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μίγμα 4 μl 5x διαλύματος αντίδρασης, 2 μl dNTPs 10mM και 1 μl ενζύμου και ακλούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα για τη σύνθεση του cDNA και στους 70°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200 (Marshall Scientific).

2.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η διαδικασία της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Οι αντιδράσεις έγιναν σε πιάτα 96 θέσεων (96 well plates) με το FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche) και ειδικούς εκκινητές για κάθε γονίδιο (Πίνακες 1 και 2). Σε κάθε well προστέθηκαν 10 μl FastStart Essential DNA Green Master Mix, 0.3 μl forward εκκινητή 20μM, 0.3 μl reverse εκκινητή 20 μM, 5-7 μl cDNA (αραίωση 1:15) και dH₂O μέχρι να συμπληρωθεί συνολικός όγκος 20 μl για την κάθε αντίδραση. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Lightcycler 96 (Roche) στο παρακάτω θερμοκρασιακό πρόγραμμα: επώαση στους 95°C για 10 λεπτά και επώαση για 45 κύκλους στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα, 60°C για 15 δευτερόλεπτα και 72°C για 15 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε ανάλυση καμπυλών τήξης (melting curve analysis), με μετρήσεις κάθε 1°C από τους 65°C έως τους 95°C προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία ενός μόνο προϊόντος στην

αντίδραση. Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων κανονικοποιήθηκε με βάση τα γονίδια GAPDH, HPRT, RPL32 ή GUSB χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ΔΔCT.

Πίνακας 1: Εκκινητές για τα ανθρώπινα γονίδια που μελετήθηκαν με RT-qPCR.

Γονίδιο	Εκκινητές
14-3-3β	FW: 5'- AGCCTGGCAAAAACGGCATTGTA - 3' RV: 5' - GCGTCTCCTTCGTCTCCCTGGT - 3'
14-3-3γ	FW: 5'- GCGGCCATGAAGAACGTGACAGAG - 3' RV: 5' - ATGACCCTCCAGGAAGAGCGGC - 3'
14-3-3ε	FW: 5'- GCCGAGCAGGCTGAGCGATA - 3' RV: 5' - CAGCTCCACATCCATCCCTGCT - 3'
14-3-3ζ	FW: 5'- CCGCTGGTGATGACAAGAAAGGGAT - 3' RV: 5' - AGGGCCAGACCCAGTCTGATAGGA - 3'
14-3-3η	FW: 5'- CGACGACATGGCCTCCGCTA - 3' RV: 5' - CGCCTGGCACCAACCACATT - 3'
14-3-3σ	FW: 5'- CTGGACAGCCACCTCATCAA - 3' RV: 5' - GACCGGGCTGAGCAATGAT - 3'
14-3-3τ	FW: 5'- ACCTTGCTGAAGTTGCGTGTGGT - 3' RV: 5' - CCCAGGCGGATTGGGTGTG - 3'
Calreticulin	FW: 5'- GCTGGATCGAATCCAAACAC - 3' RV: 5' - GAGCATAAAAGCGTGCATCC - 3'
RPL32	FW: 5'- GTTACGACCCATCAGCCCTTG - 3' RV: 5'- CATGATGCCGAGAAGGAGATGG - 3'
GUSB	FW: 5'- GAGTGCAAGGAGCTGGACG - 3' RV: 5'- TGGGGCCTGACTCCCACA - 3'
GAPDH	FW: 5'- GCACCACCAACTGCTTAG - 3' RV: 5' - GCCATCCACAGTCTTCTG - 3'

Πίνακας 2: Εκκινητές για τα γονίδια ποντικού που μελετήθηκαν με RT-qPCR.

Γονίδιο	Εκκινητές
14-3-3β	FW: 5'- ACGGCATTTGATGAGGCGAT - 3' RV: 5' - ACGTCCACAGGGTGAGATTG - 3'
14-3-3γ	FW: 5'- TTCAAGGCGGTCTTCGGTTT - 3' RV: 5' - CAGCTCGGTCACGTTCTTCA - 3'
14-3-3ε	FW: 5'- AGACGCTATCCGCTTCCATC - 3' RV: 5' - TCCACCATTTGTCGTATCGC - 3'
14-3-3ζ	FW: 5'- TTGAGCAGAAGACGGAAGGT - 3' RV: 5' - GAAGCATTGGGGATCAAGAA - 3'
14-3-3η	FW: 5'- GAAGGCGGTGACAGAGCTGAAT - 3' RV: 5' - TGCCATGGTTTTCTGCTCAATG - 3'
14-3-3σ	FW: 5'- TGGCCCTGAACTTTTCAGTC - 3' RV: 5' - GAGGGTGCTGTCCTTG TAGG - 3'
14-3-3τ	FW: 5'- AAGGAAGCCATTCGTGTGT - 3' RV: 5' - ACACCAGGAAGGCGGAGATA - 3'
HIF1a	FW: 5'- AGGATGAGTTCTGAACGTCGAAA - 3' RV: 5' - GGGGAAGTGGCAACTGATGA - 3'
HPRT	FW: 5'- GGAGCGGTAGCACCTCCT - 3' RV: 5' - CTGGTTCATCATCGCTAATCAC - 3'
GUSB	FW: 5'- CTCTGGTGGCCTTACCTGAT - 3' RV: 5' - CAGTTGTTGTCACCTTACCTC - 3'
GAPDH	FW: 5'- AGGCCGGTGCTGAGTATGTC - 3' RV: 5' - TGCCTGCTTCACCACCTTCT - 3'

2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε δείγματα ιστού ή κυττάρων. Η διαδικασία περιλαμβάνει τον

διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, τη μεταφορά τους σε στερεό υπόστρωμα και την ανίχνευση τους με ειδικά αντισώματα.

2.6.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η εκχύλιση πρωτεϊνών έγινε από κυτταρικές σειρές ή νεφρικό ιστό με σκοπό την ανάλυση των δειγμάτων με western blot.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6 well plates) και επώαστηκαν στις συνθήκες ανάπτυξής τους μέχρι να καλύψουν το 80% περίπου της επιφάνειας καλλιέργειας. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα ξεπλύθηκε με 1 ml PBS, μεταφέρθηκε σε 1,5 ml eppendorfs και φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 10 λεπτά. Η λύση των κυττάρων έγινε με το διάλυμα radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) το οποίο περιείχε 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% deoxycholate (DOC), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na₂EDTA, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) και αναστολείς πρωτεασών (Sigma-Aldrich). Μετά την επαναδιάλυση του ιζήματος σε RIPA τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο και αναδεύονταν κάθε 10 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C και το υπερκείμενο που περιείχε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε νέα eppendorfs.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1 με τη διαφορά ότι τα δείγματα αραιώθηκαν 1:100 με dH₂O σε τελικό όγκο 100 μl και προστέθηκαν σε 2 ml 1x διαλύματος χρωστικής BIORAD protein assay .

2.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος πραγματοποιήθηκε

ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνταν από δύο συστατικά μέρη: το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel).

Για την ανάλυση των δειγμάτων, 20-50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος θερμάνθηκαν στους 100°C για 10 λεπτά υπό αναγωγικές συνθήκες με προσθήκη κατάλληλου όγκου NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen) ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών και διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 1.5-2 ώρες υπό σταθερή τάση 140V σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τον διαχωρισμό του μείγματος των πρωτεϊνών ακολούθησε η ηλεκτροφορητική μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. Πήκτωμα διαχωρισμού 12%

30% Acrylamide/Bis solution (Biorad), 1.5M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% Ammonium Persulfate (APS), TEMED σε dH₂O

2. Πήκτωμα επιστοίβαξης 5%

30% Acrylamide/Bis solution (Biorad), 1.0M Tris pH 6.8, 10% SDS, 10% Ammonium Persulfate (APS), TEMED σε dH₂O

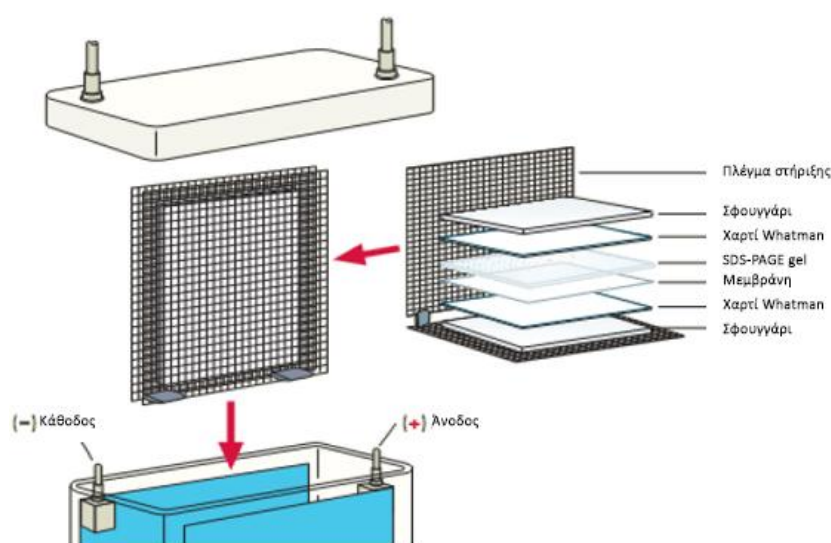
3. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5x (Running buffer)

25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1% SDS, σε dH₂O

2.6.3 Ανοσοαποτύπωση

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή (Εικόνα 15) για 2 ώρες υπό σταθερή τάση 25V σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκε με

διάλυμα χρώσης Ponceau-S (Sigma), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά όλων των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και αποχρωματίστηκε με dH_2O . Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν είχαν προσδεθεί πρωτεΐνες.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση διάταξης για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στο western blot. (Η εικόνα προσαρμόστηκε από την ιστοσελίδα <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/western-blot-principle>)

Για την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών η μεμβράνη επώαστηκε με ειδικό για τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody) για 16-20 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια επώαστηκε με δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) το οποίο ήταν συζευγμένο με υπεροξειδάση και αναγνώριζε ειδικά το πρώτο για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταξύ των επώασεων παρεμβάλλονταν πλύσεις της μεμβράνης με ειδικό διάλυμα (washing buffer) για απομάκρυνση της περίσσειας του μη προσδεμένου αντισώματος. Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλες αραιώσεις (Πίνακας 3) σε διάλυμα blocking.

Πίνακας 3: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο western blot.

Πρωτογενή αντισώματα		
Αντίσωμα	Εταιρία	Αραίωση
pan 14-3-3	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
14-3-3σ	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Calreticulin	Upstate	1:1000
Gapdh	Sigma-Aldrich	1:20.000
Δευτερογενή αντισώματα		
Αντίσωμα	Εταιρία	Αραίωση
a-Rabbit HRP	Sigma-Aldrich	1:20.000
a-Goat HRP	Sigma-Aldrich	1:20.000

Η ανίχνευση της πρόσδεσης των αντισωμάτων έγινε με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταυγείας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι η λουμινόλη οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από το ένζυμο της υπεροξειδάσης εκπέμποντας φως. Το φως αυτό μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το ECL kit της Perkin Elmer. Τα αντιδραστήρια oxidizing reagent και enhanced luminol reagent του kit αναμίχθηκαν σε ίση ποσότητα και ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με το μείγμα αυτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα και εκτέθηκε σε φιλμ για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα ανάλογα με την ένταση του σήματος (από λίγα δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά). Η εμφάνιση των φιλμ πραγματοποιήθηκε σε ειδικό μηχάνημα.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών τα φιλμ σαρώθηκαν ως εικόνες υψηλής ανάλυσης σε

υπολογιστή οι οποίες αναλύθηκαν με το λογισμικό ImageJ. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH.

Για την ηλεκτρομεταφορά και ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 10x (Transfer buffer)

25 mM Tris, 190 mM Glycine, 10% v/v μεθανόλη σε dH₂O

2. Blocking buffer

5% w/v ξηρό γάλα, 0.1% v/v Tween-20 σε 1x TBS

3. Washing buffer

0.1% v/v Tween-20 σε 1x TBS

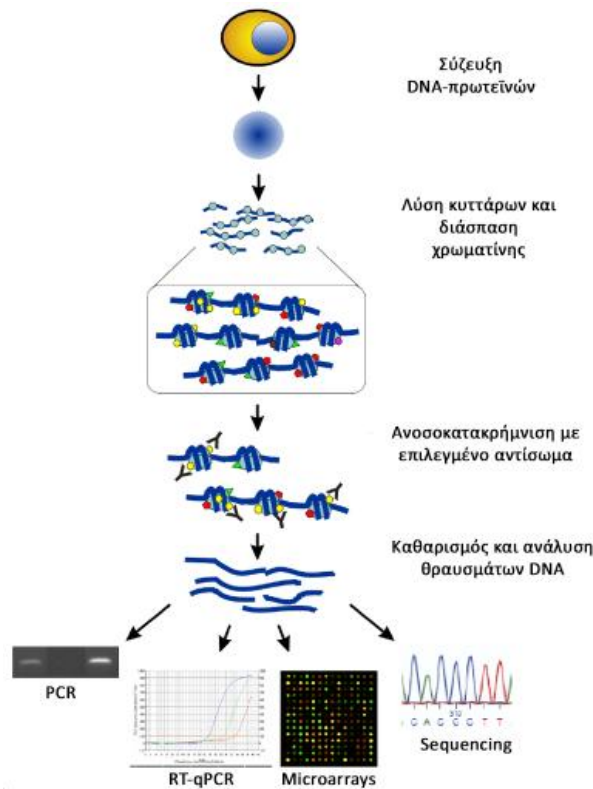
4. Ρυθμιστικό διάλυμα TBS

20mM Tris, 137mM NaCl σε dH₂O, pH 7.6

2.7 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης

Η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) είναι μια μέθοδος για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συγκεκριμένων πρωτεϊνών και περιοχών του γονιδιώματος. Οι δυο κύριες εφαρμογές της είναι η μελέτη αλληλεπίδρασης μεταγραφικών παραγόντων με συγκεκριμένα γονίδια και ο χαρακτηρισμός της τροποποίησης των ιστονών σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος.

Η τεχνική περιλαμβάνει την σύνδεση πρωτεϊνών και χρωματίνης με ομοιοπολικούς δεσμούς (crosslink), την επεξεργασία των συμπλόκων με υπερήχους για τη δημιουργία μικρών θραυσμάτων DNA και την ανοσοκατακρήμιση με κατάλληλα αντισώματα. Η ανάλυση των θραυσμάτων πραγματοποιείται με RT-qPCR ή αλληλούχιση (Εικόνα 16) (79,80).



Εικόνα 16: Διάγραμμα ροής τεχνικής ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης. Η εικόνα προσαρμόστηκε από την βιβλιογραφική αναφορά (80).

2.7.1 Προετοιμασία χρωματίνης

Τα πειράματα ChIP πραγματοποιήθηκαν σε ιστό από ζώα στα οποία είχε εφαρμοστεί το μοντέλο UUO με σκοπό να διερευνηθεί η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3σ.

Ο ιστός διατμήθηκε και ξεπλύθηκε σε διάλυμα PBS/2mM benzamidine. Στη συνέχεια ομογενοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα με τη βοήθεια ομογενοποιητή. Η σύνδεση DNA και πρωτεϊνών έγινε με την προσθήκη διαλύματος φορμαλδεΐδης 2% και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και η διακοπή της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0.125 M. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis Buffer, CLB), επώαστηκε για 10 λεπτά σε πάγο, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε

το υπερκείμενο. Για τη λύση των πυρήνων, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα λύσης πυρήνων (Nuclei Lysis Buffer, NLB) στο οποίο είχαν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών και κατάλληλη ποσότητα SDS ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0.5% και επώαστηκε στον πάγο για 10 λεπτά. Η διάσπαση της χρωματίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια υπερήχων. Τα δείγματα, τα οποία διατηρήθηκαν σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, υπέστησαν κατεργασία με υπερήχους για 10 λεπτά σε ένα πρόγραμμα 30% amplitude με επανάληψη του παλμού κάθε 1 δευτερόλεπτο με 1 δευτερόλεπτο διακοπή (1'' ON/1'' OFF pulse).

Για να ελεγχθεί το μέγεθος των θραυσμάτων της χρωματίνης απομονώθηκε από τα δείγματα ποσότητα 40 μl πριν και μετά την κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα NaCl ώστε στο τελικό διάλυμα η συγκέντρωσή του να είναι 0.2 M και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια η χρωματίνη απομονώθηκε με προσθήκη στα δείγματα ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου (1:1) και φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1-1.5%. Το επιθυμητό μέγεθος των θραυσμάτων ήταν τα 150-500 bp. Εφόσον δεν απαιτείτο περαιτέρω επεξεργασία με υπερήχους τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για 15 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του SDS. Το υπερκείμενο στο οποίο βρισκόταν διαλυμένη η χρωματίνη φωτομετρήθηκε στα 260 nm και είτε αποθηκεύτηκε στους -80°C είτε χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης.

2.7.2 Αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης

Της αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης, προηγήθηκε ένα βήμα καθαρισμού της χρωματίνης με επώαση της με σφαιρίδια αγαρόζης για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Για την αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν 50 μg χρωματίνης για κάθε συνθήκη. Σε κάθε αντίδραση

προστέθηκαν επίσης 10 µg BSA, 2 µl tRNA, 5 µg αντισώματος και ρυθμιστικό διάλυμα CHIP (CHIP dilution buffer) μέχρι τον όγκο του 1 ml. Επιπλέον, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν ως στερεό υπόστρωμα 3ml μαγνητικών σφαιριδίων (Invitrogen) ανά µg αντισώματος. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με αντίσωμα IgG. Τα δείγματα επώαστηκαν για 16-20 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C.

Η συλλογή των ανοσοσυμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μαγνητικού στατώ. Ακολούθησαν 4 διαδοχικές πλύσεις των σφαιριδίων με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων (low salt wash buffer), με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (high salt wash buffer), με ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου λιθίου (LiCl wash buffer) και με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE buffer). Οι πλύσεις έγιναν για 7 λεπτά η καθεμία υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Τα ανοσοσυμπλέγματα εκλούστηκαν από τα μαγνητικά σφαιρίδια με επώαση τους σε διάλυμα έκλουσης (Elution buffer) και θέρμανση στους 65°C για 15 λεπτά.

Η αντιστροφή της σύνδεσης πρωτεϊνών-χρωματίνης πραγματοποιήθηκε με επώαση των δειγμάτων με 0.2 M NaCl στους 65°C για 16-20 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν με RNase A (10 µg/ml) στους 37°C για 1 ώρα και με proteinase K (20 µg/ml) στους 55°C για 2 ώρες. Ο καθαρισμός του DNA έγινε με τη χρήση του MinElute PCR Purification kit (Qiagen) ενώ η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με RT-qPCR με το FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche) και ειδικούς εκκινητές για τις υπο μελέτη περιοχές του γονιδιώματος (Πίνακας 4)

Στην ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. Cell Lysis Buffer

5mM HEPES pH 8, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 10 µl/ml cocktail inhibitors, 10 µl/ml PMSF σε dH₂O

2. Nuclei Lysis Buffer

50 mM Tris HCl pH:8, 10 mM EDTA pH:8, 1% SDS, 10 µl/ml cocktail inhibitors,
10 µl/ml PMSF σε dH₂O

3. ChIP dilution buffer

0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA pH:8, 16.7 mM Tris HCl pH:8, 167
mM NaCl, 10 µl/ml cocktail inhibitors, 10 µl/ml PMSF σε dH₂O

4. Low salt wash buffer

0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH:8, 20 mM Tris HCl pH:8, 150 mM
NaCl, 1 µl/ml PMSF σε dH₂O

5. High salt wash buffer

0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH:8, 20 mM Tris HCl pH:8, 500 mM
NaCl, 1 µl/ml PMSF σε dH₂O

6. LiCl wash buffer

1% DOC, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM EDTA pH:8, 10 mM Tris HCl pH:8, 250
mM LiCl, 1 µl/ml PMSF σε dH₂O

7. TE buffer

1 mM EDTA pH:8, 10 mM Tris HCl pH:8 σε dH₂O

8. Elution Buffer

100 mM NaHCO₃, 1% SDS σε dH₂O

Πίνακας 4: Εκκινητές για επιλεγμένες περιοχές στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3σ.

Περιοχή υποκινητή γονιδίου 14-3-3σ	Εκκινητές
Locus A -1811/-1694	FW: 5' - GCAAAGCCAGTCACCAACTG - 3' RV: 5' - GGCACAGGCACAGAACTACA - 3'
Locus B -1625/-1493	FW: 5' - TTAGCCAGGACCCTGAAGTC - 3' RV: 5' - GCCTGTCTCCTCACAGTGTC - 3'
Locus C -1140/-1039	FW: 5' - CTTTCCCTCAGCCCTGTCTT - 3' RV: 5' - TCTGTCAGAGGCTGGGAAG - 3'
Locus D -325/-219	FW: 5' - ATGCAGCCAGCCCTGAAC - 3' RV: 5' - GCTGTGAGTCACCAGGACAGT - 3'
Locus E +45/+157	FW: 5' - GCCGAACGGTATGAAGACAT - 3' RV: 5' - CCCACCACGTTCTTGTAAGC - 3'

2.8 Ανοσοϊστοχημεία – Ανοσοφθορισμός

Η ανοσοϊστοχημεία και ο ανοσοφθορισμός είναι τεχνικές που εφαρμόζονται για την μορφολογική μελέτη των ιστών και τον προσδιορισμό της ιστικής κατανομής ενός αντιγόνου και βασίζονται στην σύνδεση ειδικών αντισωμάτων με τα αντιγόνα-στόχους. Το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος γίνεται ορατό στην περίπτωση της ανοσοϊστοχημείας με την πραγματοποίηση μιας χημικής αντίδρασης, ενώ στην περίπτωση του ανοσοφθορισμού με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία και ανοσοφθορισμό τομές παραφίνης από ποντίκια στα οποία είχε εφαρμοστεί το μοντέλο UUO και τομές παραφίνης από βιοψίες ασθενών με διάφορες νεφροπάθειες.

Οι τομές αποπαραφινολογήθηκαν και ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση διαδοχικά σε ξυλόλη, 100% αιθανόλη, 95% αιθανόλη, 70% αιθανόλη, dH₂O και PBS. Στη συνέχεια οι τομές επώαστηκαν με διάλυμα H₂O₂ 1.5% σε

μεθανόλη για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ανασταλεί η δραστικότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε μόνο κατά την διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας. Ακολούθησε πλύση των τομών με διάλυμα PBS και επώαση σε διάλυμα κιτρικού οξέος 10 mM pH 6 τους για 10 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 400W για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την αποκάλυψη των κρυμμένων αντιγόνων (antigen retrieval). Στη συνέχεια οι τομές επώαστηκαν με διάλυμα blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα PBS ή blocking για 16-20 ώρες στους 4°C (Πίνακας 6). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές που επώαστηκαν με ανοσοσφαιρίνη IgG κουνελιού ή ποντικού σε ίδια αραιώση με αυτή του πρωτογενούς αντισώματος.

Το επόμενο βήμα ήταν η επώαση των τομών με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (Πίνακας 6). Στην περίπτωση της ανοσοϊστοχημείας, το δεύτερο αντίσωμα ήταν συζευγμένο με υπεροξειδάση και για την αντίδραση ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 3',3'-διαμινοβενζιδίνης (Vectror Laboratories). Ακολούθως οι τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη και ακολούθησε αφυδάτωση τους με επώαση διαδοχικά σε 70% αιθανόλη, 95% αιθανόλη 100% αιθανόλη και ξυλόλη. Τέλος οι τομές καλύφθηκαν με καλυπτρίδα με τη χρήση του διαλύματος DPX ως επικαλυπτικού μέσου και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Στην περίπτωση του ανοσοφθορισμού η ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων έγινε με επώαση με δευτερογενή φθορίζοντα αντισώματα. Ακολούθησε χρώση των πυρήνων με τη χρωστική DAPI και μονιμοποίηση σε Mowiol 4-88 Reagent με τοποθέτηση καλυπτρίδας. Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αραιώσεις φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημεία.

Πρωτογενή αντισώματα		
Αντίσωμα	Εταιρία	Αραίωση
pan 14-3-3	Santa Cruz Biotechnology	1:100, 1:4000
14-3-3σ	Santa Cruz Biotechnology	1:100
Calreticulin	Upstate	1:100
Δευτερογενή αντισώματα		
Αντίσωμα	Εταιρία	Αραίωση
a-Rabbit HRP	Sigma-Aldrich	1:500
a-Mouse HRP	Sigma-Aldrich	1:500
a-Goat Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:500
a-Rabbit Alexa Fluor 568	Invitrogen	1:500

2.9 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA) ακολουθούμενη από Fischer test. Τιμή p μικρότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η υπερέκφραση της calreticulin επηρεάζει το πρωτεωμικό προφίλ των νεφρικών σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων

Η calreticulin είναι μια πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να αποθηκεύει ιόντα Ca^{2+} και να δρα ως πρωτεΐνη-συνοδός αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες μέχρι να αναδιπλωθούν σωστά πριν την έξοδο τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Με πρωτεωμική ανάλυση στο μοντέλο UUO έχει βρεθεί ότι η calreticulin υπερεκφράζεται στο νεφρό κατά την ανάπτυξη της ίνωσης σχεδόν αποκλειστικά στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα (44).

Στην παρούσα μελέτη, για να διερευνηθεί ο ρόλος που διαδραματίζει η calreticulin στις μεταβολές των ιδιοτήτων των νεφρικών επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων οι οποίες υπερέκφραζαν σταθερά calreticulin σε παρόμοια επίπεδα.

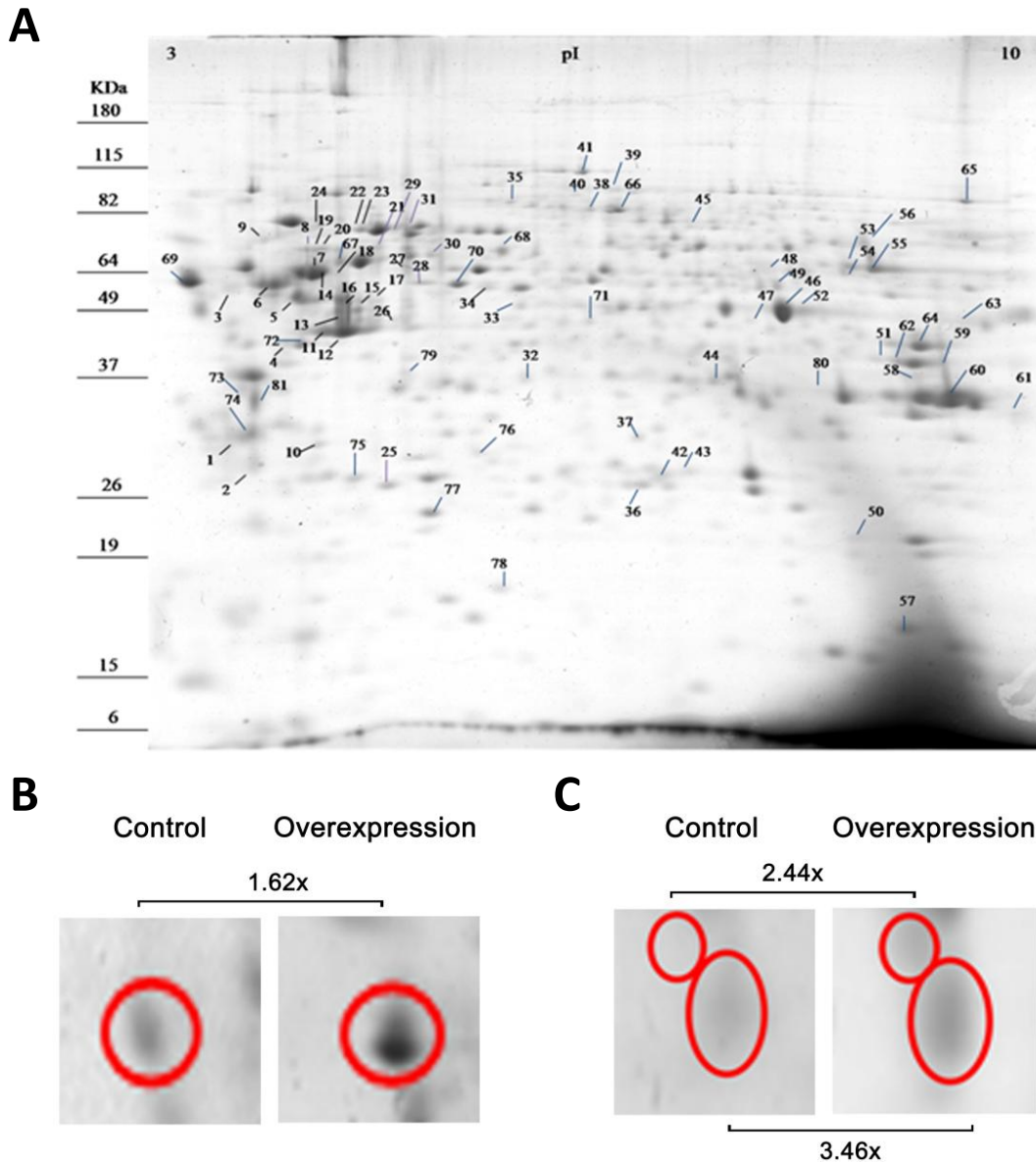
Τα δισδιάστατα πηκτώματα που προέκυψαν από την πρωτεωμική ανάλυση σαρώθηκαν και οι ψηφιακές εικόνες αναλύθηκαν με το πρόγραμμά PDQuest 8 Image Processing Software. Όλες οι εικόνες των 2D-E πηκτωμάτων συγκρίθηκαν μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε αντιστοίχιση όλων των πρωτεϊνικών κηλίδων και αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κηλίδες που παρουσίαζαν ποσοτική διαφορά έντασης μεγαλύτερη των 2 φορές μεταξύ των πηκτωμάτων. Από την ανάλυση αρχικά επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση της calreticulin στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Εικόνα 16) και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν 82 διαφορεικά εκφραζόμενες κηλίδες από τις οποίες αναγνωρίστηκαν 74 διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες (Πίνακας 1, Παράρτημα).

Στη συνέχεια, οι διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες κατηγοριοποιήθηκαν βάσει κυτταρικής λειτουργίας με το λογισμικό πρόγραμμα UniProt. Οι κατηγορίες που δημιουργήθηκαν καθώς και οι πρωτεΐνες που ταξινομήθηκαν σε κάθε κατηγορία φαίνονται στον Πίνακα 1 του παραρτήματος. Πολλές από τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες ταξινομήθηκαν σε περισσότερες από μια κατηγορίες. Η υπερέκφραση της calreticulin τροποποίησε την έκφραση πρωτεϊνών που συνδέονται με την φλεγμονή, την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, την παραγωγή κολλαγόνου και την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας. Παρατηρήθηκε επίσης υπερέκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες (Cellular Redox stress), το θερμικό στρες (Heat shock) την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό μεταβολισμό και το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA αλλά και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό αναδίπλωσης πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην αποδόμησή τους μέσω πρωτεασώματος.

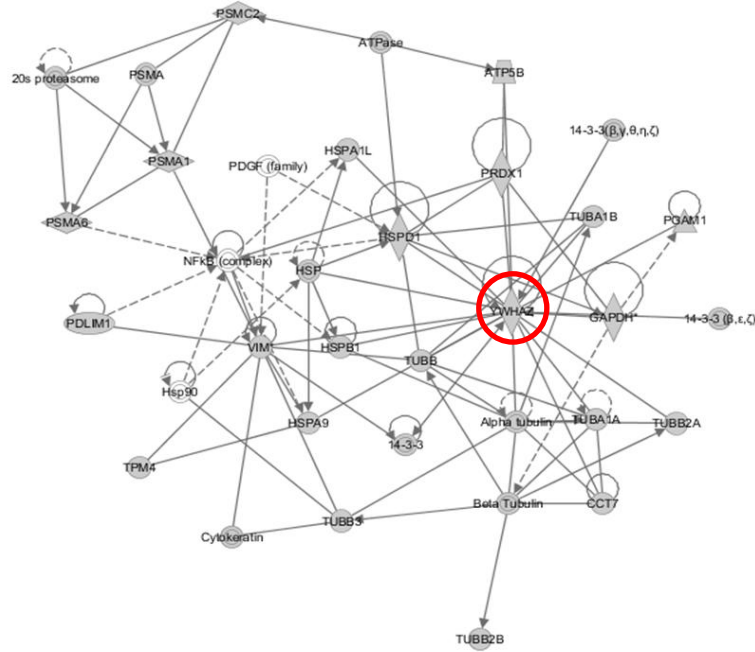
Εκτός από την κατηγοριοποίηση τους βάσει της λειτουργία τους οι πρωτεΐνες μελετήθηκαν και με το λογισμικό πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis με στόχο την αναζήτηση δικτύων αλληλεπίδρασης τους. Διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες που επηρεάζονται από την υπερέκφραση της calreticulin οργανώνονται σε 4 δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Κεντρικό ρόλο στα δίκτυα αυτά βρέθηκε ότι έχει η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών (Εικόνα 17 και Εικόνες 18-21). Στο πρώτο δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ζ (YWHAZ) η οποία αλληλεπιδρά κυρίως με heat shock πρωτεΐνες και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Στο δίκτυο αυτό συμμετέχουν οι περισσότερες από τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών (Εικόνα 18). Στο δεύτερο δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, κεντρικό ρόλο κατέχει η calreticulin, η οποία φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, με τον κυτταρικό μεταβολισμό και το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες (Εικόνα 19). Στο τρίτο δίκτυο που δημιουργήθηκε, κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ε

(YWHAE) η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την απόπτωση και την παραγωγή κολλαγόνου καθώς και με heat shock πρωτεΐνες (Εικόνα 20). Στο δίκτυο αυτό συμμετέχουν επίσης και οι πρωτεΐνες 14-3-3η (YWHAH), 14-3-3β (YWHAB), 14-3-3γ (YWHAG). Το τέταρτο δίκτυο συμμετέχουν πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν δείκτες παραγωγής κολλαγόνου (Εικόνα 21).

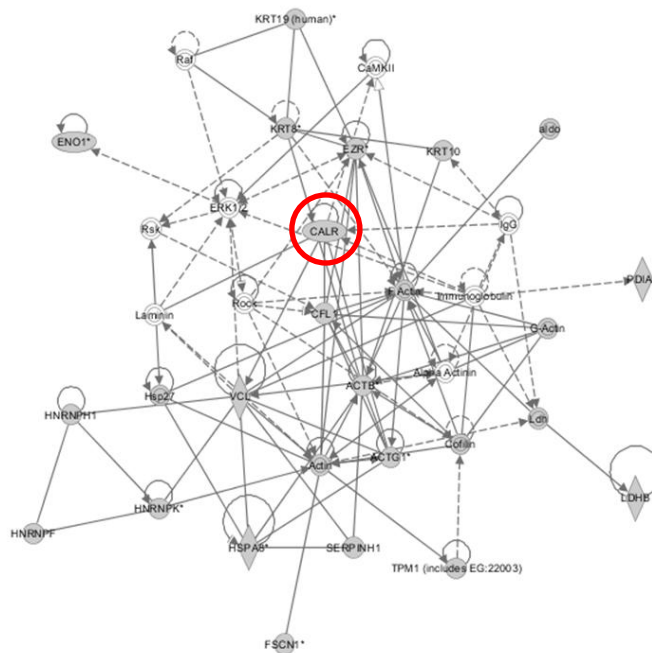
Από τις ταυτοποιημένες διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών εξαιτίας του κεντρικού ρόλου των μελών της στα δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών αλλά και γιατί βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης, ο ρόλος και η συμμετοχή της οικογένειας αυτής δεν έχει μέχρι στιγμής μελετηθεί στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των νεφρικών παθολογιών.



Εικόνα 17: Η υπερέκφραση της calreticulin επηρεάζει το πρωτεωμικό προφίλ των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων. **A.** Αντιπροσωπευτική εικόνα πηκτώματος δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης. Η calreticulin αναγνωρίστηκε από την κηλίδα με αριθμό 69 ενώ οι 14-3-3 πρωτεΐνες από της κηλίδες με αριθμούς 1 και 2. **B.** Κηλίδες που αντιστοιχούν στην calreticulin στα control κύτταρα και στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. **C.** Κηλίδες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες 14-3-3 στα control κύτταρα και στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. Οι 2 κύκλοι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ισομορφές των 14-3-3 που μεταναστεύουν σε διαφορετικές θέσεις στο πήκτωμα.



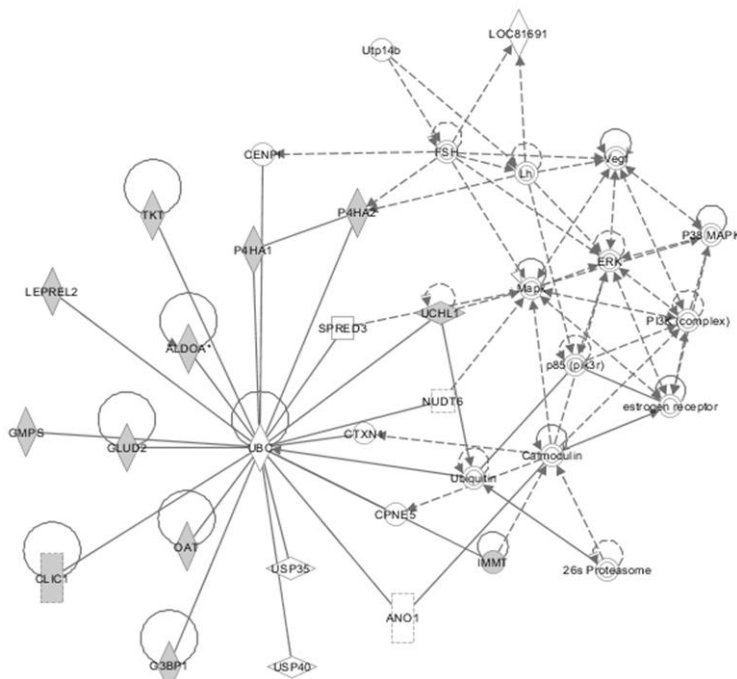
Εικόνα 18: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 1. Κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ζ η οποία αλληλεπιδρά κυρίως με heat shock και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η 14-3-3ζ



Εικόνα 19: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 2. Κεντρικό ρόλο κατέχει η calreticulin, η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, τον κυτταρικό μεταβολισμό και το κυτταρικό οξειδοαναγωγικό στρες. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η calreticulin.



Εικόνα 20: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 3. Κεντρικό ρόλο κατέχει η πρωτεΐνη 14-3-3ε, η οποία αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την απόπτωση και την παραγωγή κολλαγόνου και με heat shock πρωτεΐνες. Στον κόκκινο κύκλο απεικονίζεται η 14-3-3ε

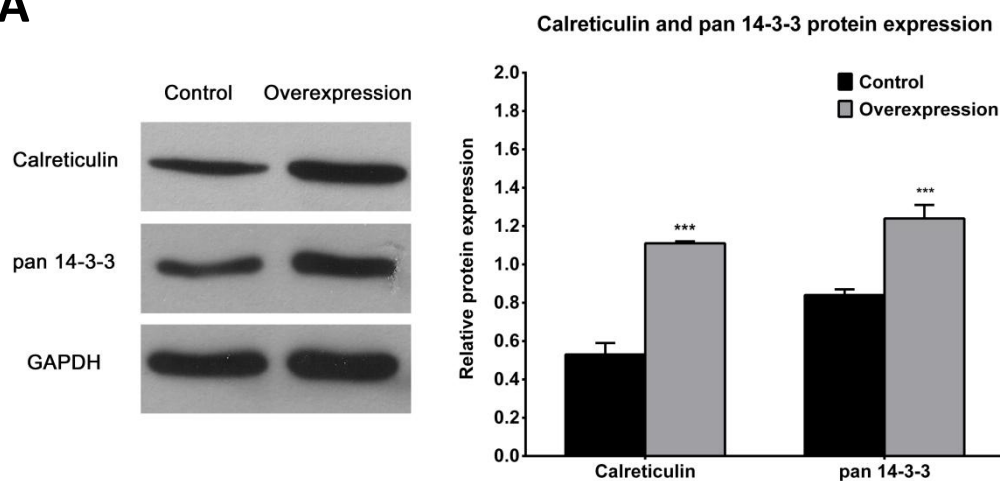
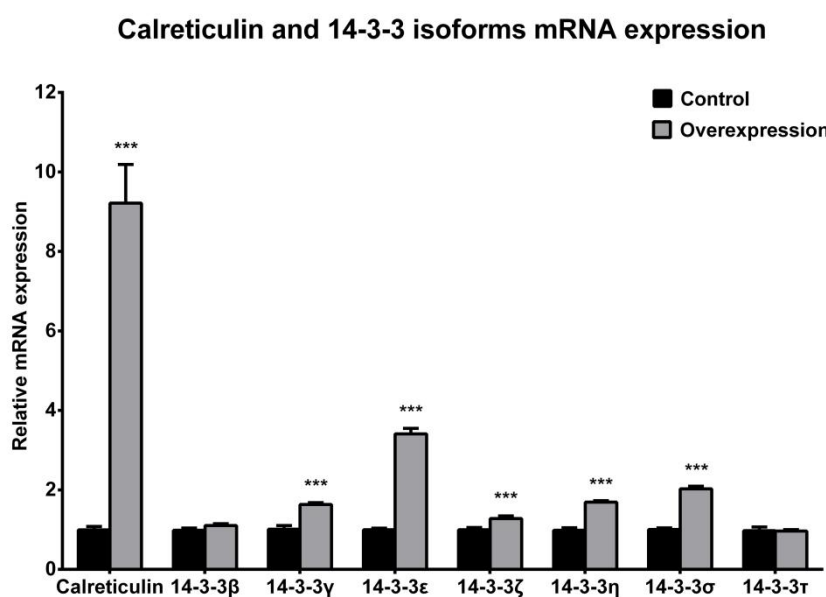


Εικόνα 21: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών 4. Στο δίκτυο αυτό οργανώνονται πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν δείκτες παραγωγής κολλαγόνου.

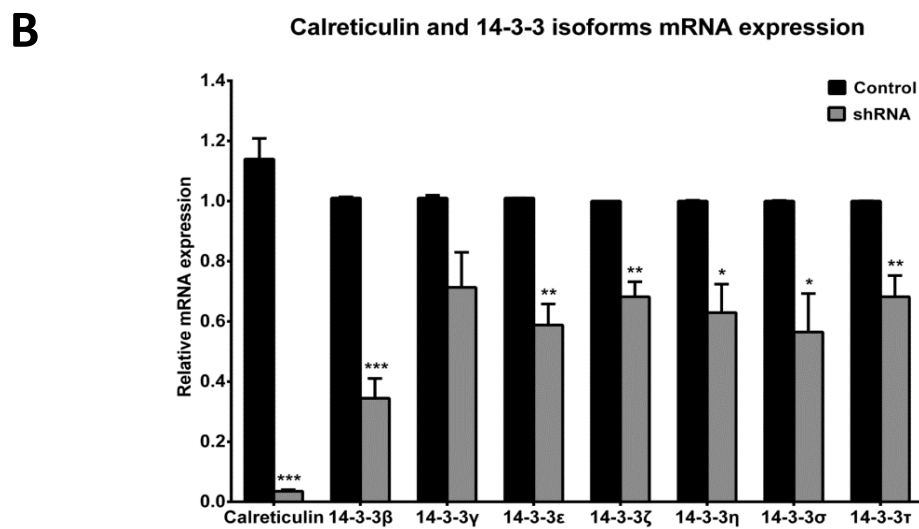
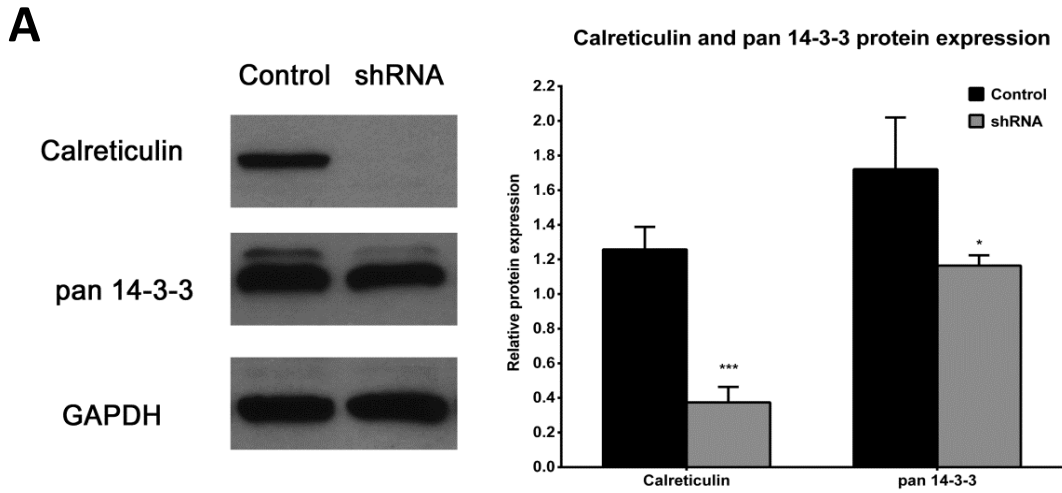
3.2 Μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών *in vitro*

Για να επαληθευτούν τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης, η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με western blot σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη χρήση αντισώματος έναντι και των 7 ισομορφών (pan 14-3-3). Τα αποτελέσματα από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν επιβεβαίωσαν ότι παρουσία υπερέκφρασης της calreticulin υπάρχει και αύξηση στην έκφραση της οικογένειας 14-3-3 (Εικόνα 22A). Για να μελετηθεί η έκφραση της κάθε ισομορφής ξεχωριστά πραγματοποιήθηκε RT-qPCR με εκκινητές ειδικούς για την κάθε ισομορφή (βλ Πίνακας 1 ενότητα 2.5). Παρατηρήθηκε ότι με εξαίρεση 2 ισομορφές, τις 14-3-3β και 14-3-3τ, το mRNA που κωδικοποιεί για τις άλλες ισομορφές της οικογένειας είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένο στις κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 22B).

Ένα επιπλέον στοιχείο για πιθανή συσχέτιση των επιπέδων της calreticulin με την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών αποτελεί και το γεγονός ότι σε κυτταρικές σειρές με μειωμένη έκφραση calreticulin η οικογένεια 14-3-3 βρέθηκε μειωμένη σε επίπεδο πρωτεΐνης όταν μελετήθηκε με western blot (Εικόνα 23A). Επιπρόσθετα, μελέτη της έκφρασης των ισομορφών με RT-qPCR έδειξε ότι με εξαίρεση την ισομορφή 14-3-3γ, η έκφραση των υπολοίπων μειώνεται στατιστικά σημαντικά στα κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin (Εικόνα 23B).

A**B**

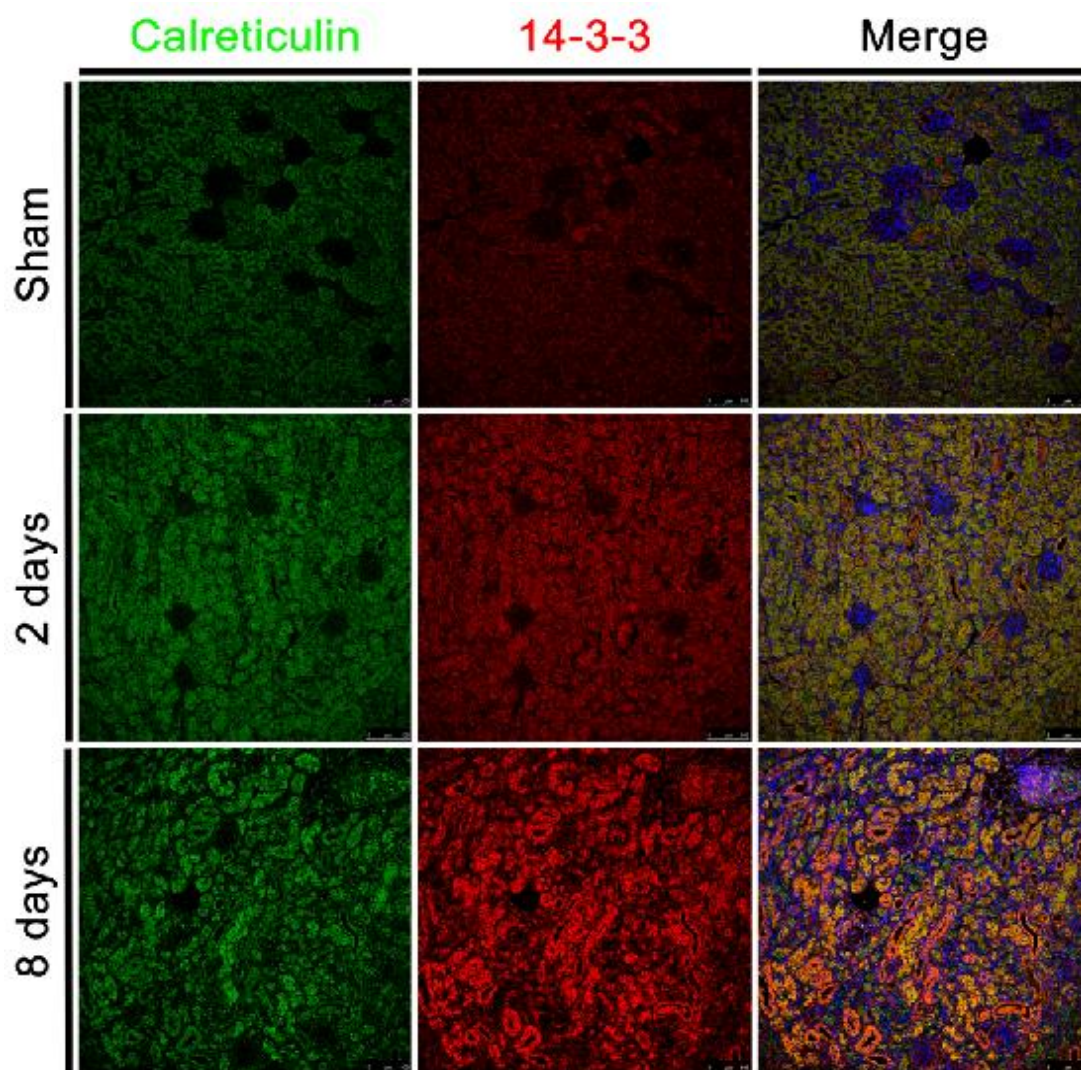
Εικόνα 22: Οι πρωτεΐνες 14-3-3 υπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin. **A.** Αντιπροσωπευτικό western blot και το αντίστοιχο διάγραμμα ποσοτικοποίησης της έκφρασης της calreticulin και της οικογένειας 14-3-3 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin. **B.** Σχετική έκφραση των mRNA της calreticulin και των 14-3-3 ισομορφών σε κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν calreticulin. *** $p < 0.001$ προς το control.



Εικόνα 23: Οι πρωτεΐνες 14-3-3 υποεκφράζονται σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA σε κυτταρικές σειρές σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων με μειωμένη έκφραση calreticulin. **A.** Αντιπροσωπευτικό western blot και το αντίστοιχο διάγραμμα ποσοτικοποίησης της έκφρασης της calreticulin και της οικογένειας 14-3-3 σε κύτταρα που υποεκφράζουν calreticulin. **B.** Σχετική έκφραση των mRNA της calreticulin και των 14-3-3 ισομορφών σε κυτταρικές σειρές που υποεκφράζουν calreticulin. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ προς το control.

3.3 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται *in vivo* στο μοντέλο UUO

Η έκφραση της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών μελετήθηκε *in vivo* κατά την ανάπτυξη της αποφρακτικής νεφροπάθειας στο μοντέλο UUO με ανοσοφθορισμό. Συγκεκριμένα, με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού βρέθηκε αρχικά ότι η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών παρουσιάζει αύξηση στην έκφραση της στις 2 ημέρες (2 days) και στις 8 ημέρες (8 days) μετά την απολίνωση του ουρητήρα σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (Sham). Η αύξηση αυτή εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. Στα σπειράματα δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά. Επιπλέον, στις 2 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της οικογένειας είναι διάχυτη στα κύτταρα των σωληναρίων του νεφρικού παρεγχύματος ενώ στις 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη φαίνεται ότι η έκφραση εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα των άπω εσπειραμένων σωληναρίων. Πολύ σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι η οικογένεια 14-3-3 συνεντοπίζεται με την calreticulin στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων και ακολουθούν το ίδιο μοτίβο έκφρασης στις 2 και 8 μέρες μετά την απολίνωση του ουρητήρα (Εικόνα 24). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι και των 7 ισομορφών της οικογένειας (pan 14-3-3).

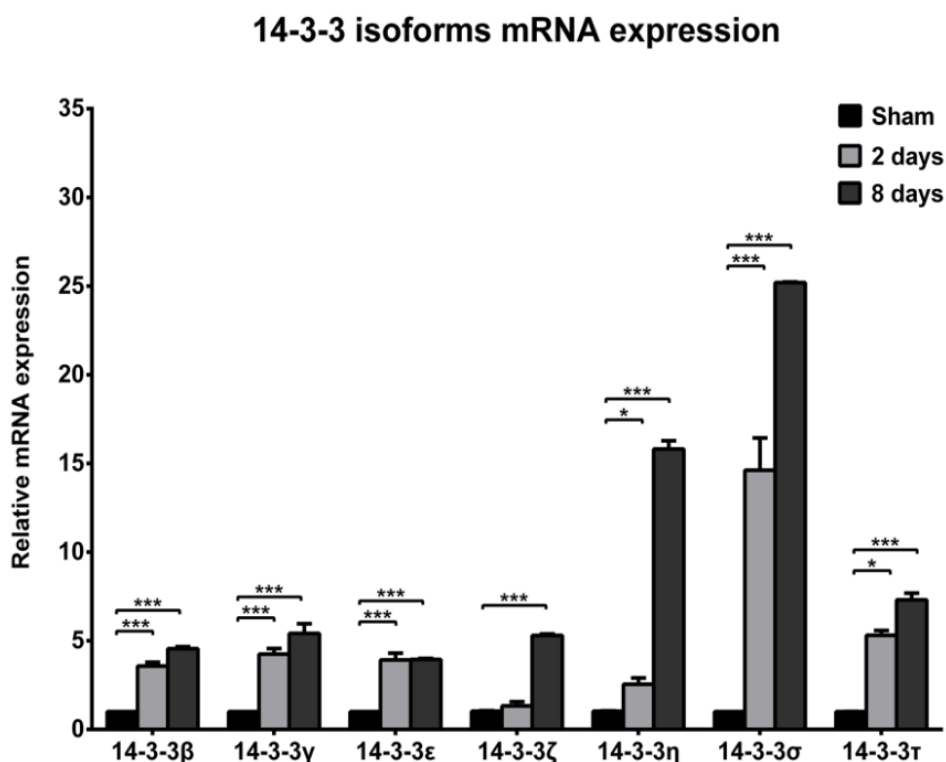


Εικόνα 24: Η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών υπερεκφράζεται in vivo στο μοντέλο UUO στα κύτταρα των επιθηλιακών κυττάρων και συνεντοπίζεται με την calreticulin σε αυτά. Η έκφραση και των δυο πρωτεϊνών είναι αυξημένη στις 2 και στις 8 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση της κάθε ισομορφής ξεχωριστά πραγματοποιήθηκε ανάλυση RT-qPCR σε δείγματα ιστού από ζώα στα οποία είχε εφαρμοστεί UUO με εκκινητές ειδικούς για κάθε ισομορφή (βλ Πίνακας 2 Ενότητα 2.5). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι η σχετική έκφραση των mRNA και των 7 ισομορφών αυξάνει προοδευτικά από τις 2 στις 8 ημέρες μετά την απολίνωση του ουρητήρα. Από αυτές, δυο ισομορφές είχαν αξιοσημείωτα υψηλότερη έκφραση, η 14-3-3η της οποίας το mRNA αυξήθηκε

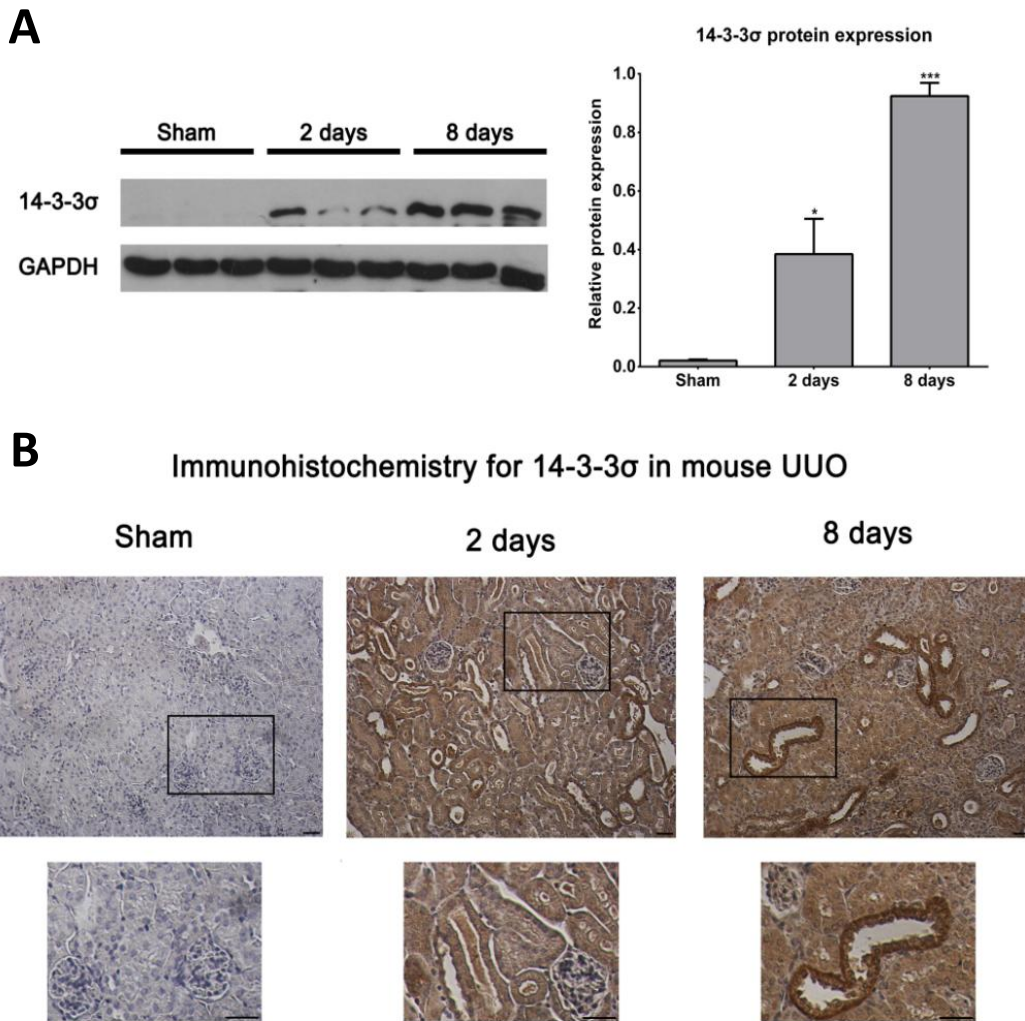
κατά 15 φορές στις 8 ημέρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και η 14-3-3σ της οποίας το mRNA αυξήθηκε κατά 14 φορές στις 2 ημέρες μετά την απολίνωση και κατά 25 φορές στις 8 ημέρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 25).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος του ζωικού μοντέλου UUO που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας (45). Η ανάλυση αυτή έδειξε μια αύξηση κατά 2.7 φορές στην έκφραση της ισομορφής 14-3-3σ στις 2 ημέρες και μια αύξηση κατά 11 φορές στις 8 ημέρες μετά την απόφραξη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 25: Σχετική έκφραση των mRNA των 14-3-3 ισομορφών στο μοντέλο UUO. Η ισομορφή 14-3-3σ παρουσιάζει την σημαντικότερη αύξηση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας στις 2 και στις 8 ημέρες μετά την απολίνωση του ουρητήρα. * $p < 0,05$; ***; $p < 0.001$ προς το control. $n = 3$ ανά ομάδα.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων η ισομορφή σίγμα επιλέχθηκε για μελέτη *in vivo* σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η ανάλυση western blot με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την ισομορφή σίγμα έδειξε ότι υπάρχει μια προοδευτική αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης από τις 2 στις 8 ημέρες η οποία είναι σύμφωνη με το πρότυπο έκφρασης των μεταγράφων (Εικόνα 26A). Όσον αφορά την ιστολογική έκφραση και κατανομή της ισομορφής 14-3-3σ τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας με αντίσωμα ειδικό για την ισομορφή, έδειξαν ότι στα ζώα της ομάδας ελέγχου η πρωτεΐνη εκφράζεται ελάχιστα στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων, η έκφραση της αυξάνει σημαντικά 2 ημέρες μετά την ουρητηρική απόφραξη ενώ φαίνεται να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των άπω εσπειραμένων σωληναρίων στις 8 ημέρες μετά την απόφραξη (Εικόνα 26B).

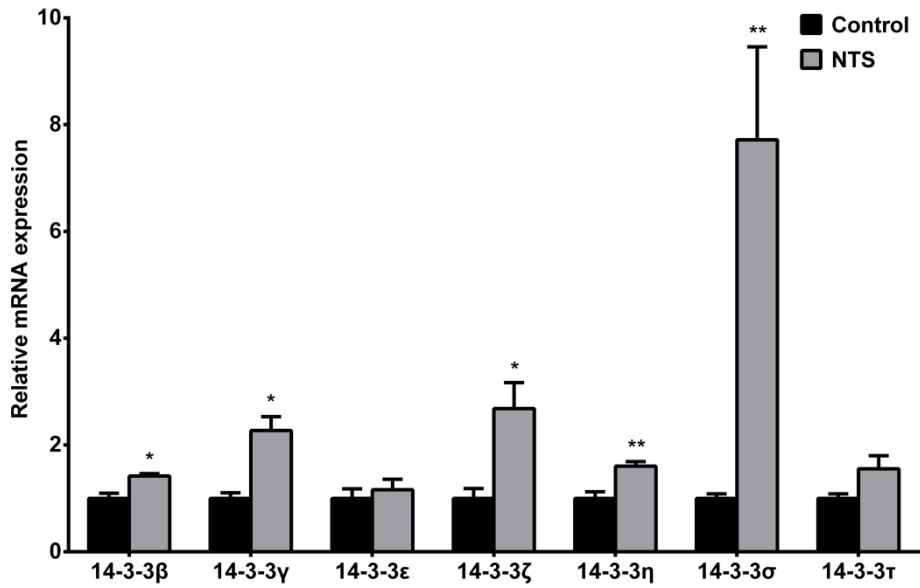
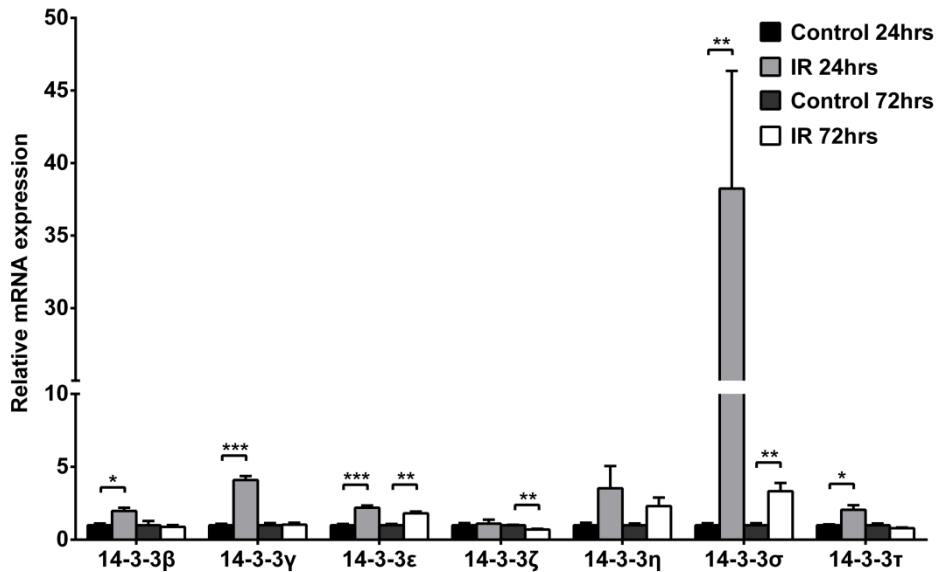


Εικόνα 26: Έκφραση της ισομορφής 14-3-3σ στο μοντέλο UUO. **A.** Αντιπροσωπευτικό western blot και το αντίστοιχο διάγραμμα ποσοτικοποίησης της έκφρασης της 14-3-3σ στο μοντέλο UUO. **B.** Εντοπισμός της ισομορφής 14-3-3σ σε τομές νεφρού ποντικών που έχουν υποστεί απολίνωση ουρητήρα για 2 (2 days) και για 8 ημέρες (8 days) καθώς και σε ζώα της ομάδας ελέγχου (Sham). Όπως φαίνεται στην επάνω ομάδα φωτογραφιών, η έκφραση της 14-3-3σ αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νεφρικής νόσου, ενώ στην κάτω ομάδα φωτογραφιών, σε αυξημένη μεγέθυνση, φαίνεται ότι η 14-3-3σ εκφράζεται κυρίως στους άπω εσπειραμένα σωληνάρια του νεφρικού παρεγχύματος. Τα εγγύς σωληνάρια εμφάνισαν ασθενέστερη χρώση ενώ τα σπειράματα δεν παρουσίασαν σημαντική χρώση. Κλίμακα 100 μm. * $p < 0,05$; ***, $p < 0.001$ προς το control. $n = 3$ ανά ομάδα.

3.4 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται *in vivo* σε άλλα ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων

Μετά τα ευρήματα στο μοντέλο UUO, τα επίπεδα έκφρασης της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών αξιολογήθηκαν σε δύο άλλα ζωικά μοντέλα νεφροπάθειας, το μοντέλο χορήγησης νεφροτοξικού ορού (NTS) και το μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (IR). Όπως περιγράφηκε και στις ενότητες 2.3.2 και 2.3.3 το NTS είναι ένα μοντέλο χρόνιας πειραματικής βλάβης ενώ το IR είναι μοντέλο οξείας νεφρικής βλάβης.

Σε συμφωνία με το μοντέλο UUO, το mRNA των περισσότερων από τις επτά ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένο και στα 2 μοντέλα. Επιπλέον, και στα δύο μοντέλα, η ισομορφή 14-3-3σ είχε το μεγαλύτερο επίπεδο αλλαγής στην έκφραση σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές. Συγκεκριμένα, εμφάνισε αύξηση κατά 6,7 φορές στο μοντέλο NTS, ενώ έδειξε αύξηση κατά 38 φορές 24 ώρες μετά την ισχαιμία και κατά 3 φορές 72 ώρες μετά την ισχαιμία στο IR μοντέλο (Εικόνα 27A και B αντίστοιχα). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από όλα τα ζωικά μοντέλα αποδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση των μελών της οικογένειας 14-3-3 και ιδιαίτερα της ισομορφής 14-3-3σ είναι ένα γενικό εύρημα κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης νεφρικών παθολογιών ποικίλης αιτιολογίας.

A**14-3-3 isoforms mRNA expression in NTS model****B****14-3-3 isoforms mRNA expression in IR model**

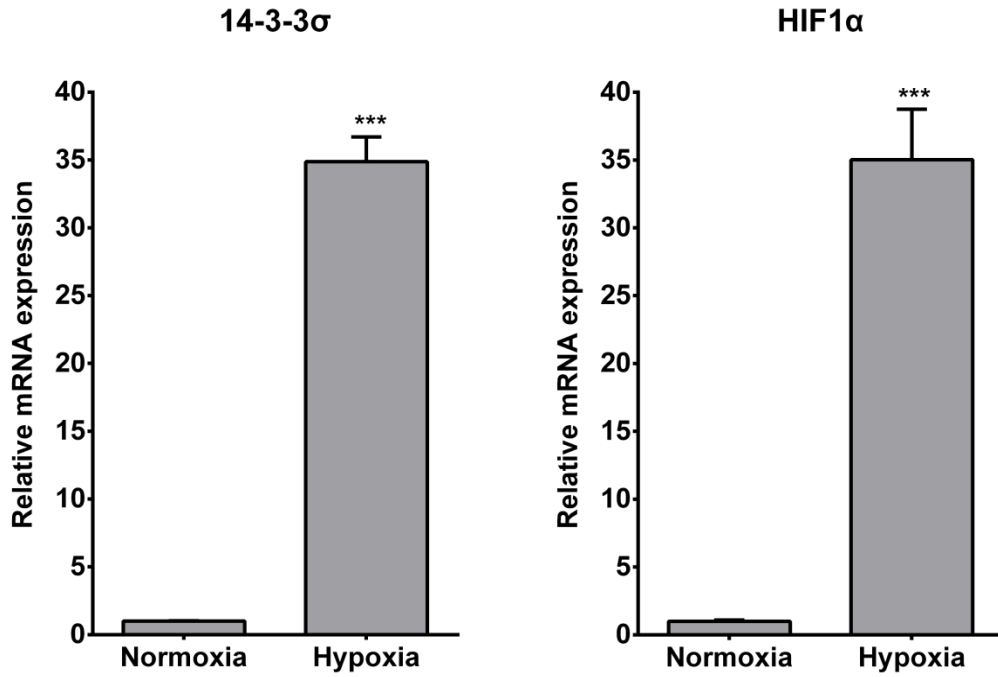
Εικόνα 27: Το μοτίβο έκφρασης των 14-3-3 ισομορφών σε άλλα ζωικά μοντέλα νεφρικών ασθενειών έδειξε μεγάλη ομοιότητα με το μοντέλο UUO. **A.** Σχετική έκφραση του mRNA των 14-3-3 ισομορφών στο μοντέλο της επαγόμενης από νεφροτοξικό ορό σπειραματονεφρίτιδας (NTS). **B.** Σχετική έκφραση του mRNA των 14-3-3 ισομορφών στο μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (IR). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***, $p < 0.001$ προς το control. $n = 3$ ανά ομάδα.

3.5 Η υποξία επηρεάζει την έκφραση της 14-3-3σ στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro*

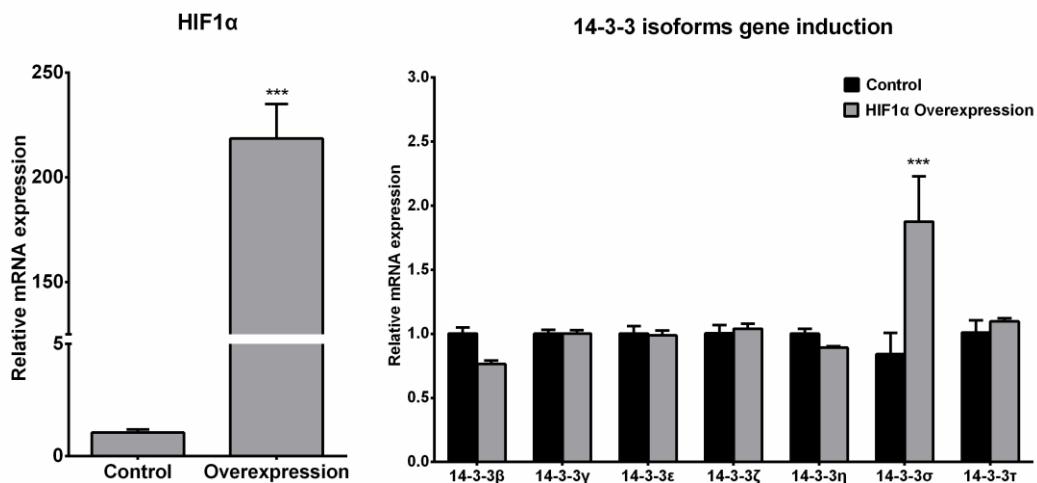
Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η νεφρική υποξία είναι βασικός παράγοντας στην παθοφυσιολογία της οξείας νεφρικής νόσου καθώς και στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (81,82). Υπάρχουν επίσης αυξανόμενες βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες αναφέρεται ότι η υποξία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από την οξεία στη χρόνια νεφρική νόσο (83,84). Τα δεδομένα αυτά κάνουν φανερό ότι κοινός παρονομαστής των ζωικών μοντέλων που μελετήθηκαν είναι η παρουσία υποξίας συνεπώς το επόμενο βήμα ήταν να διερευνηθεί εάν η έκφραση της 14-3-3σ επηρεάζεται σε υποξικές συνθήκες.

Για τον σκοπό αυτό, πρωτογενή επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης οξυγόνου. Πράγματι, η ανάλυση RT-qPCR έδειξε ότι η έκφραση της 14-3-3σ εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε συνθήκες υποξίας. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης παρουσίασε και ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1α, ο οποίος είναι το κύριο μόριο-ρυθμιστής της προσαρμοστικής απόκρισης στην υποξία (Εικόνα 28).

Τα παραπάνω αποτελέσματα επικυρώθηκαν και από την αύξηση του mRNA της 14-3-3σ σε κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF1α. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι η 14-3-3σ ήταν η μόνη ισομορφή της οικογένειας 14-3-3 που επηρεάστηκε από την υπερέκφραση του HIF1α στις κυτταρικές σειρές (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Η υποξία επάγει την έκφραση της 14-3-3σ in vitro. Σχετική έκφραση των mRNA των 14-3-3σ και HIF1α, σε πρωτογενή σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα κάτω από νορμοξικές και υποξικές συνθήκες. Η υποξία προκλήθηκε μετά από επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό που περιείχε ορυκτέλαιο για 1 ώρα. *** $p < 0.001$ έναντι νορμοξίας.

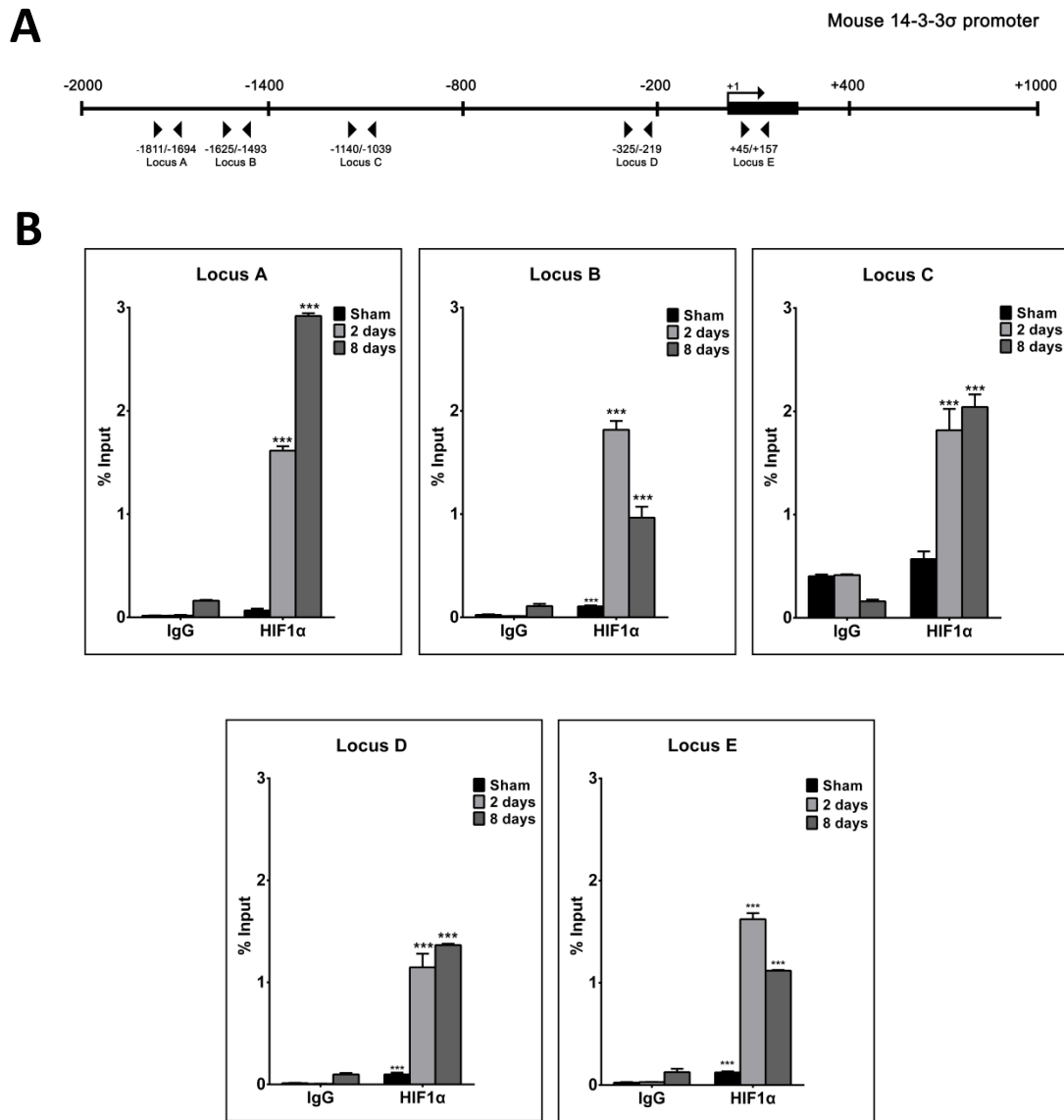


Εικόνα 29: Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α σε κυτταρικές σειρές οδήγησε σε επαγωγή έκφρασης αποκλειστικά της ισομορφής 14-3-3σ.

3.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1α αλληλεπιδρά με το υποκινητή της 14-3-3σ *in vivo* στο μοντέλο UUO

Με βάση τα *in vitro* αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α έχει ήδη βρεθεί αυξημένη στο μοντέλο UUO (85), αξιολογήθηκε με ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης η συμμετοχή του HIF1α στη μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή της 14-3-3σ σε αυτό το μοντέλο.

Αρχικά με βιοπληροφορική ανάλυση βρέθηκαν τα μοτίβα σύνδεσης που αναγνωρίζονται από τον HIF1α στον υποκινητή της 14-3-3σ (Εικόνα 30Α) Βάσει των τόπων σύνδεσης του HIF1α που προσδιορίστηκαν από την βιοπληροφορική ανάλυση, σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές (βλ Πίνακας 4, Ενότητα 2.7.2) ώστε να γίνει η ανίχνευση των ανοσοσυπλεγμάτων με RT-qPCR. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 30B, φυσιολογικά επίπεδα του HIF1α στα ζώα της ομάδας ελέγχου είναι επαρκή ώστε να επιτρέπουν τη δέσμευσή του στις θέσεις B, D και E του υποκινητή 14-3-3σ. Στα ζώα που υπέστησαν απολίνωση του ουρητήρα βρέθηκε ότι το μοτίβο πρόσδεσης του HIF1α ήταν διαφορετικό μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του στον υποκινητή της 14-3-3σ. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση του HIF1α στον υποκινητή αυξήθηκε και στις 5 διαφορετικές θέσεις στο διάστημα των 2 ημερών μετά την απολίνωση σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας αναφοράς. Στο διάστημα των 8 ημερών μετά την ουρητηρική απόφραξη παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της πρόσδεσης του HIF1α στις θέσεις A, C και D ενώ αντίθετα ο εμπλουτισμός σε HIF1α στις θέσεις B και E μειώθηκε.



Εικόνα 30: Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στο μοντέλο ΥΥΟ. **A.** Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή του γονιδίου 14-3-3 α στην οποία φαίνονται οι πιθανές θέσεις δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF1 α όπως προέκυψαν από την βιοπληροφορική ανάλυση. **B.** Εμπλουτισμός σε HIF1 α των διαφορετικών τόπων στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3 α στα ζώα της ομάδας ελέγχου (sham) και στα ζώα που υπέστησαν 2 (2 days) και 8 ημέρες (8 days) απολίνωση του ουρητήρα βάσει του μοντέλου ΥΥΟ. Τα ανοσοσυμπλέγματα ανιχνεύτηκαν με RT-qPCR. *** $p < 0.001$ έναντι του IgG. $n=3$ ανά ομάδα.

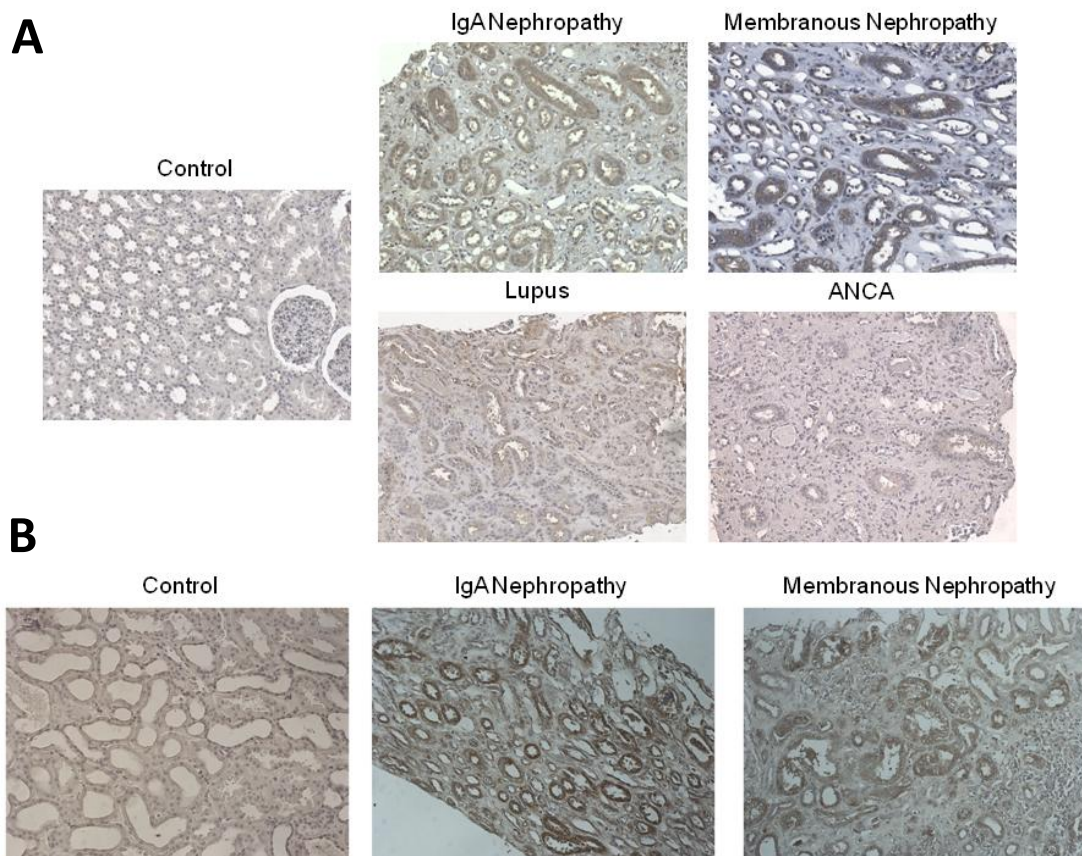
3.7 Οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται σε ανθρώπινες νεφροπάθειες

Σε συνέχεια της μελέτης της έκφρασης της οικογένειας 14-3-3 πρωτεϊνών σε *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών και σε *in vivo* συστήματα ζωικών μοντέλων νεφροπάθειας, η οικογένεια αυτή εξετάστηκε και σε βιοψίες από ασθενείς με σπειραματοπάθειες ποικίλης αιτιολογίας. Μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα έναντι όλων των ισομορφών της οικογένειας (pan 14-3-3) βιοψίες από 13 ασθενείς με IgA νεφροπάθεια (IgA Nephropathy), 10 ασθενείς με μεμβρανώδη νεφροπάθεια (Membranous Nephropathy), 11 ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (Lupus) και 11 ασθενείς με ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα (ANCA). Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 5 βιοψίες με τμήματα υγιούς ιστού από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε βιοψία λόγω κακοήθειας νεφρού.

Σε όλες τις βιοψίες που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε εντονότερη χρώση για την οικογένεια 14-3-3 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η οποία καταδεικνύει μια πιθανή αύξηση της έκφρασης της οικογένειας αυτής σε παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον σε όλες τις βιοψίες φάνηκε ότι οι 14-3-3 πρωτεΐνες εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων. Σε ορισμένα δείγματα, κυρίως ασθενών με IgA νεφροπάθεια, παρατηρήθηκε μια ήπια χρώση στα ποδοκύτταρα του σπειράματος ενώ σε καμία από τις εξεταζόμενες βιοψίες δεν παρατηρήθηκε χρώση στον διάμεσο νεφρικό χώρο (Εικόνα 31A).

Συνολικά μεταξύ των νεφροπαθειών παρατηρήθηκε εντονότερη χρώση στις περιπτώσεις IgA και στην μεμβρανώδους νεφροπάθειας σε σχέση με αυτές του λύκου και της ANCA. Για το λόγο αυτό, δείγματα από τις 2 αυτές παθολογικές καταστάσεις μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία, με το αντίσωμα έναντι της ισομορφής 14-3-3σ. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά που προέκυψαν με την χρήση του pan αντισώματος. Η χρώση ήταν ιδιαίτερως αυξημένη στα άπω σωληνάκια σε σχέση με τα υπόλοιπα τμήματα του

νεφρικού παρεγχύματος ενώ δεν παρατηρήθηκε χρώση στα σπειράματα και στον διάμεσο νεφρικό χώρο (Εικόνα 31B).



Εικόνα 31: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών και για την ισομορφή 14-3-3σ σε δείγματα βιοψιών ασθενών με νεφροπάθειες ποικίλης αιτιολογίας. **A.** Η χρώση για την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι εντονότερη σε όλες τις νεφροπάθειες σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Η IgA και η μεμβρανώδης νεφροπάθεια παρουσιάζουν εντονότερη χρώση μεταξύ των παθολογικών καταστάσεων που μελετήθηκαν. **B.** Η ένταση της χρώσης για την πρωτεΐνη 14-3-3σ είναι πιο ισχυρή στις βιοψίες ασθενών με IgA και μεμβρανώδη νεφροπάθεια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος είναι ένα νόσημα με πολύ υψηλή συχνότητα εμφάνισης καθώς προσβάλλει το 10-12% του γενικού πληθυσμού. Στο τελικό της στάδιο η υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση ή μεταμόσχευση νεφρού είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ασθενών. Οι ασθενείς με ΧΝΝ μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ή να εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα ενώ η νόσος βρίσκεται σε εξελιγμένα στάδια. Για τους λόγους αυτούς είναι επιτακτική η κατανόηση των μηχανισμών και της παθοφυσιολογίας της νόσου και η ανακάλυψη νέων αξιόπιστων βιολογικών δεικτών που αντικατοπτρίζουν την εξέλιξή της. Καθώς η ΧΝΝ είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί μοριακοί και κυτταρικοί μεσολαβητές, θα πρέπει να μελετηθεί με εφαρμογές Βιολογίας Συστημάτων οι οποίες προσφέρουν μια ολιστική προσέγγιση των πολύπλοκων φαινομένων.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι η calreticulin, μια δεσμεύουσα το Ca^{2+} πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου έχει αυξημένη έκφραση στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα κατά την εξέλιξη της νεφρικής νόσου στο μοντέλο της αποφρακτικής νεφροπάθειας στα τρωκτικά. Έχει επίσης δειχτεί ότι αυτή η υπερέκφραση σχετίζεται με έναν προϊνωτικό φαινότυπο και με αύξηση του κυτταρικού στρες που προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στα κύτταρα αυτά (44,51).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του πρωτεωμικού προφίλ των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων που υπερεκφράζουν calreticulin. Τα ευρήματα της πρωτεωμικής ανάλυση έδειξαν έναν πιθανά κρίσιμο ρόλο της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών στην ανάπτυξη της νεφρικής παθολογίας. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο μεταγράφων και πρωτεΐνης στο μοντέλο της αποφρακτικής νεφροπάθειας

ποντικού και επαληθεύτηκαν σε δυο άλλα ζωικά μοντέλα, αυτά της χορήγησης νεφροτοξικού ορού και της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Από την οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών, η ισομορφή 14-3-3σ (γνωστή και ως stratifin) βρέθηκε να έχει την μεγαλύτερη διαφορική έκφραση. Δεδομένου ότι η υποξία είναι κοινός παρανομαστής των τριών ζωικών μοντέλων που εξετάστηκαν, μελετήθηκε επίσης η εμπλοκή ενός βασικού μορίου της υποξίας, του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α, στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της 14-3-3σ. Τέλος, η εξέταση βιοψιών ασθενών με νεφροπάθειες ποικίλης αιτιολογίας έδειξε αυξημένη έκφραση της οικογένειας 14-3-3 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, κυρίως όμως στην IgA και στην μεμβρανώδη νεφροπάθεια. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν για πρώτη φορά στοιχεία για την εμπλοκή της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών στην νεφρική παθολογία.

Η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών αποτελείται από μικρά, όξινα πολυπεπίδια που υπάρχουν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα [26]. Στα θηλαστικά, η οικογένεια αποτελείται από επτά μέλη, επίσης γνωστά ως ισομορφές (β, γ, ε, η, ζ, σ και τ / θ) που εμφανίζουν πολύ υψηλή ομολογία στην αλληλουχία τους (86). Συνδέονται στα αμινοξικά κατάλοιπα φωσφοσερίνης και φωσφοθρεονίνης των πρωτεϊνών-στόχων τους και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης συμβάλλουν στη δράση, τη σταθεροποίηση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μορίων αυτών (87,88). Οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η αυτοφαγία (87–89) δρώντας κυρίως ενδοκυτταρικά αλλά και εξωκυτταρικά (90) εμφανίζοντας σε πολλές περιπτώσεις ιστοειδικότητα. Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων και σηματοδοτικών μονοπατιών ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Εξαιτίας της συμμετοχής τους σε τόσες διεργασίες

είναι αναμενόμενο ότι τα μέλη της οικογένειας 14-3-3 έχουν σημαντική συμβολή σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και αποτελούν πιθανούς στόχους για φαρμακολογικές παρεμβάσεις (91).

Από την μελέτη της οικογένειας 14-3-3 *in vivo* σε τρία ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων φάνηκε ότι η πλειοψηφία των ισομορφών έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση και στα τρία μοντέλα. Ωστόσο, σε όλα τα ζωικά πρότυπα που μελετήθηκαν η ισομορφή 14-3-3σ παρουσίασε τις πιο δραματικές αλλαγές. Η 14-3-3σ είχε αρχικά περιγραφεί στην βιβλιογραφία ως το μέλος της οικογένειας που εκφραζόταν σχεδόν αποκλειστικά στο πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο (92) ενώ δεν υπήρχαν αναφορές για την έκφραση της στο νεφρικό παρέγχυμα. Όσον αφορά τη δομή της, η 14-3-3σ διαφέρει από τα άλλα έξι μέλη της οικογένειας στην περιοχή των αμινοξέων 202-206 καθώς η μεθειονίνη (θέση 202), το ασπαραγινικό οξύ (θέση 204) και η ιστιδίνη (θέση 206) έχουν αντικατασταθεί στην περίπτωση της 14-3-3σ από ισολευκίνη, γλουταμινικό οξύ και ασπαραγινικό οξύ αντίστοιχα (64). Σε αυτές τις δομικές αλλαγές μπορεί να οφείλονται τα διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά της ισομορφής αυτής, καθώς και το γεγονός ότι σχηματίζει κατά προτίμηση ομοδιμερή (93).

Η 14-3-3σ έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο καθώς έχει προταθεί ότι δρα πιθανά σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή διαφοροποίηση των κυττάρων (94). Η δράση της αυτή πιστεύεται ότι οφείλεται στην επαγωγή της από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ως απάντηση στην καταστροφή του DNA. Είναι εξαιρετικά σημαντικό το γεγονός ότι η 14-3-3σ είναι η μόνη ισομορφή της οικογένειας 14-3-3 που επάγεται από το p53 (95). Σε ότι αφορά τις μελέτες σχετικά με την ισομορφή 14-3-3σ στα νεφρά, στη βιβλιογραφία αναφέρεται μειωμένη έκφραση της όταν εκφράζεται μια συγκεκριμένη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Von Hippel-Lindau στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (96). Σε άλλη μελέτη επισημαίνεται πως το γονίδιο της 14-3-3σ είναι υπερμεθυλιωμένο, γεγονός

που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την απώλεια της έκφρασής του σε νεφρικούς καρκινικούς ιστούς (97). Ωστόσο, δεν υπάρχουν άλλες μελέτες σχετικά με το ρόλο της 14-3-3σ σε άλλες παθολογικές διεργασίες στα νεφρά, όπως η νεφρική ίνωση.

Στην παρούσα εργασία αναφέρεται για πρώτη φορά ότι η οικογένεια 14-3-3 και κυρίως η ισομορφή 14-3-3σ υπερεκφράζονται και σε άλλες παθολογικές διεργασίες στο νεφρικό παρέγχυμα πέραν του νεφροκυτταρικού καρκινώματος. Σημείο εκκίνησης αποτέλεσε η παρατήρηση ότι η έκφραση των περισσότερων ισομορφών επηρεάζεται *in vitro* από τα επίπεδα της calreticulin και συγκεκριμένα αυξάνεται παρουσία αυξημένων επιπέδων calreticulin και μειώνεται όταν τα επίπεδα της calreticulin είναι μειωμένα. Τα μειωμένα επίπεδα calreticulin φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της οικογένειας 14-3-3 και *in vivo* στο μοντέλο UUO (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται). Δεδομένου ότι η απάλειψη του γονιδίου της calreticulin προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα (47), το μοντέλο εφαρμόστηκε σε ετερόζυγα διαγονιδιακά ποντίκια με περίπου 50% μειωμένη έκφραση calreticulin (51).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, είναι πιθανό η έκφραση της calreticulin και κατ'επέκταση της 14-3-3σ στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος να είναι αποτέλεσμα της σύγκλισης δυο πολύ σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών, της υποξίας και του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress). Στους νεφρούς, η υποξία μπορεί να προκαλέσει ανισορροπία μεταξύ των ορθώς και μη ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα τη συσσώρευση και μη έκκριση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση του αντίστοιχου μονοπατιού (Unfolded Protein Response, UPR). Αντίθετα, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το ER stress προκαλεί υποξία περιλαμβάνουν την αλλαγή της απαίτησης του ιστού σε οξυγόνο, την δυσλειτουργία του μεταβολισμού του σιδήρου και την μείωση της παραγωγής ερυθροποιητίνης. (25,29,98). Όπως είναι γνωστό από τη

βιβλιογραφία, κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin έχουν αυξημένο στρες (51,99). Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία από μια κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος δείχνουν ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1α είναι αυξημένη σε κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin (100).

Στη παρούσα εργασία διερευνήθηκε κυρίως η συμμετοχή του μονοπατιού της υποξίας στην μεταγραφική ρύθμιση της 14-3-3σ. Δεδομένου ότι σε όλα τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν, η υποξία είναι κοινός παρονομαστής (81,82) μελετήθηκε στο μοντέλο UUO η συσχέτιση του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF1α με τον υποκινητή του γονιδίου της 14-3-3σ. όπου και βρέθηκε ότι ο HIF1α συνδέεται σε πέντε διαφορετικά σημεία πάνω στον υποκινητή της σίγμα καταδεικνύοντας ότι πιθανότατα συμμετέχει στην μεταγραφική ρύθμισή της. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι στα κύτταρα που υπερεκφράζουν calreticulin η έκφραση του HIF1α βρέθηκε αυξημένη κατά 10 φορές περίπου σε σχέση με το control (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται), παρατήρηση που στηρίζει τη σύνδεση μεταξύ της calreticulin και της 14-3-3σ μέσω του HIF1α.

Μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες λειτουργίες των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η ικανότητα τους να προσδένονται σε πρωτεΐνες ώστε να τις συγκρατούν σε συγκεκριμένο τμήμα του κυττάρου. Στα πλαίσια αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι έκτοπη υπερέκφραση της 14-3-3σ μπορεί να σταματήσει τα κύτταρα στην μετάβαση τους από την G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ αντίθετα, απουσία της 14-3-3σ, κύτταρα που έχουν υποστεί ακτινοβολία οδηγούνται σε μιτωτική καταστροφή και κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, η 14-3-3σ είναι ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου καθώς έχει δυνατότητα να εμποδίζει τις πρωτεΐνες που ξεκινούν τη διαδικασία της μίτωσης να εισέλθουν στον πυρήνα (94,101,102). Με ανάλογο τρόπο η 14-3-3σ εμποδίζει την πρόοδο της απόπτωσης καθώς συνδέεται με το προ-αποπτωτικό μόριο Bax και το κρατά στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας το να

μετακινηθεί προς τα μιτοχόνδρια και να προκαλέσει την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων (103,104).

Με βάση τα παραπάνω, είναι πιθανό η υπερέκφραση της 14-3-3σ που παρατηρείται στην παρούσα εργασία σε νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro*, *in vivo* αλλά και σε δείγματα ασθενών να μην αποτελεί δείκτη βλάβης του νεφρικού παρεγχύματος. Αντίθετα, μπορεί η υπερέκφραση αυτή, η οποία επάγεται από την υποξία και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, να έχει ως στόχο την προστασία των επιθηλιακών κυττάρων από την απόπτωση και την μιτωτική καταστροφή. Ο προτεινόμενος μηχανισμός μπορεί να εξηγεί και τα ευρήματα μιας πρόσφατης έρευνας στην οποία μελετήθηκαν οι κερατίνες 8 και 18 σε διάφορα ζωικά μοντέλα νεφρικών παθήσεων αλλά και σε ασθενείς με νεφρικές παθήσεις (105). Οι κερατίνες, των οποίων μια βασική λειτουργία είναι να προστατεύουν τα επιθηλιακά κύτταρα από απόπτωση και νέκρωση που προκαλούνται από μηχανικό και μη μηχανικό στρες (106,107), είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τις 14-3-3 (108–110). Στην μελέτη βρέθηκε ότι σε συνθήκες στρες οι κερατίνες 8 και 18 είναι υπερεκφρασμένες και υπερφωσφορυλιωμένες σε νεφρικά σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα, φαινόμενο το οποίο είναι πολύ πιθανό να διαμεσολαβείται και σε αυτή την περίπτωση από την 14-3-3σ με σκοπό την προστασία του κυττάρου.

Συνολικά τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείχνουν για πρώτη φορά την εμπλοκή της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών και κυρίως της ισομορφής σ στην νεφρική παθολογία και προτείνουν έναν πιθανό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης της 14-3-3σ μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της υποξίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. OpenStax. Anatomy & Physiology. OpenStax CNX; 2016.
2. Ηρακλής Ιωαννίδης. Επίτομη κλινική νεφρολογία. 1η έκδοση. Εκδόσεις Ροτόντα; 2007. 465 p.
3. Scanlon VC, Sanders T. Essentials of anatomy and physiology. Male hypogonadism. 2007.
4. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. The Lancet. 2017.
5. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. JAMA - J Am Med Assoc. 2010;
6. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. Journal of Clinical Investigation. 2006.
7. Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. JAMA. 2015;
8. Of OJOS, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl. 2013;
9. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. Lancet. 2012;
10. DuBose, TD. National Kidney Foundation Primer on Kidney Diseases. National Kidney Foundation Primer on Kidney Diseases. 2014.
11. Boyd JK, Cheung CK, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. Kidney International. 2012.
12. Waldman M, Austin HA. Controversies in the treatment of idiopathic membranous nephropathy. Nature Reviews Nephrology. 2009.

13. Beck LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: Recent travels and new roads ahead. *Kidney International*. 2010.
14. Makker SP, Tramontano A. Idiopathic Membranous Nephropathy: An Autoimmune Disease. *Semin Nephrol*. 2011;
15. Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland SJ. Podocyte disorders: Core curriculum 2011. *Am J Kidney Dis*. 2011;
16. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*. 2010.
17. Jennette JC, Nachman PH. ANCA glomerulonephritis and vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;
18. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2007.
19. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*. 2011.
20. Kaissling B, LeHir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2013.
21. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol*. 2010;
22. Eddy AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney International Supplements*. 2014.
23. Campanholle G, Ligresti G, Gharib S a, Duffield JS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;
24. Pereira ER, Frudd K, Awad W, Hendershot LM. Endoplasmic Reticulum (ER) stress and Hypoxia response pathways interact to Potentiate Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Transcriptional activity on targets like Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Biol Chem*. 2014;
25. Maekawa H, Inagi R. Stress signal network between hypoxia and ER

- stress in chronic kidney disease. *Frontiers in Physiology*. 2017.
26. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;
 27. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;
 28. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;
 29. Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum- new mechanisms in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2014.
 30. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;
 31. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield C a. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*. 1998;
 32. Liu J, Wei Q, Guo C, Dong G, Liu Y, Tang C, et al. Hypoxia, HIF, and associated signaling networks in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
 33. Zagórska A, Dulak J. HIF-1: The knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*. 2004.
 34. Simon MC. The Hypoxia Response Pathways - Hats Off! *N Engl J Med*. 2016;
 35. Tanaka T, Nangaku M. The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2010.
 36. Blaustein M, Pérez-Munizaga D, Sánchez MA, Urrutia C, Grande A, Risso G, et al. Modulation of the Akt Pathway Reveals a Novel Link with PERK/eIF2 α , which Is Relevant during Hypoxia. *PLoS One*. 2013;
 37. Muratsu-Ikeda S, Nangaku M, Ikeda Y, Tanaka T, Wada T, Inagi R.

- Downregulation of miR-205 modulates cell susceptibility to oxidative and endoplasmic reticulum stresses in renal tubular cells. *PLoS One*. 2012;
38. Chiang C-K, Nangaku M, Tanaka T, Iwawaki T, Inagi R. Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;
 39. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science (80-)*. 2009;
 40. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση Σ, Ζαχαριάδης Γ, Ζώτου ΑΣ, Σαμανίδου Β. Βιοαναλυτική Χημεία [Internet]. ύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών; 2015. Available from: <http://hdl.handle.net/11419/3667>
 41. He JC, Chuang PY, Ma'ayan A, Iyengar R. Systems biology of kidney diseases. *Kidney International*. 2012.
 42. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2005.
 43. Cisek K, Krochmal M, Klein J, Mischak H. The application of multi-omics and systems biology to identify therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2016.
 44. Kypreou KP, Kavvadas P, Karamessinis P, Peroulis M, Alberti A, Sideras P, et al. Altered expression of calreticulin during the development of fibrosis. *Proteomics*. 2008;
 45. Arvaniti E, Moulos P, Vakrakou A, Chatziantoniou C, Chadjichristos C, Kavvadas P, et al. Whole-transcriptome analysis of UUO mouse model of renal fibrosis reveals new molecular players in kidney diseases. *Sci Rep*. 2016;
 46. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a

- multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2009;
47. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* 1999;
 48. Lynch JM, Chilibeck K, Qui Y, Michalak M. Assembling pieces of the cardiac puzzle; calreticulin and calcium-dependent pathways in cardiac development, health, and disease. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2006.
 49. Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2009.
 50. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: From the ER lumen to the extracellular space. *Trends in Cell Biology.* 2001.
 51. Prakoura N, Politis PK, Ihara Y, Michalak M, Charonis AS. Epithelial calreticulin up-regulation promotes profibrotic responses and tubulointerstitial fibrosis development. *Am J Pathol.* 2013;
 52. Mendlovic F, Conconi M. Calreticulin: a Multifaceted Protein. *Nat Educ.* 2011;
 53. Aitken A. 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology.* 2006.
 54. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.* 1987;
 55. Hubert H. 14-3-3 Proteins. In: *Handbook of Cell Signaling.* 2009. p. 1367–74.
 56. van Heusden GPH, Steensma HY. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast.* 2006.
 57. Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C. Evolution of

- the 14-3-3 protein family: Does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J Mol Evol.* 2000;
58. Van Heusden GPH, Griffiths DJF, Ford JC, Chin-A-Woeng TFC, Schrader PAT, Carr AM, et al. The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Can be Replaced by a Plant Homologue. *Eur J Biochem.* 1995;
 59. Kleppe R, Martinez A, Døskeland SO, Haavik J. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;
 60. Cornell B, Toyo-Oka K. Deficiency of 14-3-3 ϵ and 14-3-3 ζ by the Wnt1 promoter-driven Cre recombinase results in pigmentation defects. *BMC Res Notes.* 2016;
 61. Cheah PS, Ramshaw HS, Thomas PQ, Toyo-Oka K, Xu X, Martin S, et al. Neurodevelopmental and neuropsychiatric behaviour defects arise from 14-3-3 ζ deficiency. *Mol Psychiatry.* 2012;
 62. Toyo-oka K, Wachi T, Hunt RF, Baraban SC, Taya S, Ramshaw H, et al. 14-3-3 and Regulate Neurogenesis and Differentiation of Neuronal Progenitor Cells in the Developing Brain. *J Neurosci.* 2014;
 63. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;
 64. Li Z, Liu J-Y, Zhang J-T. Review Article 14-3-3 σ , the double-edged sword of human cancers. *Am J Transl Res.* 2009;
 65. Bridges D, Moorhead GBG. 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Sci Signal.* 2005;
 66. Cornell B, Toyo-oka K. 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2017;
 67. Wang B, Yang H, Liu YC, Jelinek T, Zhang L, Ruoslahti E, et al. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry.* 1999;

68. Dalal SN, Schweitzer CM, Gan J, DeCaprio JA. Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol.* 1999;
69. El Machhour F, Keuylian Z, Kavvadas P, Dussaule J-C, Chatziantoniou C. Activation of Notch3 in Glomeruli Promotes the Development of Rapidly Progressive Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2015;
70. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology.* 1996;
71. No Title [Internet]. Available from: www.uniprot.org
72. No Title [Internet]. Available from: www.ingenuity.com
73. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2013.
74. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: Insights from genetically engineered animals. *Kidney International.* 2005.
75. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney International.* 2009.
76. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev.* 2015;
77. Le Clef N, Verhulst A, D'Haese PC, Vervaet BA. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. *PLoS One.* 2016;
78. Fu Y, Du Y, Mohan C. Experimental anti-GBM disease as a tool for studying spontaneous lupus nephritis. *Clinical Immunology.* 2007.
79. Chip CI, Carey MF, Peterson CL, Smale ST, Press C, Spring C. ChIP Protocol. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;
80. Collas P. Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin

- immunoprecipitation. *Front Biosci.* 2008;
81. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2013.
 82. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: Tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nature Reviews Nephrology.* 2010.
 83. Nangaku M, Hirakawa Y, Mimura I, Inagi R, Tanaka T. Epigenetic Changes in the Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Transition. *Nephron.* 2017;
 84. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *AJP Ren Physiol.* 2014;
 85. Gao F, Wang Y, Li S, Wang Z, Liu C, Sun D. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases attenuates renal interstitial fibrosis in a murine unilateral ureteral occlusion model. *Life Sci.* 2016;
 86. Aitken A, Collinge DB, van Heusden BPH, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, et al. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends in Biochemical Sciences.* 1992.
 87. Aghazadeh Y, Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discovery Today.* 2016.
 88. Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2011.
 89. Pozuelo-Rubio M. 14-3-3 Proteins are Regulators of Autophagy. *Cells.* 2012;
 90. Kaplan A, Bueno M, Fournier AE. Extracellular functions of 14-3-3 adaptor proteins. *Cellular Signalling.* 2017.
 91. Babula JJ, Liu J-Y. Integrate Omics Data and Molecular Dynamics Simulations toward Better Understanding of Human 14-3-3 Interactomes and Better Drugs for Cancer Therapy. *J Genet Genomics.*

- 2015;
92. Nakajima T, Shimooka H, Weixa P, Segawa A, Motegi A, Jian Z, et al. Immunohistochemical demonstration of 14-3-3 sigma protein in normal human tissues and lung cancers, and the preponderance of its strong expression in epithelial cells of squamous cell lineage. *Pathol Int.* 2003;
 93. Wilkert EW, Grant RA, Artim SC, Yaffe MB. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J Biol Chem.* 2005;
 94. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews Cancer.* 2003.
 95. Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 σ and other proteins. *Seminars in Cancer Biology.* 2006.
 96. Tsuchiya MI, Okuda H, Takaki Y, Baba M, Hirai SI, Ohno S, et al. Renal cell carcinoma- and pheochromocytoma-specific altered gene expression profiles in VHL mutant clones. *Oncol Rep.* 2005;
 97. Liang S, Xu Y, Shen G, Zhao X, Zhou J, Li X, et al. Gene expression and methylation status of 14-3-3 σ in human renal carcinoma tissues. *IUBMB Life.* 2008;
 98. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Current Opinion in Pharmacology.* 2010.
 99. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation.* 2005.
 100. Weng WC, Lin KH, Wu PY, Lu YC, Weng YC, Wang BJ, et al. Calreticulin Regulates VEGF-A in Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol.* 2015;
 101. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature.* 1999;
 102. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997;

103. Samuel T, Weber HO, Rauch P, Verdoodt B, Eppel JT, McShea A, et al. The G2/M Regulator 14-3-3 ζ Prevents Apoptosis through Sequestration of Bax. *J Biol Chem*. 2001;
104. Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, Narita M, Ito T, Matsuda H, et al. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem*. 2003;
105. Djurdjaj S, Papisotiriou M, Bülow RD, Wagnerova A, Lindenmeyer MT, Cohen CD, et al. Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury. *Kidney Int*. 2016;
106. Oshima RG. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death and Differentiation*. 2002.
107. Coulombe PA, Omary MB. "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002.
108. Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR, Hermeking H. Targeted Proteomic Analysis of 14-3-3 ζ , a p53 Effector Commonly Silenced in Cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2005;
109. Liao J, Omary MB. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol*. 1996;
110. Ku NO, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J*. 1998;

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από τις διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεϊνικές κηλίδες μεταξύ κυτταρικών σειρών ελέγχου και κυτταρικών σειρών που υπερέκφραζαν calreticulin

Πρωτεϊνική κηλίδα	Όνομα πρωτεΐνης	Κωδικός πρόσβασης	Mascot Score	MS Coverage	Θεωρητικό μοριακό βάρος	pI
1	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	124	72	29326	4.50
2	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	116	67	27899	4.60
	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	86	54	28179	4.61
	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	83	60	28456	4.65
	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	58	35	28372	4.61
3	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	58	30	47911	4.60
4	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	259	76	44079	4.90
5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	162	67	56525	5.10
	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	110	52	48490	4.81
6	Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	228	68	50095	4.60

7	Vimentin	VIME_HUMAN	368	79	53676	4.90
8	Vimentin	VIME_HUMAN	156	56	53676	4.90
9	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	74	34	42108	5.20
10	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	94	47	27248	4.90
11	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	139	49	42052	5.20
12	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	134	57	42052	5.20
13	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	117	43	42052	5.20
14	Vimentin	VIME_HUMAN	166	59	53676	4.90
15	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	89	48	42052	5.20
16	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	105	42	42052	5.20
17	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	58	33	42052	5.20
18	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	91	39	42052	5.20
19	Vimentin	VIME_HUMAN	130	56	53676	4.90
20	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	72	37	51230	5.30
21	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1_HUMAN	63	34	52189	5.30
22	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	90	35	71082	5.20
23	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	131	36	71082	5.20

24	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	67	39	42052	5.20
25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN	111	59	25151	5.20
26	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	57	38	42052	5.20
27	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_HUMAN	63	35	50804	4.80
28	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	61	23	53671	5.40
29	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	235	58	70294	5.40
30	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_HUMAN	78	29	61263	5.40
31	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	91	34	70294	5.40
	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	66	30	71082	5.24
	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_HUMAN	57	29	73920	5.81
32	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	110	55	36900	5.70
33	26S protease regulatory subunit 7	PRS7_HUMAN	102	40	49002	5.60
34	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	55	36	49484	5.90
35	Mitochondrial inner membrane protein	IMMT_HUMAN	57	20	84026	6.10
36	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	90	56	25133	6.00
37	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	61	37	29822	6.20
38	Ezrin	EZRI_HUMAN	79	29	69484	5.90

39	Ezrin	EZRI_HUMAN	61	25	69484	5.90
40	Prolyl 3-hydroxylase 3	P3H3_HUMAN	60	23	82584	5.90
41	Vinculin	VINC_HUMAN	241	45	124292	5.40
42	Proteasome subunit alpha type-6	PSA6_HUMAN	52	32	27838	6.40
43	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN	89	59	28900	6.80
44	PDZ and LIM domain protein 1	PDLI1_HUMAN	85	55	36505	6.60
45	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GUAA_HUMAN	102	34	77408	6.40
46	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	211	61	47481	7.70
47	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	52	26	59020	5.00
48	Fascin	FSCN1_HUMAN	107	44	55123	7.00
49	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	DHE3_HUMAN	153	50	61701	8.50
	Fascin	FSCN1_HUMAN	58	36	55123	7.02
50	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	96	68	22324	9.20
51	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	122	53	39851	9.20
52	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	176	66	47481	7.70
53	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	68	28	58470	9.00
54	T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	76	32	59842	8.60

55	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	271	65	58470	9.00
56	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	169	57	58470	9.00
	Transketolase	TKT_HUMAN	80	39	68519	8.54
57	Cofilin-1	COF1_HUMAN	78	59	18719	9.10
58	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	138	52	36201	9.30
59	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	129	65	39851	9.20
60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	167	60	36201	9.30
61	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN	103	43	38837	9.60
62	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	189	70	39851	9.20
63	Serpin H1	SERPH_HUMAN	59	37	46525	9.30
64	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN	187	64	44985	9.20
65	Nucleolin	NUCL_HUMAN	120	26	76625	4.40
66	Ezrin	EZRI_HUMAN	168	41	69484	5.90
67	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN	147	44	61187	5.60
68	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4HA1_HUMAN	85	29	61296	5.60
69	Calreticulin	CALR_HUMAN	235	66	48283	4.10
70	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN	175	46	53671	5.40

71	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT_HUMAN	71	23	48846	6.60
72	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	290	84	44079	4.90
73	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	59	25	32746	4.50
74	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN	76	31	28619	4.50
75	Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMAN	96	57	22826	6.00
76	Cathepsin D	CATD_HUMAN	53	19	45037	6.10
77	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN	109	52	23569	5.30
78	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_HUMAN	60	42	17309	5.80
79	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I_HUMAN	95	35	36878	5.30
80	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	138	59	38808	8.50
81	Putative annexin A2-like protein	AXA2L_HUMAN	67	37	38806	6.58
82	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	50	19	32746	4.50

