



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του επαγόμενου από την υποξία  
μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου»**

**ΤΣΑΓΓΑΡΗ ΜΑΡΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ**  
**Σεπτέμβριος 2014**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**1<sup>ος</sup> εξεταστής**  
**(Επιβλέπων)**

Δρ. Παναγιώτης **Λιάκος**  
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> εξεταστής**

Δρ. Ασπασία **Τσέζου**  
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> εξεταστής**

Δρ. Νικόλαος **Βαμβακόπουλος**  
Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Λιάκο Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την ανάθεση, τη διεξαγωγή και τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης τους καθηγητές κ. Τσέζου Ασπασία και κ. Βαμβακόπουλο Νικόλαο, που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ιδιαίτερα τη μεταδιδάκτορα Μπεφάνη Χριστίνα, για τη βοήθειά και την συμπαράσταση της στη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη, κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου όπως επίσης και τον καλό μου φίλο Γιώργο Ζουρμπαδέλο για την πολύτιμη συντροφιά του και την ηθική στήριξη που μου παρείχε.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν τους δομικούς λίθους του αγγειακού εμβρυϊκού δικτύου. Κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η υποξία δίνει το έναυσμα για την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος του εμβρύου. Κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF (Hypoxia Inducible Factors). Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων, υποδεικνύουν ότι οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αναπτυξιακή του αγγειακού ενδοθηλίου ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α αναστέλλει την φυσιολογική ανάπτυξη του αγγειακού ενδοθηλίου.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της κινητικής της έκφρασης του HIF-2α, η σύγκριση της με εκείνη του HIF-1α, η μεταγραφική δραστηριότητα τους και την επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων HMEC-1. Παρατηρήσαμε σταθερή επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α από την υποξία, ενώ η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α φάνηκε να είναι διφασική. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι η ολική μεταγραφική ενεργότητα των HIF επάγεται από την υποξία με τρόπο χρονο-εξαρτώμενο. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι η υποξία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούνται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Γίνεται φανερό ότι η υποξία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και υποδεικνύεται ότι η υποξία έχει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του ενδοθηλίου. Επιπλέον, σ' αυτή τη διαδικασία επάγεται η έκφραση και η μεταγραφική ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων HIF οι οποίοι είναι γνωστό ότι επάγουν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην φυσιολογική αναπτυξιακή των αγγείων μέσω του ενδοθηλίου.

## ABSTRACT

Microvascular endothelial cells are the structural components of the embryonic vascular system. During early embryonic development, hypoxia triggers the vascular development of the embryo. The primary modulators of cellular response to hypoxia are the family of hypoxia inducible transcriptional factors HIF (Hypoxia Inducible Factors). Animal model's research has shown that these transcriptional factors play a dominant role in the development of vascular endothelium, while gene silencing of HIF-2 $\alpha$  has been shown to inhibit the normal development of vascular endothelium.

This work aims to study the kinetics of HIF-2 $\alpha$  protein expression and compare it to that of HIF-1 $\alpha$ , study the transcriptional activity of HIFs and the effect of hypoxia on the proliferation of human microvascular endothelial cells HMEC-1. We observed a stable induction of HIF-2 $\alpha$  expression by hypoxia, while the induction of HIF-1 $\alpha$  expression was shown to be biphasic. We also observed that HIF transcriptional activity is induced by hypoxia in a time-dependent manner. Finally, we observed that hypoxia enhances cell proliferation of HMEC-1.

The above results are observed for the first time in literature. It becomes clear that hypoxia enhances the proliferation of human microvascular endothelial cells and suggests that hypoxia has an essential role in physiological development of endothelium. Moreover, in this process we observed an induction of HIF protein expression and transcriptional activity and these transcriptional factors are known to induce a large number of genes that are implicated in the physiological vascular development through endothelium.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 ΤΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1. Η ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΚΑΙ Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Ο HIF-2.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.1 Δομή.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.2 Κατανομή στους ιστούς.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.3 Γονίδια στόχοι.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.2 Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση.....</b>	<b>33</b>
<b>1.5.2.1 Φωσφορυλίωση.....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.2.2 Ακετυλίωση.....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.2.3 Σουμοϋλίωση.....</b>	<b>35</b>
<b>1.5.2.4 Ρύθμιση από χημικούς παράγοντες.....</b>	<b>35</b>
<b>1.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HIF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....</b>	<b>36</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>40</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.1 Κυτταρικές σειρές.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....</b>	<b>41</b>

2.1.3 Χημικές ενώσεις-αντιδραστήρια.....	42
2.1.4 Αντισώματα.....	42
2.1.5 Εξοπλισμός.....	42
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	43
2.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	43
2.2.3 Μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α.....	44
2.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα.....	44
2.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	45
2.2.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE.....	45
2.2.7 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	46
2.2.8 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α.....	47
2.2.9 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT.....	48
2.2.10 Στατιστική ανάλυση.....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3.1 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-2α και συγκριτική έκφραση με του HIF-1α.....	50
3.2 Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των εκφραζόμενων HIFs σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας.....	53
3.3 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1.....	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη η διάχυση είναι επαρκής ώστε να παρέχεται στο έμβρυο το οξυγόνο και τα θρεπτικά υλικά που είναι απαραίτητα για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Λίγο μετά την έναρξη της γαστριδίωσης, κατά την τρίτη εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής, ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που συντελεί στην ταχεία επέκταση των εμβρυϊκών ιστών, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και την μειωμένη διάχυσή του στα κύτταρα του εμβρύου, δημιουργώντας ένα περιβάλλον υποξικό. Το έμβρυο ανταποκρίνεται σ' αυτή την περιβαλλοντική αλλαγή αναπτύσσοντας ένα κυκλοφορικό σύστημα για τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Έτσι η υποξία δρα ως ο πρωταρχικός διεγέρτης της αγγειακής ανάπτυξης στο έμβρυο, επάγοντας τη μεταγραφή αγγειογενετικών παραγόντων.

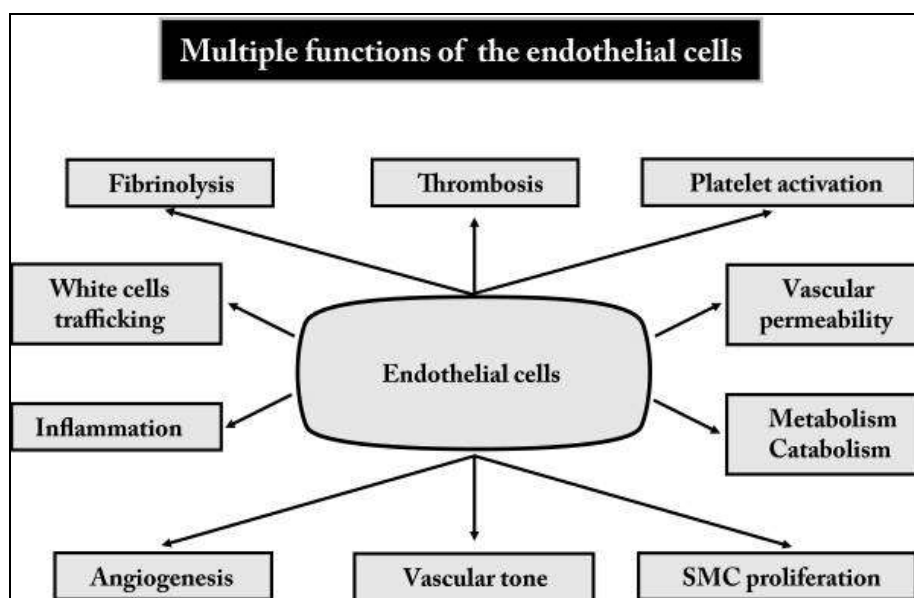
Κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία της αναπτυξιακής αγγειογένεσης διαδραματίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία δομούν ολόκληρο το αγγειακό ενδοθήλιο. Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται στην υποξία αλλάζοντας την έκφραση των γονιδίων τους με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους ώστε να σχηματίσουν τα πρώτα αγγεία του εμβρύου.

### 1.1 ΤΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

Το ενδοθήλιο, μια λεπτή μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, συνιστά το εσωτερικό κυτταρικό περίβλημα των αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία) και του λεμφικού συστήματος, κατά συνέπεια βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα της κυκλοφορίας. Ο όρος «ενδοθήλιο» δόθηκε αρχικά το 1865 από τον Ελβετό ανατόμο, Wilhelm His (*Aird WC et al., 2007a; George CR et al., 2003*). Έκτοτε μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '70, αυτή η μονοστιβάδα θεωρήθηκε απλώς μια μεμβράνη-φραγμός στη διάχυση των κυττάρων, που αποτρέπει την πρόσβαση των κυττάρων του αίματος στην αγγειακή μήτρα. Πλέον όμως το ενδοθήλιο, αναγνωρίζεται ως κυρίαρχος φορέας στον έλεγχο της ρευστότητας αίματος, της πήξης του αίματος, της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και του αγγειακού τόνου, ως σημαντικός ρυθμιστής της ανοσολογίας, της φλεγμονής και της αγγειογένεσης, ως ένα δυναμικό μεταβολικό και ενδοκρινικό όργανο και επίσης



αποτελεί μια μεγάλη επιφάνεια για την ανταλλαγή υλικών μεταξύ του αίματος και των ιστών (Εικόνα 1). (Féléτου M., εκδ. Morgan & Claypool Life Sciences Publishers, 2011, κεφ. 1).

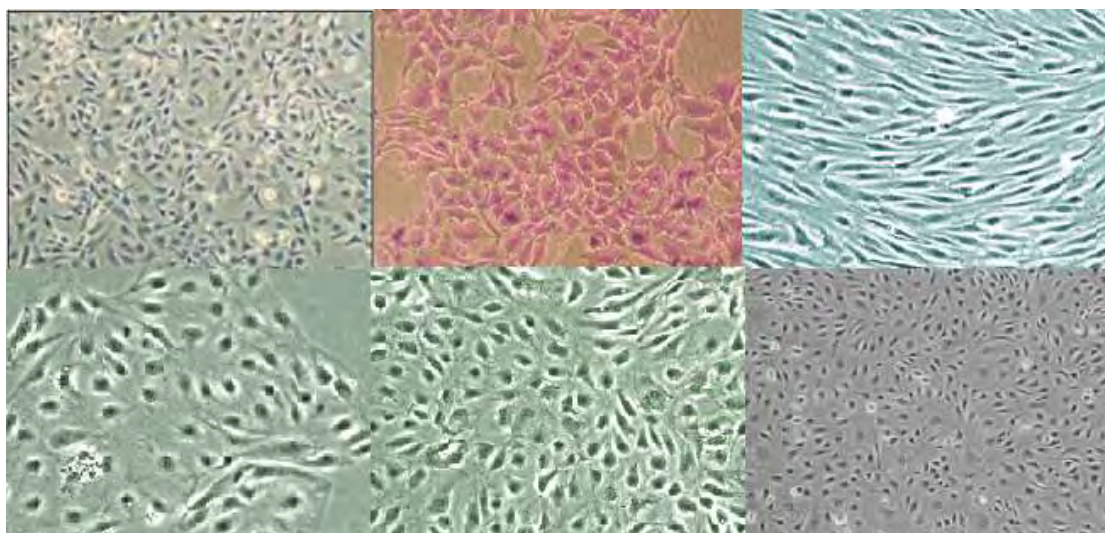


Εικόνα 1: Οι λειτουργίες του ενδοθηλίου (Féléτου M., εκδ. Morgan & Claypool Life Sciences Publishers, 2011, κεφ. 1)

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των επιθηλιακών κυττάρων και προέρχονται από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα, από τη διαφοροποίηση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, των αιμαγγειοβλαστών. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν τα σωμάτια Weibel–Palade, συνδεδεμένες με τη μεμβράνη δομές πλάτους 0.1μm και μήκους 3μm οι οποίες αντιπροσωπεύουν το οργανίδιο αποθήκευσης του παράγοντα von Willebrand (vWF). Η χαρακτηριστική πόλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίζει την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη σε τρεις διακριτές περιοχές: την κορυφαία, η οποία βρίσκεται προς τον αυλό των αγγείων, τη βασική, η οποία βρίσκεται προς τους ιστούς και τη βασειοπλευρική, με την οποία σχηματίζουν συνδέσεις με γειτονικά κύτταρα, μια οργάνωση η οποία εξυπηρετεί την ιδιαίτερη λειτουργία των κυττάρων αυτών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το αίμα λέγονται αγγειακά ενδοθηλιακά, ενώ αυτά που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη λέμφο είναι γνωστά ως λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αγγειακά ενδοθηλιακά

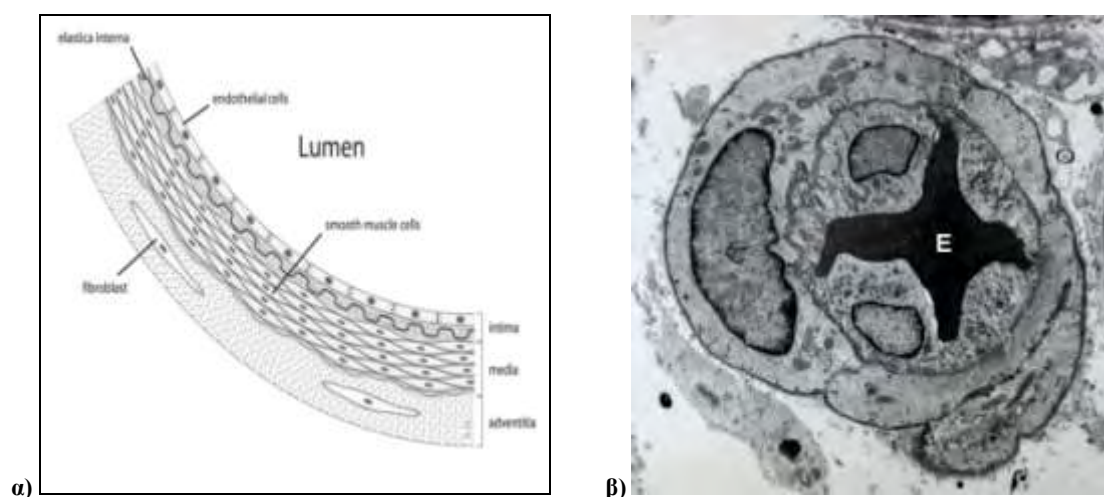
κύτταρα καλύπτουν ολόκληρο το κυκλοφορικό σύστημα από την καρδιά ως τα μικρότερα τριχοειδή αγγεία (*Sumpio et al., 2002*).

Η μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων ποικίλλει κατά μήκος του αγγειακού δικτύου, αλλά γενικά είναι λεπτά και ελαφρώς επιμήκη, οι διαστάσεις τους είναι κατά προσέγγιση 50-70 μm μήκος, 10-30 μm πλάτος και 0.1-10 μm πάχος. Στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι προσανατολισμένα κατά μήκος του άξονα του αγγείου, ελαχιστοποιώντας τις δυνάμεις πίεσης που ασκούνται από το κυκλοφορούν αίμα. Παρότι το ενδοθήλιο αποτελείται από ένα ενιαίο στρώμα κυττάρων, περίπου  $10-60 \times 10^{12}$  ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου σώματος (*Huttner et al., 1983*) καταλαμβάνουν μια επιφάνεια (διεπαφή αίματος/ενδοθηλίου) περίπου 300 έως 1000m<sup>2</sup> (*Jaffe et al., 1987; Pries et al., 2000*). Αυτά τα μορφολογικά δεδομένα δείχνουν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μια προνομιούχος περιοχή για ανταλλαγή και μεταφορά. Εντούτοις, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι όλα όμοια και υπάρχουν σημαντικές μορφολογικές, φυσιολογικές και φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων σε διαφορετικά σημεία του αρτηριακού δικτύου όπως επίσης και μεταξύ αρτηριών και φλεβών (εικόνα 2) (*Aird WC. et al., 2007a,b*).



**Εικόνα 2: Η μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους ιστούς.** Μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HMEC-1), μακροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του ομφαλίου λώρου (HUVVEC), ημιτονοειδή μικροαγγειακά κύτταρα του ήπατος (SEC), μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα (HPMEC), μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του εντέρου (HIMEC), μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα της ωθήκης (HOMEC) (από πάνω αριστερά προς τα κάτω δεξιά) ([www.sciencecellonline.com](http://www.sciencecellonline.com))

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσδένονται σε ένα βασικό έλασμα πάχους 80nm, σχηματίζοντας τον έσω-μέσω χιτώνα. Το βασικό έλασμα είναι ένα σημαντικό συστατικό του αιμοφόρου αγγείου δεδομένου ότι είναι το ικρίωμα κάθε αρτηρίας, φλέβας ή τριχοειδούς αγγείου. Το εσωτερικό αυτού του ικριώματος είναι καλυμμένο με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ το εξωτερικό καλύπτεται με λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα (εικόνα 3). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν ουσιαστικά όλες τις πρωτεΐνες που αποτελούν το βασικό έλασμα και να παραγάγουν τα σχετικά ένζυμα που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες που αποδομούν αυτή την εξωκυτταρική μήτρα, μια σημαντική δράση για την πλαστικότητα των αιμοφόρων αγγείων και για την αγγειογένεση (Fischer C et al., 2006 ; Kalebic T. et al., 1983).



**Εικόνα 3:** α) Διαγραμματική απεικόνιση της θέσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στη δομή του αιμοφόρου αγγείου. β) Τομή τριχοειδούς αγγείου. Ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν τον έσω χιτώνα, περικυκλώνουν ένα ερυθροκύτταρο.

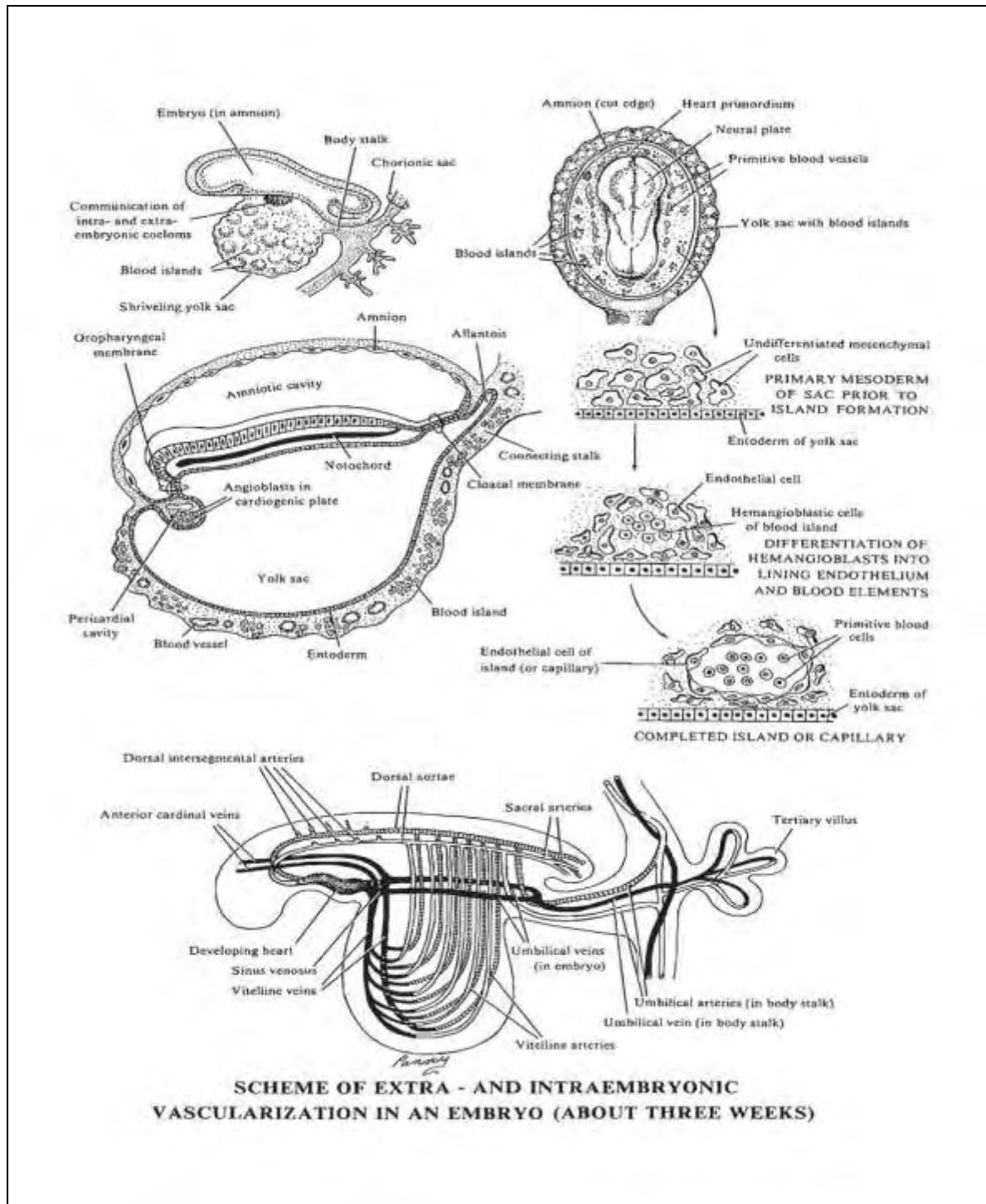
### 1.1.1. Η ΕΜΒΡΥΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΚΑΙ Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το αγγειακό σύστημα αρχίζει να σχηματίζεται στις αρχές της τρίτης εβδομάδας (με την έναρξη της γαστριδίωσης όπως προαναφέρθηκε). Η αγγειογένεση αρχίζει με το σχηματισμό αιματικών νησιδίων στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα του λεκιθικού ασκού, στο χόριο και στον συνδετικό μίσχο. Συγκεκριμένα, πρώτη ένδειξη του σχηματισμού των αιμοφόρων αγγείων παρουσιάζεται στο σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα του λεκιθικού ασκού τη 17<sup>η</sup> ημέρα, καθώς αναπτύσσονται

μεσοδερματικές συναθροίσεις που ονομάζονται αιματικά νησίδια (blood islands) δίπλα στο ενδόδερμα, από αιμαγγειοβλάστες προερχόμενες από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα που συσσωρεύονται και μεταναστεύουν στο λεκιθικό ασκό. Η σηματοδότηση μέσω VEGF και μελών της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση του μεσοδέρματος σε αιμαγγειοβλάστες (Faloon et al., 2000; Kennedy et al., 1997). Από τα αιματικά νησίδια αναπτύσσονται τα ενδοθηλιακά και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα αιμοποιητικά νησίδια του λεκιθικού ασκού αποτελούν τις πρωταρχικές αιμοποιητικές και αγγειακές δομές κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών. Τα κύτταρα στο εσωτερικό των νησιδίων διαφοροποιούνται στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα (αιμοβλάστες), ενώ τα κύτταρα στην περιφέρεια των νησιδίων διαφοροποιούνται στα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs ή αγγειοβλαστες). Οι αιμοβλάστες διαφοροποιούνται στα πρώτα αιματικά κύτταρα του εμβρύου, ενώ τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα εξελίσσονται στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων. Τα αιμοποιητικά νησίδια στη συνέχεια συγχωνεύονται ώστε να σχηματίσουν τα εξωεμβρυϊκά αιμοφόρα αγγεία με τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα να επενδύουν περιοχές που περιέχουν τα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα. Οι εν λόγω καταβολές των αγγείων επιμηκύνονται και αναστομώνονται σχηματίζοντας ένα αρχικό αγγειακό δίκτυο. Στο τέλος της τρίτης εβδομάδας αυτό το δίκτυο έχει αγγειώσει πλήρως τον λεκιθικό ασκό, τον ομφάλιο λώρο και τις χοριακές λάχνες («Εμβρυολογία του ανθρώπου», William J. Larsen, κεφ. 8 τρίτη έκδοση).

Πρόδρομα κύτταρα των αγγείων που σχηματίζουν το κύριο εμβρυϊκό αγγειακό σύστημα προέρχονται και από το ενδοεμβρυϊκό μεσόδερμα. Τη 18<sup>η</sup> ημέρα τα αιμοφόρα αγγεία αρχίζουν να αναπτύσσονται στο σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα του εμβρυϊκού δίσκου, όπου σχηματίζονται με μια διεργασία ελαφρώς διαφορετική από εκείνη του λεκιθικού ασκού. Η αγγειογένεση στο έμβρυο δεν συμμετέχει στο σχηματισμό κυττάρων του αίματος. Επαγωγικές ουσίες που εκκρίνονται από το υποκείμενο ενδόδερμα (VEGF, FGF) προκαλούν τη διαφοροποίηση μερικών κυττάρων του σπλαγχοπλευρικού μεσοδέρματος σε αγγειοβλάστες (angioblasts), οι οποίες εξελίσσονται σε πεπλατυσμένα ενδοθηλιακά κύτταρα που ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μικρούς κυστικούς σχηματισμούς που ονομάζονται αγγειοκύστες (angiocysts). Οι εν λόγω αγγειοκύστες με τη σειρά τους συνενώνονται σχηματίζοντας μακρούς σωλήνες ή αγγεία που ονομάζονται αγγειοβλαστικές χορδές

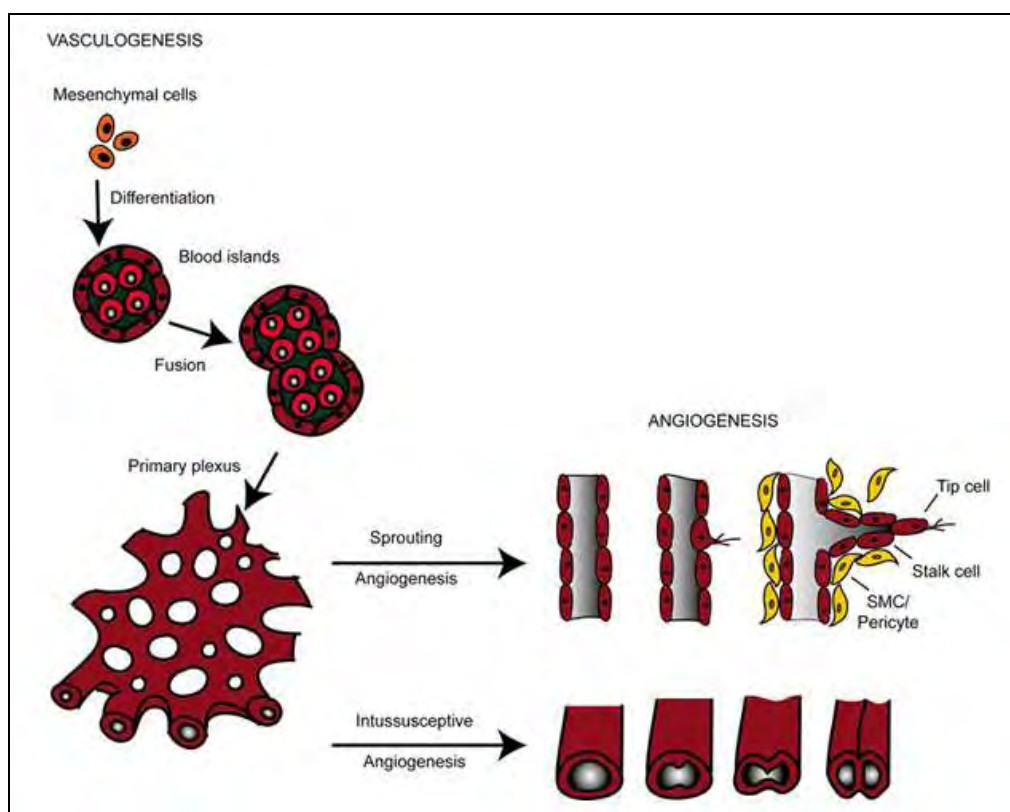
(angioblastic cords). Όλη η διεργασία αποκαλείται επιτόπιος σχηματισμός και συνένωση κυστιδίων ή νεοαγγειογένεση (in situ vesicle formation and fusion or **vasculogenesis**). Οι αγγειοβλαστικές χορδές αναπτύσσονται σε όλο τον εμβρυϊκό δίσκο και αναστομώνονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός εξαπλωμένου δικτύου αγγειοβλαστικών πλεγμάτων (angioblastic plexuses), που καθορίζουν την αρχική διάταξη του κυκλοφορικού συστήματος του εμβρύου. Αυτά τα πρώιμα γεγονότα στην αγγειακή ανάπτυξη με τη μετανάστευση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων, τη διαφοροποίησή τους και τη συναρμολόγηση ενός αρχέγονου αγγειακού δικτύου συνιστούν την διαδικασία της νεοαγγειογένεσης (vasculogenesis) η οποία συμβαίνει και στην ενήλικη ζωή με την επιστράτευση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, προερχόμενων από το μυελό των οστών, τα οποία ενσωματώνονται σε αναπτυσσόμενα αγγεία ή διεγείρουν την ανάπτυξη νέων αγγείων απελευθερώνοντας προ-αγγειογενετικούς ενεργοποιητές (*Suburo AM and D'Amore, 2006; Tirziu D and Simons 2009*).



**Εικόνα 4: Η έξω και ένδοεμβρυϊκής νεοαγγειογένεση, κατά την 3<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης.** Αγγειοβλαστες από το σπλαγνοπλευρικό μεσόδεσμα μεταναστεύουν στο εξωεμβρυϊκό μεσόδεσμα του λεκιθικού ασκού όπου σχηματίζουν τα αιματικά νησίδα. Τα κύτταρα της περιφέρειας των νησιδίων διαφοροποιούνται σε αγγειοβλάστες και τα εσωτερικά σε αιμοβλάστες από τα οποία θα προέλθουν τα αγγειακά ενδοθηλιακά και τα αιμοποιητικά κύτταρα αντίστοιχα. Ταυτόχρονα στο ενδοεμβρυϊκό μεσόδεσμα λαμβάνει χώρα η ενδοεμβρυϊκή νεοαγγειογένεση (vasculogenesis) η οποία δεν συμμετέχει στο σχηματισμό κυττάρων του αίματος. Τα αιματικά νησίδα συγχωνεύονται διαμορφώνοντας τις αγγειοβλαστικές χορδές οι οποίες συνενώνονται σχηματίζοντας το αρχέγονο δίκτυο. Με τη διαδικασία της αγγειογένεσης το αρχέγονο δίκτυο μετατρέπεται στο ώριμο αγγειακό δίκτυο. (MEDICAL EMBRYOLOGY by BEN PANSKY, Ph.D, M.D.)



Το αρχέγονο αγγειακό δίκτυο στη συνέχεια, αναπτύσσεται και επεκτείνεται σε όλο το έμβryo διαμορφώνοντας την υπόλοιπη αγγείωση και σχηματίζοντας την παλλόμενη καρδιά το πρώτο λειτουργικό οργανικό σύστημα του εμβρύου. Η επέκταση του αρχέγονου αγγειακού δικτύου πραγματοποιείται με τρεις διεργασίες: (1) το συνεχιζόμενο σχηματισμό και τη συνένωση των αγγειοκύστεων (vasculogenesis) (2) την αγγειογένεση (angiogenesis), δηλ. την εκβλάστηση νέων αγγείων από τις υπάρχουσες αγγειοβλαστικές χορδές και (3) την παρεμβολή νέων μεσοδερματικών κυττάρων στα τοιχώματα των υπαρχόντων αγγείων. Ένας επιπλέον μηχανισμός ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου, στον οποίο εικάζεται ότι συμμετέχει η οδός του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης Tie, είναι η διάπλαση νέων αγγείων χωρίς εκβλάστηση (nonsprouting angiogenesis). Ο εν λόγω μηχανισμός αναφέρεται επίσης υπό τον όρο εγκολεασμός (intussusception) (William J. Larsen, κεφ. 8, τρίτη έκδοση).

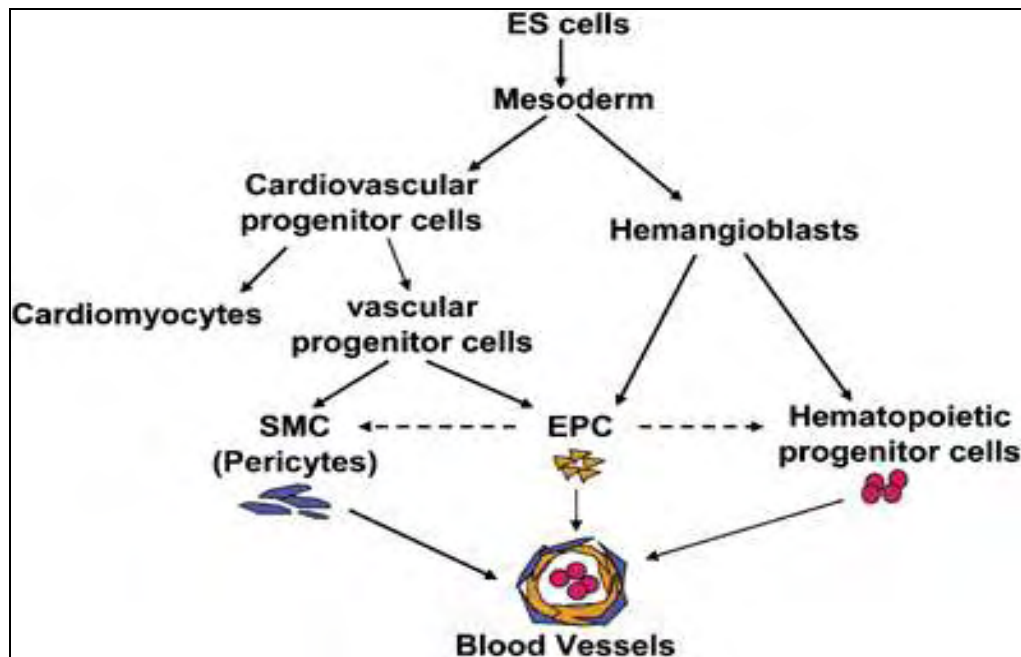


**Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της νεοαγγειογένεσης και αγγειογένεσης.** Κατά την ανάπτυξη μεσοδερμικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε αιμαγγειοβλάστες, οι οποίες αναπτύσσονται περαιτέρω σε αγγειοβλάστες, τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η νεοαγγειογένεση περιλαμβάνει την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τις αγγειοβλάστες ώστε να σχηματιστεί το αρχέγονο αγγειακό δίκτυο. Η αναδιαμόρφωση και ανάπτυξη αυτών των προϋπάρχοντων αγγείων καλείται αγγειογένεση. Ο εγκολεασμός (intussusceptive angiogenesis) περιλαμβάνει τη διάπλαση νέων αγγείων χωρίς εκβλάστηση. Και οι δύο τύποι αγγειογένεσης απαιτούν την επιστράτευση λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) ή περικυττάρων ώστε να σταθεροποιηθούν τα νέα αγγεία. Γειτονικά μεσεγχυματικά κύτταρα μεταναστεύουν προς τα νέα αγγεία και διαφοροποιούνται ως απόκριση σε επαγωγικούς παράγοντες όπως ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) (Heinke et al., 2012).

Όλοι οι τύποι του εμβρυϊκού μεσοδέρματος, εκτός από το προχορδιαίο πέταλο και το προερχόμενο από τη νευρική ακρολοφία μεσοδερματικού τύπου εξωμεσέγγυμα, έχει αποδειχτεί ότι είναι ικανοί για αγγειογένεση. Η αγγειογενετική ικανότητα των διαφόρων διαμερισμάτων του μεσοδέρματος ποικίλλει, με το σπλαγχοπλευρικό και το παραξονικό μεσόδερμα να είναι τα πλουσιότερα σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι πληθυσμοί των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) φαίνεται πως είναι δύο. Η πρώτη σειρά που προέρχεται από το παραξονικό μεσόδερμα, είναι δυνατό να διαφοροποιηθεί μόνο σε κύτταρα των αγγείων, ενώ η δεύτερη, με προέλευση από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα, δύναται να σχηματίσει αιμαγγειοβλαστικά πρόδρομα κύτταρα, με δυναμικό διαφοροποίησης τόσο σε ενδοθηλιακά όσο και σε αιμοποιητικά κύτταρα. Επιπλέον η γεινίαση διαφοροποιούμενων αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων σε θέσεις ενδο- και εξωεμβρυϊκής αγγειογένεσης συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης ενός διδύναμου μεσοδερματικού προγονικού κυττάρου και για τα δύο συστήματα, της αιμαγγειοβλάστης (*Choi K., et al., 2002, Ribatti D et al., 2002*).

Η κοινή προέλευση κυττάρων του αίματος και ενδοθηλιακών κυττάρων επιβεβαιώνεται και μοριακά από την έκφραση κοινών γονιδίων στα πρόδρομα κύτταρα τόσο της αιμοποιητικής σειράς όσο και στα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα γονίδια περιλαμβάνουν το CD34, CD133, PECAM-1, c-Kit και Sca-1, ενώ επιπλέον υπάρχουν πληθυσμοί ευαίσθητοι στην επίδραση του VEGF που μπορούν να προκύψουν από καλλιέργειες εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων [blast colony-forming cells (BL-CFC)] και δύνανται να διαφοροποιηθούν τόσο σε ενδοθηλιακά όσο και σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα. Ακόμη, έχουν απομονωθεί κύτταρα που εκφράζουν τον VEGFR-2 υποδοχέα (ή Flk-1) που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά αλλά και αιμοποιητικά κύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη κοινού προγονικού κυττάρου και για τις δύο σειρές, παρόλο που μπορεί να είναι και πιο πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο. Μόρια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διαφοροποίηση της αιμαγγειοβλάστης σε ενδοθηλιακά κύτταρα περιλαμβάνουν τα Ets-1, Fli-1, Vezf-1 και VEGFR-2, αλλά και το μεταγραφικό παράγοντα Tal-1 (T cell acute leukaemia ή Scl) και μέλη των πρωτεϊνικών οικογενειών GATA, Hox και Id (inhibitors of differentiation), με πειραματικά αποδεδειγμένη απαραίτητη την έκφραση του VEGFR-2 για τη σωστή ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Choi K., et al., 2002, Ribatti D et al., 2002*).





**Εικόνα 6: Η εμβρυϊκή προέλευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.** Οι πληθυσμοί των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) φαίνεται πως είναι δύο. Η πρώτη σειρά που προέρχεται από το παραξονικό μεσόδερμα, είναι δυνατό να διαφοροποιηθεί μόνο σε κύτταρα των αγγείων, ενώ η δεύτερη, με προέλευση από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα, δύναται να σχηματίσει αιμαγγειοβλαστικά πρόδρομα κύτταρα, με δυναμικό διαφοροποίησης τόσο σε ενδοθηλιακά όσο και σε αιμοποιητικά κύτταρα.

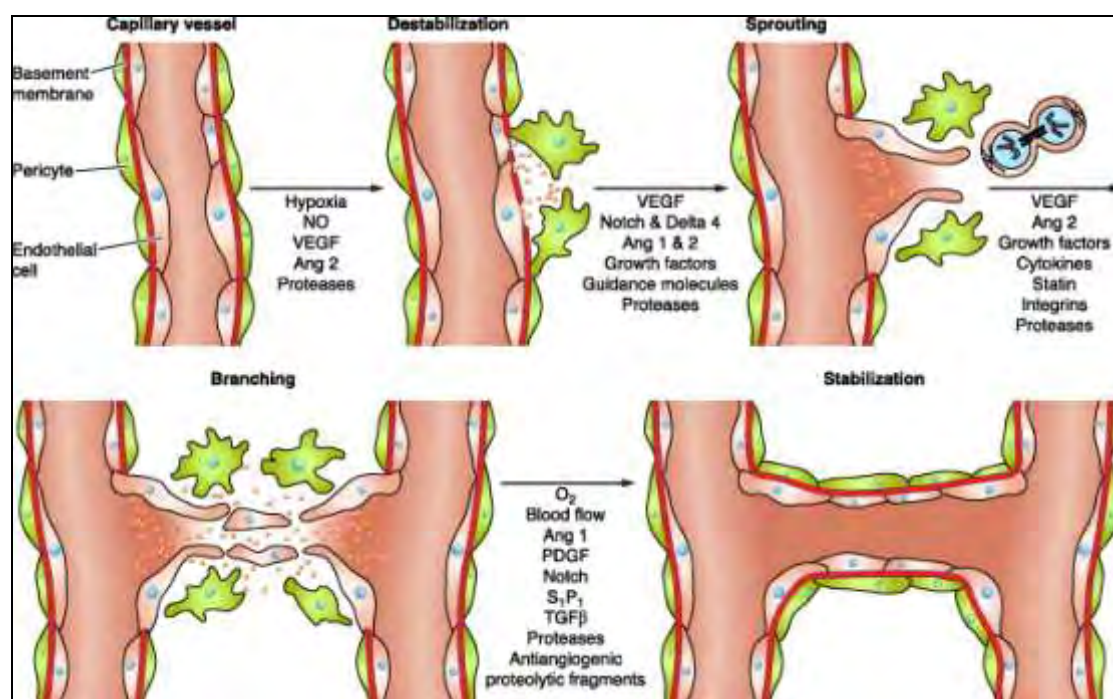
Όπως προαναφέρθηκε, μετά τη διαμόρφωση ενός αρχέγονου αγγειακού δικτύου μέσω της νεοαγγειογένεσης, αυτό επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται σε ένα ώριμο αγγειακό δίκτυο με τη διαδικασία της αγγειογένεσης (**angiogenesis**), κατά την οποία δημιουργούνται νέα αγγεία με εκβλάστηση από προϋπάρχοντα. Η αγγειογένεση ελέγχεται από μια ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων και ο λεγόμενος «αγγειογενετικός διακόπτης» (**angiogenic switch**), γυρίζει όταν αυτή η ισορροπία κλίνει προς το μέρος των διεγερτών (*Carmeliet et al., 2005; Hanahan and Folkman, 1956*). Οι διαδικασίες της αγγειογένεσης πραγματοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων, εξωκυτταρικής μήτρας (**extracellular matrix, ECM**) και υποστηρικτικών κυττάρων και περιλαμβάνουν διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων.

Αρχικά, η υποξία επάγει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) και την έκφραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και της αγγειοποιητίνης 1 και 2 (Ang-1 και Ang-2), που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεάσες της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) ώστε να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα

(Clapp et al., 2009). Η αποσταθεροποίηση της ECM από μεταλλοπρωτεάσες (matrix metalloproteases, MMPs) παραγόμενες από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους επιτρέπει να μεταναστεύσουν και να πολλαπλασιαστούν ως απόκριση σε χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τον περιβάλλοντα ιστό και να σχηματίσουν σωληναριακές δομές που αποτελούν τη βάση των νέων αιμοφόρων αγγείων (Egleblad M and Werb Z., 2002). Ο VEGF και οι αγγειοποιητίνες (Ang-1 και Ang-2), μαζί με τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor, FGF) και τον προερχόμενο απ' τα αιμοπετάλια αυξητικό παράγοντα (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), μεσολαβούν στη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ECs στα νεοσχηματισμένα αγγεία (Conway et al., 2001; Jain et al., 2003; Risau et al., 1997).

Για να μεταναστεύσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα πρέπει να χαλαρώσουν τις ενδοθηλιακές τους συνδέσεις, που αποτελούν ένα καθοριστικό παράγοντα της αγγειακής διαπερατότητας, να απαλλαχθούν από την επαφή τους με περιενδοθηλιακά κύτταρα, που είναι ένας κύριος παράγοντας της αγγειακής σταθερότητας και ωριμότητας και να διαρρήξουν τη βασική μεμβράνη (basal lamina) και την εξωκυτταρική μήτρα, το ικρίωμα του αιμοφόρου αγγείου. Η αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας πραγματοποιείται και ρυθμίζεται από διάφορες οικογένειες πρωτεασών, ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, MMPs, χυμάσες, ηπαρινάσες, τρυπτάσες, καθεψίνες, καλλικρεΐνες και τους αναστολείς αυτών. Υπό την επίδραση πρωτεασών, πολυάριθμοι αυξητικοί παράγοντες με αγγειογενετικές ιδιότητες απελευθερώνονται από τη μήτρα, όπως ο FGF-2, TGF-β, VEGF, IGF-1 και TNF-α. Από τη μήτρα επίσης απελευθερώνονται ως αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης και αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες όπως η θρομβοσπονδίνη-1, η αρεστίνη, διάφορες στατίνες κτλ. ώστε να σταματήσει η αγγειογενετική διαδικασία. Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται, ο VEGF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της αγγειογένεσης με την επιπρόσθετη συνεισφορά άλλων παραγόντων όπως η αγγειοποιητίνη-1, ιντεγκρίνες, και διάφορες χημειοκίνες. Ο VEGF και η αγγειοποιητίνη-1 ίσως παίζουν ρόλο στο σχηματισμό σωληναρίων, ενώ οι εφρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθοδήγηση του σχηματιζόμενου αγγείου προς το στόχο του. Ο VEGF είναι επίσης ένας παράγοντας επιβίωσης για το αποτελούμενο από ενδοθηλιακά κύτταρα νέο αιμοφόρο αγγείο (Fischer C et al., 2006; Sylvestre J-S and Levy B., 2002). Τέλος, τα αγγεία διακλαδίζονται, αναπτύσσονται, μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς και πολλαπλασιάζονται για να

σχηματίσουν ένα ώριμο αγγειακό δίκτυο. Η ωρίμανση και σταθεροποίηση των νεοσχηματισθέντων αγγείων επίσης απαιτεί την επιστράτευση υποστηρικτικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των περικυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο PDGF, η αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1) και ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας (TGF)- $\beta$ , είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση αυτών των διαδικασιών (Jain *et al.*, 2003).



**Εικόνα 7: Τα στάδια της αγγειογένεσης και οι επαγωγικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε κάθε στάδιο.** Η υποξία επάγει την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) και την έκφραση του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και της αγγειοποιητίνης 1 και 2 (Ang-1 και Ang-2), που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) ώστε να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα. Η αποσταθεροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν και να πολλαπλασιαστούν ώστε να σχηματίσουν σωληναριακές δομές με τη βοήθεια του VEGF, αγγειοποιητινών, χημειοτακτικών παραγόντων, αυξητικών παραγόντων, κυττοκινών και της αποδόμησης της ECM. Η ωρίμανση των νεοσχηματισθέντων αγγείων συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση αντιαγγειογενετικών παραγόντων, πολλοί εκ των οποίων απελευθερώνονται σαν αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης (Clapp *et al.*, 2009).

Μετά τη γέννηση, η αγγειογένεση συνεχίζεται ώστε να συνεισφέρει στην ανάπτυξη των οργάνων (Tirziu D and Simons M., 2009). Στον ενήλικα, η αγγειογένεση εμπλέκεται στη φυσιολογία της αναπαραγωγής, στην επούλωση πληγών και σε αποκρίσεις σε διεγέρτες όπως η υποξία και η φλεγμονή. Πολυάριθμες ασθένειες χαρακτηρίζονται ή οφείλονται σε ανώμαλη ή υπερβολική αγγειογένεση ή αντιστρόφως σε ανεπαρκή αγγειογένεση ή αγγειακό εκφυλισμό (Fischer C *et al.*, 2006).

## 1.2 ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Το οξυγόνο ( $O_2$ ) είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό που εξυπηρετεί ως βασικό υπόστρωμα στον κυτταρικό μεταβολισμό και παραγωγή ενέργειας (*Majmundar et al., 2010*). Η ικανότητα διατήρησης της ομοιόστασης του  $O_2$  είναι σημαντική για την επιβίωση όλων των πολυκύτταρων οργανισμών. Μη φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα  $O_2$  (υποξία) μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπαρκή παραγωγή ATP και ανικανότητα διατήρησης βασικών κυτταρικών λειτουργιών (*Covello and Simon, 2004*). Η πλειοψηφία των υγείων ιστών υπόκειται σε επίπεδα 2-9 %  $O_2$ , ενώ ως υποξία ορίζεται η κατάσταση ανεπαρκούς διαθεσιμότητας οξυγόνου σε επίπεδα μικρότερα από 2%  $O_2$ , λόγω εξάντλησης του αποθέματος οξυγόνου ή μείωσης της παροχής οξυγόνου στον ιστό (*Bertout et al., 2008*).

Η υποξία συμβάλλει στη ρύθμιση της ομοιοστασίας όλων των σημαντικών γεγονότων της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης επάγοντας την μεταγραφή ειδικών γονιδίων στόχων. Πιο συγκεκριμένα, η διάχυση του οξυγόνου είναι επαρκής μόνο στα πρώτα στάδια ώστε να παρέχεται στα κύτταρα το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Αργότερα, κατά τη γαστριδίωση, καθώς τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται, με παθητική διάχυση το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά δεν είναι πλέον διαθέσιμα σε όλα τα κύτταρα. Συνεπώς, η τοπική υποξία που δημιουργείται συμβάλλει στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού και αγγειακού συστήματος λίγο μετά τη γαστριδίωση (περίπου 15<sup>η</sup> ημέρα στο ανθρώπινο έμβρυο) με έναυσμα τη χαμηλή διαθεσιμότητα του οξυγόνου (*Covello and Simon, 2004*).

Η εμβρυογένεση λαμβάνει χώρα σε ένα «φυσιολογικό» υποξικό περιβάλλον (3-5%  $O_2$ ). Κατά τον ταχύ κυτταρικό πολλαπλασιασμό που συμβαίνει κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η φυσιολογική υποξία επάγει την ανάπτυξη του αιμοποιητικού και κυκλοφορικού συστήματος του εμβρύου (*Covello and Simon, 2004*). Επίσης η υποξία ασκεί σημαντικές επιδράσεις στη λειτουργία των βλαστοκυττάρων. Έχει βρεθεί ότι η υποξία προάγει την επιβίωση των βλαστοκυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (Embryonic Stem cells, ES) (*Morrison et al., 2000; Studer et al., 2000; Danet et al., 2003; Ezashi et al., 2005*). Ακόμα βρέθηκε ότι η υποξία ρυθμίζει τον αριθμό των κυττάρων της έσω κυτταρικής

μάζας (ICM) σε βλαστοκύστες βοοειδών και ενισχύει την ανάπτυξη αιμαγγειοβλαστών και αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (Adelman *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 2004; Ramirez-Bergeron *et al.*, 2004). Τέλος βρέθηκε ότι η υποξία ασκεί την επίδρασή της στη λειτουργία των βλαστοκυττάρων ενεργοποιώντας την έκφραση του Oct-4 μέσω της επαγωγής του HIF-2α ο οποίος ενεργοποιεί την μεταγραφή του Oct-4 ως απόκριση στην υποξία (Covello *et al.*, 2006).

Η συγκεντρώσεις  $O_2$  σε έναν ιστό διατηρούνται από ομοιοστατικούς μηχανισμούς που λειτουργούν σε επίπεδο κυττάρου, οργάνου και συστήματος οργάνων. Τα σπονδυλωτά έχουν αναπτύξει πολλαπλά, σύνθετα φυσιολογικά συστήματα για την οξυγόνωση που απαιτούν το αιμοποιητικό, καρδιαγγειακό και αναπνευστικό σύστημα. Έτσι σε συνθήκες υποξίας, τα κύτταρα ενεργοποιούν έναν αριθμό προσαρμοστικών αποκρίσεων ώστε να εξισορροπήσουν την παροχή  $O_2$  με τις μεταβολικές, βιοενεργειακές και οξειδοαναγωγικές απαιτήσεις. Υπάρχουν βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες αποκρίσεις στα χαμηλά επίπεδα  $O_2$  που συμβαίνουν σε επίπεδο κυττάρου, ιστού και συστήματος οργάνων. Οι ταχείες αποκρίσεις στην υποξία περιλαμβάνουν την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης (διαμέσου του μεταφορέα γλυκόζης 1 [GLUT-1]), την μετατροπή του μονοπατιού παραγωγής ενέργειας από αερόβια οξειδωτική φωσφορυλίωση σε αναερόβια γλυκόλυση (μέσω γλυκολυτικών ενζύμων όπως η κίνηση του φωσφογλυκερικού [PGK]), την αυξημένη παραγωγή ερυθροκυττάρων (μέσω αιμοποιητικών κυτταροκινών όπως η ερυθροποιητίνη [EPO]) και την αγγειοδιαστολή (μέσω της επαγόμενης συνθάσης του νιτρικού οξέος) ώστε να ανακτηθεί η παροχή αίματος. Τα κύτταρα του υποξικού ιστού υφίστανται προσωρινή αναστολή του κυτταρικού κύκλου, μειώνουν την πρόσληψη ενέργειας και εκκρίνουν παράγοντες επιβίωσης και προαγγειογεννητικούς παράγοντες. Ωστόσο αυτές οι αποκρίσεις είναι μόνο βραχυπρόθεσμες στρατηγικές επιβίωσης. Για να επιτραπεί η μεταφορά  $O_2$  σε νέους ιστούς και να αποκατασταθεί η μεταφορά  $O_2$  σε ιστούς που το στερούνται, πρέπει να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη νέων αγγείων και/ή αναδιαμόρφωση της υπάρχουσας αγγείωσης (Covello and Simon, 2004). Αυτά τα γεγονότα οργανώνονται από διάφορα κυτταρικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων της σηματοδότησης mTOR και της γονιδιακής ρύθμισης από τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες HIF (Majmundar *et al.*, 2010).

Κεντρικό συστατικό της σηματοδότησης της υποξίας στο κύτταρο είναι οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors), οι οποίοι

εμπλέκονται σημαντικά τόσο στην αίσθηση όσο και στην απόκριση στις αλλαγές του κυτταρικού οξυγόνου. Οι HIFs είναι οι κύριοι μεταγραφικοί ρυθμιστές τόσο της κυτταρικής όσο και της συστηματικής απόκρισης στην υποξία (*Majmundar et al., 2010*).

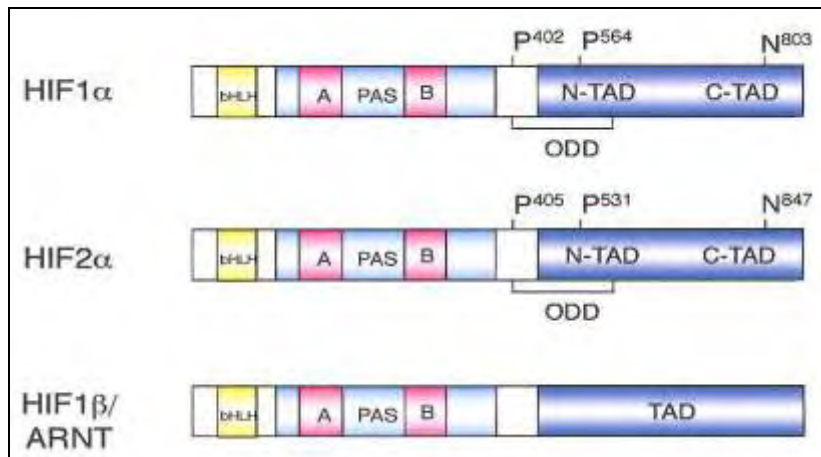
### 1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

Οι HIF είναι μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων basic Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS). Οι πρωτεΐνες bHLH-PAS, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης που εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες. Αυτές περιλαμβάνουν μεταγραφικές αποκρίσεις σε περιβαλλοντικούς ρύπους και στην υποξία, που πραγματοποιούνται μέσω του aryl hydrocarbon (Dioxin) receptor (AHR) και των HIF αντίστοιχα και τον έλεγχο της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος που πραγματοποιείται μέσω των Single minded (SIM) πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες bHLH-PAS είναι διμερή και διακρίνονται από τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας των bHLH πρωτεϊνών λόγω της εξειδίκευσής τους ως προς το διμερισμό που τους προσδίδουν οι περιοχές ομολογίας PAS. Μετά το διμερισμό τους, τα λειτουργικά μεταγραφικά σύμπλοκα που σχηματίζουν προσδένονται σε συναινετικές αλληλουχίες παρόμοιες με την αλληλουχία E-box (CACGTG) η οποία βρίσκεται στους ενισχυτές γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων της υπεροικογένειας bHLH. Οι πρωτεΐνες bHLH-PAS είναι ευρέως διαδεδομένες στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Δύο στενά συγγενικοί τύποι οι πρωτεΐνες HIF-α και οι SIM πρωτεΐνες, και η κοινή υπομονάδα με την οποία ετεροδιμερίζονται, ο aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), είναι παρόντες σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (*Kewley R et al., 2004*).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF, αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως ρυθμιστές της παραγωγής ερυθροποιητίνης (EPO). Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν ως βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής και συστηματικής προσαρμογής των θηλαστικών στην υποξία και φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές διαδικασίες (*Majmundar et al., 2010*). Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μία οξυγόνο-εξαρτώμενη υπομονάδα α (HIF-α) και μία σταθερή υπομονάδα β (HIF-β γνωστός και ως Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator, ARNT). Οι HIF ρυθμίζουν την έκφραση τουλάχιστον 180

γονιδίων, που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, την κυτταρική ανάπτυξη, την κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση, τη μετάσταση, την ερυθροποίηση και την αγγειακή αναδιαμόρφωση με την πρόσδεσή τους σε cis-acting αποκρινόμενα στην υποξία στοιχεία 50 βάσεων, τα HREs (Hypoxia Responsive Elements) που περιέχουν τη βασική αλληλουχία (A/G)CGTG και εντοπίζονται στους ενισχυτές ή/και στους υποκινητές αυτών των γονιδίων (Covello *et al.*, 2006).

Οι  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες των HIF έχουν παρόμοια δομή και οι δύο περιέχουν (1) μια αμινοτελική (N-terminus) περιοχή basic Helix-Loop-Helix (bHLH) η οποία εξυπηρετεί στην πρόσδεση στο DNA, (2) μία κεντρική περιοχή PER-ARNT-SIM (PAS), η οποία διευκολύνει τον ετεροδιμερισμό και (3) μια καρβοξυτελική περιοχή (C-terminus), η οποία επιστρατεύει μεταγραφικές συνενεργοποιητικές πρωτεΐνες (Loboda *et al.*, 2012). Η βασική περιοχή και η περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας (Helix-Loop-Helix, HLH) συνιστούν την περιοχή bHLH η οποία είναι κοινή σε ένα μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων και απαιτείται για το διμερισμό πρωτεϊνών και τη δέσμευση στο DNA. Η περιοχή PAS ορίστηκε ως το ακρωνύμιο των πρώτων γνωστών μελών αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών: *Drosophila period* (Per) και *single-minded* (Sim) και των πρωτεϊνών των θηλαστικών aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (Wang *et al.*, 1995). Περιέχει δύο μονάδες εσωτερικής ομολογίας, τις A και B ατελείς επαναλήψεις και εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών. Οι PAS πρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε πολλά είδη οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των προκαρυωτών, πράγμα που υποδεικνύει την υψηλή εξελικτική τους σταθερότητα (Wang *et al.*, 1995). Οι υπομονάδες HIF- $\alpha$  παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους στις περιοχές bHLH (85%), PAS-A (68%) και PAS-B (73%) (Tian *et al.*, 1997). Οι HIF- $\alpha$  υπομονάδες διαθέτουν επίσης μία περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποδόμησης (Oxygen Dependent Degradation domain, ODD) στην καρβοξυτελική τους περιοχή η οποία εξυπηρετεί στη ρύθμιση της σταθερότητας τους από το οξυγόνο. Η υπομονάδα HIF-1 $\beta$  δεν διαθέτει περιοχή ODD γι' αυτό και εκφράζεται σταθερά και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Ο διμερισμός των υπομονάδων HIF είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική τους δραστηριότητα (Keith *et al.*, 2012).



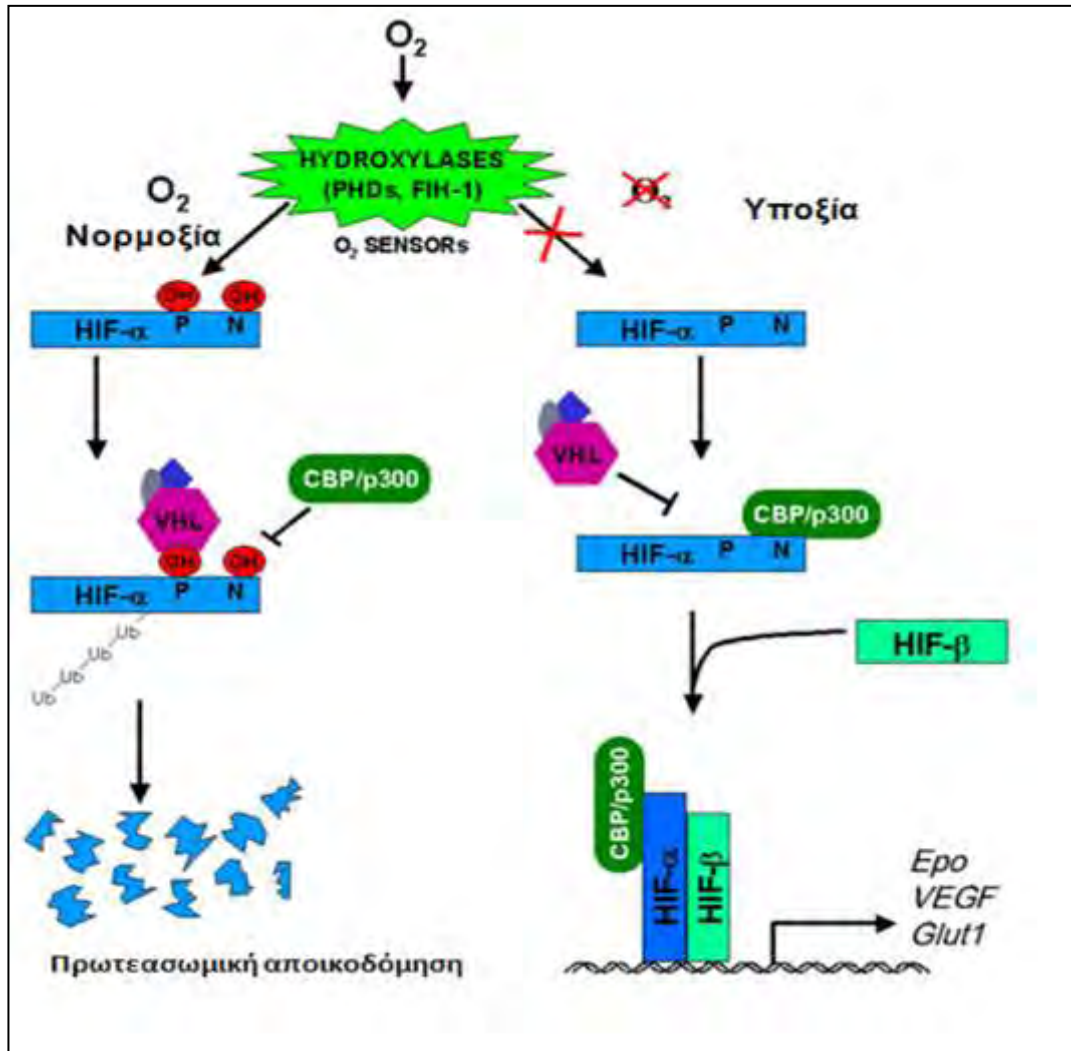
**Εικόνα 8:** Η δομή των δύο καλύτερα χαρακτηρισμένων υπομονάδων HIF-α (HIF-1α και HIF-2α) και της υπομονάδας HIF-1β με την οποία ετεροδιμερίζονται. Οι α και β υπομονάδες των HIF περιέχουν (1) μια N-τελική περιοχή basic Helix-Loop-Helix (bHLH) η οποία εξυπηρετεί στην πρόσδεση στο DNA, (2) μία κεντρική περιοχή PER-ARNT-SIM (PAS), η οποία διευκολύνει τον ετεροδιμερισμό και (3) μια C-τελική περιοχή, η οποία επιστρατεύει μεταγραφικές συνενεργοποιητικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα HIF-1β δεν περιέχει την περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποδόμησης την οποία διαθέτουν οι HIF-α υπομονάδες, γι' αυτό άλλωστε εκφράζεται σταθερά και εντοπίζεται στον πυρήνα (Keith et al., 2012).

Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές της υπομονάδας HIF-α (HIF-1α, -2α και -3α) και τρεις ισομορφές της υπομονάδας HIF-β (ARNT/HIF-1β, ARNT2 και ARNT3). Ωστόσο δεν εμπλέκονται όλα τα μέλη της οικογένειας στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων ως απόκριση στην υποξία και ο διμερισμός μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων μπορεί να περιοριστεί από την έκφραση. Ενώ οι HIF-1α και HIF-2α μπορούν άμεσα να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων, ο HIF-3α δεν διαθέτει μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και φαίνεται να μην ενεργοποιεί τη μεταγραφή (Gu et al., 1998; Makino et al., 2001, 2002; Tian et al., 1997, 1998). Ο HIF-3α (ή IPAS) υπάρχει σε πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα μερικά εκ των οποίων αναστέλλουν τη δραστηριότητα των HIF-1α και HIF-2α. Από τις διαφορετικές β υπομονάδες, μόνο οι ARNT και ARNT2 μπορούν να σχηματίσουν λειτουργικά σύμπλοκα HIF ώστε να ρυθμίσουν αποκρινόμενα στην υποξία γονίδια ενώ η υπομονάδα ARNT3/MOP3 δεν σχηματίζει σύμπλοκα HIF, ούτε μπορεί να επαναφέρει την έκφραση των γονιδίων στόχων των HIF όταν εκφράζεται σε *Arnt*<sup>-/-</sup> εμβρυϊκά κύτταρα (Cowden and Simon, 2002). Οι υπομονάδες HIF-1α και ARNT (HIF-1β) φαίνονται να εκφράζονται ευρέως, στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους σε ιστούς ανθρώπου και ποντικών, ενώ ο HIF-2α, ο HIF-3α, ο ARNTN2 και ο ARNT3 παρουσιάζουν ιστοειδικότητα (Loboda et al., 2012).



Και οι δύο υπομονάδες HIF (HIF-α και HIF-β) μεταγράφονται και μεταφράζονται συνεχώς. Η ικανότητα των HIF να ενεργοποιούν τη μεταγραφή ρυθμίζεται από τη σταθερότητα της HIF-α υπομονάδας. Η υποξική δραστηριότητα των HIF ελέγχεται κυρίως μέσω μετά-μεταγραφικών τροποποιήσεων και σταθεροποίησης των HIF-α υπομονάδων, ώστε τα επίπεδα πρωτεϊνών HIF-α και η συνολική μεταγραφική δραστηριότητα των HIF να αυξάνεται καθώς τα κύτταρα γίνονται περισσότερο υποξικά (*Loboda et al., 2012*). Εν συντομία, παρουσία φυσιολογικών συνθηκών οξυγόνου ή αλλιώς στην «νορμοξία» (21% O<sub>2</sub>) οι υπομονάδες HIF-α τροποποιούνται από ειδικές υδροξυλάσες προλίνης (PHDs), με αποτέλεσμα την πρωτεασωμική τους αποδόμηση σε συνθήκες νορμοξίας, η οποία πραγματοποιείται μέσω της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης von Hippel Lindau (VHL). Αντίθετα, η υπομονάδα β εκφράζεται σταθερά και διαρκώς σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Σε συνθήκες υποξίας, η δράση των PHDs αναστέλλεται με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της HIF-α υπομονάδας, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει έναν ιδιαιτέρως σύντομο χρόνο ημιζωής μικρότερο των 5 λεπτών (*Huang et al., 1996*). Στη συνέχεια, οι υπομονάδες HIF-α συσσωρεύονται και μεταβαίνουν στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζονται με τη σταθερή υπομονάδα HIF-β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), μέσω των HLH και PAS περιοχών τους (*Loboda et al., 2012*). Τα ετεροδιμερή HIF αναγνωρίζουν και προσδέονται στα αποκρινόμενα στην υποξία στοιχεία HRE (Hypoxia Response Elements) στο γονιδίωμα, τα οποία εντοπίζονται στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων-στόχων και έχουν τη συναινετική αλληλουχία G/ACGTG. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μεταγραφική ενεργοποίηση (transactivation) των HIF με την επιστράτευση συνενεργοποιητών, όπως ο p300/CREB-binding protein. Ο p300/CBP είναι ένας κεντρικός συνενεργοποιητής, ο οποίος με τρόπο εξαρτώμενο από την υποξία προσδέεται στην περιοχή C-TAD του HIF-1α και του HIF-2α και επιστρατεύει διάφορους βοηθητικούς συμπαραγόντες, όπως το συνενεργοποιητή του υποδοχέα στεροειδών (steroid receptor coactivator), τον ενδιάμεσο παράγοντα της μεταγραφής-2 (transcription intermediary factor-2) ή τον οξειδοαναγωγικό παράγοντα Ref-1 (*Loboda et al., 2010; Arany et al., 1996*). Στη νορμοξία, η αλληλεπίδραση των HIF με τον p300/CBP αναστέλλεται από μια επιπλέον αντίδραση υδροξυλίωσης που πραγματοποιείται από μια υδροξυλάση ασπαραγίνης των HIF γνωστή ως FIH (Factor Inhibiting HIF). Αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει ότι η μείωση στα επίπεδα O<sub>2</sub> οδηγεί σε

μια καλά οργανωμένη και αναλογική αύξηση στη συσσώρευση των υπομονάδων HIF-α (Covello and Simon, 2004).



**Εικόνα 9:** Ένα απλοποιημένο μοντέλο της ρύθμισης των HIF. Υπό συνθήκες νορμοξίας, η περιοχή ODD της υπομονάδας HIF-α υδροξυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης στην περιοχή ODD από τις PHDs και οδηγείται σε πρωτεασωμική αποδόμηση μέσω του pVHL. Επίσης σε συνθήκες νορμοξίας η υπομονάδα HIF-α υδροξυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαργίνης στην περιοχή C-TAD από τον FIH. Υπό συνθήκες υποξίας, η δράση των PHDs και FIH αναστέλλεται με αποτέλεσμα η υπομονάδα HIF-α να σταθεροποιείται και να μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου διμερίζεται με τον HIF-1β/ARNT και επιστρατεύει συμπαράγοντες για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων.

Εκτός της υποξίας υπάρχουν και άλλοι ενεργοποιητές της HIF σηματοδότησης που οδηγούν στη σταθεροποίηση της HIF-α υπομονάδας με μηχανισμούς ανεξάρτητους από το οξυγόνο (Loboda et al., 2012). Για παράδειγμα, η αυξημένη ογκογενετική σηματοδότηση στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να επάγει την

έκφραση των HIF-α υπομονάδων με έναν ανεξάρτητο του οξυγόνου μηχανισμό που περιλαμβάνει την αυξημένη μεταγραφή και/ή μετάφραση των HIF-A mRNAs (Pouyssegur *et al.*, 2006). Επίσης χημικοί παράγοντες που μιμούνται την υποξία όπως η δυσφερριόξαμίνη και επαγωγικά μέταλλα όπως το κοβάλτιο μπορούν να επάγουν τους HIF.

Από τις τρεις ισομορφές της υπομονάδας HIF-α (HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α), οι HIF-1α και HIF-2α (γνωστός και ως EPAS1) παρουσιάζουν την μεγαλύτερη δομική ομοιότητα και είναι οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι. Οι HIF-1α και HIF-2α ενεργοποιούν τη μεταγραφή κοινών γονιδίων στόχων όπως ο VEGF, ωστόσο η ρύθμιση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων γίνεται επιλεκτικά είτε από τον HIF-1α είτε από τον HIF-2α. Ο HIF-1α επάγει επιλεκτικά την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης όπως η κινάση του φωσφογλυκερινικού 1 (PGK1), η δεϋδρογενάση του γαλακτικού οξέος A (LDHA), η καρβονική ανυδράση 9 (Hu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Από την άλλη ο HIF-2α εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων σημαντικών για την ανάπτυξη όγκων, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη διατήρηση του πολυδυνάμου των βλαστικών κυττάρων, όπως το πρωτο-ογκογονίδιο c-Myc (Gordan *et al.*, 2007) και τον παράγοντα των βλαστοκυττάρων OCT-3/4 (Covello *et al.*, 2006).

Οι διαφορές στην λειτουργία των HIF-1α και HIF-2α οφείλονται κατά ένα μέρος στη ρύθμιση ειδικών γονιδίων στόχων αλλά επίσης και στις ανταγωνιστικές τους επιδράσεις σε άλλους σημαντικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των c-Myc, IL-8, p53 και του νιτρικού οξειδίου. Οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν ανταγωνιστικές δράσεις στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Σε συνθήκες χαμηλής ιντερφερόνης-γ (IFN-γ), ο HIF-2α είναι σε αφθονία και επάγει την έκφραση της αργινάσης 1, μειώνοντας έτσι την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO). Υπό συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων IFN-γ, τα επίπεδα του HIF-2α μειώνονται και επικρατεί ο HIF-1α και επάγει τη νιτρική οξειδάση που χρησιμοποιεί την αργινίνη προς παραγωγή NO (Doedens *et al.*, 2010). Επίσης οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν ανταγωνιστικές δράσεις και ως προς τη ρύθμιση του μεταγραφικού συμπλόκου c-Myc. Ο HIF-2α αυξάνει τη δράση του c-Myc σταθεροποιώντας το σύμπλοκο c-Myc:Max, που προάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ενώ ο HIF-1α αναστέλλει τη λειτουργία του c-Myc δεσμεύοντας το μεταγραφικό παράγοντα Max και αποτρέποντας τη συμπλοκοποίησή του με τον c-Myc, αλληλεπιδρώντας με

το συμπαράγοντα του c-Myc, SP-1 ή επάγοντας τη μεταγραφή του ανταγωνιστή του c-Myc, Mxi-1 (To et al., 2006; Gordan et al 2007; Zhang et al., 2007). Η ανταγωνιστική δράση των HIF-1α και HIF-2α στη δράση του c-Myc αντανακλάται και στην επίδρασή τους στη ρύθμιση της ιντερλευκίνης-8 (IL-8). Ενώ ο HIF-1α μειώνει την έκφραση της IL-8, ο HIF-2α την αυξάνει και η ανταγωνιστική αυτή δράση τους φαίνεται να οφείλεται στη διαφορετική αλληλεπίδρασή τους με τον SP-1 ο οποίος είναι συμπαράγοντας του c-Myc αλλά και ρυθμιστής της IL-8 (Florczyk et al., 2001). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α επάγει τη δράση της p53, καθώς δεσμεύεται στην MDM2 και έτσι καταστέλλει την ουβικιτινυλίωση της p53 από την MDM2 και την επακόλουθη πρωτεασωμική της αποδόμηση (Chen et al., 2003). Αντίθετα ο HIF-2α, δεν δεσμεύεται στην MDM2 και φαίνεται να αναστέλλει τη δράση της p53 με πολλαπλούς μηχανισμούς (Bertout et al., 2009; Roberts et al., 2009).

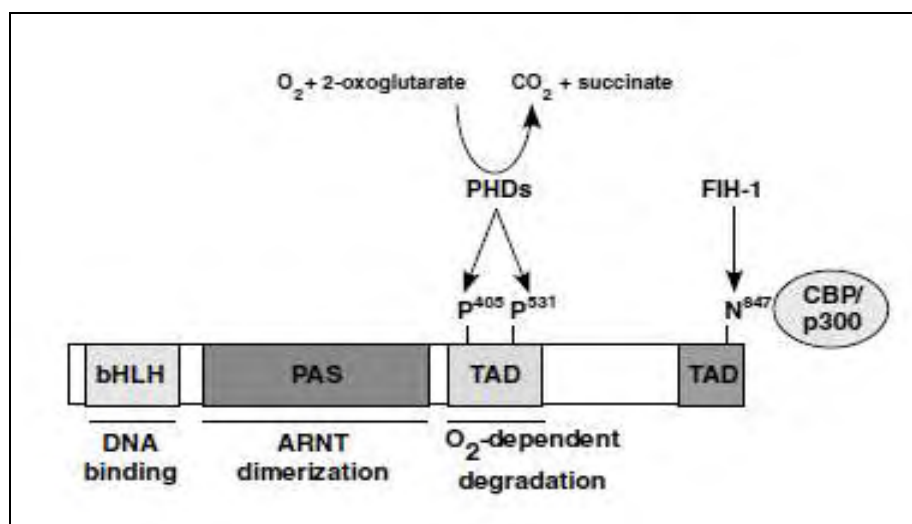
## 1.4 Ο HIF-2

Η υπομονάδα HIF-2α ταυτοποιήθηκε το 1997 από διάφορες ανεξάρτητες επιστημονικές ομάδες και ονομάστηκε αρχικά ως endothelial PAS domain (EPAS1), HIF-related factor (HRF), HIF1α-like factor (HLF) ή member of PAS family 2 (MOP2) (Tian et al., 1997; Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997).

### 1.4.1 Δομή

Ο HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη 870 αμινοξέων (118 kDa). Στην αμινοτελική του περιοχή περιέχει τη βασική περιοχή, την περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH) και την περιοχή PAS με τις PAS-A και PAS-B επαναλήψεις. Δύο περιοχές trans-ενεργοποίησης, η N-τελική TAD και C-τελική TAD περιοχή (γνωστές και ως NAD και CAD αντίστοιχα), εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό ήμισυ του HIF-2α. Επιπλέον, η καρβοξυ-τελική περιοχή περιέχει μία περιοχή υπεύθυνη για την αποδόμηση του HIF-2α υπό συνθήκες νορμοξίας. Αυτή η περιοχή οξυγόνο-εξαρτώμενης αποδόμησης (Oxygene- Dependent Degradation domain, ODD) περιέχει δύο PEST-like μοτίβα: αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T) κοινά για πολλές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μικρό χρόνο ημιζωής (λιγότερο

από 2 ώρες). Επιπλέον, ο HIF-2α περιέχει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού: το N-NLS και το C-NLS. Το καρβοξυ-τελικό C-NLS είναι βασικό για την εισαγωγή του HIF-2α στον πυρήνα, ενώ το αμινο-τελικό N-NLS φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντικό (Loboda *et al.*, 2012).



**Εικόνα 10: Η δομή του HIF-2α.** Περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης στο DNA bHLH, την περιοχή διμερισμού με τον HIF-1β (ARNT) PAS και τις περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης (TADs). Οι υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) υδροξυλιώνουν τα κατάλοιπα προλίνης 405 και 531 στην περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποδόμησης (ODD) του HIF-2α κάτω από συνθήκες νορμοξίας, σημαίνοντάς τον για αποδόμηση από το πρωτεόσωμα. Επιπλέον, υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης 847 στην καρβοξυτελική TAD από τον ανασταλτικό παράγοντα των HIF (FIH-1) αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 (Patel and Simon, 2008).

Ο HIF-2α έχει παρόμοια δομή με τον HIF-1α. Η διαφοροποίηση μεταξύ του HIF-1α και HIF-2α παρατηρείται κυρίως στην N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-TAD). Για την ακρίβεια η περιοχή N-TAD συνεισφέρει στην εξειδίκευση των HIF-1α και HIF-2α ως προς τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων τους (Hu *et al.*, 2007). Η δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (C-TAD) είναι ομόλογη μεταξύ των ισομορφών και προάγει την έκφραση των κοινών τους γονιδίων-στόχων (Hu *et al.*, 2007). Η περιοχή οξυγόνο-εξαρτώμενης αποδόμησης (ODD) που εντοπίζεται μέσα στην περιοχή N-TAD περιέχει ειδικά κατάλοιπα προλίνης (Pro402 και Pro564 για τον HIF-1α και Pro405 και Pro531 για τον HIF-2α) που υδροξυλιώνονται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου από μια ειδική ομάδα υδροξυλασών προλίνης (prolyl hydroxylases, PHDs). Στην περιοχή C-TAD η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης (N803 για τον

HIF-1α και N847 για τον HIF-2α) από την υδροξυλάση ασπαραγίνης FIH-1 (Factor Inhibiting HIF) καθιστά την περιοχή C-TAD μη λειτουργική και αναστέλλει άμεσα τη μεταγραφή των εξαρτώμενων από αυτή την περιοχή γονιδίων (Lando *et al.*, 2002).

#### 1.4.2 Κατανομή στους ιστούς

Ενώ αρχικά ανιχνεύθηκε σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ο HIF-2α εκφράζεται σε παρεγχυματικά και διάμεσα κύτταρα πολυάριθμων οργάνων (Tian *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1998; Wiesener *et al.*, 2003). Η σταθεροποίηση του HIF-2α μπορεί να παρατηρηθεί μέσω ανοσοϊστοχημείας σε νεφρικά διάμεσα κύτταρα, ηπατοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του δωδεκαδακτύλου, καρδιομυοκύτταρα και αστροκύτταρα σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε συστηματική υποξία (Wiesener *et al.*, 2003). Ενώ ο HIF-2α σταθεροποιείται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> απ' ό τι ο HIF-1α *in vitro*, ο HIF-2α δεν ανιχνεύτηκε κάτω από συνθήκες νορμοξίας στα υπό εξέταση κύτταρα (Wiesener *et al.*, 2003; Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Wiesener *et al.*, 1998). Η σταθεροποίηση και συσσώρευση του HIF-2α οφείλεται κυρίως σε μετά-μεταφραστική ρύθμιση, καθώς τα επίπεδα του mRNA του δεν επάγονται σημαντικά από την υποξία (Wiesener *et al.*, 2003). Ωστόσο τα επίπεδα του HIF-2α mRNA είναι ιδιαίτερα υψηλά σε ιστούς σημαντικούς για τη συστηματική κυκλοφορία του O<sub>2</sub>, όπως οι πνεύμονες, η καρδιά και το ενδοθήλιο (Tian *et al.*, 1997, Wiesener *et al.*, 2003). Τα μεταγραφικά επίπεδα του HIF-2α ρυθμίζονται επίσης αναπτυξιακά στον πνεύμονα, με μια επαγωγή στα επίπεδα του mRNA να συμβαίνει κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Compernele *et al.*, 2002). Κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, που συνθέτουν ορμόνες σημαντικές για τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της απόδοσης της καρδιάς, επίσης εκφράζουν τον HIF-2α (Tian *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, ο HIF-2α είναι υψηλά εκφραζόμενος στο όργανο του Zuckerkandl, μια σημαντική περιοχή σύνθεσης κατεχολαμινών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επίσης ανάλυση με χρώση ειδική για τις υπομονάδες HIF-α σε ισχαιμικό μυοκάρδιο έδειξε μια οξεία επαγωγή και των δύο α υπομονάδων που λάμβανε χώρα κυρίως στην περιοχή γύρω από το νεκρωτικό ιστό και περιλάμβανε καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. Ο HIF-2α με την πάροδο του χρόνου γινόταν ανιχνεύσιμος σε πιο απόμακρες περιοχές του μυοκαρδίου (Jurgensen *et al.*, 2004).

### 1.4.3 Γονίδια στόχοι

Ο HIF-2α ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων κοινών με τον HIF-1α συμπεριλαμβανομένων του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF), της επινεφριδιομυελίνης (adrenomedullin, ADM) και του μεταφορέα γλυκόζης-1 (glucose transporter-1, GLUT-1) (Wiesener *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2003). Ωστόσο ο HIF-2α ενεργοποιεί και ειδικά γονίδια στόχους που όπως είναι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα σε αναπτυσσόμενα έμβρυα και νεογέννητα (Scortegagna *et al.*, 2003). Βέβαια επάγει και γονίδια στόχους που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων (CYCLIN D1, TWIST1, TGF- $\alpha$ ), την ερυθροποίηση (EPO) τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων όπως το πρωτοογκογονίδιο c-Myc και ο εμβρυϊκός μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 (POU5f1 ή Oct3/4) (Warnecke *et al.*, 2004; Raval *et al.*, 2005; Baba *et al.*, 2003; Gunaratnam *et al.*, 2003; Covello *et al.*, 2006; Gort *et al.*, 2007; Gruber *et al.*, 2007).

Μελέτες ανταλλαγής περιοχών μεταξύ του HIF-1α και HIF-2α και μελέτες ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η επιλεκτική γονιδιακή ενεργοποίηση των HIF δεν οφείλεται σε εξειδικευμένες ικανότητες πρόσδεσης αυτών των παραγόντων στο DNA. Και οι δύο HIF- $\alpha$  υπομονάδες μπορούν να προσδένονται στα ενδογενή HREs των αποκρινόμενων στην υποξία γονιδίων, ωστόσο η πρόσδεση στο DNA δεν είναι επαρκής για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (Lau *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007). Η εξειδίκευση ως προς τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-2α αποδίδεται στην καρβοξυτελική του περιοχή. Για επιλεγμένους στόχους, η περιοχή N-TAD στην καρβοξυτελική περιοχή των υπομονάδων HIF- $\alpha$  είναι επαρκής για να αποδώσει εξειδίκευση ως προς τα γονίδια-στόχους και αντικατάσταση της HIF-2α N-TAD με την ανάλογη περιοχή του HIF-1α αλλάζει την εξειδίκευση αυτών των πρωτεϊνών (Hu *et al.*, 2007). Από την άλλη, στόχοι όπως η υδροξυλάση προλίνης-3 (PHD3) απαιτεί επιπλέον περιοχές της πρωτεΐνης HIF-2α να επαχθεί (Lau *et al.*, 2007). Η εξειδίκευση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-2α επίσης να οφείλεται στη συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που μπορεί να απαιτούνται για μέγιστη και κυτταροειδική επαγωγή των γονιδίων-στόχων.

## 1.5 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2

### 1.5.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση

Εφόσον οι HIF εμπλέκονται στην απόκριση στην υποξία με ένα χρονοεξαρτώμενο τρόπο, απαιτείται η αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης τους. Και οι δύο υπομονάδες του HIF-2 (HIF-2α και HIF-1β) μεταγράφονται και μεταφράζονται διαρκώς τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Ωστόσο, ενώ η υπομονάδα HIF-1β εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα και εντοπίζεται διαρκώς στον πυρήνα, η διαθεσιμότητα της υπομονάδας HIF-2α εξαρτάται από τα επίπεδα του κυτταρικού οξυγόνου. Κατά συνέπεια η ικανότητα του HIF-2 να ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του, ρυθμίζεται από τη σταθερότητα της HIF-2α υπομονάδας (*Covello and Simon 2004*).

Πιο συγκεκριμένα, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ή αλλιώς στη «νορμοξία» (>8%-10% O<sub>2</sub>), η υπομονάδα HIF-2α εκφράζεται και αποδομείται διαρκώς και η αποδόμησή της ενεργοποιείται από την υδροξυλίωση δύο βασικών καταλοίπων προλίνης στην περιοχή ODD, των Pro405 και Pro531. Η υδροξυλίωση αυτών των καταλοίπων προλίνης καταλύεται από μία οξυγόνοεξαρτώμενη και σιδηροεξαρτώμενη οικογένεια εξειδικευμένων υδροξυλασών προλίνης (PHDs). Η υδροξυλίωση των καταλοίπων Pro405 και Pro531 στην περιοχή ODD του HIF-2α από τις PHDs είναι απαραίτητη για την αναγνώριση και πρόσδεση στην HIF-2α της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης pVHL (Von Hippel-Lindau). Η pVHL διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο στην ουβικιτινίωση του HIF-2α, η περιοχή β της pVHL αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή ODD του HIF-2α, δρα ως στοιχείο αναγνώρισης υποστρώματος για το σύμπλοκο της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, και αφού προσδεθεί στην υπομονάδα HIF-2α επιστρατεύει τις enlongins B και C, την cullin 2 και την Rbx1, που αποτελούν συστατικά του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Το σύμπλοκο της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, ουβικιτινυλιώνει το αμινο-τελικό και κάρβοξυ-τελικό μέρος της περιοχής ODD σημαίνοντας τον HIF-2α για αποδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S. Η υψηλή αποτελεσματικότητα της αντίδρασης υδροξυλίωσης και επακόλουθης αποδόμησης συντελεί στη φτωχή σταθερότητα του HIF-2α που παρουσιάζει χρόνο ημιζωής λίγων λεπτών κάτω από συνθήκες νορμοξίας. Έτσι στη νορμοξία ο HIF-2α εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα (*Keith et al., 2012*).



Οι HIF-PHDs είναι μέλη της υπεροικογένειας των εξαρτώμενων από Fe (II) και 2-οξογλουταρικό δεοξυγενασών (*Bruik and McKnight, 2001, Jaakkola et al., 2001*). Είναι εξελικτικά συντηρημένες από τους νηματώδεις σκώληκες μέχρι τα θηλαστικά. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί τρία HIF-PHD ομόλογα με διαφορετικές δραστηριότητες, ειδικότητες και πρότυπα έκφρασης ενώ έχει περιγραφεί και η ύπαρξη μιας τέταρτης PHD (*Oehme et al., 2002*). Αυτά διαφέρουν ως προς τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό καθώς η PHD1 ανιχνεύεται στον πυρήνα, η PHD2 στο κυτταρόπλασμα και η PHD3 τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (*Metzen et al., 2003*). Το μοριακό οξυγόνο και το 2-οξογλουταρικό αποτελούν υποστρώματα αυτών των ενζύμων, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα και το succinate είναι παραπροϊόντα της αντίδρασης. Η αντίδραση υδροξυλίωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση O<sub>2</sub>, 2-οξογλουταρικού και των συμπαραγόντων Fe (II) και ασκορβικού. Κατά την υποξία ή στην περίπτωση έλλειψης Fe (II) ή 2-οξογλουταρικού (ψευδοϋποξία), οι PHDs παύουν να λειτουργούν και έτσι ο HIF-2α δεν υφίσταται πρωτεασωματική αποδόμηση (*Semenza, 2001; Zagorska and Dulak, 2004*).

Σε συνθήκες υποξίας (ή σε περίπτωση έλλειψης Fe(II) ή οξογλουταρικού), οι HIF-PHDs απενεργοποιούνται μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του περιορισμού του υποστρώματος (μειωμένα επίπεδα οξυγόνου), με αποτέλεσμα η υπομονάδα HIF-2α να σταθεροποιείται, να μετατοπίζεται στον πυρήνα και να ετεροδιμερίζεται με την υπομονάδα HIF-1β για να σχηματίσει ένα λειτουργικό σύμπλοκο HIF. Το μεταγραφικό σύμπλοκο HIF-2 στον πυρήνα, προσδένεται στις συναινετικές αλληλουχίες A/GCGTG στα HRE (Hypoxia Responsive Elements) που εντοπίζονται στους υποκινητές ή ενισχυτές των γονιδίων-στόχων του HIF-2 (*Keith et al., 2012*).

Ένας επιπλέον μηχανισμός οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του HIF-2α αφορά την πρόσδεση συμπαραγόντων στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (CTAD). Στη νορμοξία, μετά τη σταθεροποίηση της η HIF-2α υπομονάδα μεταφέρεται εντός του πυρήνα, όπου γίνεται η μεταγραφική της ενεργοποίηση με τη επιστράτευση συνενεργοποιητών (cofactors), όπως η p300/CREB Binding Protein (p300/CBP). Στη νορμοξία η αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-2α με τους συνενεργοποιητές p300 και CBP εμποδίζεται από μια επιπλέον αντίδραση υδροξυλίωσης ενός συντηρημένου καταλοίπου ασπαραγίνης (N 847) στην περιοχή C-TAD της υπομονάδας HIF-2α, η οποία καταλύεται από μια HIF υδροξυλάση του ασπαραγίνης γνωστή ως

ανασταλτικός παράγοντας των HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH), οδηγώντας σε μεταγραφική απενεργοποίηση του HIF-2α. Σε συνθήκες υποξίας, η υδροξυλίωση από τον FIH αναστέλλεται επιτρέποντας στην υπομονάδα HIF-2α να συνδεθεί με συνενεργοποιητές, επιτρέποντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση πολλών γονιδίων-στόχων που φέρουν HRE και κωδικοποιούν μεταβολικούς και αγγειογεννητικούς παράγοντες (Keith *et al.*, 2012). Έτσι ενώ η υδροξυλίωση από τις PHDs αποσταθεροποιεί την υπομονάδα HIF-2α, η υδροξυλίωση από τον FIH εμποδίζει τη μεταγραφική της ενεργότητα. Εν κατακλείδι, αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει ότι η μείωση των επιπέδων O<sub>2</sub> οδηγεί σε μια καλά ρυθμισμένη και αναλογική αύξηση στη συσσώρευση της υπομονάδας HIF-2α.

Η οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση της έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζει επιλεκτικότητα. Συγκεκριμένες PHDs παρουσιάζουν επιλεκτική δραστηριότητα ως προς τον HIF-1α ή τον HIF-2α. Για παράδειγμα, η PHD3 υδροξυλιώνει επιλεκτικά τον HIF-2α σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές (Appelhoff *et al.*, 2004). Ο Peet και συνεργάτες, έχει δείξει ότι ο HIF-2α είναι πιο ανθεκτικός στην υδροξυλίωση από τον FIH σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, εξαιτίας ενός αμινοξικού καταλοίπου αλανίνης που βρίσκεται πλησίον του προς υδροξυλίωση από τον FIH καταλοίπου ασπαραγίνης, στο καρβοξυτελικό άκρο της περιοχής CTAD. Το αντίστοιχο αμινοξύ στον HIF-1α είναι βαλίνη και ευνοεί την επιλεκτική υδροξυλίωσή του από τον FIH. (Bracken *et al.*, 2006)

Πέραν της υδροξυλίωσης ο HIF-2α υφίσταται ένα εύρος διακριτών, ανεξάρτητων του οξυγόνου μετά-μεταφραστικών (φωσφορυλιώσεις, ακετυλιώσεις), για τις οποίες θα γίνει λόγος παρακάτω. Όλο και περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον μερικές από αυτές τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι ειδικές είτε για τον HIF-1α είτε για τον HIF-2α και μπορεί να προάγουν τη διαφορετική τους μεταγραφική δραστηριότητα (Keith *et al.*, 2012).

### 1.5.2 Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση

Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι οι HIFs μπορούν να υποστούν διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση και σουμοϋλίωση.

### 1.5.2.1 Φωσφορυλίωση

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK (Mylonis et al., 2006) και εμποδίζει την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα, εξουδετερώνοντας την αναγνώριση από την εξπορτίνη CRM1 (Mylonis et al., 2008). Επίσης, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την καζεϊνική κινάση 1δ CK1δ (Kalousi et al., 2010) επηρεάζοντας αρνητικά τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT. Αυτό οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1. Η καζεϊνική κινάση 2 CK2 φωσφορυλιώνει επίσης τον HIF-1α (Cho, H et al., 2007) και πιθανώς επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον FIH (Lancaster, DE et al., 2004) με αποτέλεσμα την διατήρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Τέλος, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3β (Sodhi et al., 2001) Αυτή η φωσφορυλίωση επηρεάζει αρνητικά τον HIF-1α εντείνοντας την αποικοδόμησή του μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου από την pVHL (Flugel, D et al., 2007).

Η φωσφορυλίωση του HIF-2α δεν έχει επαρκώς διαλευκανθεί. Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την CK2 και αυτή η φωσφορυλίωση είναι σημαντική για τη διατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-2α (Gradin, K et al., 2002). Επίσης έχει βρεθεί μόνο μία ακόμη κινάση που φωσφορυλιώνει τον HIF-2α, η κινάση της πρωτεΐνης D1 (protein kinase D1, PKD1). Αυτή η φωσφορυλίωση εμποδίζει την σύνδεση του HIF-2 με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1.

### 1.5.2.2 Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση των HIFs ρυθμίζει την μεταγραφική τους ενεργότητα. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν οι σιρτουΐνες (sirtuins, Sirt1-7), μία οικογένεια αποακετυλασών ευαίσθητες στο οξειδοαναγωγικό στρες και εξαρτώμενες από το NAD<sup>+</sup>. Η Sirt1 σχηματίζει σύμπλοκο με τον HIF-2α και αποακετυλιώνει κατάλοιπα λυσίνης στο καρβοξυτελικό του άκρο. Η αποακετυλίωση του HIF-2α από την Sirt1 ενισχύει την μεταγραφική του ενεργότητα HIF-2α. Συγκεκριμένα, η Sirt1 συμμετέχει στην σύνδεση του HIF-2α με τον υποκινητή της EPO και στην ενίσχυση της δράσης του HIF-2α in vitro σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, ενώ in vivo το σύστημα Sirt1/HIF-2α ρυθμίζει την νεφρική και ηπατική έκφραση της ερυθροποιητίνης (Dioum, EM et al., 2009).

Η Sirt1 αποακετυλιώνει και τον HIF-1α, με αποτέλεσμα όμως να καταστέλλεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Lim, JH et al., 2010). Επίσης,

η λυσίνη 532 (K532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD του HIF-1α βρέθηκε να ακετυλιώνεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης, της arrest-defective-1 (ARD1). Η ακετυλίωση της λυσίνης K532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του (Jeong, JW et al., 2002).

### 1.5.2.3 Σουμοϋλίωση

Άλλη μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίστανται οι HIFs είναι η σουμοϋλίωση. Η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικουιτίνη στη δομή και προσδέεται στις πρωτεΐνες στόχους με ένα παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό. Η σουμοϋλίωση είναι μια διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες δεν οδηγούνται απαραίτητα για αποικοδόμηση όπως στην ουβικουιτινυλίωση, αλλά έχει συνδεθεί με διάφορα μονοπάτια όπως η ενδοκυτταρική μεταφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η DNA αντιγραφή και επιδιόρθωση, ο RNA μεταβολισμός και η κυτταρική σηματοδότηση (Muller, S et al., 2001). Ο HIF-1α περιέχει τρεις αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων (Brahimi-Horn, C et al., 2005). Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν έχει διευκρινιστεί.

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο HIF-2α είναι πρωτεΐνη στόχος για σουμοϋλίωση και ότι περιέχει δύο αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στη λυσίνη 394 του HIF-2α προκαλώντας τη μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Ο σουμοϋλιωμένος HIF-2α ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες RNF4 λιγάση, SENP1 πρωτεάση και τον VHL και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (van Hagen, M et al., 2010).

### 1.5.2.4 Ρύθμιση από χημικούς παράγοντες

Η δραστηριότητα των PHDs και η επακόλουθη σταθεροποίηση των υπομονάδων HIF-α επηρεάζεται από χημικούς παράγοντες («hypoxia mimetics») όπως ο χηλικός παράγοντας του σιδήρου δεσφериοξαμίνη (DFO) (Wang and Semenza, 1993), τα φλαβονοειδή όπως η κερσετίνη (Triantafyllou et al., 2007), ο εξαρτώμενος από το 2-οξογλουταρικό αναστολέας της οξυγενάσης όπως ο DMOG

(Elvidge *et al.*, 2006) και το δισθενές μέταλλο το κοβάλτιο (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Οι παράγοντες αυτοί χρησιμοποιούνται συχνά για την προσομοίωση σε υποξικές συνθήκες και την επαγωγή των HIF. Ωστόσο η δράση συγκεκριμένων από αυτούς τους παράγοντες, όπως του κοβαλτίου και των φλαβονοειδών, μπορεί να ασκείται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που δεν ενεργοποιούν απαραίτητα τη φυσιολογική απόκριση στην υποξία και έτσι μπορεί να ασκούν διαφορετικές μη-οξυγονοεξαρτώμενες βιολογικές επιδράσεις (Chachami *et al.*, 2004, Triantafyllou *et al.*, 2006, 2008).

Χαρακτηριστικά μελετώντας την επίδραση του κοβαλτίου και της υποξίας στην επαγωγή των HIF-1α και HIF-2α και στην μεταγραφική τους δραστηριότητα σε συγκεκριμένα γονίδια διερευνήθηκε σε δύο ηπατικές καρκινικές σειρές, τις Huh7 και HepG2. Βρέθηκε ότι τόσο η υποξία όσο και το κοβάλτιο προκαλούν ταχεία επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α. Ωστόσο ενώ η υποξία προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης και έκκρισης της ερυθροποιητίνης (EPO) με τρόπο εξαρτώμενο από τον HIF-2α, η έκφρασή και έκκριση της EPO δεν επάγεται παρουσία κοβαλτίου. Επίσης η υποξία ενεργοποιεί τόσο τον υποκινητή του γονιδίου PGK που είναι στόχος του HIF-1α όσο και τον υποκινητή του γονιδίου SOD2 που είναι στόχος του HIF-2α ενώ το κοβάλτιο ενεργοποιεί μόνο τον εξαρτώμενο από τον HIF-1α υποκινητή PGK. Σε αντίθεση με το κοβάλτιο, άλλοι παράγοντες μιμητές της υποξίας όπως η DFO και ο DMOG ενεργοποιούν και τους δύο υποκινητές. Έτσι, βρέθηκε ότι το κοβάλτιο μειώνει την υποξική ενεργοποίηση μόνο του HIF-2α διότι ο ενεργοποιημένος από το κοβάλτιο HIF-2α μειώνει την αλληλεπίδραση ενός ειδικού συνενεργοποιητή του HIF-2α, τον USF-2, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (Befani *et al.*, 2013).

## **1.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HIF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.**

Κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η παθητική διάχυση του οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών γίνεται περιοριστική λόγω του ταχύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο έμβρυο που υφίσταται γαστριδίωση (3<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης). Έτσι η υποξία είναι ένα σημαντικό σήμα για την εμβρυϊκή αγγειακή ανάπτυξη και οι αποκρίσεις στα μειωμένα επίπεδα οξυγόνου ή αλλιώς υποξία, είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και το σχηματισμό του

καρδιαγγειακού συστήματος (*Ramirez-Bergeron and Simon, 2001*). Παρότι οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην υποξική ρύθμιση της εμβρυϊκής αγγειακής ανάπτυξης δεν είναι απόλυτα ξεκάθαροι, έχει αποδειχθεί ότι οι HIF είναι σημαντικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές των γεγονότων της εμβρυϊκής αγγειακής ανάπτυξης (*Ramirez-Bergeron and Simon, 2001; Maltepe and Simon, 1998*).

Εφόσον η υποξία δίνει το έναυσμα για την αγγειακή ανάπτυξη στο έμβρυο, γι' αυτό και έχουν μελετηθεί μοντέλα ζώων με αποσιώπηση των γονιδίων των HIF. Ποντίκια με έλλειψη του ARNT/HIF-1 $\beta$  (εξαλείφει ολοκληρωτικά τη δραστηριότητα των HIF κατά την καρδιαγγειακή διαφοροποίηση) πεθαίνουν εντός 10,5 ημερών εμβρυϊκής ανάπτυξης (E10,5) και χαρακτηρίζονται από ανώμαλη αγγείωση του λεκιθικού ασκού, των βραχιόνιων αγγείων και του πλακούντα (*Adelman et al., 2000; Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997*). Παρότι η αρχική ανάπτυξη των αγγειακών στρωμάτων παραμένει φυσιολογική, η αγγειακή αναδιαμόρφωση στο *Arnt*<sup>-/-</sup> έμβρυο είναι ανώμαλη. Επιπλέον, τα *Arnt*<sup>-/-</sup> έμβρυα παράγουν μειωμένο αριθμό πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στο λεκιθικό ασκό και αυτός ο φαινότυπος αποδόθηκε σε εξωκυτταρικούς παράγοντες και μπορούσε να διασωθεί με εξωγενή χορήγηση VEGF *in vitro* (*Adelman et al., 1999*). Καλλιέργειες κυττάρων σπλαγχοπλευρικής προέλευσης από *Arnt*<sup>-/-</sup> έμβρυα επίσης παρουσίαζαν ανώμαλη αιμοποίηση και αναστολή τόσο της νεοαγγειογένεσης όσο και της αγγειογένεσης. Τα *Arnt*<sup>-/-</sup> έμβρυα παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα VEGF και αυξημένο αριθμό αποπτωτικών αιμοποιητικών κυττάρων. Και πάλι η χορήγηση ανασυνδιασμένου VEGF διόρθωσε αυτές τις αγγειακές ανωμαλίες, επιβεβαιώνοντας ότι ο VEGF εκκρινόμενος απ' τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι απαραίτητος για την αγγειακή ανάπτυξη (*Ramirez-Bergeron, 2006*). Τα κύτταρα του πλακούντα (το αγγειακό όργανο, που εφοδιάζει το έμβρυο με αίμα και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη) επίσης ρυθμίζονται από τις αποκρίσεις στην υποξία μέσω HIF καθώς οι *Arnt*<sup>-/-</sup> πλακούντες παρουσιάζουν ανώμαλη αρχιτεκτονική (*Adelman et al., 2000*). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι ο HIF-1 $\beta$  είναι σημαντικός στην ανάπτυξη των καρδιαγγειακών οργάνων, όπως η αγγείωση, το αίμα και ο πλακούντας. Επίσης φαίνεται πως είναι σημαντικός ο ρόλος της HIF σηματοδότησης, μέσω της ενεργοποίησης γονιδίων στόχων όπως ο VEGF και η EPO, τόσο σε εξωεμβρυϊκούς όσο και σε εμβρυϊκούς ιστούς για την εγκαθίδρυση της αγγείωσης και του αιμοποιητικού συστήματος.

Τα έμβρυα με έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον HIF-1α είναι επίσης θνησιγενή και πεθαίνουν κατά το μέσω της κύησης μέχρι την 11<sup>η</sup> μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E11) με αγγειακές ανωμαλίες και δυσμορφίες στην καρδιαγγειακή μορφογένεση (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). Αρχικά η αγγειογένεση των HIF-1α<sup>-/-</sup> εμβρύων πραγματοποιείται φυσιολογικά αλλά ακολουθείται από μια αξιοσημείωτη υποστροφή του αγγειακού ενδοθηλίου μέχρι την E9,5. Τα HIF-1α<sup>-/-</sup> έμβρυα, επίσης παρουσιάζουν ανωμαλίες της σύγκλισης του νευρικού σωλήνα και εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο ειδικά στις κεφαλικές και βραχιόνιες περιοχές. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο HIF-1α είναι απαραίτητος για την καρδιαγγειακή ανάπτυξη, τη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και την εμβρυϊκή αγγειογένεση.

Τέσσερα ανεξάρτητα HIF-2α<sup>-/-</sup> μοντέλα ποντικών έχουν δημιουργηθεί καθένα από τα οποία παρουσίασε θνησιγένεια αλλά με σημαντικά διαφορετικούς φαινοτύπους. Μια ομάδα έδειξε θνησιμότητα εν μέσω της κύησης λόγω βραδυκαρδίας που αποδόθηκε σε ανωμαλίες στη βιοσύνθεση κατεχολαμινών από το όργανο του Zuckerkandl που εκφράζει ειδικά τον HIF-2α, πιθανώς λόγω μειωμένης έκφρασης της υδροξυλάσης τυροσίνης. Παρά την αρχική ταυτοποίηση του γονιδίου HIF-2α σε ενδοθηλιακά κύτταρα, δεν παρατηρήθηκαν αγγειακές ανωμαλίες σ' αυτά τα έμβρυα (Tian et al., 1998). Μια άλλη ομάδα έδειξε ότι η έλλειψη του HIF-2α οδήγησε σε μερικά βιώσιμα ποντίκια που πέθαναν μέσα σε 24 ώρες καθώς εκδήλωσαν σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας. Η έλλειψη του HIF-2α σχετίστηκε με ανωμαλίες στην έκφραση του VEGF με αποτέλεσμα την έλλειψη παραγωγής πνευμονικού surfactant στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (Comperole et al., 2002). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ένα ρόλο του HIF-2α στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGF και στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού πνεύμονα, που εκφράζει υψηλά επίπεδα του HIF-2α (Ema et al., 1997). Μια τρίτη ομάδα επίσης παρατήρησε βραδυκαρδία με θνησιμότητα μεταξύ της E9,5 και E13,5. Ωστόσο, σ' αυτή την ομάδα περίπου το 50% των ομόζυγων εμβρύων παρουσίαζαν εκτεταμένες ανωμαλίες της αγγειακής διαμόρφωσης του λεκιθικού ασκού και του ιδίως εμβρύου (Peng et al., 2000). Σε αυτά τα έμβρυα η εκ νέου αγγειογένεση (vasculogenesis) πραγματοποιήθηκε φυσιολογικά αλλά παρουσίασε ανωμαλίες στην αναδιαμόρφωση που οφειλόταν στην αδυναμία σύνδεση των αιμοφόρων αγγείων που είχε ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση των αυλών και αιμορραγία. Μεταγενέστερη μελέτη

απέδωσε αυτές τις αγγειακές ανωμαλίες στην μειωμένη έκφραση του Tie2 εξαιτίας της απώλειας της μεταγραφικής του ενεργοποίησης από τον HIF-2α (Duan *et al.*, 2005). Τέλος, ο Scortegagna και συνεργάτες αποκόμισαν μια μικρή ομάδα βιώσιμων HIF-2α<sup>-/-</sup> ενήλικων ποντικών που παρουσίαζαν πολυοργανική δυσλειτουργία, συμπεριλαμβανομένης πανκυττοπενίας, ηπατικής στεάτωσης, καρδιακής υπερτροφίας και νεφροπάθειας που σχετίζονταν με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Αυτή η μελέτη πρότεινε ένα νέο ρόλο του HIF-2α στη ρύθμιση της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση, η υπεροξειδική δυσμουτάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Πειράματα μεταμόσχευσης μυελού έδειξαν ότι οι αιμοποιητικές ανωμαλίες δεν οφείλονται αποκλειστικά στα κύτταρα αλλά ο φαινότυπος οφειλόταν στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων και προτάθηκε πως η μειωμένη παραγωγή EPO εξαιτίας της έλλειψης του HIF-2α, ήταν υπεύθυνη για την ανώμαλη αιμοποίηση (Scortegagna *et al.*, 2003). Οι διαφορές σ' αυτούς τους φαινοτύπους αποδίδονται πιθανώς σε τροποποιητικά γονίδια στα ποικίλα γενετικά υπόβαθρα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μοντέλο. Ωστόσο, η εμβρυϊκή επιβίωση με τις όποιες διαταραχές που παρατηρήθηκε απουσία της έκφρασης HIF-2α, τονίζει ότι ο HIF-1α και ο HIF-2α έχουν διακριτές μη αλληλεπικαλυπτόμενες, σημαντικές λειτουργίες στην αναπτυξιακή αγγειογένεση.

Συνολικά, τα μοντέλα ποντικών του HIF-1α, HIF-2α και ARNT υποδεικνύουν ότι οι HIF διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο κατά τα στάδια που ακολουθούν μετά την εκ νέου αγγειογένεση, και απαιτούνται για την αναδιαμόρφωση του αρχικού δικτύου στο ώριμο αγγειακό δίκτυο. Από τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος, ορισμένα είναι γονίδια στόχοι ειδικά του HIF-2α, όπως η EPO και ο Flk-1 (VEGFR) (Elvert *et al.*, 2003) και όπως υποδεικνύουν τα HIF-2α<sup>-/-</sup> μοντέλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή αγγειογένεση.



## ΣΚΟΠΟΣ

Η υποξία λαμβάνει χώρα σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία, η επούλωση πληγών, η φλεγμονή και ο καρκίνος. Ο κύριος ρυθμιστής της προσαρμοστικής απόκρισης στην υποξία στα θηλαστικά είναι η οικογένεια μεταγραφικών ρυθμιστών HIF (Hypoxia Inducible Factors). Αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν την έκφραση πλειάδας γονιδίων που μεταβιβάζουν πολλές από τις αποκρίσεις στην υποξία, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης πρόσληψης γλυκόζης, της αυξημένης ερυθροποίησης και του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω αγγειογένεσης. Η νεοαγγειογένεση και η αγγειογένεση είναι μια σειρά δυναμικών διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση ενός ώριμου αγγειακού συστήματος απαραίτητου για τη σωστή μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών σε όλα τα κύτταρα των ιστών. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα περισσότερα αγγειογενετικά γεγονότα λαμβάνουν χώρα στο επίπεδο του μικροαγγειακού ενδοθηλίου και απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία του αγγειακού δικτύου είναι η παρουσία υποξίας. Στη βιβλιογραφία, έχει μελετηθεί η επίδραση της υποξίας σε μακροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του ομφαλίου λώρου (HUVEC), ωστόσο σε κύτταρα του μικροαγγειακού ενδοθηλίου, η επίδραση της υποξίας και ο ρόλος των HIF και ιδιαίτερα του HIF-2α που περιγράφεται ότι έχει κυρίαρχο ρόλο στο αγγειακό ενδοθήλιο, δεν έχει μελετηθεί.

Έτσι, η εργασία μας, έχει ως σκοπό να μελετήσουμε την κινητική της έκφρασης του HIF-2α στα ανθρώπινα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και να τη συγκρίνουμε με την κινητική της έκφρασης του HIF-1α, να μελετήσουμε την ολική μεταγραφική ενεργότητα των HIF και την επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

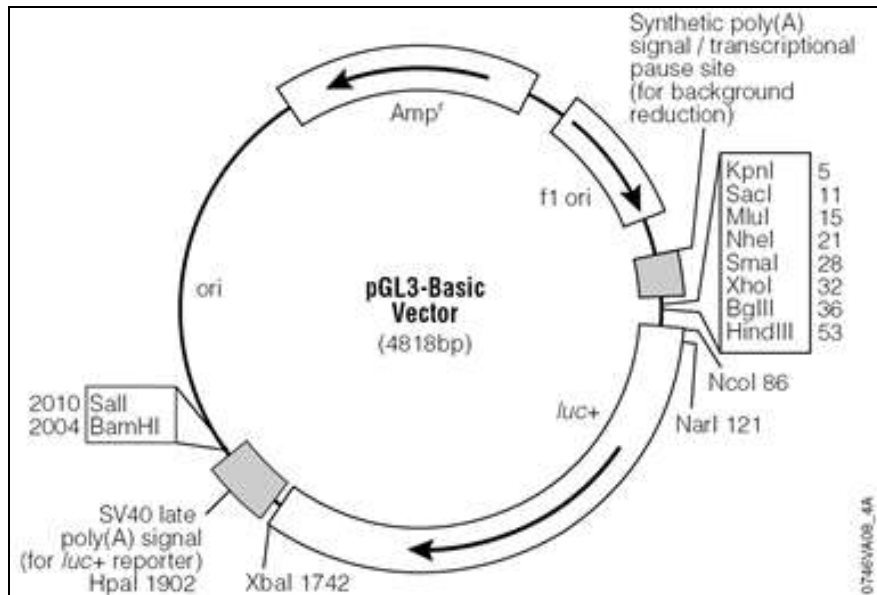
#### 2.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HMEC-1. Πρόκειται για μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η κυτταρική σειρά HMEC-1 δημιουργήθηκε από τον Edwin W. Ades (Ades et al., 1992) με διαμόλυνση και αθανатоποίηση ανθρώπινων μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων με το μεγάλο αντιγόνο T του SV40. Τα κύτταρα HMEC-1 διατηρούν τον ενδοθηλιακό φαινότυπο. Η μορφολογία των HMEC-1 είναι ακριβώς η ίδια με αυτή των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Διατηρούν χαρακτηριστικά των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως η έκφραση του παράγοντα von Willebrand (vWF), η πρόσληψη ακετυλιωμένης LDL, υφίστανται χρώση με την ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα λεκτίνη Ulex europaeus.

#### 2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pGL3-VEGF-5HRE και pCI-renilla. Ο pGL3-VEGF-5HRE χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της ολικής μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου VEGF στον SV-40 υποκινητή, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (Εικόνα 19)

Όσον αφορά τον πλασμιδιακό φορέα pCI-renilla (Promega), όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla και χρησιμοποιείται σαν κοντρόλ για τον έλεγχο της διαμόλυνσης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 11: Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-Basic ([www.worldwide.promega.com](http://www.worldwide.promega.com))

### 2.1.3 Χημικές ενώσεις-αντιδραστήρια

Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικής καθαρότητας έγινε από τις εταιρίες Sigma (St. Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).

### 2.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα.
- Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα (Lyberopoulou et al., 2007)
- Πολυκλωνικό αντί-tubulin αντίσωμα (Cell Signaling)
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι, ποντικό ή αίγα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

### 2.1.5 Εξοπλισμός

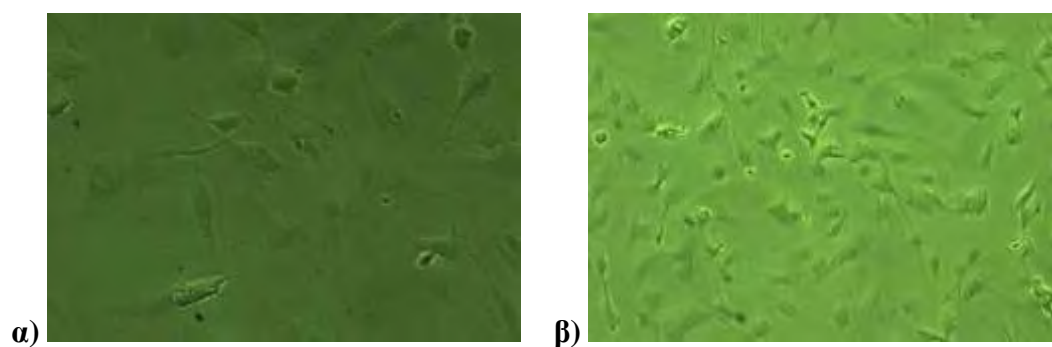
Συσκευή εμφάνισης των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης (Uvitec Cambridge) και λογισμικό για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Η κυτταρική σειρά HMEC-1 (Εικόνα 2 α και β) παραχωρήθηκε σ' εμάς από την επιστημονική ομάδα του Edwin W. Ades (Ades et al., 1992). Τα κύτταρα HMEC-1 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Molecular, Cellular, and Developmental Biology 131 (MCDB 131) το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βώος (FBS), και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (100 U/ml). Η κυτταρική σειρά επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub>. Κάθε 5-7 ημέρες (90-100% confluence) συλλέγαμε τα κύτταρα με θρυψινοποίηση (συλλέγαμε συνήθως 300.000-400.000 κύτταρα/ml) και προσδιορίζαμε τη συγκέντρωση και τη βιωσιμότητα των κυττάρων με χρώση με trypan blue και μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυττόμετρο. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων HMEC-1 γινόταν σε συγκέντρωση 50.000 κυττάρων/ml όπως προτείνεται από την επιστημονική ομάδα απ την οποία προμηθευτήκαμε τα κύτταρα (Ades et al., 1992).

Η κυτταρική σειρά HMEC-1 έχει ελεγχθεί για τα ανθρώπινα παθογόνα, μυκόπλασμα, HIV και τους ιούς της ηπατίτιδας και είναι αρνητικά για τους συγκεκριμένους παράγοντες.



Εικόνα 12: Κύτταρα HMEC-1. α) 50% confluence β) 90-100% confluence

### 2.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κύτταρα τα οποία ήταν προσκολλημένα σε τρυβλίο ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.2% τρυψίνης σε PBS και το τρυβλίο

επώαστηκε για 30 δευτερόλεπτα στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 2 ml θρεπτικού υλικού ψύξης που περιείχε 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους (-1 °C/min) στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιέργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανση τους στους 37°C και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φλάσκα με το πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37°C σε 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες ώστε να προσκολληθούν στον πυθμένα της φλάσκας.

### **2.2.3 Μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α**

Η επαγωγή των HIF-1α και HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1 έγινε με επώαση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες (1% O<sub>2</sub>), οι οποίες αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας (IN VIVO<sub>2</sub> 200, RUSKINN Life Sciences). Πρόκειται για αεροστεγή επωαστικό κλίβανο με υγρασία, βαλβίδες εισροής και εκροής, υποξικό μείγμα αερίων (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> και 94% N<sub>2</sub>) και θερμοκρασία 37°C.

Η μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1, έγινε με καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας για χρόνους που αναφέρονται στα αποτελέσματα.

### **2.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα**

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε διάλυμα λύσης (Tris-HCl pH 7,5, NaCl, Triton X-100, MgCl<sub>2</sub>, DTT, PMSF). Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 14000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και ακολούθησε θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά.

### 2.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H<sub>2</sub>O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετريέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

### 2.2.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8% πηκτής διαχωρισμού (separating gel): 8% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H<sub>2</sub>O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS,

0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H<sub>2</sub>O. Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 min, με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

### 2.2.7 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτή αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική θήκη τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά, με τη νιτροκυτταρίνη να είναι προς τον θετικό πόλο. Η μεταφορά έγινε στα 400 mA για 1 ώρα και 15 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 3% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Ακολουθώς έγινε επώαση με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραίωση

1:3000, με 3% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (3x 5 min).

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO) και 30 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρεται σε συσκευή εμφάνισης (Unitec Cambridge) όπου με το κατάλληλο φίλτρο ανιχνεύεται το εκπεμπόμενο, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης χημειοφωταύγειας, φως και τα αποτελέσματα ποσοτικοποιούνται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

### 2.2.8 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α

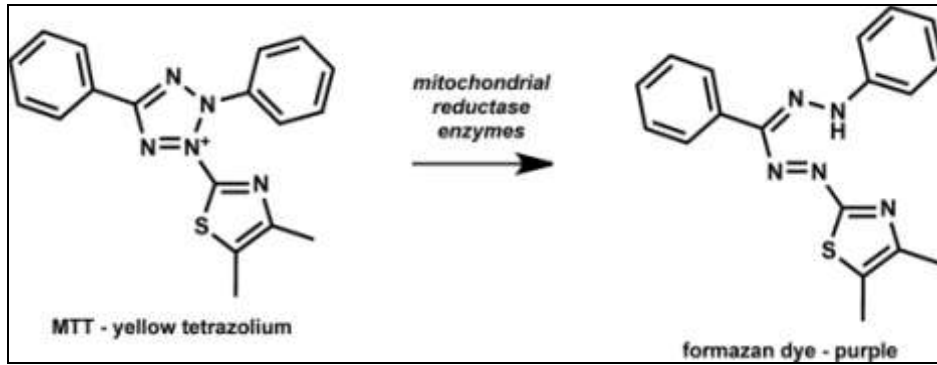
Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg<sup>2+</sup>. Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF-5HRE-Luc ή το pGL3-Luc και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί κατιονικό πολυμερές. Τα κύτταρα λύθηκαν με 100-150 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay system kit της Promega) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολούθησε στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 10μl από το υπερκείμενο των



κυττάρων αναμίχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 20 μl από το διάλυμα stop & glow (του luciferase assay reagent, Promega) προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παρήχθη μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glow σταματάει την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και ταυτόχρονα επάγει τη δράση της Renilla λουσιφεράσης.

### **2.2.9 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT.**

Πρόκειται για μια *in vitro* μέθοδο μέτρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας, στην περίπτωση που μεταβολικά γεγονότα οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση. 2500 κύτταρα HMEC-1/πηγάδι εμβολιάστηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών, σε τρεις επαναλήψεις και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνεια της πλάκας. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 0, 4 και 48 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) ή υποξίας (1% O<sub>2</sub>). 10μl της ένωσης τετραζολίου MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) προστέθηκαν στα πηγάδια και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στη νορμοξία ή στην υποξία. Το MTT ανάγεται από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα σε αδιάλυτους κρυστάλλους χρώματος ιώδους της χρωστικής φορμαζάνης (Εικόνα 3). Μετά την πάροδο του χρόνου επώασης με το αντιδραστήριο MTT προστέθηκε στα πηγάδια 100μl διαλύματος ισοπροπανόλης-HCl (0,4% HCl σε ισοπροπανόλη), το οποίο διαλυτοποιεί τους κρυστάλλους ώστε να μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση της χρωστικής χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο, και τα κύτταρα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση για να γίνει καλή διαλυτοποίηση των κρυστάλλων. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε απευθείας στα πηγάδια. Το βέλτιστο μήκος κύματος για την απορρόφηση είναι 570nm, αλλά οποιοδήποτε φίλτρο που απορροφά μεταξύ 550-600nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Ο βαθμός της αναγωγής του τετραζολίου είναι ανάλογος με το βαθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα δεδομένα που προέκυψαν εκφράστηκαν ως ποσοστό της απορρόφησης που μετρήθηκε σε κύτταρα κοντρόλ.



Εικόνα 13: Η αναγωγή του MTT σε έγχρωμους κρυστάλλους της χρωστικής φορμαζάνης.

### 2.2.10 Στατιστική ανάλυση

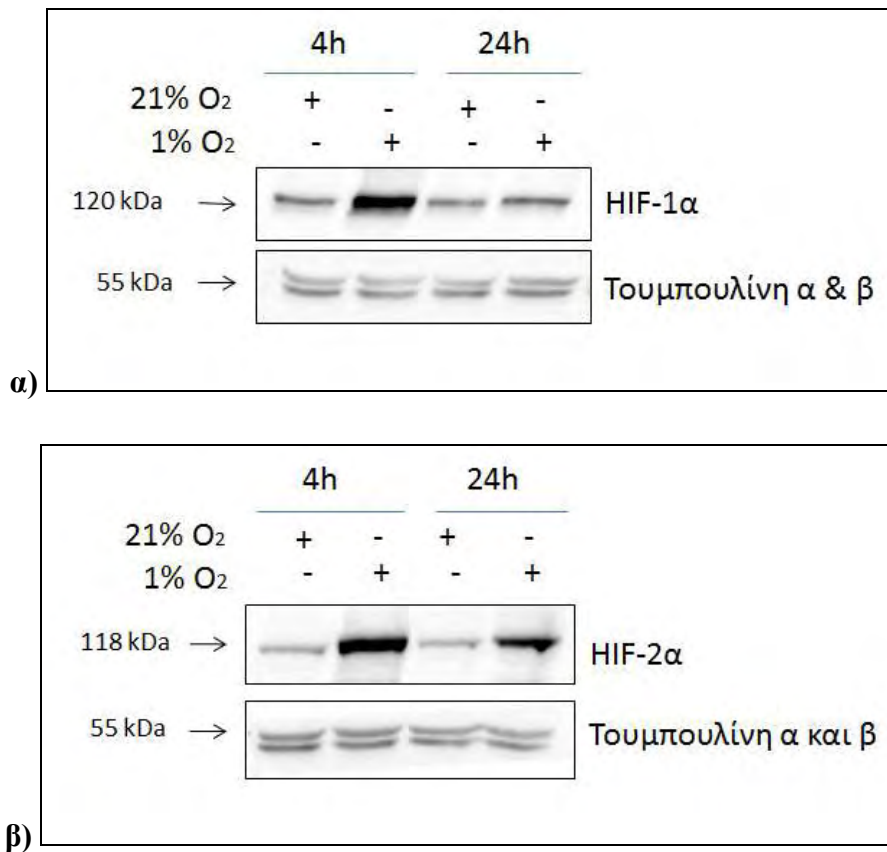
Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SD).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-2α και συγκριτική έκφραση με του HIF-1α

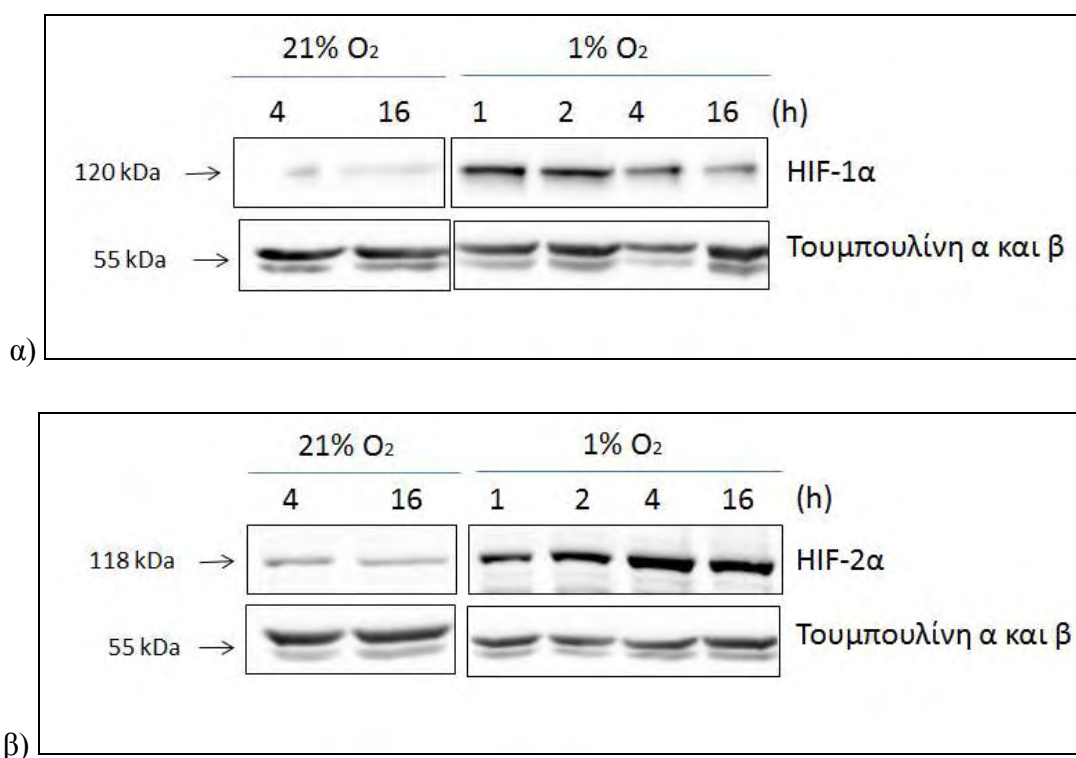
Διερευνήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α, στην κυτταρική σειρά HMEC-1, σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) με ανοσοαποτύπωση (Western Blot). Προκειμένου να μελετηθεί πως επηρεάζεται η έκφραση του HIF-2α από την υποξία σε σχέση με το χρόνο, πραγματοποιήθηκε κινητική έκφρασης του HIF-2α για 1, 2, 4, 16, 24, 30 και 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στη νορμοξία ή στην υποξία. Επίσης, με σκοπό τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης του HIF-2α σε σχέση με την έκφραση του HIF-1α, ελέγχθηκε και η κινητική έκφρασης του HIF-1α στα κύτταρα HMEC-1 για τα ίδια χρονικά διαστήματα καλλιέργειας στη νορμοξία και στην υποξία.

Αρχικά, προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν για 4 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα HMEC-1 εκφράζουν τους HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Η υποξία φαίνεται να επάγει την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α στα κύτταρα HMEC-1. Πιο αναλυτικά, η έκφραση του HIF-2α επάγεται έντονα μετά από 4 και 24 ώρες έκθεσης στην υποξία (Εικόνα 1β). Η έκφραση του HIF-1α επίσης επάγεται έντονα μετά από 4 ώρες έκθεσης στην υποξία, όμως τα επίπεδα έκφρασής του έπειτα από 24 ώρες επώασης στην υποξία μειώνονται σε επίπεδα συγκρίσιμα με τη νορμοξία (Εικόνα 1α). Συνεπώς, οι HIF-1α και HIF-2α εκφράζονται στα κύτταρα HMEC-1 σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε συνθήκες υποξίας και η υποξία επάγει την έκφρασή τους στα κύτταρα αυτά. Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α είναι σταθερή έπειτα από 4 έως και 24 ώρες έκθεσης στην υποξία, σε αντίθεση με τον HIF-1α του οποίου η έκφραση έπειτα από 24 ώρες έκθεσης στην υποξία δεν φαίνεται να εξακολουθεί να επάγεται.



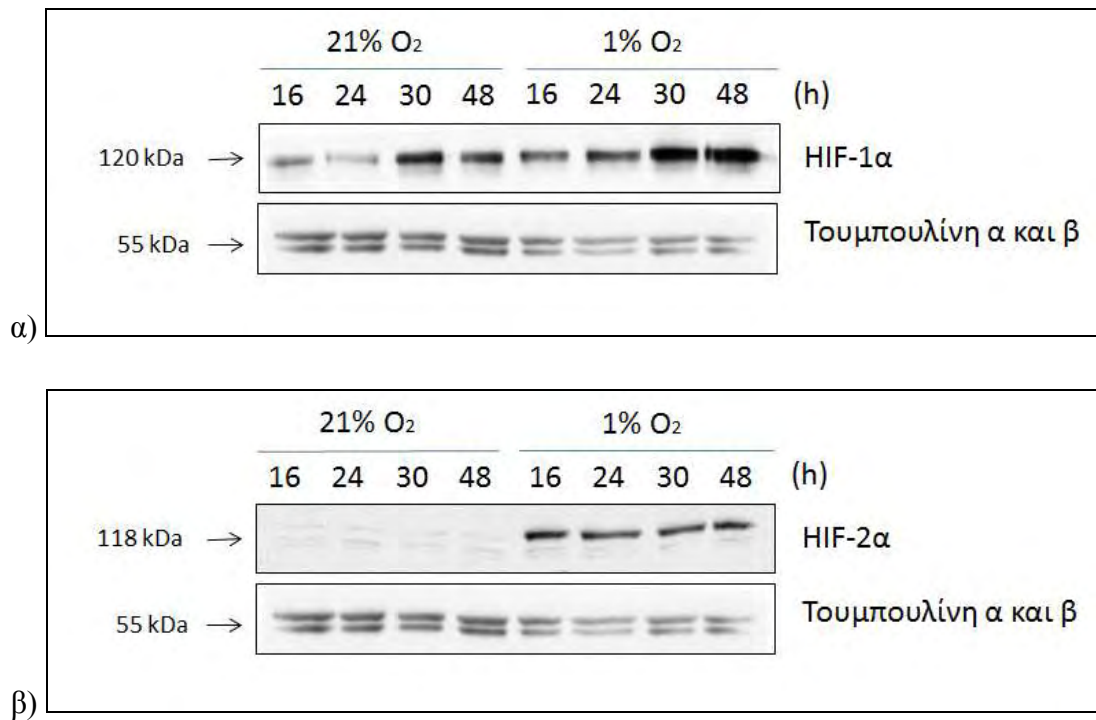
**Εικόνα 14:** Η έκφραση των (α) HIF-1α και (β) HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του HIF-1α, του HIF-2α και της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HMEC-1 που καλλιιεργήθηκαν για 4 και 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) ή σε συνθήκες υποξίας.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η κινητική έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α στις 1, 2, 4 και 16 ώρες έκθεσης σε συνθήκες υποξίας, προκειμένου να παρατηρηθεί πως εκφράζονται οι HIF-1α και HIF-2α κατά τις πρώτες ώρες έκθεσης στην υποξία. Φάνηκε ότι η έκφραση τόσο του HIF-1α όσο και του HIF-2α επάγεται έντονα από την υποξία μετά από 1 ώρα καλλιέργειας. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου τα επίπεδα έκφρασης του HIF-2α είναι οριακά διακριτά. Σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του HIF-2α επάγεται έντονα στις 1, 2, 4 και 16 ώρες (Εικόνα 2β). Όσον αφορά τον HIF-1α παρατηρήθηκε έντονη επαγωγή της έκφρασης του μετά από 1, 2, και 4 ώρες έκθεσης στην υποξία, ωστόσο στις 16 ώρες η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α, φαίνεται μειωμένη (Εικόνα 2α). Συνεπώς, η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α επάγεται γρήγορα από την υποξία και επιπλέον η επαγωγή της έκφρασης κατά τις πρώτες ώρες έκθεσης στην υποξία, στον HIF-2α φαίνεται να είναι σταθερή ενώ στον HIF-1α φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις.



**Εικόνα 15:** Η κινητική της έκφρασης των (α) HIF-1α και (β) HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1 για τις πρώτες ώρες έκθεσης στην υποξία. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του HIF-1α, του HIF-2α και της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HMEC-1 που καλλιεργήθηκαν για 1, 2, 4 και 16 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) ή σε συνθήκες υποξίας.

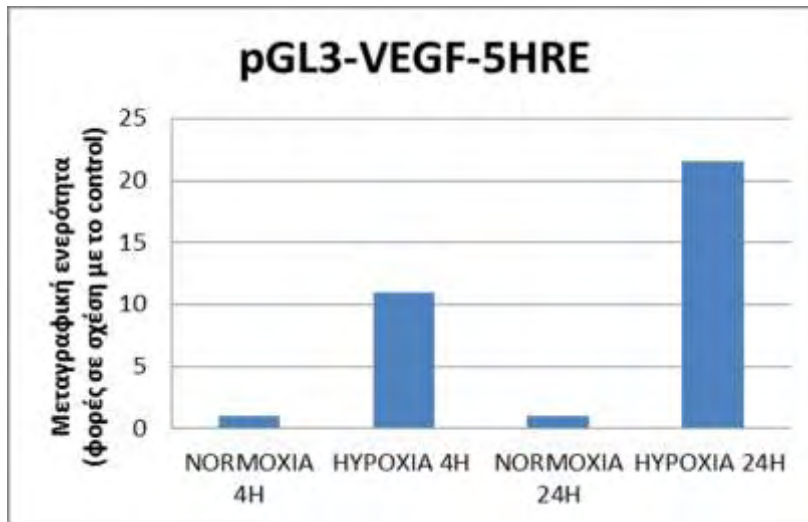
Τέλος, μελετήθηκε η κινητική των HIF-1α και HIF-2α στις 16, 24, 30 και 48 ώρες έκθεσης σε συνθήκες υποξίας, προκειμένου να παρατηρηθεί πως εκφράζονται οι HIF-1α και HIF-2α σε μεγαλύτερης διάρκειας έκθεση στην υποξία. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του HIF-2α είναι οριακά διακριτά στη νορμοξία, ενώ η έκφρασή του επάγεται μετά από 16, 24, 30 και 48 ώρες στην υποξία (Εικόνα 3β). Όσον αφορά την έκφραση του HIF-1α φαίνεται να επάγεται μετά από 30 και 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του HIF-1α επάγεται στους εξεταζόμενους χρόνους, ωστόσο η επαγωγή της έκφρασής του είναι μειωμένη στις 16 και 24 ώρες και έντονη στις 30 και 48 ώρες (Εικόνα 3α). Συνεπώς, στη νορμοξία ο HIF-2α δεν επάγεται ενώ ο HIF-1α επάγεται μετά από 30 και 48 ώρες καλλιέργειας. Στην υποξία η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α είναι σταθερή ενώ του HIF-1α παρουσιάζει διακυμάνσεις.



**Εικόνα 16:** Η κινητική της έκφρασης των (α) HIF-1α και (β) HIF-2α στην κυτταρική σειρά HMEC-1 για 16, 24, 30 και 48 ώρες έκθεσης στην υποξία. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του HIF-1α, του HIF-2α και της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HMEC-1 που καλλιιεργήθηκαν για 16, 24, 30 και 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) ή σε συνθήκες υποξίας.

### 3.2 Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των εκφραζόμενων HIFs σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε κατά πόσο οι εκφραζόμενοι HIFs είναι μεταγραφικά ενεργοί. Η μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας έγινε με τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεταγραφής γονιδίων στόχων των HIFs με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HMEC-1 τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακές κατασκευές που περιείχαν το pGL3-VEGF-5HRE. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε συνθήκες υποξίας για 4 και 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε η μελέτη της ολικής μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs.



URL

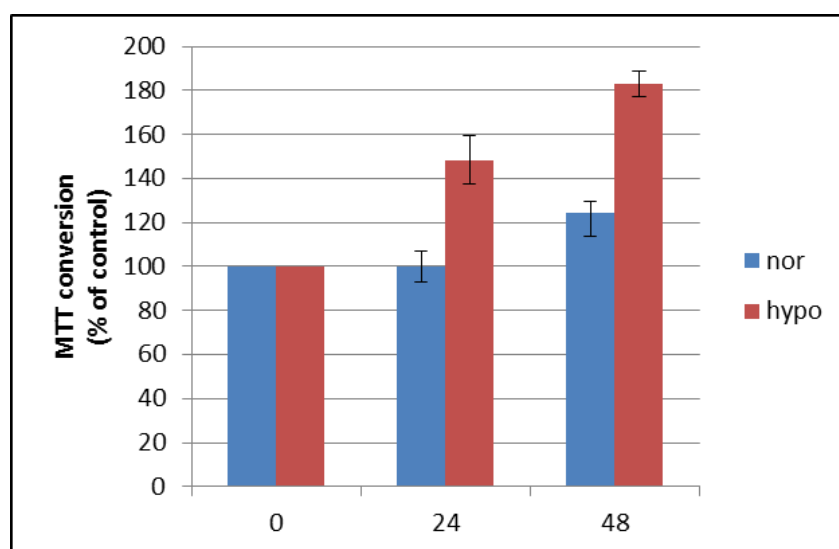
NORMOXIA 4h	0,36
HYPOXIA 4h	3,92
NORMOXIA 24h	0,37
HYPOXIA 24h	7,68

**Εικόνα 17:** Προσδιορισμός της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs και πίνακας με τις πραγματικές τιμές. Η μεταγραφική ενεργότητα προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HMEC-1 που καλλιεργήθηκαν για 4 και 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) ή σε συνθήκες υποξίας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, αυξάνεται η επαγωγή της μεταγραφής από τους HIFs στις 4 και 24 ώρες έκθεσης στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία. Παρατηρήθηκε ότι η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs δεν μεταβάλλεται στις 4 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας. Η υποξία φαίνεται να επάγει την μεταγραφική ενεργότητα των HIFs. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs κατά 10,98 φορές μετά από 4 ώρες και κατά 21,53 φορές μετά από 24 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs στις 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας, φαίνεται να είναι αυξημένη κατά 10 φορές (21,53%) σε σχέση με τη μεταγραφική τους ενεργότητα στις 4 ώρες έκθεσης στην υποξία (10,98%). Συνεπώς οι εκφραζόμενοι HIF είναι μεταγραφικά ενεργοί στα κύτταρα HMEC-1 σε συνθήκες υποξίας και μάλιστα η μεταγραφική τους ενεργότητα αυξάνεται με χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε συνθήκες υποξίας.

### 3.3 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1.

Τέλος, διερευνήθηκε ο τρόπος με τον οποίο η υποξία, επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1, με τη μέθοδο του MTT. Σε πλάκα 96 πηγαδιών καλλιεργήθηκαν τρεις επαναλήψεις από 2.500 κύτταρα HMEC-1 ανά πηγάδι, επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας για 0, 24 και 48 ώρες και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με τη μέθοδο MTT. Παρατηρήσαμε ότι μετά από 24 ώρες καλλιέργειας, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου τα κύτταρα δεν έχουν αρχίσει ακόμα να πολλαπλασιάζονται ενώ σε συνθήκες υποξίας ο αριθμός των κυττάρων έχει αυξηθεί κατά 48,3%. Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, στη νορμοξία ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε κατά 24,58% ενώ στην υποξία ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε κατά 83,05%. Συνεπώς, η υποξία επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1 στις 24 και 48 ώρες καλλιέργειας (Εικόνα 5).



Εικόνα 18: Κινητική του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HMEC-1 στη νορμοξία (μπλε) και την υποξία (κόκκινο), με τη μέθοδο MTT.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αγγειακό ενδοθήλιο αποτελεί έναν από τους ιστούς στους οποίους περιγράφεται από τη βιβλιογραφία ότι εκφράζεται και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ο HIF-2α. Γι' αυτό το λόγο επιλέξαμε την κυτταρική σειρά HMEC-1 για τη μελέτη της έκφρασής του. Σκοπός μας ήταν να μελετήσουμε την έκφραση του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στο αγγειακό ενδοθήλιο και να συγκρίνουμε την έκφραση του HIF-2α με αυτή του HIF-1α στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Επίσης θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της υποξίας στη συμπεριφορά και λειτουργία των κυττάρων αυτών.

Παρατηρήσαμε ότι, τα επίπεδα έκφρασης του HIF-2α είναι οριακά διακριτά σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ενώ σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του HIF-2α επάγεται από τις πρώτες ώρες καλλιέργειας και δεν μεταβάλλεται στο χρόνο αλλά παραμένει σταθερά επαγμένη μέχρι τις 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στην υποξία. Η μελέτη κινητικής της έκφρασης του HIF-2α, πραγματοποιείται για πρώτη φορά στην κυτταρική σειρά HMEC-1. Παρόμοια αποτελέσματα για την κινητική της έκφρασης του HIF-2α έχουν αναφερθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Poitz et al., 2014).

Όσον αφορά τον HIF-1α παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του επάγεται σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου μετά από 30 και 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων. Η έκφρασή του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας επάγεται από τις πρώτες ώρες καλλιέργειας και παρουσιάζει διακυμάνσεις, με έντονη έκφραση στις 2, 4, 30 και 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα για την κινητική της έκφρασης του HIF-1α έχουν αναφερθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Poitz et al., 2014). Οι Minet et al., (Minet et al., 2000) μελέτησαν την κινητική του HIF-1α για μισή, 1 και 2 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων HMEC-1 σε νορμοξία και υποξία και οι Chen et al. (Chen et al., 2012) μελέτησαν την κινητική του HIF-1α για μισή, 2, 4 και 8 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων HMEC-1 σε νορμοξία και υποξία και τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα δικά μας.

Ενώ η έκφραση του HIF-1α έχει μελετηθεί στην οξεία υποξία, η μελέτη κινητικής της έκφρασης του HIF-1α, για παρατεταμένο χρόνο καλλιέργειας στην

νορμοξία και υποξία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από μας και παρατηρούμε ότι μόνο ο HIF-1α φαίνεται να επάγεται στη νορμοξία έπειτα από 30 και 48 ώρες καλλιέργειας. Επίσης παρατηρήθηκε μια διφασική επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α στην υποξία ενώ ο HIF-2α που είναι οριακά διακριτός σε όλους τους χρόνους της νορμοξίας, επάγεται έντονα στην υποξία και η επαγωγή του είναι σταθερή σε όλους τους εξεταζόμενους χρόνους στην υποξία.

Στη συνέχεια ελέγξαμε αν οι εκφραζόμενοι HIFs είναι μεταγραφικά ενεργοί στα κύτταρα HMEC-1. Ελέγξαμε τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs στις 4 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και παρατηρήσαμε ότι δεν μεταβάλλεται. Παράλληλα, παρατηρήσαμε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF μόνο σε συνθήκες υποξίας και η επαγωγή αυτή αυξάνεται με τρόπο χρονοεξαρτώμενο. Ωστόσο, θα είχε ενδιαφέρον, να γίνουν στο μέλλον πειράματα αποσιώπησης των HIF-1α και HIF-2α και έλεγχος ειδικά της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2. Πιο συγκεκριμένα, θα είχε ενδιαφέρον να γίνουν πειράματα προσδιορισμού της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2 με ειδικά γονίδια αναφοράς για τον καθένα, στις 30 και 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων σε συνθήκες νορμοξίας, όπου παρατηρήσαμε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-1α στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

Είναι καλά γνωστό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIFs μπορούν να επηρεάσουν μεταξύ άλλων και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Γι' αυτό και ελέγξαμε την επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1. Παρατηρήσαμε ότι ο πληθυσμός των κυττάρων στις 24 ώρες καλλιέργειας, στη νορμοξία ήταν αμετάβλητος ενώ στην υποξία αυξήθηκε κατά 48,3%. Ο πληθυσμός των κυττάρων στις 48 ώρες καλλιέργειας, στη νορμοξία αυξήθηκε κατά 24,58% ενώ στην υποξία αυξήθηκε κατά 83,05%. Συνεπώς, η υποξία επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αποτελέσματα από διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Έχει δειχθεί στην καρκινική κυτταρική σειρά Huh7 ότι η υποξία επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις 24 και 48 ώρες (Kalousi et al., 2010; Mylonis et al., 2010).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων που μελετήσαμε, γίνεται φανερό ότι η υποξία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HMEC-1 και υποδεικνύει ότι η υποξία έχει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του ενδοθηλίου. Επιπλέον, σ' αυτή τη διαδικασία επάγεται η

έκφραση και η μεταγραφική ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων HIF -οι οποίοι είναι γνωστό ότι επάγουν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην φυσιολογική ανάπτυξη των αγγείων μέσω του ενδοθηλίου. Αναμένεται σε επόμενα πειράματα να αναδειχθεί ο ρόλος του HIF-2 στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και κυρίως στον πολλαπλασιασμό τους καθώς και να συγκριθεί με εκείνον του HIF-1α.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adelman, D. M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M. C., and Maltepe, E. (2000). Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 14, 3191–3203.
- Adelman, D. M., Maltepe, E., and Simon, M. C. (1999). Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev.* 13, 2478–2483.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ., HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line., *J Invest Dermatol.* 1992 Dec;99(6):683-90.
- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function and mechanisms. *Circ Res* 100: pp. 158–73, 2007a.
- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Structure, function and mechanisms. *Circ Res* 100: pp. 174–90, 2007b.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadow JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004 Sep 10;279(37):38458-65.
- Arany, Z.; Huang, L. E.; Eckner, R.; Bhattacharya, S.; Jiang, C.; Goldberg, M. A.; Bunn, H. F.; Livingston, D. M. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:12969–12973; 1996.
- Baba M, Hirai S, Yamada-Okabe H, Hamada K, Tabuchi H, Kobayashi K et al. Loss of von Hippel–Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through hypoxia-inducible factor. *Oncogene* 2003; 22: 2728–2738.
- Befani C1, Mylonis I, Gkoutinakou IM, Georgoulas P, Hu CJ, Simos G, Liakos P. Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Nov;45(11):2359-68.
- Bertout JA, et al. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:14391–6.
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. (2008) The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Dec;8(12):967-75.
- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L., Peet, D.J., 2006. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J. Biol. Chem.* 281, 22575–22585.

Brahimi-Horn C1, Mazure N, Pouyssegur J., Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications., *Cell Signal*. 2005 Jan;17(1):1-9.

Bruick RK, McKnight SL. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*.; 294: 1337–40.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breir, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhard, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Riscu, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.

Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobaltinduces HIF-1 expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygenspecies- and PI3K-dependent mechanism. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2004;31:544–51.

Chen L, Qiu J, Zhang L, Luo X, Adrenomedullin promotes human endothelial cell proliferation via HIF-1a, *Mol Cell Biochem* (2012) 365:263–273.

Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett*. 2007 Apr 17;581(8):1542-8. Epub 2007 Mar 15.

Choi K., et al., The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:91-101

Clapp C, Thebault S, Jeziorski M.C., Martínez De La Escalera G, Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis *Physiological Reviews* Published 1 October 2009 Vol. 89 no. 4, 1177-1215

Cockman ME, Webb JD, Ratcliffe PJ. FIH-dependent asparaginyl hydroxylation of ankyrin repeat domain-containing proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1177:9–18.

Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Velderhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., and Carmeliet, P. (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* 8, 702–710.

Conway, E. M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* 49, 507–521.

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20: 557–570.

Covello, K.L., and Simon, M.C. (2004). HIFs, hypoxia, and vascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 62, 37–54.

Cowden KD, Simon MC. The bHLH/PAS factor MOP3 does not participate in hypoxia responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 1;290(4):1228-36.

Danet, G.H., Pan, Y., Luongo, J.L., Bonnet, D.A., and Simon, M.C. 2003. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* 112: 126–135.

Dioum EM, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science.* 2009; 324:1289–93.

Doedens AL, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res.* 2010; 70:7465–75.

Duan L, Zhang-Benoit Y, Fong GH. Endothelium-intrinsic requirement for Hif-2alpha during vascular development. *Circulation.* 2005;111:2227-2232.

Egleblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2: pp. 161–74, 2002.

Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 2003; 278:7520–7530.

Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleadle JM. Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281:15215–26.

Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4273–4278.

Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. 2005. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 4783–4788.

Faloon, P., Arentson, E., Kazarov, A., Deng, C. X., Porcher, C., Orkin, S., and Choi, K. (2000). Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 127, 1931–1941.

Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4–25.

Ferrara, N., and Gerber, H. P. (2001). The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 106, 148–156.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442.

Fischer C, Schneider M, Carmeliet P., Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis, *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):157-212.

Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997; 63: 51–60.

Fong, G. H., Klingensmith, J., Wood, C. R., Rossant, J., and Breitman, M. L. (1996). Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Dev. Dyn.* 207, 1–10.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70.

Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., and Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015–3025.

Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.

George CR et al., The cellular history of the glomerulus. *J Nephrol* 16: pp. 949–57, 2003

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007; 11:335–347.

Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, Groot AJ, Plasterk RH, Shvarts A et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene* 2007.

Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K., The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine., *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23508-14.

Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2301–2306.

Gu et al., Molecular characterization and chromosomal localization of a third class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3alpha (1998)

Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA et al. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 44966–44974.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.

Harvey, A.J., Kind, K.L., Pantaleon, M., Armstrong, D.T., and Thompson, J.G. 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71: 1108–1119.

Heinke J, Cam Patterson, Martin Moser, Life is a pattern: vascular assembly within the embryo, *Frontiers in Bioscience E4*, 2269-2288, January 1, 2012

Hickey M.M. and Simon M.C. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors *Cur Top Dev Biol*, 76

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 8581–8593.

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10: 413–423.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 9361–9374.



- Hu, C.J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., Simon, M.C., 2007. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol. Biol. Cell* 18, 4528–4542.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F., 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 32253–32259.
- Huttner IG, Gabbiani G Vascular endothelium in hypertension. In: J. Genest, O. Kuchel, P. Hamet, M. Cantin (eds) Hypertension, McGraw-Hill, New York, pp. 473–488, 1983.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149–162.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation.
- Jaffe EA Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 18: pp. 234–9, 1987.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685–693.
- Jeong JW1, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW., Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation., *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):709-20.
- Jokilehto T, Jaakkola PM. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:758–70.
- Jurgensen JS, Rosenberger C, Wiesener MS, Warnecke C, Horstrup JH, Grafe M et al. Persistent induction of HIF-1alpha and -2alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 2004; 18: 1415–1417.
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* 2008;30:393–402.
- Kalebic T, Garbisa S, Glaser B. Basement membrane collagen degradation by migrating endothelial cells. *Science.* 221: pp. 281–4, 1983.
- Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G., Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1., *J Cell Sci.* 2010 Sep 1;123(Pt 17):2976-86.

- Keith B, Johnson RS, Simon MC. (2012) HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. Dec 15;12(1):9-22.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488–493.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Feb;36(2):189-204.
- Kieran, M. W., Perkins, A. C., Orkin, S. H., and Zon, L. I. (1996). Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9126–9131.
- Kozak, K. R., Abbott, B., and Hankinson, O. (1997). ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev. Biol.* 191, 297–305.
- Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004 Nov 1;383(Pt. 3):429-37.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K., 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466–1471.
- Larsen, W. (2004). *Εμβρυολογία του Ανθρώπου*. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου.
- Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer* 2007; 96: 1284–1292.
- Lee FS, Percy MJ. The HIF pathway and erythrocytosis. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:165–92.
- Lehembre F, Müller S, Pandolfi PP, Dejean A. Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene*. 2001 Jan 4;20(1):1-9.
- Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A. P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* 273, 6417–6423.
- Lim JH, et al. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Mol Cell*. 2010; 38:864–78.

Lin, C. S., Lim, S. K., D'Agati, V., and Costantini, F. (1996). Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes. Dev.* 10, 154–164.

Loboda et al., HIF-1 versus HIF-2 - Is one more important than the other?, 2012, *Vascular Pharmacology*, 56 (5-6):p. 245–251

Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors—similar but not identical. *Mol. Cells* 29:435–442; 2010.

Majmundar A.J, Wong J.W., Simon M.C (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress, *Molecular Cell* 40, 294-309

Makino et al., Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible target gene expression (2001)

Maltepe, E., and Simon, M. C. (1998). Oxygen, genes, and development: An analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *J. Mol. Med.* 76, 391–401.

Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., and Simon, M. C. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386, 403–407.

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J., Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. , *J Cell Sci.* 2003 Apr 1;116(Pt 7):1319-26.

Michel Félétou, M. (2011). *The Endothelium Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators.*, Institut de Recherches Servier, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.

Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C., ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation., *FEBS Lett.* 2000 Feb 18;468(1):53-8.

Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., and Anderson, D.J. 2000. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20: 7370–7376.

Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G., Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha., *J Biol Chem.* 2006 Nov 3;281(44):33095-106.

Mylonis I1, Chachami G, Paraskeva E, Simos G., Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK., *J Biol Chem.* 2008 Oct 10;283(41):27620-7

Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hütter J, Schramm M, Flamme I., Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors., *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 16;296(2):343-9.

Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L., and Fong, G. H. (2000). The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8386–8391.

Poitz D.M., Augstein A., Hesse K., Christoph M., Ibrahim K, Braun-Dullaeus R.C., Strasser R.H., Schmeißer A, Regulation of the HIF-system in human macrophages – Differential regulation of HIF- subunits under sustained hypoxia, *Molecular Immunology* 57 (2014) 226– 235

Pouyssegur, J., Dayan, F & Mazure, N. M. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443 (2006)

Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*, 2000. 440(5): p. 653-66

Ramírez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells.* 2001;19(4):279-86.

Ramirez-Bergeron, D.L., Runge, A., Adelman, D.M., Gohil, M., and Simon, M.C. (2006). HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev. Cell* 11, 81–92.

Ramirez-Bergeron, D.L., Runge, A., Dahl, K.D., Fehling, H.J., Keller, G., and Simon, M.C. 2004. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development* 131: 4623–4634.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel–Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5675–5686.

Ribatti D et al., Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med* 2002;2:537-543

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.

Roberts AM, et al. Suppression of hypoxia-inducible factor 2alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009; 69:9056–64.

Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo. J.* 17, 3005–3015.

Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*<sup>-/-</sup> mice. *Nat Genet.* 2003;35:331-340.

Semenza GL. (2001) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.*; 107: 1–3.

Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for *Flk1* in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981–990.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *Flk-1* deficient mice. *Nature* 376, 62–66.

Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Sep 14;287(1):292-300.

Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z., and Keshet, E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: Implications for translation under hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3112–3119.

Studer, L., Csete, M., Lee, S.H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., and McKay, R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* 20: 7377–7383.

Suburo AM, D'Amore, PA Development of the endothelium In Moncada S, Higgs A (eds) *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium I.* pp. 71–106, 2006.

Sumpio, B., Riley, J. & Dardik, A. (Δεκέμβριος 2002). Cells in focus: endothelial cell.. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(12):1508-1512.

Sylvestre J-S, Levy B. Vasculogenèse et angiogenèse. In Pinet F. et al., (eds) *Biologie et Pathologie du Cœur et des Vaisseaux.* Paris, Medecine-Sciences, Flammarion, pp. 463–8, 2002.

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998; 12: 3320–3324.

Tian H, Mcknight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11: 72–82.

Tirziu D, Simons M. Endothelium as master regulator of organ development and growth. *Vascul Pharmacol* 50: pp. 1–7, 2009.

To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PASB distinguishes HIF-1 $\alpha$  from HIF-2 $\alpha$  in NBS1 repression. *Embo J*. 2006; 25:4784–94.

Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Chachami G, Paraskeva E, Molyvdas PA, et al. The flavonoid quercetin induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and inhibits cell proliferation by depleting intracellular iron. *Free Radical Research* 2007;41:342–56.

Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. Cobalt induces HIF-1 in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radical Research* 2006;40:847–56.

Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1 but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2008;44:657–70.

Urszula Florczyk, Szymon Czauderna, Anna Stachurska, Magdalena Tertel, Witold Nowak, Magdalena Kozakowska, Lorenz Poellinger, Alicja Jozkowicz, Agnieszka Loboda, Jozef Dulak, (2011) Opposite effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 51(10) 1882-1892

van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC., RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$ ., *Nucleic Acids Res*. 2010 Apr;38(6):1922-31. doi: 10.1093/nar/gkp1157. Epub 2009 Dec 21.

Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., and Alitalo, K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 60, 203–212.

Volker H. Haase, Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism, *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Published 1 July 2010 Vol. 299 no. 1

Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:5510–5514. [PubMed: 7539918]

Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for model of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610–5.

Wang, V., Davis, D.A., Haque, M., Huang, L.E., and Yarchoan, R. 2005. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia-inducible factor-2 in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65: 3299–3306.

Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004; 18: 1462–1464.

Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17: 271–273.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 1998; 92: 2260–2268.

Wu, H., Lee, S. H., Gao, J., Liu, X., and Iruela-Arispe, M. L. (1999). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126, 3597–3605.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59–67.

Zagórska A, Dulak J. (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(3):563-85.

Zhang H, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell.* 2007; 11:407–420.