

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μηχανισμοί της αντι-καρκινικής δράσης της βιταμίνης D: ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και HIF-2»

Κεχαγιά Ελένη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ανδρέας Τσακάλωφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, επιβλέπων
- Παναγιώτης Λιάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Μάρτιος 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

«Mechanisms of anti-cancer activity of vitamin D: regulation of transcription factors HIF-1 and HIF-2»

Kechagia Eleni

Advisory Thesis Committee:

- Andreas Tsakalof, Assistant Professor of Medical Chemistry, supervisor
- Panagiotis Liakos, Assistant Professor of Medical Biochemistry
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larisa, March 2018

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 6 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 9 |
| 1.1 Βιταμίνη D και παραγωγή της | 9 |
| 1.2 Μεταβολισμός της βιταμίνης D | 9 |
| 1.3 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D | 10 |
| 1.3.1 Γενωμικός μηχανισμός δράσης | 10 |
| 1.3.2 Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης | 11 |
| 1.4 Οι ρόλοι της βιταμίνης στην υγεία του ανθρώπου. | 12 |
| 1.4.1 Ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και φωσφόρου-Κλασικός ρόλος της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό | 12 |
| 1.5 Βιταμίνη D και καρκίνος | 14 |
| 1.6 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF .. | 16 |
| 1.6.1 Δομή | 16 |
| 1.6.2 Λειτουργία | 17 |
| 1.7 Ρύθμιση των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων | 18 |
| 1.7.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF | 18 |
| 1.8 Ο ρόλος των HIF στον καρκίνο | 20 |
| 1.9 Βιταμίνη D και HIF: Σημεία σύγκλισης | 22 |
| 1.10 Μελέτες επίδρασης της βιταμίνης D στους HIF σε καρκινικές σειρές κυττάρων | |
| 22 | |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ | 24 |
| 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ | 25 |
| 3.1 Υλικά | 25 |
| 3.1.1 Κυτταρικές σειρές | 25 |
| 3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς | 25 |
| 3.1.3 Εκκινητές | 26 |
| 3.1.4 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας | 26 |
| 3.1.5 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια | 27 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.6 | Αντισώματα | 27 |
| 3.1.7 | Απομόνωση RNA(kit) | 27 |
| 3.1.8 | Μέσα παροδικής επιμόλυνσης..... | 27 |
| 3.2 | ΜΕΘΟΔΟΙ | 27 |
| 3.2.1 | Κυτταροκαλλιέργειες..... | 27 |
| 3.2.2 | Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα | 28 |
| 3.2.3 | Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. | 28 |
| 3.2.4 | Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)..... | 29 |
| 3.2.5 | Ανοσοαποτύπωση κατά Western | 32 |
| 3.2.6 | Ανοσοανίχνευση..... | 34 |
| 3.2.7 | Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) | 35 |
| 3.2.8 | Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF1α και HIF2α | 38 |
| 3.2.9 | Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας | 41 |
| 3.2.10 | Στατιστική ανάλυση..... | 46 |
| 4. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 47 |
| 4.1 | Εκτίμηση της διαμεμβρανικής μεταφοράς της 25OHD με UHPLC | 47 |
| 4.2 | ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΡΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΣΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΣΤΟ ΣΗΜΑΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ HIFs..... | 49 |
| 4.2.1 | Επίδραση της 25OHD στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF1α και HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας..... | 49 |
| 4.2.2 | Επίδραση της 25OHD στην μεταγραφική ενεργότητα των HIFs..... | 52 |
| 4.2.3 | Σταθερότητα των HIF παρουσία 25OHD..... | 53 |
| 4.3 | ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 1,25(OH) ₂ D ΣΤΑ ΣΗΜΑΤΟΛΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ HIFs. | 55 |
| 4.3.1 | Η 1,25(OH) ₂ D προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF σε συνθήκες υποξίας | 55 |
| 4.3.2 | Επίδραση της 25OHD στην μεταγραφική ενεργότητα των HIFs..... | 57 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.3 | Ποσοτική Real time PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των mRNA της PGK1 και της EPO και του PAI-1 με την προσθήκη 1,25(OH) ₂ D | 59 |
| 5. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 62 |
| 6. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 65 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας, κυρίου Ανδρέα Τσακάλωφ.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και διαδραμάτισαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Δεν μπορώ να παραλείψω να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την εκτίμηση που οφείλω στο πρόσωπο του επιβλέποντά μου κυρίου Ανδρέα Τσακάλωφ για την εμπιστοσύνη του και την συνεχή καθοδήγηση και συμβουλές. Κυρίως τον ευχαριστώ, διότι μέσα από την πολυδιάστατη επιστημονική του σκέψη και τις εξόχως εποικοδομητικές συζητήσεις, εμπλούτισε τις γνώσεις μου στον τομέα της έρευνας και της επιστήμης. Τον ευχαριστώ ειλικρινά.

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Λιάκο για τη συνεχή στήριξή του και επίβλεψη καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Οι παρατηρήσεις και οι συμβουλές του ήταν καίριας σημασίας για την διεξαγωγή και την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Θ ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του Π.Μ.Σ. και μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, κύριο Αναστάσιο Γερμενή για την άρτια διεξαγωγή του προγράμματος και τον εμπλουτισμό του με διαλέξεις εξαιρετων επιστημόνων.

Επιπλέον οφείλω ευχαριστίες στον Καθηγητή Βιοχημείας κύριο Γεώργιο Σίμο και διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, που με δέχτηκε ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο εργαστήριο και συνέβαλε στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Εδώ, θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου σε όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Βιοχημείας, η συνεχής δράση των οποίων διατηρεί το εργαστήριο σε υψηλό λειτουργικό επίπεδο.

Θέλω να ευχηθώ από καρδιάς τα καλύτερα στους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καραγιώτα Αγγελική, Γκοτινάκου Ιωάννα, Ταζέ Χρύσα, Υφαντή Άγγελο, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα αλλά και όλους τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου. Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω προσωπικά την υποψήφια διδάκτορα Γκοτινάκου Ιωάννα για την καθημερινή της επίβλεψη, υπομονή και στήριξη. Η συμβολή της ήταν καθοριστική τόσο για τη διαμόρφωση της διπλωματικής αυτής εργασίας αλλά και για την ψυχολογική βοήθεια σε κάθε μου βήμα.

Τέλος δεν φτάνει ένα μόνο ευχαριστώ για τους δικούς μου ανθρώπους, τους φίλους και την οικογένεια μου που ήταν και είναι δίπλα μου σε κάθε προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D σε διάφορους τύπους καρκίνου. Το βιοχημικό υπόβαθρο των μηχανισμών των δράσεων αυτών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Οι επαγόμενοι από υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIFs) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διεργασίες του καρκίνου, όπως στην αγγειογένεση και στις διεργασίες της μεταστατικής οδού. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι HIF υπερεκφράζονται σε πολλούς τύπους όγκων. Για τους παραπάνω λόγους, η αναστολή των HIF θεωρείται ως εφικτή προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου και είναι αναγνωρισμένοι αντικαρκινικοί στόχοι.

Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποδεικνύει σημεία σύγκλισης μεταξύ της βιταμίνης D και των HIF, που φανερώνουν την ύπαρξη πιθανής αλληλεπίδρασης (cross-talking). Μέχρι σήμερα, υπήρχαν ελάχιστα και αντιφατικά δεδομένα για την αλληλεπίδραση αυτή. Συνεπώς, στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι να μελετηθεί η επίδραση των δυο βασικών μεταβολιτών της βιταμίνης D, της 25(OH)D και της 1,25(OH)₂D, στα μονοπάτια των HIF και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της πρωτεϊνικής τους έκφρασης, της μεταγραφικής τους ενεργότητας και της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της 25(OH)D στους HIF σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 δείχνουν στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας, χωρίς σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF.

Με την επίδραση της 1,25(OH)₂D, παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF σε 8 και 24 ώρες υποξίας, Η μεταγραφική ενεργότητα των HIF αναστέλλεται επίσης σημαντικά σε 8 ώρες και αυτό επιβεβαιώνεται και με την αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους. Σε 24 ώρες υποξίας ενώ υπάρχει μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF και της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους, η μεταγραφική ενεργότητα παρουσιάζει διαφορετική εικόνα.

Συνεπώς, αποδεικνύεται ότι η επίδραση και στους δύο HIFs στην υποξία μπορεί να συμπεριλαμβάνεται στην αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)₂D και για πρώτη φορά μελετήθηκε ο ρόλος της 25(OH)D στους HIFs και ότι έχει ξεχωριστή βιολογική δράση, ειδική για τον HIF2α.

Λέξεις κλειδιά: βιταμίνη D, HIF, αντικαρκινική δράση, 1,25(OH)₂D, 25(OH)D, υποξία

ABSTRACT

Numerous epidemiological studies demonstrate the anti-cancer activity of vitamin D in various types of cancer. The biochemical background of these actions has not been fully elucidated and is the subject of intensive research. Hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) play a crucial role in cancer processes, such as angiogenesis and metastatic pathway processes. In addition, it has been found that HIFs are overexpressed in many different tumor types. For this, inhibition of HIF is considered a feasible approach to the treatment of cancer and are recognized cancer targets.

Recent literature suggests points of convergence between vitamin D and HIF, which reveal the existence of cross-talking. So far, there have been little and contradictory data on this interaction. The aim of this thesis is to investigate the effect of the two major metabolites of vitamin D, 25(OH)D and 1,25(OH)₂D, on the pathways of HIFs and in particular in the regulation of their protein expression, transcriptional activity and expression of their target genes. The effects of 25(OH)D on HIF on hepatocarcinoma cells show a statistically significant increase in HIF2 α protein levels under normoxic conditions, with no significant change in HIF transcriptional activity.

With the effect of 1,25(OH)₂D, a dose-dependent decrease in HIFs protein levels is observed at 8 and 24 hours of hypoxia. HIFs transcriptional activity is also significantly inhibited in 8 hours, and this is confirmed by inhibition of expression of their target genes. At 24 hours of hypoxia while there is a reduction in protein levels of HIFs and expression of the target genes, the transcriptional activity is different.

Therefore, it is shown that the effect of both HIF on hypoxia is included in the anti-cancer activity of 1,25(OH)₂D and for the first time the role of 25(OH)D in HIFs has been studied and has a distinct biological activity specific for HIF2 α .

Keywords: vitamin D, HIF, anti-cancer activity, 1,25(OH)₂D, 25(OH)D, hypoxia

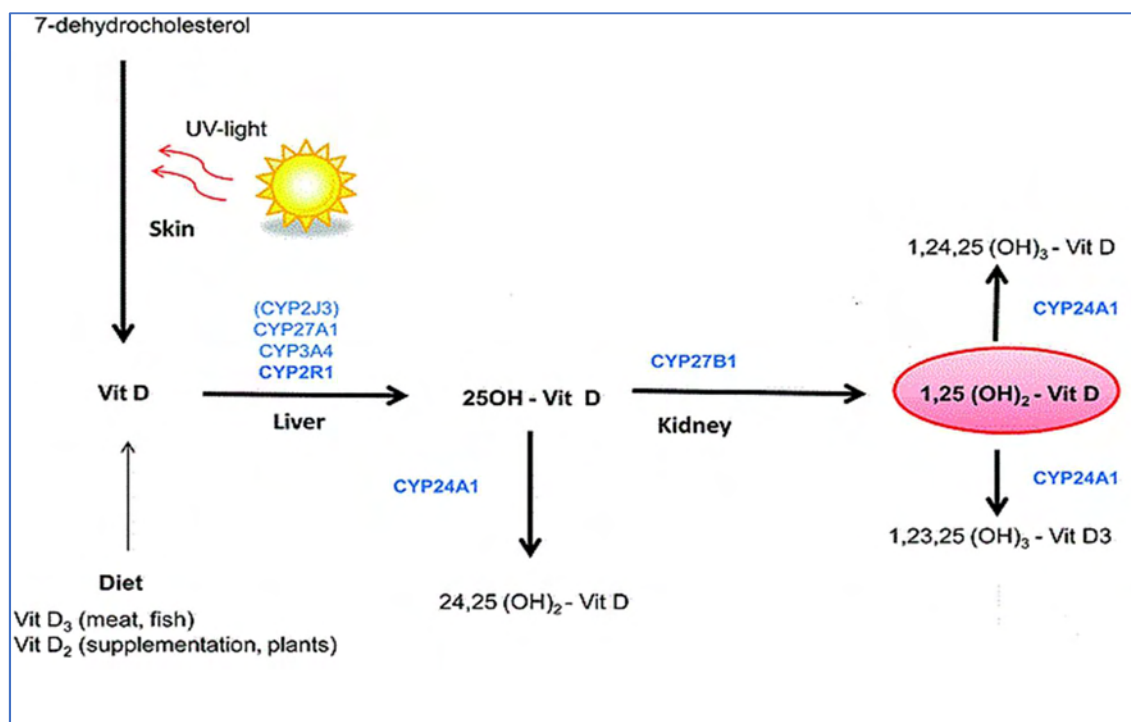
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιταμίνη D και παραγωγή της

Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, γνωστή για τη σχέση της με το ηλιακό φως, εφόσον, για τους περισσότερους ανθρώπους, η μέτρια έκθεση στο φως του ήλιου είναι συνήθως επαρκής για να παράγουν από μόνοι τους τη συγκεκριμένη βιταμίνη. Η σύνθεσή της εξαρτάται από δύο παράγοντες: την υπεριώδη ακτινοβολία και τη χοληστερόλη. Η D3 (χοληκαλσιφερόλη) παράγεται από την 7-δεϋδροχοληστερόλη (7-DHC) μέσω μιας διαδικασίας δύο σταδίων στην οποία ο δακτύλιος B θραύεται από ακτινοβολία υπεριώδους ακτινοβολίας (φάσμα 280-320 UVB) από τον ήλιο, σχηματίζοντας την προ-D3 που ισομεριώνεται σε D3 με μια θερμοευαίσθητη αλλά μη-κατιολυτική διαδικασία (Εικόνα 1.1). Η D3 απομακρύνεται κατά προτίμηση από το δέρμα, δεσμευμένη στην D Binding Protein (DBP) (1).

1.2 Μεταβολισμός της βιταμίνης D

Τα τρία βασικά στάδια του μεταβολισμού της βιταμίνης D, της 25-υδροξυλίωσης, της 1α-υδροξυλίωσης και της 24-υδροξυλίωσης εκτελούνται από οξειδάσες του κυτοχρώματος P450 μικτής λειτουργίας (CYPs)(Εικόνα 1.1). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (CYP2R1) ή στα μιτοχόνδρια (π.χ. CYP27B1 και CYP24A1). Το ήπαρ και άλλοι ιστοί μεταβολίζουν τη βιταμίνη D, που παράγεται ενδογενώς στο δέρμα ή λαμβάνεται από την τροφή, σε 25OHD, την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D. Πολλά ένζυμα έχουν δραστηριότητα 25-υδροξυλάσης, αλλά το CYP2R1 είναι το πιο σημαντικό. Η 25OHD στη συνέχεια μεταβολίζεται περαιτέρω σε 1,25(OH)₂D κυρίως στους νεφρούς, από το ένζυμο CYP27B1, αν και άλλοι ιστοί που περιλαμβάνουν διάφορα επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και παραθυρεοειδή αδένες έχει βρεθεί ότι εκφράζουν το ένζυμο αυτό με μειωμένη όμως δραστηριότητα. Η 1,25(OH)₂D είναι η κύρια μορφή της βιταμίνης D με ορμονική δράση και υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις βιολογικές της δράσεις. Η παραγωγή της 1,25(OH)₂D στους νεφρούς διεγείρεται από την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTH) και αναστέλλεται από αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου, φωσφόρου και από τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23). Η 1,25(OH)₂D μειώνει τα επίπεδα της ίδιας της 1,25(OH)₂D στα κύτταρα κυρίως με διέγερση του καταβολισμού της μέσω της επαγωγής του CYP24A1, της 24-υδροξυλάσης. Η 25OHD και η 1,25(OH)₂D υδροξυλιώνονται στη θέση 24 με αυτό το ένζυμο για να σχηματίσουν 24,25(OH)₂D και 1,24,25(OH)₃D, αντίστοιχα.(1)



Εικόνα 1.1 Διακρίνεται η παραγωγή της βιταμίνης D στο δέρμα και στη συνέχεια τα στάδια μεταβολισμού της για να παραχθεί η ενεργός μορφή 1,25(OH)₂D (2)

1.3 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D

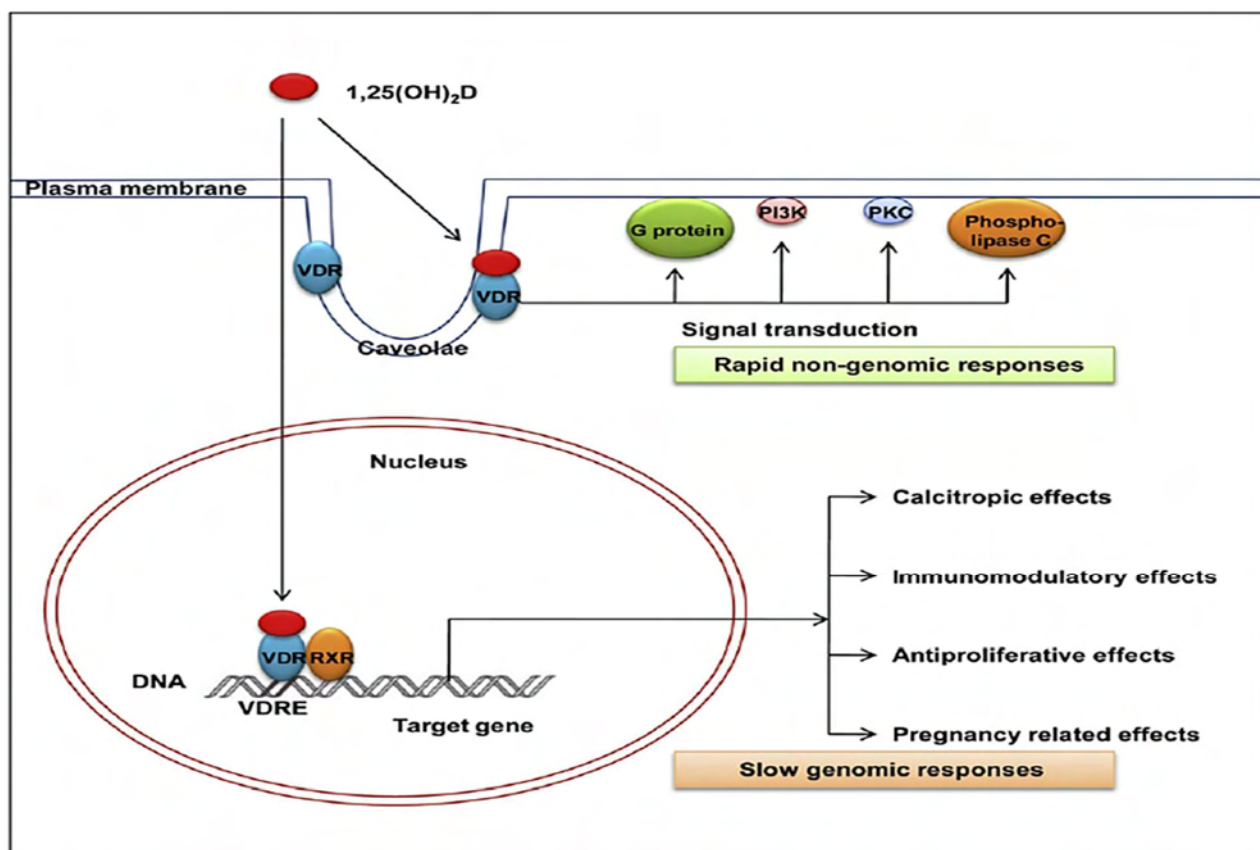
1.3.1 Γενωμικός μηχανισμός δράσης

Οι περισσότερες βιολογικές δράσεις της 1,25(OH)₂D διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR). Ο VDR ανήκει στην οικογένεια στεροειδών υποδοχέων που περιλαμβάνει υποδοχείς για το ρετινοϊκό οξύ, την θυρεοειδή ορμόνη, τις ορμόνες του φύλου και τα στεροειδή των επινεφριδίων. Η ορμονική μορφή της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D, είναι ο συνδέτης για τον (VDR). Ο VDR, που δρα κυρίως ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων των οποίων οι προαγωγείς περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs).

Η 1,25(OH)₂D που δεσμεύεται με τον VDR προκαλεί διμερισμό του με τον υποδοχέα ρετινοειδούς X (RXR) και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Το σύμπλεγμα VDR-RXR συνδέεται με στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs) σε πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές που βρίσκονται σε υποκινητές γονιδίων-στόχων ή σε απομακρυσμένες θέσεις (Εικόνα 1.2). Μετά τη σύνδεση του ετεροδιμερούς VDR-RXR στα VDREs, οι μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση διαμεσολαβούνται μέσω της ικανότητας του προσδεδεμένου υποδοχέα να στρατολογήσει μεταγραφικούς συνενεργοποιητές (1).

1.3.2 Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης

Οι μη γενωμικές δράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ είναι ταχείες και δεν εξαρτώνται από τη μεταγραφή. Ωστόσο, η μη γενωμική σηματοδότηση μπορεί να επηρεάσει έμμεσα τη μεταγραφή μέσω διασταυρούμενης σηματοδότησης. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δράση αυτή ξεκινά από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιλαμβάνει έναν μεμβρανικό υποδοχέα, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί λιγότερο καλά από τον πυρηνικό VDR. Οι μη γενωμικοί μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων, όπως PI3K (κινάση της φωσφατιδυλοinosιτόλης 3), MAP κινάσες (πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα), CaMKII (πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη) και PLC (φωσφολιπάση C). Το εύρος ενεργοποίησης των μορίων σηματοδότησης σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο και την κατάσταση της ωρίμανσης των κυττάρων. Στους στόχους αυτών των κινασών περιλαμβάνονται παράγοντες μεταγραφής, π.χ. SP1 (πρωτεΐνη ειδικότητας 1), SP3 και RXR που δεσμεύονται με στοιχεία απόκρισης στους προαγωγούς γονιδίων που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (3).



Εικόνα 1.2 Ο γενωμικός μηχανισμός δράσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μέσω πρόσδεσής της στον πυρηνικό υποδοχέα και ο μη-γενωμικός μέσω σύνδεσής της σε μεμβρανικό υποδοχέα (4)

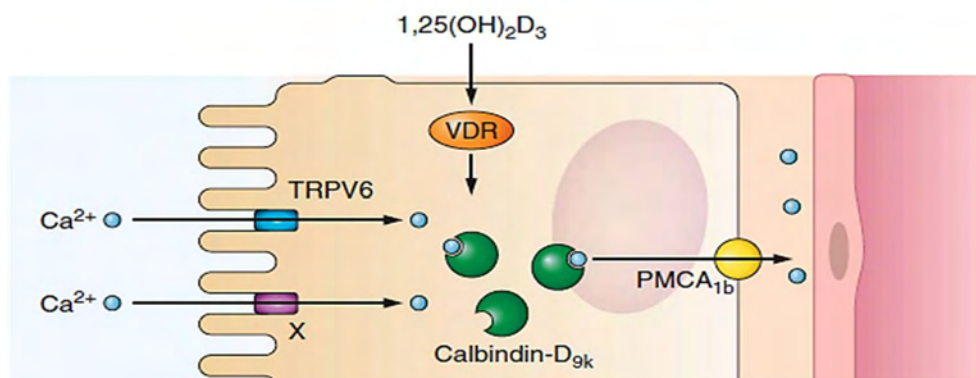
Το πιο γνωστό μη γενωμικό αποτέλεσμα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ είναι η ταχεία εντερική απορρόφηση του Ca^{2+} . Η σύνδεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ στο μεμβρανικό υποδοχέα μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση πολυάριθμων διαύλων σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση αυτών των καταρρακτών σηματοδότησης, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), μπορεί να οδηγήσει στο γρήγορο άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} και στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , το οποίο μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση του καταρράκτη κινασών Raf-MEK-ERK (4).

1.4 Οι ρόλοι της βιταμίνης στην υγεία του ανθρώπου.

Η ανακάλυψη της βιταμίνης D συνδέεται πρωτίτως με την υγεία των οστών και τον μεταβολισμό του ασβεστίου. Οι μηχανισμοί αυτής της δράσης είναι περισσότερο μελετημένοι και η δράση αυτή σήμερα συχνά αναφέρεται ως κλασική. Αργότερα ανακαλύφθηκαν και άλλες δράσεις και ρόλοι της βιταμίνης D και σήμερα το ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με αυτή επικεντρώνεται στην μελέτη του ρόλου της στην λειτουργία του ανοσοποιητικού, νευρικού συστήματος και στην αντικαρκινική της δράση.

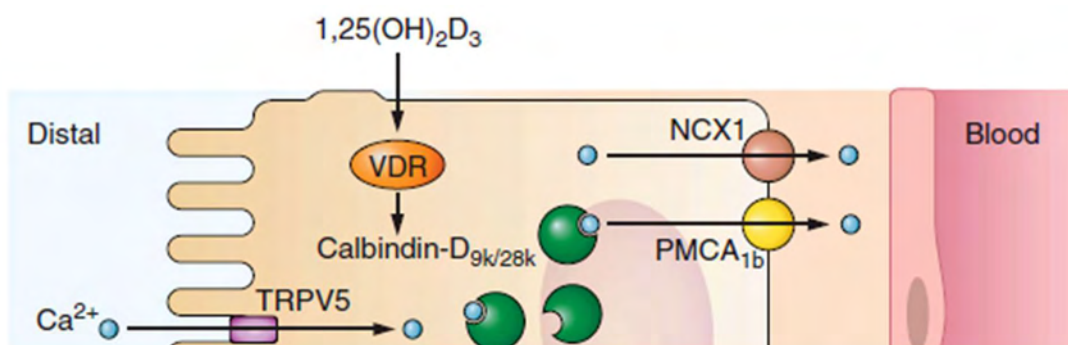
1.4.1 Ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και φωσφόρου-Κλασικός ρόλος της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό

Η κύρια δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ είναι η ρύθμιση της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου. Το διευκολυνόμενο μοντέλο διάχυσης είναι ο πλέον μελετημένος μηχανισμός απορρόφησης ασβεστίου που ρυθμίζεται από τη βιταμίνη D. Σε αυτό το μοντέλο, η διαμεμβρανική μεταφορά ασβεστίου είναι μια διαδικασία που αποτελείται από τρία στάδια που ρυθμίζονται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$: 1) είσοδος ασβεστίου μέσω του διαύλου ασβεστίου TRPV6 της βασικής μεμβράνης, 2) σύνδεση με την πρωτεΐνη πρόσδεσης ασβεστίου calbindin-D9k, και 3) εξώθηση ασβεστίου διαμέσου της βασοπλευρικής μεμβράνης με PMCA1b. Οι διάλυτοι TRPV6 και η πρωτεΐνη calbindin-D9k έχουν αξιολογηθεί ως κύριοι εντερικοί στόχοι της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (5).



Εικόνα 1.3 Μία σημαντική λειτουργία της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ είναι η διέγερση της ενδοκυτταρικής μεταφοράς ασβεστίου με αύξηση της έκφρασης του καναλιού ασβεστίου TRPV6 της βασικής μεμβράνης και της πρωτεΐνης πρόσδεσης ασβεστίου calbindin-D9k (5)

Στους νεφρούς, στα εγγύς σωληνάρια, η επαναρρόφιση ασβεστίου και φωσφόρου ρυθμίζεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ και την παραθορμόνη (PTH). Τα εγγύς σωληνάρια του νεφρού είναι η κύρια θέση σύνθεσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Περίπου το 80% του διηθημένου φωσφόρου επαναρροφάται από τα ούρα εντός του εγγύς σωληναρίου. Η μεταφορά φωσφόρου κατά μήκος του εγγύς επιθηλίου των σωληναρίων διαμεσολαβείται από τους μεταφορείς NPT2a και NPT2c (συν-μεταφορείς φωσφόρου-νατρίου). Αυτή η επαναρρόφιση του φωσφόρου στα εγγύς σωληνάρια ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες που συμπεριλαμβάνουν την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ και την PTH. Η PTH προάγει την απώλεια φωσφόρου από τους νεφρούς μειώνοντας την αφθονία του συν-μεταφορέα φωσφόρου-νατρίου (NPT2a/2c) στην βασική μεμβράνη, ενώ η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ αυξάνει την επαναρρόφιση του. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ αυξάνει επίσης την επαναρρόφιση του ασβεστίου στα εγγύς σωληνάρια του νεφρού, με την αύξηση της πρωτεΐνης δέσμευσης του ασβεστίου calbindin-D9k καθώς και του καναλιού ασβεστίου TRPV5 (εικόνα 1.4) (5).



Εικόνα 1.4 Η επαναρρόφιση ασβεστίου στα εγγύς σωληνάρια του νεφρού διεγείρεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, η οποία αυξάνει την έκφραση της calbindin-D9k και σε μικρότερο βαθμό του TRPV5. Η εξώθηση του ασβεστίου στη βασεοπλευρική πλευρά γίνεται μέσω του PMCA_{1b} και του NCX1 (5)

Το ασβέστιο βρίσκεται σε ποσοστό 99% στα οστά και συνεπώς αποτελεί μείζον συστατικό τους. Επομένως, η δομική ακεραιότητα των οστών στηρίζεται σε επαρκή παροχή ασβεστίου από τον ορό και ως εκ τούτου έμμεσα από την εντερική απορρόφιση και νεφρική επαναρρόφιση του ασβεστίου. Στον ενήλικα, τα οστά συνεχώς αναδιαμορφώνονται, και η οστική απορρόφιση από οστεοκλάστες είναι σε ισορροπία με το σχηματισμό των οστών από οστεοβλάστες για να διατηρηθεί η οστική μάζα. Πιο συγκεκριμένα, σε περίπτωση επαρκούς παροχής ασβεστίου, η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της μπορούν να βελτιώσουν την ισορροπία του ασβεστίου και να διευκολύνουν την εναπόθεση του στη μήτρα των οστών σε μεγάλο βαθμό χωρίς άμεσες επιδράσεις στα οστεοκύτταρα. Ωστόσο, στην περίπτωση ανεπάρκειας ασβεστίου, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ενισχύει την οστική απορρόφιση, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την οστική μεταλλοποίηση, έτσι ώστε να προάγει την ομοιοστασία του ασβεστίου του ορού σε βάρος της οστικής μάζας (6).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, γίνεται ολοένα και πιο σαφές ότι οι επιδράσεις της 1,25(OH)₂D δεν περιορίζονται στη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου. Είναι αποδεκτό ότι η 1,25(OH)₂D ρυθμίζει πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες με επιδράσεις στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση τόσο φυσιολογικών όσο και καρκινικών κυττάρων.

1.5 Βιταμίνη D και καρκίνος

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες συγκλίνουν στην αναγνώριση της αντικαρκινικής δράσης της βιταμίνης D (7), (8), (9). Επίσης οι δράσεις της στο επίπεδο κυττάρων αποκαλύπτουν τους βιοχημικούς μηχανισμούς της αντικαρκινικής της δράσης (10), (11), (12). Οι επιδράσεις της 1,25(OH)₂D έχουν δειχθεί ότι ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση.

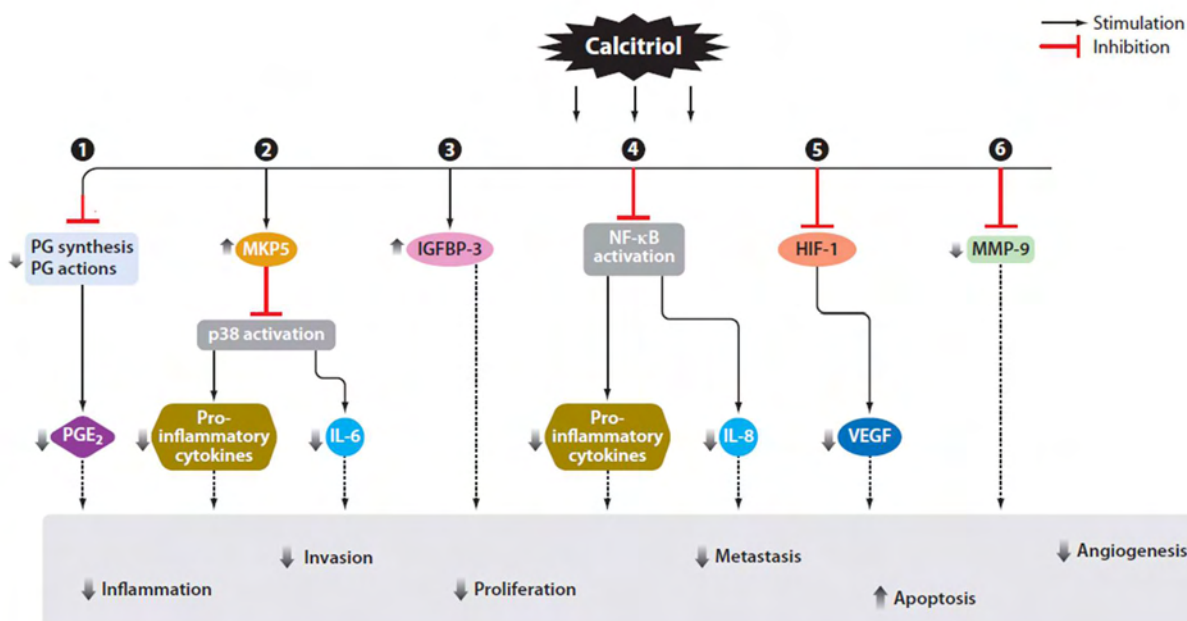
Η 1,25(OH)₂D αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών καρκινικών κυττάρων προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου και διέγερση της απόπτωσης (13), (14), (15), (16). Οι μοριακοί μεσολαβητές αυτών των ενεργειών της 1,25(OH)₂D είναι καλά χαρακτηρισμένοι. Η 1,25(OH)₂D αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων προστάτη μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 / G0 (17), (18) με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από τον p53 αυξάνοντας την έκφραση των αναστολέων κινάσης p21Waf/Cip1 και p27Kip1 (18), (19), (20), μειώνοντας τη δραστικότητα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2 (CDK2) και προκαλώντας την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η καλσιτριόλη επάγει επίσης την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα προστάτη και μαστού με διάσπαση των μιτοχονδρίων και ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού της απόπτωσης. Επιπλέον, αυτό γίνεται με καταστολή της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών γονιδίων όπως το Bcl2 και την αύξηση της έκφρασης του προ-αποπτωτικού γονιδίου Bax (21).

Η 1,25(OH)₂D έχει δειχθεί ότι επάγει τη διαφοροποίηση ενός αριθμού φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Η 1,25(OH)₂D διεγείρει μια ποικιλία από πρώιμα αιματοποιητικά μυελοειδή κύτταρα για να διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων μυελοειδών λευχαιμικών κυττάρων ποντικού M-1, κυττάρων ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60, ανθρώπινων μονοκυτταρικών κυττάρων U-937 και περιφερικών ανθρώπινων κυττάρων. Διεγείρει τις μυελοειδείς λευχαιμικές κυτταρικές σειρές ώστε να διαφοροποιούνται τελικά σε μονοκύτταρα / μακροφάγα (20). Στα κύτταρα HL-60, η επαγόμενη από την 1,25(OH)₂D απόκριση προκαλεί διέγερση της τερματικής διαφοροποίησης σε κύτταρα που έχουν χαρακτηριστικά μακροφάγων και η απόκριση φαίνεται ότι προκαλείται από την αναστολή της έκφρασης του c-myc ογκογονιδίου (22). Επίσης μειώνει την έκφραση του c-myc σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, συμπεριλαμβανομένων αυτών των κυττάρων που εξαρτώνται από την ανδρογενίνη (23).

Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η φλεγμονή συμβάλλει στην ανάπτυξη και πρόοδο πολλών καρκίνων (24),(25),(26). Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως οι κυτοκίνες, οι χημειοκίνες, οι προσταγλανδίνες (PGs) και τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) αυξάνουν την ογκογένεση μέσω της ενεργοποίησης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοματιών στον καρκινικό ιστό. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα προστάτη και μαστού αποκαλύπτουν ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις δράσεις ρυθμίζοντας μερικές από τις κύριες μοριακές οδούς που εμπλέκονται στη φλεγμονή, όπως η αναστολή της σύνθεσης και των δράσεων της προσταγλαδίνης (PG) (27), η αναστολή της σηματοδότησης της κινάσης που ενεργοποιείται από το στρες (28) και η επακόλουθη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και η αναστολή της σηματοδότησης του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) (29),(30),(31) και την παραγωγή προ-αγγειογόνων παραγόντων.

Η αγγειογένεση, η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από τα υπάρχοντα αγγεία, είναι ένα κρίσιμο βήμα στη συνεχή ανάπτυξη, εξέλιξη και μετάσταση των όγκων (32). Ο παράγοντας αύξησης του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) είναι ο πιο ισχυρός διεγέρτης της αγγειογένεσης. Οι PGs είναι επίσης σημαντικοί προ-αγγειογόνοι παράγοντες. Η έναρξη της αγγειογένεσης ελέγχεται από τοπική υποξία, η οποία επάγει τη σύνθεση προ-αγγειογόνων παραγόντων που ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης. Αυτή η σύνθεση οδηγεί στη δομική αναδιοργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που ευνοεί τον νέο τριχοειδή σχηματισμό (33). Η διέγερση της αγγειογένεσης σε απόκριση της υποξίας προκαλείται από τους επαγωγίσιμους από υποξία παράγοντες (HIFs), οι οποίοι αυξάνουν άμεσα την έκφραση πολλών προ-αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (34), (35). Σε μοριακό επίπεδο, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ασκεί τα αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματά της ρυθμίζοντας την έκφραση βασικών παραγόντων που ελέγχουν την αγγειογένεση. Μία μελέτη, που θα αναλυθεί και παρακάτω, υποστηρίζει ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μειώνει την έκφραση του VEGF σε διάφορες καρκινικές σειρές, μέσω της μεταγραφικής καταστολής του HIF-1 (36).

Συνεπώς, φαίνεται ότι οι HIF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου συμμετέχοντας σε διαδικασίες όπως η αγγειογένεση. Για το λόγο αυτό είναι και αποδεδειγμένα στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων. Αξίζει στη συνέχεια να αναλυθεί η δομή, η λειτουργία και η ρύθμιση των παραγόντων αυτών αλλά και τα στοιχεία που δείχνουν τη σύνδεσή τους με τη βιταμίνη D και την ρύθμισή τους από αυτή.



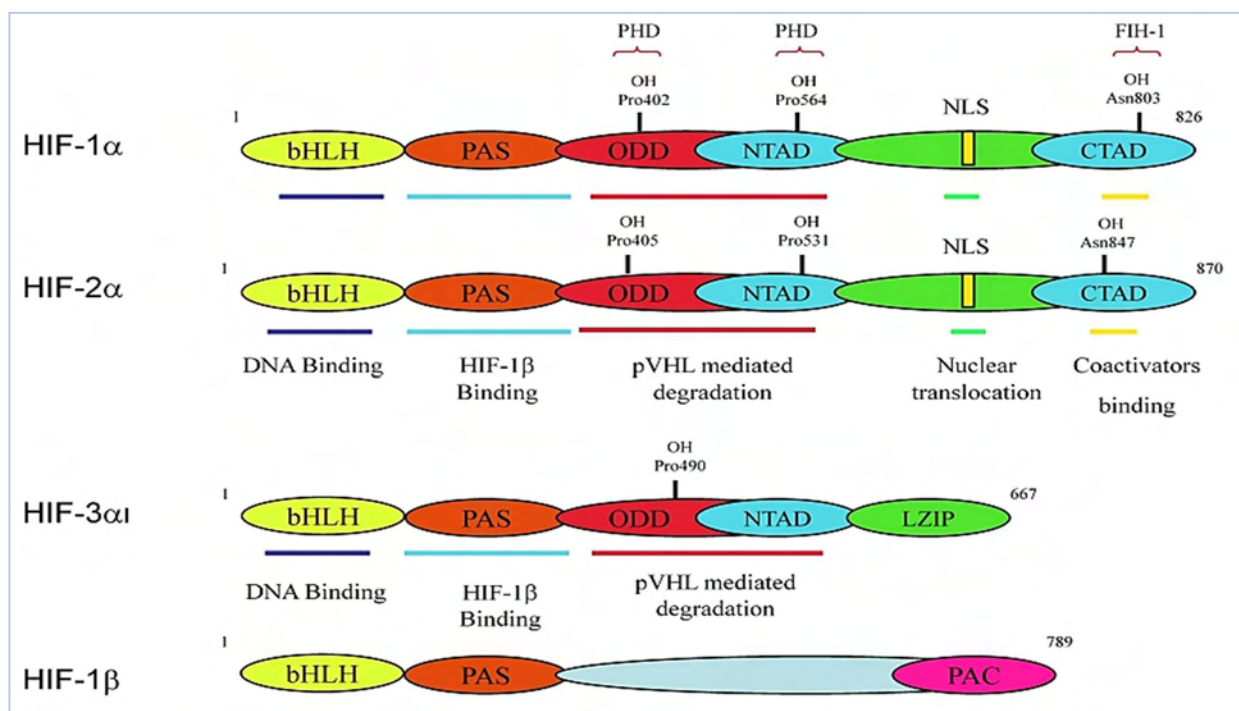
Εικόνα 1.5 Ορισμένες από τις μοριακές σηματοδοτικές οδούς που μεσολαβούν στις αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της 1,25(OH)₂D ή καλσιτριόλης (37)

1.6 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

1.6.1 Δομή

Οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που είναι γνωστοί ως επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors).

Οι HIFs είναι πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH/PAS, που σχηματίζουν πυρηνικά ετεροδιμερή και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων της υποξίας. Το ετεροδιμερές συνίσταται από μια α-υπομονάδα που ρυθμίζεται από το οξυγόνο και από μια β-υπομονάδα που εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα. Στα κύτταρα των θηλαστικών τρία γονίδια εκφράζουν για τις ισομορφές της α-υπομονάδας HIF-1α, HIF-2α (EPAS1) και HIF-3α (IPAS) (38), (39), (40). Η β-υπομονάδα αποτελείται από την πρωτεΐνη HIF-1β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator). Τα μέλη της οικογένειας των HIFs χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη κατανομή επικρατειών (Εικόνα 1.6). Συγκεκριμένα, οι τρεις ισομορφές HIF-α και ο HIF-1β φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο επικράτειες βασικών αμινοξέων με βασική δομή έλικα-βρόγχο-έλικα (bHLH) για δέσμευση στο DNA, αλλά και PER-ARNT-SIM (PAS) επικράτειες με -A και -B υποπεριοχές, που ευθύνονται για την συγκρότηση του ετεροδιμερούς. Κεντρικά στις HIF-α υπομονάδες εντοπίζεται η επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD). Η ιδιότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής οφείλεται στις επικράτειες TADs (Transactivation Domains) που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο των HIF (41).



Εικόνα 1.6 Δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF. Διακρίνονται οι συντηρημένες επικράτειες σύνδεσης στο DNA (bHLH), ετεροδιμερισμού (PAS), οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD) και ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD, C-TAD) (42)

1.6.2 Λειτουργία

Όπως ήδη περιγράφηκε, η μεταγραφική δράση των HIFs εκδηλώνεται από ετεροδιμερή, των οποίων η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από το οξυγόνο ενώ η HIF-1β εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα. Σε συνθήκες υποξίας η α υπομονάδα σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και ετεροδιμερίζεται με την HIF-1β υπομονάδα (ARNT) (38). Το σύμπλοκο δεσμεύει τους συμπαράγοντες CBP/P300 στις TAD-C επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης και συνδέεται στις περιοχές των προαγωγέων ή των ενισχυτών γονιδίων στόχων και επάγει τη μεταγραφή τους (43). Η αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν οι HIFs είναι τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements). Πρόκειται για σύνθετα στοιχεία αποτελούμενα από ένα καλά συντηρημένο πυρήνα όπου συνδέεται ο HIF με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' και υψηλής ποικιλότητας πλευρικές αλληλουχίες που ρυθμίζουν την μεταγραφική απόκριση (44).

Η ανακάλυψη των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων έγινε σε μελέτες της επαγωγής, υπό συνθήκες υποξίας, τη μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), μιας γλυκοπρωτεΐνης που ρυθμίζει στα θηλαστικά την παραγωγή ερυθροκυττάρων (45).

Η ερυθροποίηση είναι μια από τις κύριες αποκρίσεις στην υποξία σε επίπεδο οργανισμού. Βασική τοπική απόκριση στην ελλιπή οξυγόνωση σε επίπεδο ιστού αποτελεί η αγγειογένεση, με πληθώρα γονιδίων να αποτελούν στόχους των HIFs και σημαντικότερο εκπρόσωπο τον παράγοντα αύξησης του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelium Growth Factor). Πέρα

από τις αποκρίσεις που στοχεύουν στην αύξηση της πρόσληψης και της αξιοποίησης του οξυγόνου, οι HIFs ρυθμίζουν τη μετατόπιση του μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς τη γλυκόλυση. Γονίδια στόχοι των HIFs κωδικοποιούν μεταξύ άλλων για μονομεταφορείς γλυκόζης (GLUT1) αλλά και για τα περισσότερα γλυκολυτικά ένζυμα (46). Εκτός από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, οι παράγοντες HIF ρυθμίζουν και τον μεταβολισμό των λιπιδίων επάγοντας γονίδια στόχους που εκφράζουν ένζυμα όπως η λιπίνη-1 και συμβάλουν στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων σε λιποσταγονίδια σε συνθήκες υποξίας (47),(48).

Σε αντίθεση με τον HIF-1α που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους, η έκφραση και δράση του HIF-2α είναι αρκετά ιστοειδική και εντοπίζεται κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο κατά την εμβρυική ανάπτυξη και σε μια σειρά άλλων κυτταρικών τύπων (49).

1.7 Ρύθμιση των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων

Ο HIF-1α και ο HIF-2α εκφράζονται συνεχώς και υπόκεινται σε συνεχή ρύθμιση τόσο σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης (νορμοξία) όσο και σε υποξία. Η ρύθμιση τους γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής, έκφρασης, σταθεροποίησης και συσσώρευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζεται ο διμερισμός με τον ARNT, η πρόσδεση σε γονίδια στόχους και η αλληλεπίδραση με ποικίλους παράγοντες της μεταγραφής. Μέρος αυτών των ρυθμίσεων, όπως οι οξυγονοεξαρτώμενες ρυθμίσεις, αλλά και κάποιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν καθολικό χαρακτήρα και τελούνται σε όλα τα κύτταρα που εκφράζουν τους HIFs.

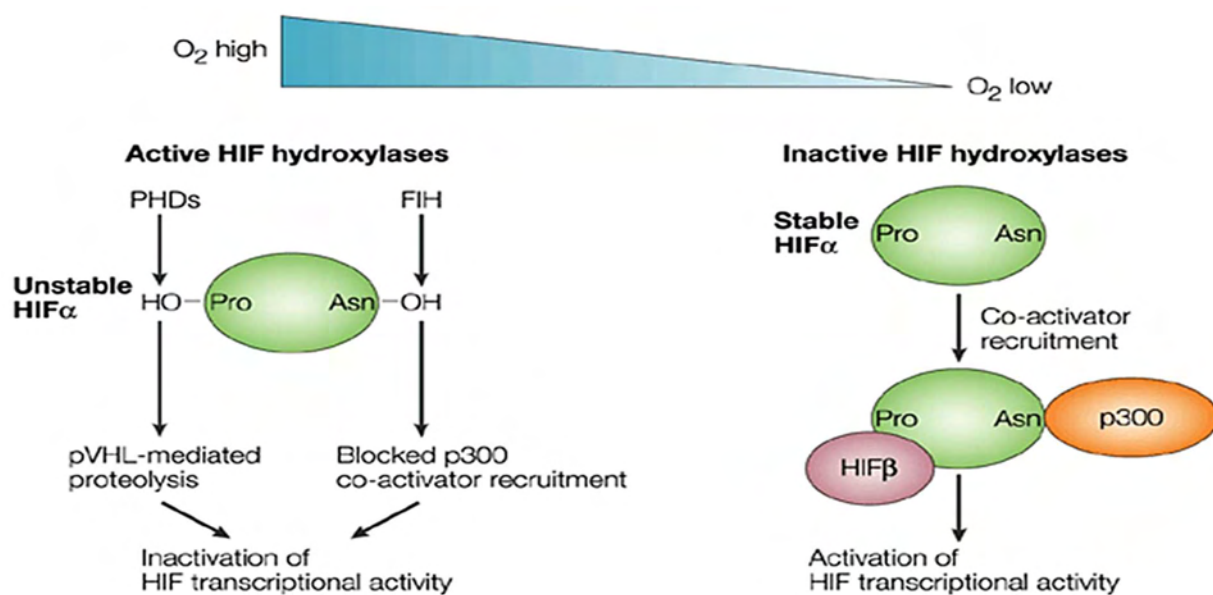
1.7.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση των HIF

Η κυριότερη ρύθμιση στην οποία υπόκεινται οι HIFs βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα οξυγόνωσης του κυττάρου ή ιστού (εικόνα 1.7). Υπό συνθήκες νορμοξίας, οι υπομονάδες HIF-α μεταγράφονται συνεχώς και μεταφράζονται. Η επαρκής τάση οξυγόνου όμως οδηγεί στην αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα. Συγκεκριμένα, μια οικογένεια προλυλο-υδροξυλάσεων (PHDs), και κυρίως η PHD2, υδροξυλιώνουν τις ευαίσθητες στο οξυγόνο υπομονάδες. Οι PHDs απαιτούν σίδηρο, α-κετογλουταρικό, ασκορβικό και μοριακό οξυγόνο. Η υδροξυλίωση του HIF-1α γίνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης, Pro-402 και Pro-564 (50), και του HIF-2α σε Pro-405 και Pro-531, εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD. Αυτή η υδροξυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευσή τους από την πρωτεΐνη Von Hippel-Lidau (VHL). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος E3 λιγάσης-ουβικιτίνης, έτσι οι HIFs πολύ-ουβικιτινιώνονται και οδηγούνται για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα.

Αντιθέτως, σε συνθήκες υποξίας το μοριακό οξυγόνο εκλείπει από τα υποστρώματα των PHDs, καθιστώντας τις PHDs ανενεργές. Έτσι οι HIFs σταθεροποιούνται και εισάγονται στον πυρήνα, όπου διμερίζονται με τον ARNT και επάγουν την έκφραση γονιδίων στόχων.

Πέρα από την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση, οι HIF1α και HIF2α υπόκεινται σε μια πρόσθετη ρυθμιστική υδροξυλίωση. Ένα ένζυμο γνωστό ως αναστολέας του παράγοντα HIF (FIH-Factor Inhibiting HIF) υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη (Asn-803 για HIF1A, Asn-847 για HIF2A) εντός των C-TAD των HIF1α και HIF2α, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση των HIFs με συμπαράγοντες της μεταγραφής (51).

Παρόλο που και ο FIH, όπως οι PHDs, ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών που χρειάζονται Fe^{2+} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαράγοντες και μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα, τα δύο ένζυμα διαφέρουν σημαντικά. Ο παράγοντας FIH παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το μοριακό οξυγόνο από τις PHDs με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργός και σε συνθήκες σχετικά χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (52). Έτσι ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργότητα και σε συνθήκες όπου οι HIFs σταθεροποιούνται.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 1.7 Η οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση των HIFs. Σε συνθήκες νορμοξίας υδροξυλιώνονται από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες στην ODD, πολυουβικιτινιώνονται από τον VHL και αποικοδομούνται στο 26S πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και μειωμένου οξυγόνου η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs αναστέλλεται από τον παράγοντα FIH που υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη στη C-TAD και αποτρέπει τη σύνδεση των συμπαράγοντων της μεταγραφής CBP/p300. Σε συνθήκες υποξίας οι HIFs σταθεροποιούνται και είναι μεταγραφικά ενεργοί (53)

1.8 Ο ρόλος των HIF στον καρκίνο

Οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ακανόνιστη, μη λειτουργική αγγειογένεση. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη δημιουργία ενός υποξικού μικροπεριβάλλοντος που επάγει την σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1α και HIF-2α. Με τη σειρά τους οι HIFs, ενεργοποιώντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ρυθμίζουν την προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

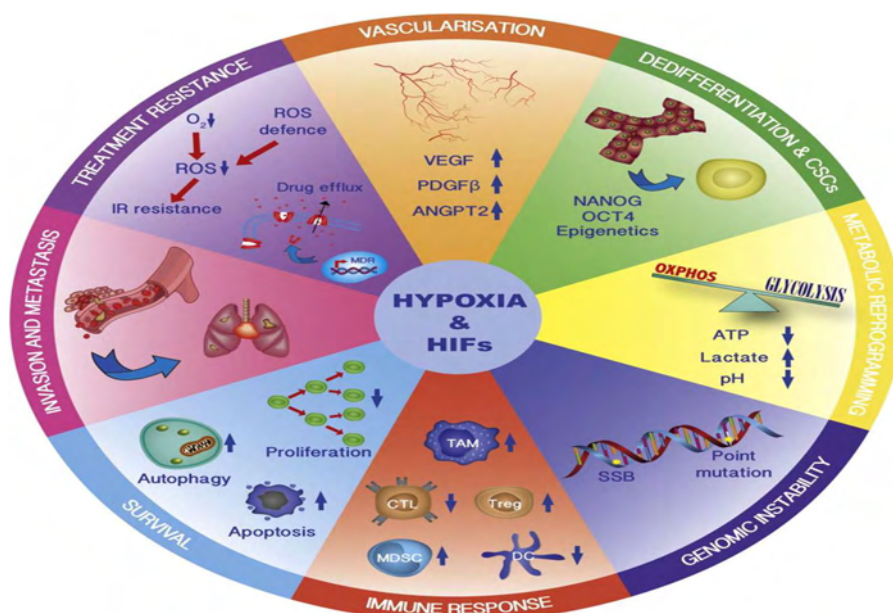
Συγκεκριμένα ο HIF-1, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF, ANGPT-2, iNOS) (54), και τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπέρ της γλυκόλυσης (GLUT-1, HK2) (55), συμβάλλοντας στη παροχή οξυγόνου και την άμεση κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του αυξανόμενου όγκου. Πέρα από τη ρύθμιση της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης, ο HIF-1 αναστέλλει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-CoA, άρα την είσοδό του στον κύκλο του Krebs, καθώς επάγει τα επίπεδα της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK-1). Ενώ, επάγοντας τα επίπεδα της LDH-A (Lactate Dehydrogenase A) προωθεί τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ (56). Έτσι μειώνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια μειώνονται η κατανάλωση μοριακού οξυγόνου και η παραγωγή ROS. Σε αυτό συμβάλλει και η αύξηση της αποδοτικότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, λόγω της αντικατάστασης του τέταρτου συμπλόκου που έχει δράση οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX4-1 σε COX4-2), στη οποία συμβάλλει η δράση του HIF-1. Η πρόσληψη γλυκόζης είναι πολύ αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, ακόμα και σε συνθήκες όπου η οξειδωτική φωσφορυλίωση δε μεταβάλλεται. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ αυξάνει κατά πολύ το όξινο φορτίο του κυττάρου. Αυτό ρυθμίζεται από επαγόμενους από τον HIF-1 μεταφορείς (monocarboxylate transporters MCTs) που εξάγουν το γαλακτικό οξύ με συμμεταφορά H^+ ρυθμίζοντας έτσι το pH τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον του (55). Ως αποτέλεσμα, το όξινο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο η μεταβολή του pH δεν είναι η μόνη επίδραση των HIF1 στον εξωκυττάριο χώρο του υποξικού ιστού. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 επάγει την σύνθεση μιας ομάδας υδροξυλασών του κολλαγόνου (P4HA1, P4HA2, PLOD2), που δρουν αναδιοργανώνοντας το εξωκυττάριο πλέγμα σε φυσιολογικά και καρκινικά υποξικά κύτταρα (57)

Η φλεγμονή είναι ένα ακόμη χαρακτηριστικό του καρκίνου και η αντικαρκινική ανοσοαπόκριση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου. Εσωτερικά του όγκου η υποξία ρυθμίζει την καρκινική ανοσοαπόκριση με πολλούς τρόπους, έχοντας συνολικά μια συνολική ανοσοκατασταλτική επίδραση. Για παράδειγμα, η υποξία του όγκου και / ή οι HIFs μπορούν να προσελκύσουν κύτταρα που προέρχονται από ρυθμιστικά T-κύτταρα και μακροφάγα που

σχετίζονται με όγκους με ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες (58). Η υποξία μπορεί επίσης να καταστείλει τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων και να αναστέλλει τη δράση της κυτταροτοξικής T-λεμφοκυτταρικής διήθησης (59).

Η μετάσταση είναι η κύρια αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Η υποξία στο μικροπεριβάλλον του όγκου συνδέεται με τη μετάσταση σε πειραματικούς όγκους και οι HIF εμπλέκονται σε μεταστατική νόσο σε διάφορες κλινικές μελέτες (60). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο HIF-1α υπερεκφράζεται στο 29% των πρωτογενών καρκίνων του μαστού αλλά στο 69% των μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού. Μηχανιστικά, η υποξία και οι HIFs εμπλέκονται σε πολλά διαφορετικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας. Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) είναι ένα αρχικό στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την έκφραση του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης E-κανχτερίνης (που κωδικοποιείται από το CDH1) και αποκτούν ένα κινητό φαινότυπο. Η υποξία και τα HIFs συμβάλλουν στην EMT με ρύθμιση των μεταγραφικών καταστολέων, όπως το SNAIL, το TWIST, το TCF3, το ZFH1A και το ZFH1B, των οποίων τα γονιδιακά προϊόντα με τη σειρά τους καταστέλλουν την CDH1 (59).

Η υπερέκφραση του HIF-1α και HIF-2α στα καρκινικά κύτταρα επιβεβαιώνεται από πάρα πολλά κλινικά δεδομένα βιοψιών που προέρχονται από διάφορες μορφές ανθρώπινων όγκων. Τα υψηλά επίπεδα των HIF σε όγκους σχετίζονται με κακή πρόγνωση, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης και υψηλή θνησιμότητα (61). Αν και δεν έχει επιτευχθεί άμεση στόχευση του HIF, κλινικές δοκιμές και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι θα μπορούσε να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου, ενώ φάρμακα που δρουν έμμεσα, παρεμποδίζοντας μονοπάτια που επάγουν τους HIFs έχουν ήδη μερική επιτυχία σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (62).



Εικόνα 1.8 Διεργασίες που σχετίζονται με την προώθηση της καρκινογένεσης και ρυθμίζονται από την υποξία και τους HIF. Η στόχευση της υποξίας / HIFs αναστέλλει έτσι αρκετά χαρακτηριστικά της εξέλιξης του όγκου, της μετάστασης και της αντίστασης της θεραπείας. PDGF-β : αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων-β, ANGPT2: αγγειοποιητίνη 2. SSB: μονόκλωνο σπάσιμο. TAM: μακροφάγο που σχετίζεται με όγκους. CTL: κυτταροτοξικό T-λεμφοκύτταρο, Treg: ρυθμιστικό T-κύτταρο; MDSC: μυελοειδές κατασταλακτικό κύτταρο, DC: δένδριτικό κύτταρο, MDR: αντοχή σε πολλά φάρμακα, ROS: δραστικά είδη οξυγόνου, IR: ιονίζουσα ακτινοβολία (59).

1.9 Βιταμίνη D και HIF: Σημεία σύγκλισης

Όπως αναφέρθηκε, η αντικαρκινική δράση της βιταμίνης είναι πλέον αναγνωρισμένη και τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται όλο και περισσότερο στους μηχανισμούς της αντικαρκινικής της δράσης. Ωστόσο, το βιοχημικό υπόβαθρο αυτών των δράσεων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας. Οι HIFs είναι μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από υποξία, που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διεργασίες του καρκίνου (αγγειογένεση, φλεγμονή, μετάσταση). Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποδεικνύοντας κοινούς στόχους και δράσεις προσέφερε μια ένδειξη ότι μπορεί να υπάρχει ένας βιοχημικός σύνδεσμος σηματοδότησης (counter play) μεταξύ της βιταμίνης D και των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (HIFs). Πιο συγκεκριμένα, έχουν ταυτοποιηθεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs) στον υποκινητή του γονιδίου του HIF1α (63). Οπότε η βιταμίνη D με τον ενεργοποιημένο VDR συνδέεται σε αυτά και ελέγχει την έκφραση του HIF1α. Επιπλέον, ανάμεσα στα πολλά γονίδια στόχους των παραγόντων HIF ανήκει και το γονίδιο της υπεροξειδικής δισμουτάσης 2 (SOD2), που μετατρέπει το τοξικό ανιόν σουπεροξειδίου O_2^- , ένα παραπροϊόν της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και διατομικό οξυγόνο. Αυτή η λειτουργία επιτρέπει στο SOD2 να εξουδετερώσει το ανιόν του σουπεροξειδίου, μία από τις βασικές δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS) και, κατά συνέπεια, παρέχει προστασία από το οξειδωτικό στρες. Έχει αποδειχθεί ότι η 1,25(OH)₂D επάγει τα επίπεδα mRNA των αντιοξειδωτικών γονιδίων SOD1 και SOD2 σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PECs και LNCaP (64), (65). Η βιταμίνη D διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως των ERK1/2, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταφορά και ενεργοποίηση του HIF1α (66). Έχει βρεθεί, τέλος, ότι η 1,25(OH)₂D μειώνει την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-1α και του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (VEGF) (36).

1.10 Μελέτες επίδρασης της βιταμίνης D στους HIF σε καρκινικές σειρές κυττάρων

Η πρώτη έρευνα για την επίδραση της 1,25(OH)₂D στον HIF1α σε υποξία έγινε το 2007 από τους Shoshan et al. (36) Στη συγκεκριμένη μελέτη, δείχθηκε ότι σε τρεις σειρές καρκινικών κυττάρων ένα σημαντικό μέρος των αντι-αγγειογενετικών δράσεων της 1,25(OH)₂D

διαμεσολαβείται μέσω του HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, έδειξαν ότι η 1,25(OH)₂D μειώνει την πρωτεϊνική έκφραση και του HIF-1α και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, ότι η 1,25(OH)₂D αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α καθώς και τα γονίδια στόχους του, συμπεριλαμβανομένων των VEGF, ενδοθηλίνης 1(ET-1) και μεταφορέα γλυκόζης 1 Glut-1) σε καρκινική σειρά CL-1. Αυτή είναι και η μοναδική βιβλιογραφική αναφορά που αναφέρεται η σχέση και πώς επηρεάζει η 1,25(OH)₂D την έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Η μελέτη αυτή όμως έχει μια σειρά από μειονεκτήματα που μπορούν να θέσουν σε αμφισβήτηση τα τελικά συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, στην μελέτη αυτή χρησιμοποιούνται αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της 1,25(OH)₂D, 0,1-1μM, που απέχουν πολύ από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης στην κυκλοφορία. Δεν πρέπει να ξεχνά κανείς ότι βιταμίνη D μπορεί να έχει και τοξικές εκδηλώσεις. Υπάρχει ασυνέχεια στα πειραματικά δεδομένα εφόσον κάποια αποτελέσματα αντλούνται από μια σειρά κυττάρων ενώ άλλα από την άλλη. Σε ανοσοαποτύπωση κατά Western ως μάρτυρας ισοφόρτισης (loading control) χρησιμοποιείται για κάποιες σειρές το ένζυμο τοποϊσομεράση και για κάποιες η πρωτεΐνη κυταρροσκελετού ακτίνη. Από παρουσιαζόμενα ανοσοαποτυπώματα είναι φανερό ότι η τοποϊσομεράση επηρεάζεται από την βιταμίνη D είναι αμφίβολο αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Επίσης η παρατηρούμενη σχετικά μικρή μείωση της συγκέντρωσης του VEGF (από 300 σε 200-250 pg/mL/10⁶ cells για 0,1 μM της βιταμίνης) δεν αποδεικνύει την αναστολή της αγγειογένεσης όπως ισχυρίζονται οι συγγραφείς. Σε μερική αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης των Shoshan et al., το 2010 οι Jiang et al (67), έδειξαν ότι, με εισαγωγή της 1,25(OH)₂D σε μη μετασχηματισμένα και μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο H-ras μαστικά κύτταρα MCF10A, αυξήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α ενώ τα επίπεδα mRNA του παρέμειναν αμετάβλητα (σε συνθήκες νορμοξίας). Το 2014, οι Lee et al (68) επίσης απέδειξαν ότι η 1,25(OH)₂D επάγει τον HIF1α και τον HIF2α υπό συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου (νορμοξίας) σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (Lee et al, 2014). Επομένως, μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι υπάρχουν πολύ λίγα και αντιφατικά πειραματικά δεδομένα για το αν η αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D περιλαμβάνει και ανάλογη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, έναν από τους βασικούς παραγόντες για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα για την σχέση του HIF-2α και της βιταμίνης D. Όμως τα κοινά σημεία δράσης της βιταμίνης D και των HIF που αναφέρθηκαν παραπάνω (κεφάλαιο 1.9) υποδεικνύουν ότι μπορεί να υπάρχουν σημεία σύγκλισης των σηματοδοτικών μονοπατιών της βιταμίνης D και των μεταγραφικών παραγόντων HIF. Το θέμα αυτό χρίζει άμεση μελέτη και αποτελεί τον βασικό στόχο της παρούσας εργασίας.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ο αντικαρκινικός ρόλος της βιταμίνης D είναι γενικά αποδεκτός και η δυναμική της στη θεραπεία του καρκίνου βρίσκεται υπό διερεύνηση. Ωστόσο, το βιοχημικό υπόβαθρο αυτών των δράσεων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας.

Τα προηγούμενα δεδομένα υποδεικνύοντας κοινό στόχο και δράσεις έδειξαν ότι μπορεί να υπάρχει μια βιοχημική σηματοδοτική σύνδεση μεταξύ της βιταμίνης D και των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (HIFs), μείζονες παράγοντες στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Η αναστολή των HIFs θεωρείται σήμερα ως εφικτή προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου και οι HIFs είναι καθιερωμένοι στόχοι φαρμάκων.

Μία προηγούμενη μελέτη της διερεύνησης της επίδρασης της βιταμίνης D στην έκφραση των HIF έδειξε αναστολή της έκφρασης του HIF1α σε διάφορους τύπους καρκίνων, χωρίς να αποσαφηνίζεται ο μηχανισμός και η δράση στον HIF2α.

Σκοπός τη παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετηθεί ο ρόλος τόσο του ενεργού μεταβολίτη της βιταμίνης D (1,25(OH)₂D) όσο και της κύριας κυκλοφορούσας μορφής της (25OHD) στη ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIFs και συγκεκριμένα

- στην ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας στην επιλεγμένη καρκινική σειρά κυττάρων Huh7 και
- στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των συμπλοκών HIF-1 και HIF-2
- στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων των HIFs, όπως της κινάσης του φωσφογλυκερικού 1 (PGK1) για τον HIF1α και της ερυθροποιητίνης (EPO) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1(PAI-1).

Η επίτευξη του παραπάνω σκοπού προϋποθέτει την ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIFs μετά την επίδραση με τους μεταβολίτες της βιταμίνης D με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ακολουθώς, την μελέτη της ρύθμισης των HIF από τη βιταμίνη D σε μεταγραφικό επίπεδο με τη δοκιμασία λουσιφεράσης καθώς και με τον προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA των γονιδίων στόχων τους. Τέλος, την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της βιταμίνης D στη ρύθμιση των HIFs.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

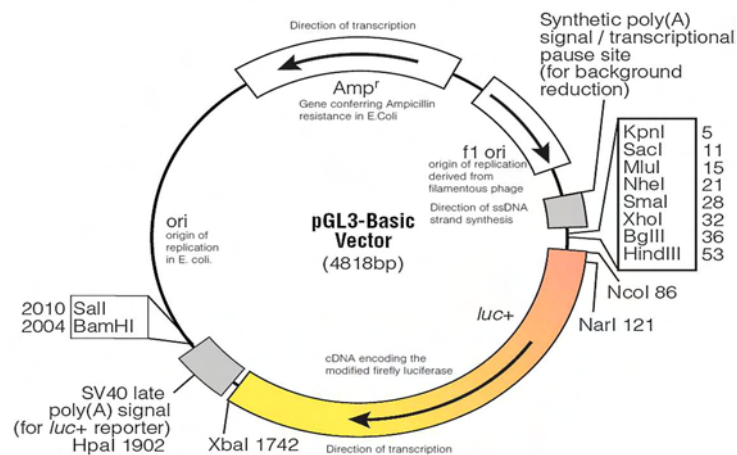
3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Huh7. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος.

3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

- pGL3-VEGF-5HRE

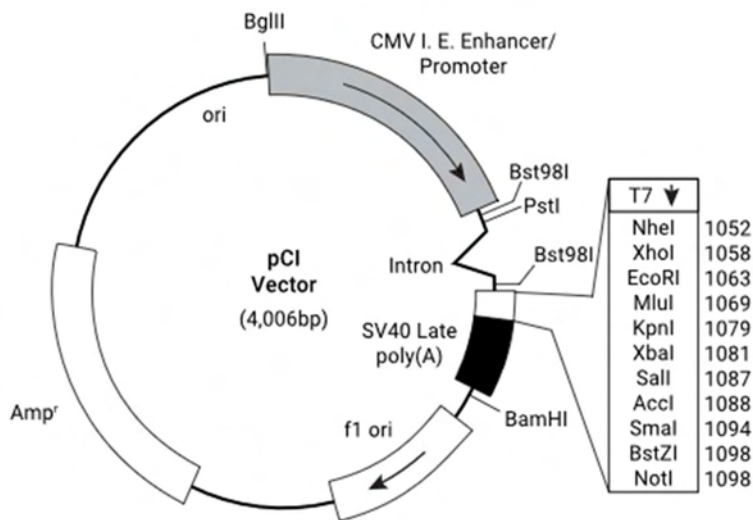
Ο pGL3-VEGF-5HRE χρησιμοποιείται σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου VEGF στον SV-40 υποκινητή, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας.



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic.

- pCI-renilla

Ο πλασμιδιακός φορέας 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 3.2 Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα *pCI-renilla*

3.1.3 Εκκινητές

Στα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του mRNA με RT-PCR (PCR πραγματικού χρόνου), οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

EPO F: 5'-AGGCCGAGAATATCAGACG-3'

EPO R: 5'-CCATTCTCTTCCAGGCATAGAAA-3'

PGK F: 5'-CTGTGGCTTCTGGCATAACCT-3'

PGK R: 3'-CGAGTGACAGCCTCAGTATA-3'

PAI-1 F: 5'-CAGCTGACAGGAGGAGA-3'

PAI-1 R: 5'-CCCATGAGCTCCTTGTACAGAT-3'

Το γονίδιο της φωσφογλυκερικής κινάσης 1 (PGK1) είναι στόχος του HIF1α, ενώ το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO) και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1) του HIF2α. Τέλος, το γονίδιο της 18S υπομονάδας του ριβοσώματος χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς καθώς η έκφραση του mRNA του είναι σταθερή.

3.1.4 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Από την εταιρεία BIOCHROME (Biochrome, U.K.) χρησιμοποιήθηκαν

- Θρεπτικά υγρά DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) high glucose
- οροί βόειου εμβρύου (FBS)
- αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη

3.1.5 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma Aldrich (USA) και Merck (Germany).

3.1.6 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα (Lyberopoulou et al., 2007) από ορό κουνελιού σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρείας Novus σε αραίωση 1:600.
- Μονοκλωνικό αντί-τουμπουλίνης από ορό ποντικού σε αραίωση 1:10000.

3.1.7 Απομόνωση RNA(kit)

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoZol της εταιρείας Macherey-Nagel.

3.1.8 Μέσα παροδικής επιμόλυνσης

Το χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική επιμόλυνση με πλασμιδιακό DNA ήταν το PEI (Πολυαιθυλενιμίνη) της εταιρείας Polysciences.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) καλλιεργούνται με θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο προστίθενται αντιβιοτικά (100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη) και 10% ορός εμβρύου βοός (FBS), μέσα σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm ή 60 mm. Επώζονται σε υγρανόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂.

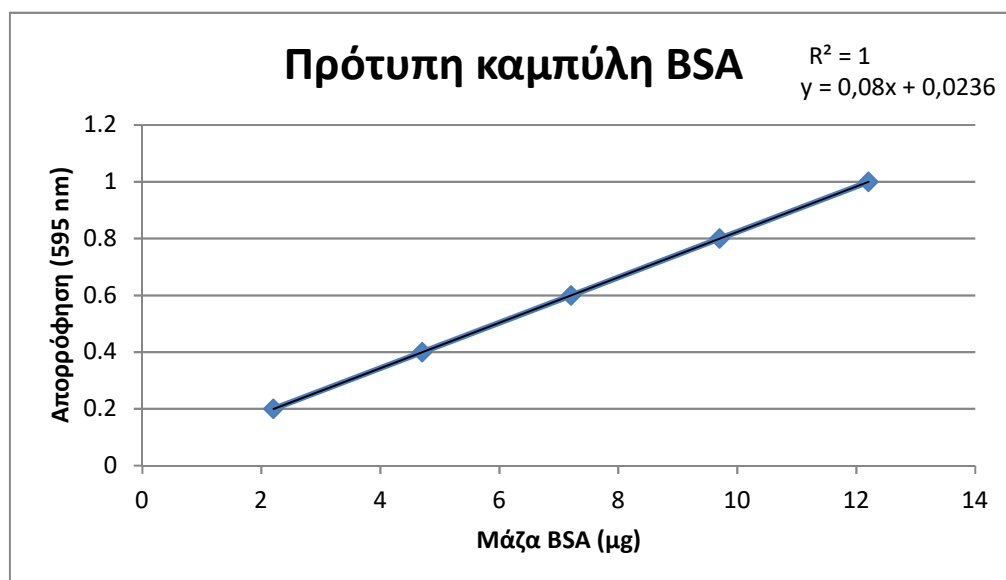
Τα κύτταρα επώζονται και ανακαλλιεργούνται όταν το τρυβλίο κορεστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Καθώς τα κύτταρα Huh7 διπλασιάζονται κάθε 14-16 ώρες αραιώνονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να χρειάζονται ανακαλλιέργεια κάθε 48 ώρες. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το κορεσμένο τρυβλίο όπου τα κύτταρα είναι προσκολλημένα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Για την αποκόλλησή τους γίνεται επίδραση με το ένζυμο θρυψίνη για 5-10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό μέσο, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη αραίωση, και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων. Από το αιώρημα μεταφέρονται 1 ml κυττάρων σε νέα τρυβλία στα οποία έχουν προστεθεί 7 ml θρεπτικού μέσου. Η όλη κατεργασία των κυττάρων γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.2.2 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 1x PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε 70μl διαλύματος λύσης (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5% γλυκερόλη, 1% Triton, 5 mM DTT, 1 mM PMSF). Οι αναστολείς πρωτεασών (PMSF) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT), που χρησιμοποιείται για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, προστίθενται πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Στη συνέχεια, το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5ml, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για δεκαπέντε λεπτά στους 4°C. Κρατείται το υπερκείμενο (supernatant) για ανάλυση πρωτεϊνών-SDS PAGE με ανοσοαποτύπωση, αφού πρώτα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και θέρμανση στους 95°C για πέντε λεπτά.

3.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Η μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Ουσιαστικά, βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της εν λόγω χρωστικής από κόκκινο – καφέ σε μπλέ κατά τη σύνδεσή της σε πρωτεΐνες, υπό όξινες συνθήκες. Η κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου Bradford δίνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια της στις ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και να εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές. Αυτές οι υδρόφοβες περιοχές φτιάχνουν δεσμούς van der Waals με τις μη πολικές περιοχές της χρωστικής σταθεροποιώντας τη μπλε μορφή της. Η χρωστική αυτή κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας BioRad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μl αραιωμένα με νερό σε τελικό όγκο 1 ml είτε σαν τυφλό, είτε με προσθήκη 5 μl διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm, όπου το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παραμένει σταθερός για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μας με βάση την μετρούμενη οπτική πυκνότητα (O.D.). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA) (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

3.2.4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Ο αναλυτικός διαχωρισμός μακρομορίων που επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρηση, βασίζεται σε συγκεκριμένες αρχές της κίνησης φορτισμένων μακρομορίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) μακρομορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (q) και το συντελεστή τριβής (f).

$$v = E \cdot q / f$$

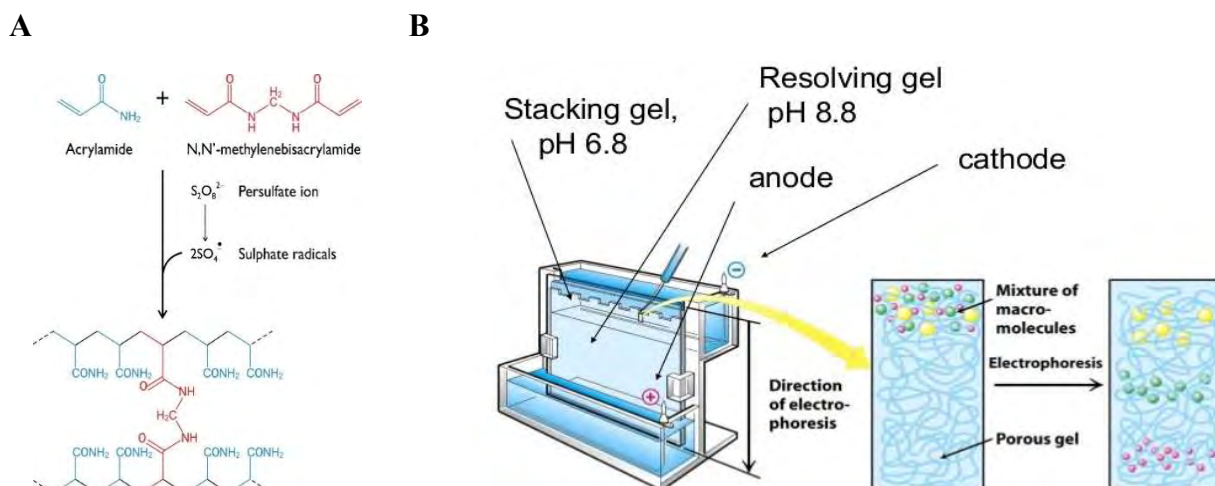
Η ηλεκτροστατική δύναμη $E \cdot q$ που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα (ιξώδες) του μέσου. Το πήκτωμα σαν μέσο ηλεκτροφόρησης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό με βάση το μοριακό βάρος και το σχήμα των μακρομορίων. Επίσης ο στερεός του χαρακτήρας αποτρέπει την τυρβώδη ροή που μπορεί να δημιουργηθεί από μικρές τοπικές μεταβολές της θερμοκρασίας.

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δι-ακρυλαμίδιο (MBA) (3.4 A). Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια

ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-Poly AcrylamideGel Electrophoresis, SDS-PAGE) και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που σχηματίζει υδρόφοβους δεσμούς με τις πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες κατά βάρος ποσότητες (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει επίμηκες σχήμα και καθαρό αρνητικό φορτίο. Το συνολικό φορτίο είναι ανάλογο του μοριακού βάρους ωστόσο, λόγω της ισοκατανομής του SDS, το φορτίο ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι κοινό. Προστίθεται επίσης διθειοθρεϊτόλη (DTT) που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση 5 λεπτά στους 97°C. Μετά από αυτή την κατεργασία η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται αποκλειστικά από το μοριακό τους μέγεθος. Έτσι, οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικόνα 3. Β).

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού – separating gel (7.5 cm ύψος, 1 mm πάχος) και το πήκτωμα επιστοίβαξης – stacking gel (2.5 cm ύψος). Οι θέσεις εισαγωγής δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό της πηκτής. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθενται πρώτα 5ml πηκτής διαχωρισμού με 10% πυκνότητα σε πολυακρυλαμίδιο, pH 8.8. Ακολούθως παρασκευάζεται και στοιβάζεται διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης 4 ml, 4.5% πυκνότητας πολυακρυλαμίδης, pH 6.8.



Εικόνα 3. 4 Α) Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. Β) Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο. Ανατύπωση από: Jeremy M Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, Jr. & Lubert Stryer: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Έβδομη έκδοση ©2012 Freeman and Company

Αφού πήξει, το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλύπτεται πλήρως με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Τα δείγματα και δείγμα μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών πριν φορτωθούν στις θέσεις εισαγωγής δείγματος του πηκτώματος επιστοίβαξης, θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 97°C και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V.

Παρατίθεται η χημική σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων:

Διάλυμα Διαχωρισμού:

0.375 M Tris-HCL pH 8.8
2 mM EDTA
0.1% SDS

Πήκτωμα Διαχωρισμού 10%:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Ακρυλαμίδιο 10% | 1.25 ml |
| Διάλυμα Διαχωρισμού 1x | 1.25 ml |
| Αποστειρωμένο H ₂ O | 2.5 ml |
| 0.04 % APS | 20 μl |
| TEMED 1:500 | 10 μl |

Διάλυμα Επιστοίβαξης:

0.125 M Tris-HCL pH 6.8
2 mM EDTA
0.1 % SDS

Πήκτωμα Επιστοίβαξης 4,5%:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Ακρυλαμίδιο 4.5% | 0.45 ml |
| Διάλυμα Επιστοίβαξης 1x | 1 ml |
| Αποστειρωμένο H ₂ O | 2.5 ml |
| 0.0625 % APS | 25 μl |
| TEMED 1:333 | 12.5 μl |

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

0.25 M Tris
1.92 M γλυκίνη
0.5 % SDS

Εξερχόμενες από τις θέσεις εισαγωγής δείγματος, οι πρωτεΐνες διασχίζουν 2.5 cm πηκτής επιστοίβαξης. Η πηκτή αυτή, καθώς έχει μικρή συγκέντρωση σε πολυακρυλαμίδιο (4.5%), σχηματίζει μεγάλους πόρους και έτσι οι πρωτεΐνες δε διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό

τους βάρους. Κατά τη ροή προς τον θετικό πόλο ανιόντα χλωρίου Cl^- παρουσιάζουν υψηλή κινητικότητα και προπορεύονται των πρωτεϊνών του δείγματος, ενώ συγκρατούνται από αυτές μέσω αλληλεπιδράσεων με θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Από την άλλη, η γλυκίνη, που περιέχεται στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, στο πήκτωμα επιστοιβάξης βρίσκεται σε ένα περιβάλλον με pH 6.8, αρκετά κοντά στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI~6). Ως αποτέλεσμα παρουσιάζει χαμηλή κινητικότητα και ακολουθεί το δείγμα πρωτεϊνών. Έτσι όλες οι πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, στοιβάζονται και σχηματίζουν μια ζώνη στο τέλος του πηκτώματος επιστοιβάξης περνώντας ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Εκεί, σε βασικό περιβάλλον (pH 8.8) τα μόρια γλυκίνης ιοντίζονται και κινούνται ταχύτατα προς το θετικό πόλο, προσπερνώντας τις πρωτεΐνες οι οποίες, λόγω των μικρών πόρων που σχηματίζονται από την υψηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης (10%), διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανιχνεύονται στη παρούσα εργασία με ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

3.2.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

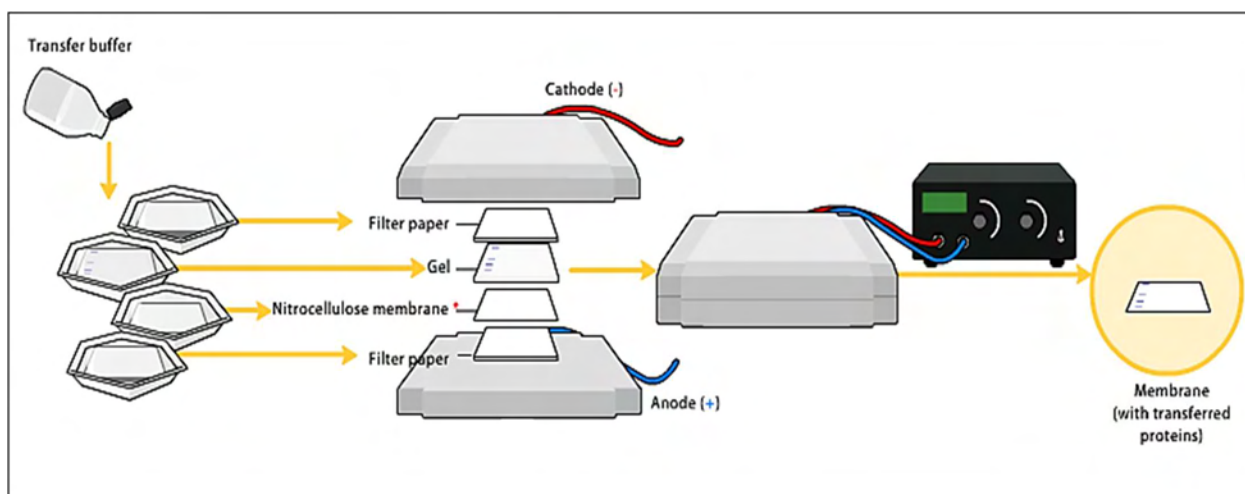
Η ανοσοαποτύπωση είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη και τον εντοπισμό τους με ειδικά για αυτές αντισώματα. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η μεταφορά τους (με ανοσοαποτύπωση) σε μια επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Η ηλεκτρομεταφορά βασίζεται στη κίνηση των αρνητικά φορτισμένων (υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS) πρωτεϊνών από τη πηκτή προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Κατά τη κίνηση αυτή οι πρωτεΐνες παγιδεύονται και αποτυπώνονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η ηλεκτρομεταφορά της πρωτεΐνης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται σε ένα σχεδόν υγρό περιβάλλον, όπου όλα τα επιμέρους υλικά έχουν εμποτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, πάνω στη πλάκα όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος, τοποθετούνται με τη σειρά:

- 2 χαρτιά Whatman 3MM
- η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- η πηκτή
- 2 χαρτιά Whatman 3MM

Transfer Buffer:

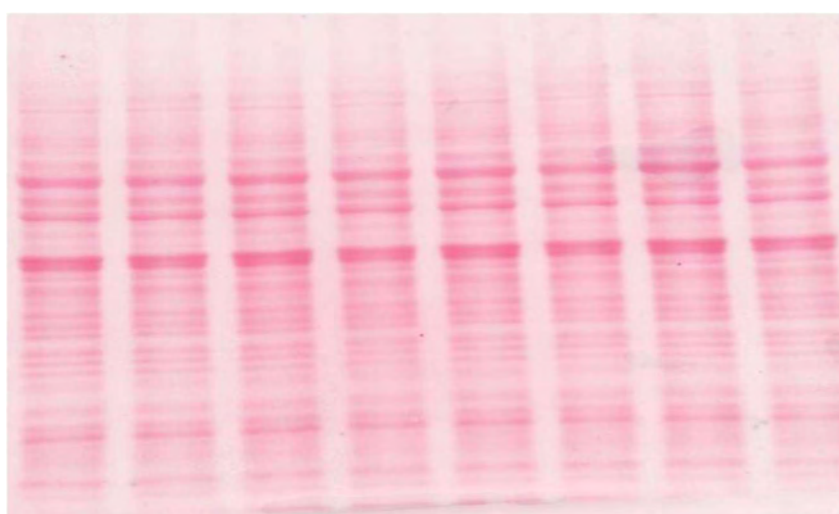
125 mM Tris-Borate (pH 8.5)
0.2% SDS
0.5 mM DTT



Εικόνα 3.5 Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανατύπωση από: Wikipedia.org

Καθένα από τα παραπάνω μέρη επιστρώνεται το ένα πάνω στο άλλο με ιδιαίτερη προσοχή στο να μη δημιουργούνται φυσαλίδες μεταξύ τους, καθώς αυτό θα παρεμπόδιζε τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος. Η πηκτή τοποθετείται προσανατολισμένη προς τον αρνητικό πόλο. Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται σε συνθήκες 10 V για 60 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο reqlab® Semi-Dry Blotter (VWR).

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς για να ελέγξουμε αν έγινε επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S. (Εικόνα 3.6). Η χρωστική αυτή βάφει τις πρωτεΐνες οπότε στην επιτυχή μεταφορά παρατηρήσαμε ζώνες πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, το διάλυμα Ponceau S. ξεβάφεται από τη μεμβράνη με αποσταγμένο νερό και διάλυμα 1x PBS.

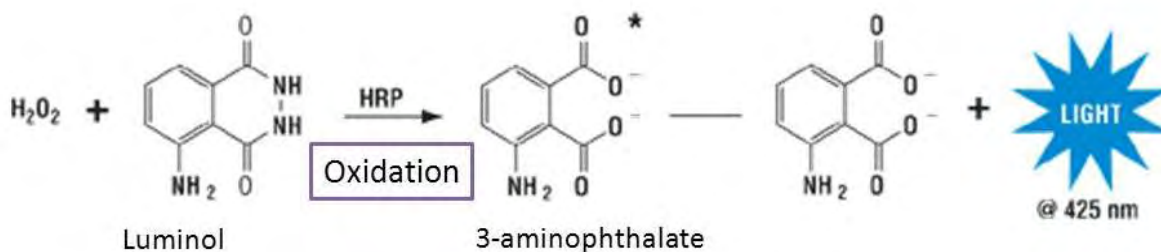


Εικόνα 3.6 Χρωματισμός των πρωτεϊνικών ζωνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S που υποδεικνύει την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Ανατύπωση από: www.protocol-online.org

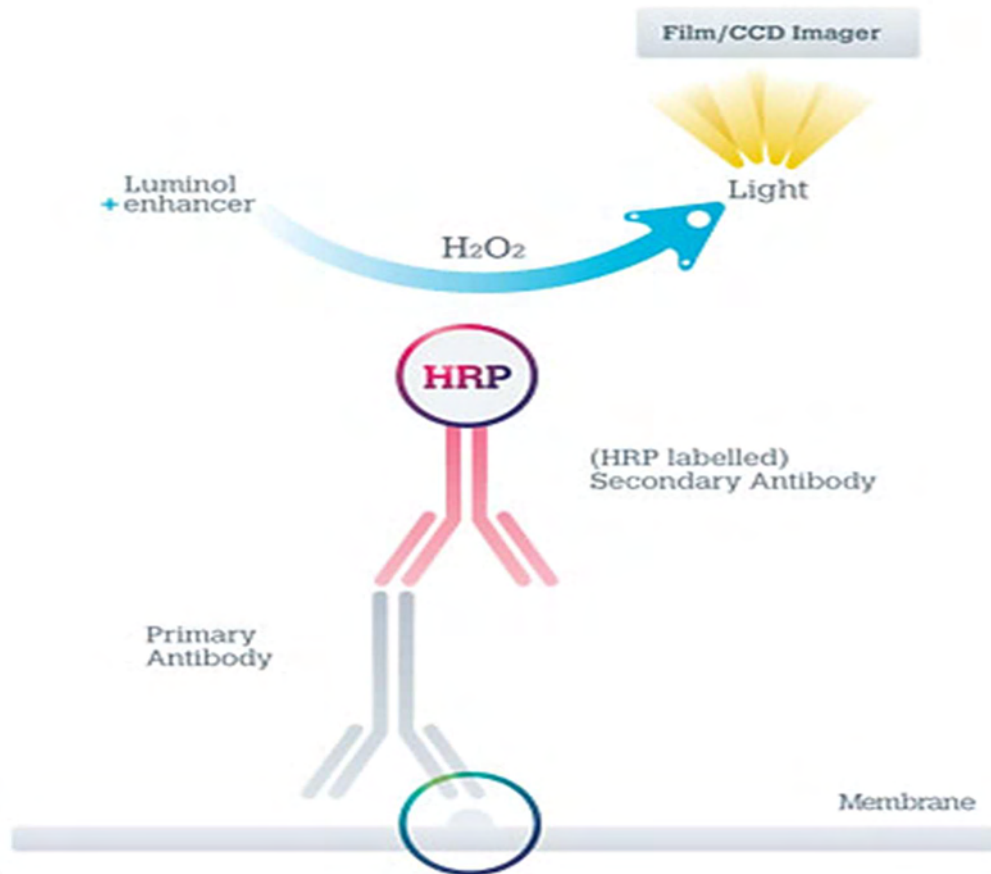
3.2.6 Ανοσοανίχνευση

Για την μέθοδο της ανοσοανίχνευσης η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις αποτυπωμένες πρωτεΐνες εμβαπτίζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού. Αυτό αποτελείται από 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS. Η καζεΐνη του γάλακτος προσδένεται σε βαθμό κορεσμού στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθά στην αποφυγή όλων των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με τη μεμβράνη. Κατόπιν η μεμβράνη επώάζεται με το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού ή σκέτο 1x PBS. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση στους 4°C για 16 ώρες. Μετά την επίδραση του 1^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με 1x. Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το 2^ο αντίσωμα έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού ή ποντικού σε αραιώση 1:10000 σε διάλυμα κορεσμού. Τα δεύτερα αντισώματα, που είναι συνδεδεμένα με την Horseradish peroxidase, προέρχονται από την εταιρία Cell Signaling. Μετά τη σύνδεση του 2^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 5 λεπτών. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών προϋποθέτει την αντίδραση χημειοφωταύγειας κατά την οποία η υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων (

Εικόνα 3.7). Προετοιμάζεται διάλυμα που περιέχει 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1.25 mM λουμινόλης σε Tris-Cl pH 8.5), 30 μl H₂O₂ και 100 μl κουμαρικό οξύ (6.8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) που δρα σαν ενισχυτής της αντίδρασης. Το διάλυμα επώάζεται για 1-2 λεπτά με τη μεμβράνη για να γίνει η αντίδραση. Στη συνέχεια το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού της Uvitec Alliance.



Εικόνα 3.7 Αντίδραση χημειοφωταύγειας κατά την οποία η υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂ με ταυτόχρονη εκπομπή φωτός. Ανατύπωση από www.thermofisher.com



Εικόνα 3.8 Αναπαράσταση της ανοσοανίχνευσης βάση χημειοφωταύγεια. Ανατύπωση από www.crbdiscovery.com.

3.2.7 Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Απόδοσης, γνωστή ως Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η HPLC είναι μια δυναμική διεργασία προσρόφησης (adsorption). Τα προς ανάλυση μόρια, κατά την κίνησή τους μέσω του πορώδους υλικού πλήρωσης της στήλης τείνουν να αλληλεπιδράσουν με θέσεις της προσροφητικής επιφάνειας, ενώ ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση.

Οι βασικές μονάδες ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι:

- Το σύστημα της αντλίας (pump).
- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve).
- Στήλη (column).
- Ανιχνευτής (detector).
- Καταγραφικό.
- Υπολογιστής -εκτυπωτής

Το σύστημα αντλίας περιλαμβάνει το δοχείο του διαλύτη, τα διάφορα φίλτρα και τις διατάξεις πίεσης και ροής. Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλυση (isocratic), ή φιάλες μέχρι τέσσερις στη βαθμωτή έκλυση (gradient) όπου τοποθετούνται οι διαλύτες και απαερώνονται. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να φύγουν όλα τα διαλυμένα αέρια και κυρίως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα και μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής.

Η εισαγωγή του υγρού δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα κατευθείαν στη στήλη, ή συνήθως διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόγχο.

Οι κυρίως στήλες ή απλά στήλες HPLC είναι κυλινδρικές από ανοξείδωτο μέταλλο, ή πλαστικό κατάλληλο, ώστε να αντέχουν στις μεγάλες πιέσεις που εξασκούν επάνω τους οι αντλίες. Οι διαστάσεις τους είναι 10-50 cm και η διάμετρός τους 1-5mm. Αγοράζονται έτοιμες από τις κατασκευάστριες εταιρίες. Το εσωτερικό τους πληρούται με λεπτόκοκκο αδρανές υλικό που οι πόροι του καλύπτονται με την υγρή στατική φάση.

Οι ανιχνευτές στην HPLC χρησιμοποιούνται τόσο για τον ποιοτικό, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς μελέτη ουσιών. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών και η επιλογή του κατάλληλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του προς ανάλυση μίγματος. Ένας εκ των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην HPLC και UHPLC, είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode-Array Detector, PDA), με τον οποίο ολόκληρο το φάσμα μιας ουσίας καταγράφεται σε δευτερόλεπτα, καθώς εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη. Ο ανιχνευτής αυτός συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους (69).

Η UPLC αντιπροσωπεύει μια βελτιωμένη και εκσυγχρονισμένη εκδοχή της HPLC με σημαντικές καινοτομίες στην οργανολογία και στην τεχνολογία των σωματιδίων. Με τη χρήση στηλών νέας γενιάς πακεταρισμένες με σωματίδια μεγέθους 1.7 μm και όργανα σχεδιασμένα με εξειδικευμένες ικανότητες για να παρέχουν την κινητή φάση με πιέσεις έως και 15.000 psi, κατάφερε να επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην ανάλυση, στην ταχύτητα και στην ευαισθησία (69)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 UHPLC (Εικόνα 3.9).



- ▶ ΔΙΑΛΥΤΕΣ
- ▶ ΑΝΤΑΙΑ
- ▶ ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ
- ▶ ΦΟΥΡΝΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜ/ΚΗ ΣΤΗΛΗ
- ▶ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ PDA

Εικόνα 3.9 Σύστημα ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ DIONEX MODEL ULTIMATE 3000 UHPLC με ανιχνευτή PDA. Ανατύπωση από www.thermofischer.com

Για τη λειτουργία του συστήματος αυτού και την ανάλυση των δειγμάτων απαιτείται η εξοικείωση με το λογισμικό Chromeleon του συστήματος MODEL ULTIMATE 3000, δηλαδή η δημιουργία μιας sequence και ενός προγράμματος με το οποίο θα γίνει η ανάλυση της sequence. Για την ανάλυση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- Αναλυτική στήλη: SUPERALCO C18 (15cm X 4,6mmX 5μm)
- Εκλουστικό σύστημα (κινητή φάση): Ακετονιτρίλιο (C₂H₃N) 100% και H₂O με ακετοτονιτρίλιο 90%:10%, με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης
- Πίεση: 3500-4500psi
- Ταχύτητα ροής: 1mL/min
- Θερμοκρασία στήλης: 50°C
- Όγκος έγχυσης: 500μl

3.2.7.1 Προκατεργασία των δειγμάτων για ανάλυση UHPLC

Για τα δείγματα θρεπτικού μέσου κυττάρων Huh7, πριν εισαχθούν για χρωματογραφική ανάλυση στο παραπάνω σύστημα, ακολουθήθηκε συγκεκριμένη κατεργασία για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό του δείγματος:

- Προσθήκη ακετονιτριλίου στάγδην σε όγκο 1:1 με το δείγμα για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών
- Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με συσκευή vortex για λίγα δευτερόλεπτα και φυγοκέντριση στα 4000x g για 15 λεπτά στους 4°C
- Μετά την φυγοκέντριση, παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο, γιατί στο ίζημα συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν την ανάλυση
- Τέλος, το υπερκείμενο εισάγεται σε φίλτρο σύριγγας PVDF syringe filter 0.2µm, η χρήση του οποίου βοηθά στην κατακράτηση πιθανόν προσμίξεων ή πρωτεϊνών που υπάρχουν στο υπερκείμενο.

Έτσι, με τον τρόπο επεξεργασίας τα δείγματα που εισάγονται στη χρωματογραφική στήλη είναι καθαρά από προσμίξεις και δεν δημιουργούν προβλήματα επιμόλυνσης στη στήλη.

Στην παρούσα εργασία, τα δείγματα θρεπτικού μέσου επεξεργάστηκαν με αυτόν τον τρόπο πριν την ανάλυσή τους με UHPLC για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της 25OHD στο θρεπτικό μέσο. Το πρόγραμμα και οι συνθήκες ανάλυσης για την ποσοτικοποίηση της 25OHD που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν σε προηγούμενη μέθοδο ανάλυσης και ποσοτικοποίησης για την 25OHD που είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο (70).

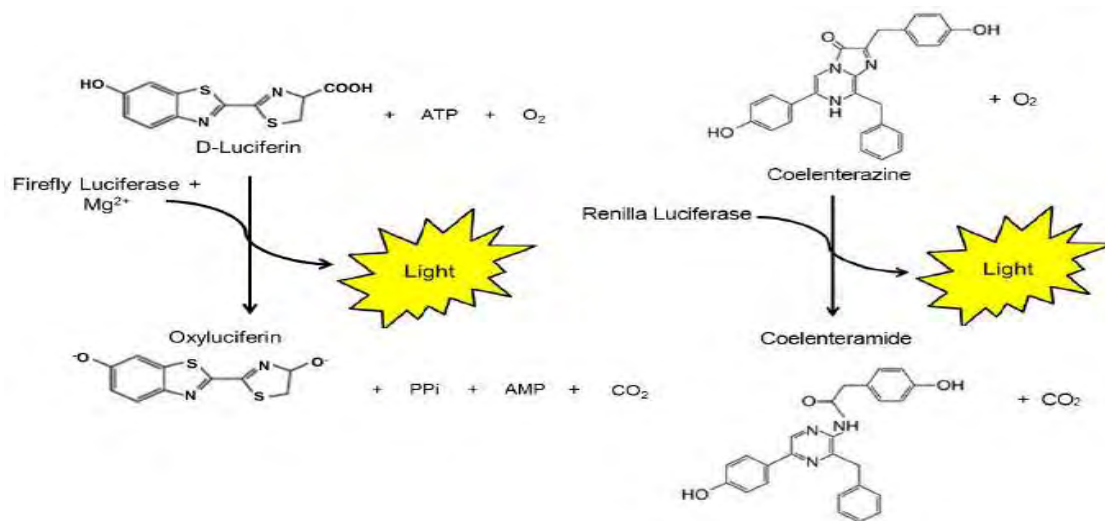
3.2.8 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF1α και HIF2α

Η δοκιμασία λουσιφεράσης (luciferase assay) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της μεταγραφικής ενεργότητας ενός γονιδίου με τη βοήθεια ενός παράγοντα αναφοράς, της λουσιφεράσης. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία “Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR) που έχει αναπτυχθεί από την εταιρία Promega (Promega E1960) και επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και μέτρηση δύο διαφορετικών ενζύμων αναφοράς (reporter enzymes) σε ένα μοναδικό σύστημα.

Κατά τη διαδικασία DLR γίνεται η μέτρηση της ενεργότητας δύο ενζύμων αναφοράς, της Firefly και της Renilla λουσιφεράσης. Τα δύο αυτά ένζυμα είναι κλωνοποιημένα σε δύο διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Το ένα ένζυμο (στην περίπτωσή μας η Firefly λουσιφεράση) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας ενός ρυθμιστικού στοιχείου που είναι κλωνοποιημένο ανοδικά αυτού (upstream), και το δεύτερο ένζυμο (Renilla λουσιφεράση) χρησιμοποιείται σαν control της διαμόλυνσης (transfection control).

Ο pGL3-VEGF-5HRE χρησιμοποιείται σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs. 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. 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.

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{2+} (Εικόνα 3.10). 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 χρησιμοποιείται για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται το pGL3-VEGF-5HRE και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιείται το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια γίνεται με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το πολυμερές PEI.



Εικόνα 3.10 Αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα Firefly και Renilla λουσιφεράση παράγοντας ταυτόχρονα φως
Ανατύπωση από www.bpsbioscience.com

3.2.8.1 Πρωτόκολλο δοκιμασίας λουσιφεράσης

Αποτελείται από δύο βήματα, αρχικά γίνεται η παθητική λύση των κυττάρων και στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης.

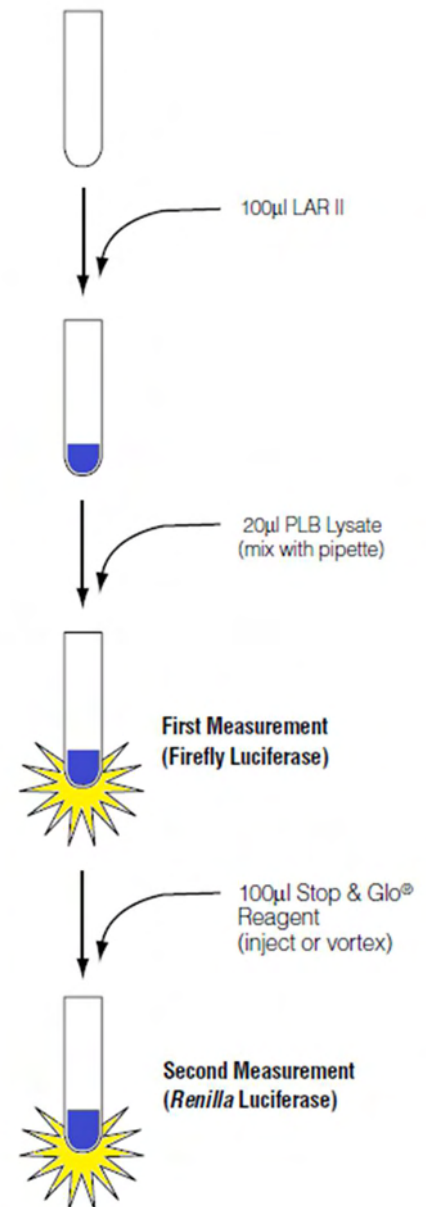
Παθητική λύση κυττάρων

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα.

2. Ξεπλύνουμε με PBS 1x.
3. Προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι 70 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay system kit της Promega).
4. Τοποθετούμε το 24-well plate με τα κύτταρα σε πλατφόρμα ανακίνησης, και ανακινούμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

Μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης

1. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου.
2. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμιγνύονται με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παράγεται μετράται σε λουμινόμετρο.
3. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 20 μl από το διάλυμα stop & glow (του luciferase assay reagent, Promega) προστίθενται στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παράγεται μετράται ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glow σταματάει την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και ταυτόχρονα επάγει τη δράση της Renilla λουσιφεράσης. (Εικόνα 3.11)
4. Ο λόγος που προκύπτει από τη διαίρεση της τιμής της Firefly λουσιφεράσης προς την τιμή της Renilla λουσιφεράσης δείχνει τη μεταγραφική ενεργότητα κάθε ρυθμιστικού στοιχείου (RLU, Related Luciferase Units, σχετικές μονάδες λουσιφεράσης): $RLU = \text{firefly luciferase} / \text{renilla luciferase}$



Εικόνα 3.11 Δοκιμασία “Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR).

Ανατύπωση από

www.promega.com

3.2.9 Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας

3.2.9.1 Απομόνωση ολικού κυτταροπλασματικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία με μικρές παραλλαγές. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Σε άσηπτες συνθήκες έγινε προσθήκη 400 µl NucleoZOL σε κύτταρα που ιζηματοποιήθηκαν μετά την αιώρησή τους σε κρύο PBS. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 160 µl RNase free H₂O. Παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 30 s. Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 12000 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης ~500 µl μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου erendorf και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά 12000 x g. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 400 µl 75% αιθανόλης και φυγοκέντρηση τριών λεπτών 12000 x g. Αφαιρείται η αιθανόλη και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 12000 x g για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 30 µl ελεύθερο ριβονουκλεασών H₂O.

3.2.9.2 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoFischer). Πιο συγκεκριμένα με μια πολύ μικρή ποσότητα 2 µl του δείγματος RNA προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του και ο λόγος απορρόφησης 260/280nm. Ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο της καθαρότητας του RNA και των προσμίξεων από DNA ή πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 ως 2. Στη μέτρηση των δειγμάτων ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας.

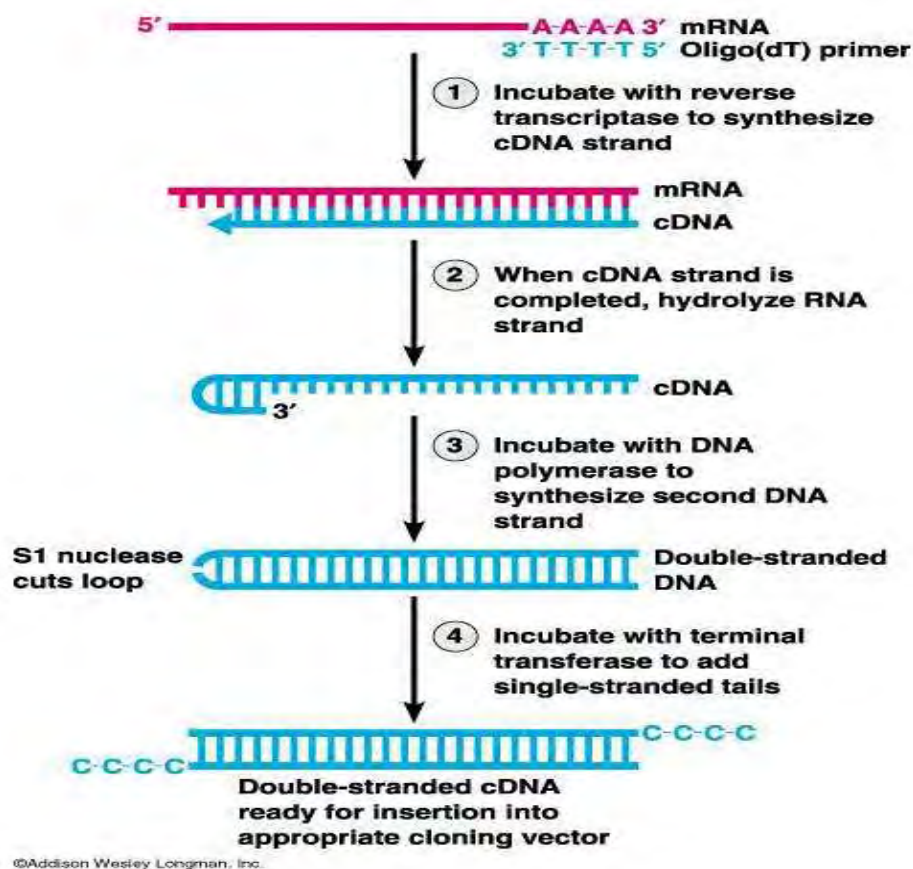
3.2.9.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, RT-PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον

τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, παράγονται αντίγραφα cDNA από εκμαγείο mRNA. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (σύνθεση πρώτου κλώνου). Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση του επόμενου κλώνου και στα ακόλουθα βήματα ολοκληρώνεται η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

3.2.9.3.1 Σύνθεση cDNA

Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Αυτή η RNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από ρετροϊούς, χρειάζεται τη προσθήκη κατάλληλων εκκινήτων για να ξεκινήσει τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Στη συνέχεια η RNA αλυσίδα καταβολίζεται σε πολλά σημεία από τη δράση RNάσης. Τελικά, μια DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο DNA, ενώ μια λιγάση ενώνει τα κομμάτια με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA.



Εικόνα 3.12 Αναπαράσταση της ανάστροφης μεταγραφής. Ανατύπωση από: www.mua/ca.biology.com

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit της εταιρείας Applied Biosystems και εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα η αντίδραση ετοιμάζεται στον πάγο ως εξής:

- 10μl δείγματος RNA 1μg
- 2μl RT Buffer (αρχικής συγκέντρωσης 10x)
- 0,8μl dNTP mix (αρχικής συγκέντρωσης 100mM)
- 2μl τυχαίων εκκινητών
- 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4,2μl H₂O

Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση των εκκινητών)
- 37°C για 120 λεπτά (ανάστροφη μεταγραφή)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C – ψύξη

Στα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 80μl ddH₂O (διπλά αποσταγμένο νερό) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.9.3.2 PCR πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός αρχικού δείγματος DNA μέσω της συνεχούς ανίχνευσης της ενίσχυσής του. Η ενίσχυση του αρχικού δείγματος βασίζεται στη κλασική PCR με τα διαδοχικά στάδια της αποδιάταξης των δύο κλώνων, της σύνδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης από μια DNA πολυμεράση. Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται στη πρόσδεση στα ενισχυόμενα μόρια DNA μιας φθορίζουσας ουσίας και ανίχνευση της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος στο δίκλωνο DNA. Η φθορίζουσα ουσία μπορεί να είναι ειδική για μια ενισχυόμενη αλληλουχία επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό της από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών.

Στη παρούσα εργασία η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Syber Green mix (Applied Biosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, Mogul₂, dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου PGK1 (κινάση του φωσφογλυκερικού 1), της ερυθροποιητίνης (EPO), του αναστολέα του ενεργοποιητή του

πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αλλά και αυτό του 18S που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα mRNA του τελευταίου δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

Παρασκευάζονται δύο μείγματα για τα τρία διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 10 pMol/μl ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H₂O απαλλαγμένο από RNάσες και DNάσες (ThermoFisher Scientific). Σε 7,5μl μείγματος προσθέτουμε 2,5μl cDNA. Κάθε συνθήκη ελέγχθηκε εις τριπλούν, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA που έγινε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης και αφετέρου δείγμα με H₂O αντί για cDNA.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τα γονίδια 18S και PGK1 και PAI-1 είναι οι ακόλουθες:

1. 95°C για 180 δευτερόλεπτα
2. 95°C για 3 δευτερόλεπτα
3. 60°C για 30 δευτερόλεπτα
4. 95°C για 10 δευτερόλεπτα
5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης

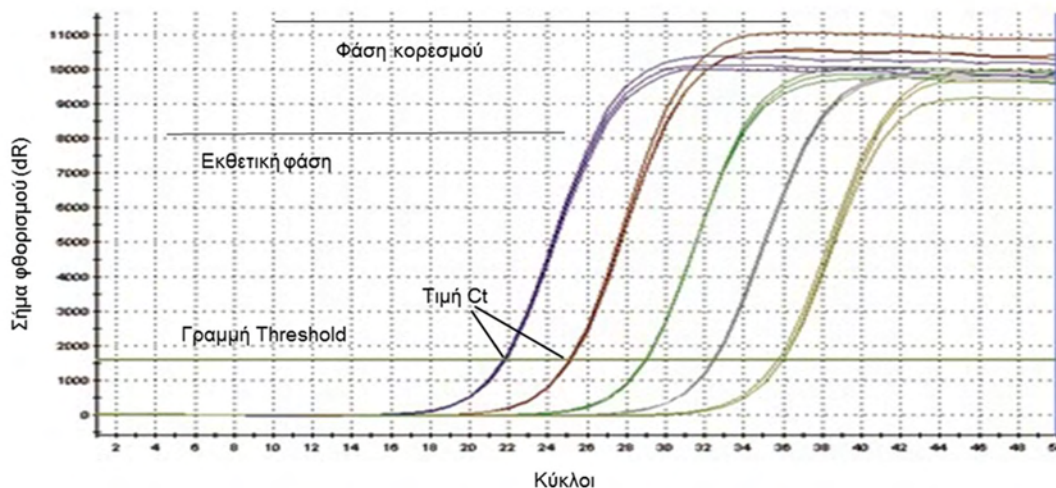
Οι συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο της EPO είναι οι ακόλουθες:

1. 50°C για 2 λεπτά
2. 94°C για 10 λεπτά
3. 95°C για 15 δευτερόλεπτα
4. 60°C για 1 λεπτό
5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης

3.2.9.3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

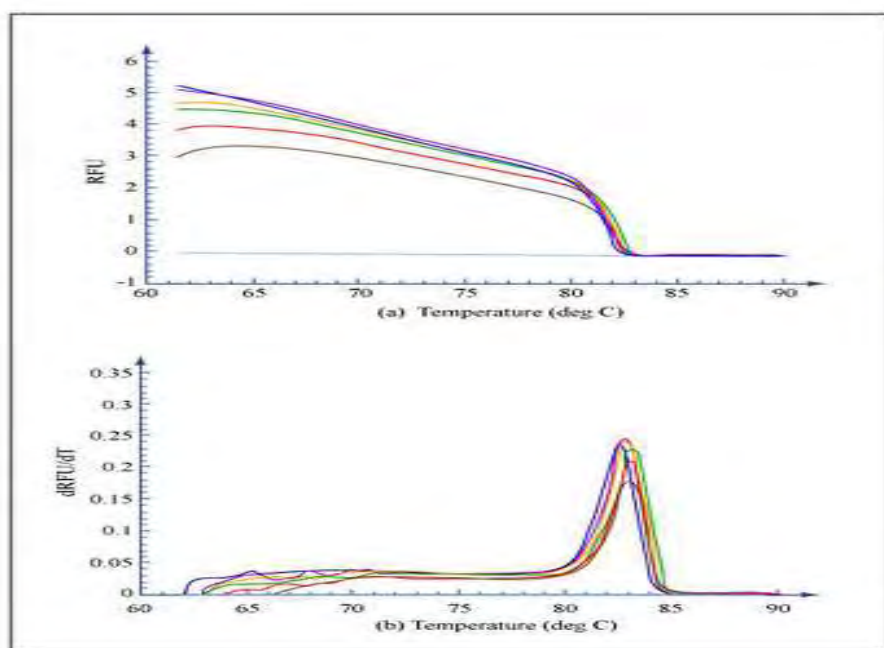
Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει σε πραγματικό χρόνο την αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε: εκθετική φάση και τη φάση κορεσμού. Η μεταβολή των φάσεων σχετίζεται με την σταδιακή εξάντληση των αντιδραστηρίων (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) και τη συσσώρευση μορίων που δρουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Έτσι ενώ στην εκθετική φάση ο διπλασιασμός του αρχικού προϊόντος γίνεται ιδανικά, ακολούθως η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της, και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της

αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (71), (72).



Εικόνα 3.13 Καμπύλη ενίσχυσης cDNA δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR Ανατύπωση από: www.bioline.com

Η ενίσχυση των προϊόντων ακολουθείται από την αποδιάταξή τους σε ένα στάδιο αυξανόμενης θερμοκρασίας. Καθώς η θερμοκρασία τήξης των δίκλωνων μορίων επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, το σημείο τήξης T_m (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος. Από την άλλη με την αποδιάταξη των κλώνων, η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης των προϊόντων της Real-Time PCR μέσω μιας καμπύλης τήξης. Η καμπύλη αυτή εμφανίζει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και σε επόμενο στάδιο τον λόγο της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ($-dF/dT$). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βοηθάει στον έλεγχο της ειδικότητας και της καθαρότητας των προϊόντων αντίδρασης ενίσχυσης, καθώς αποκαλύπτει πιθανό διμερισμό εκκινητών ή επιμόλυνση με ξένο DNA. Τα μόρια DNA που ενισχύθηκαν στοχευμένα κατά την αντίδραση, αναμένονται να συμβαδίζουν και να συσσωρεύονται σε κοινή κορυφή στη καμπύλη τήξης. Αντίθετα, επιμολύνσεις θα δώσουν μεταβολή φθορισμού σε πολλαπλά σημεία τήξης.



Εικόνα 3.1 Αναπαράσταση τυπικής καμπύλης τήξης με χρήση της SYBR Green, πάνω: μονάδες φθορισμού σε συνάρτηση με θερμοκρασία, κάτω: λόγος μεταβολής φθορισμού/μεταβολή θερμοκρασίας σε συνάρτηση με θερμοκρασία. Ανατύπωση από:MIT OpenCourseWare

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA γίνεται με τη μέθοδο της $\Delta\Delta Ct$ (διαφορά της διαφοράς των κύκλων). Για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά Ct (ΔCt) του γονιδίου στόχου (*PGK1, EPO*) και του 18S και στη συνέχεια από το ΔCt κάθε δείγματος αφαιρείται το ΔCt του δείγματος μάρτυρα (18S). Στη συνέχεια υπολογίζεται η δύναμη με βάση το δύο $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ που εκφράζει τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

3.2.10 Στατιστική ανάλυση

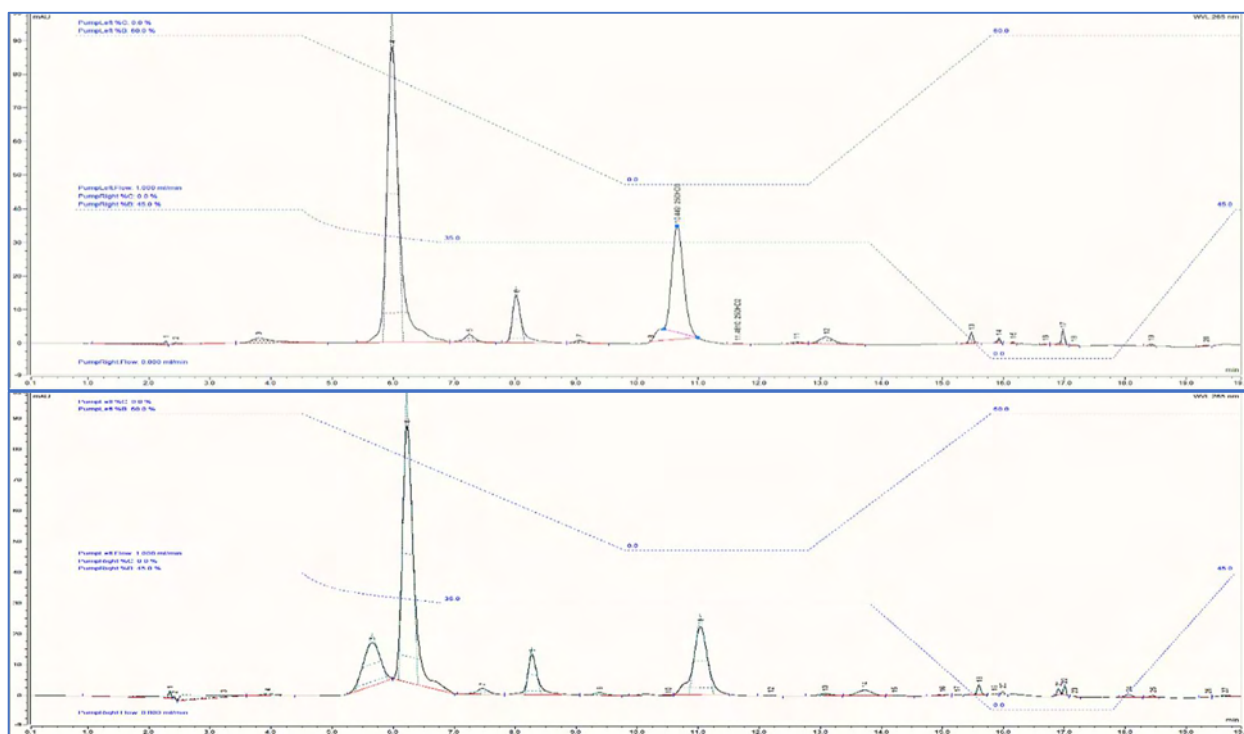
Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad InStat με ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD). Το στατιστικά σημαντικό όριο είναι $***p < 0,005$ και $**p < 0,001$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Εκτίμηση της διαμεμβρανικής μεταφοράς της 25OHD με UHPLC

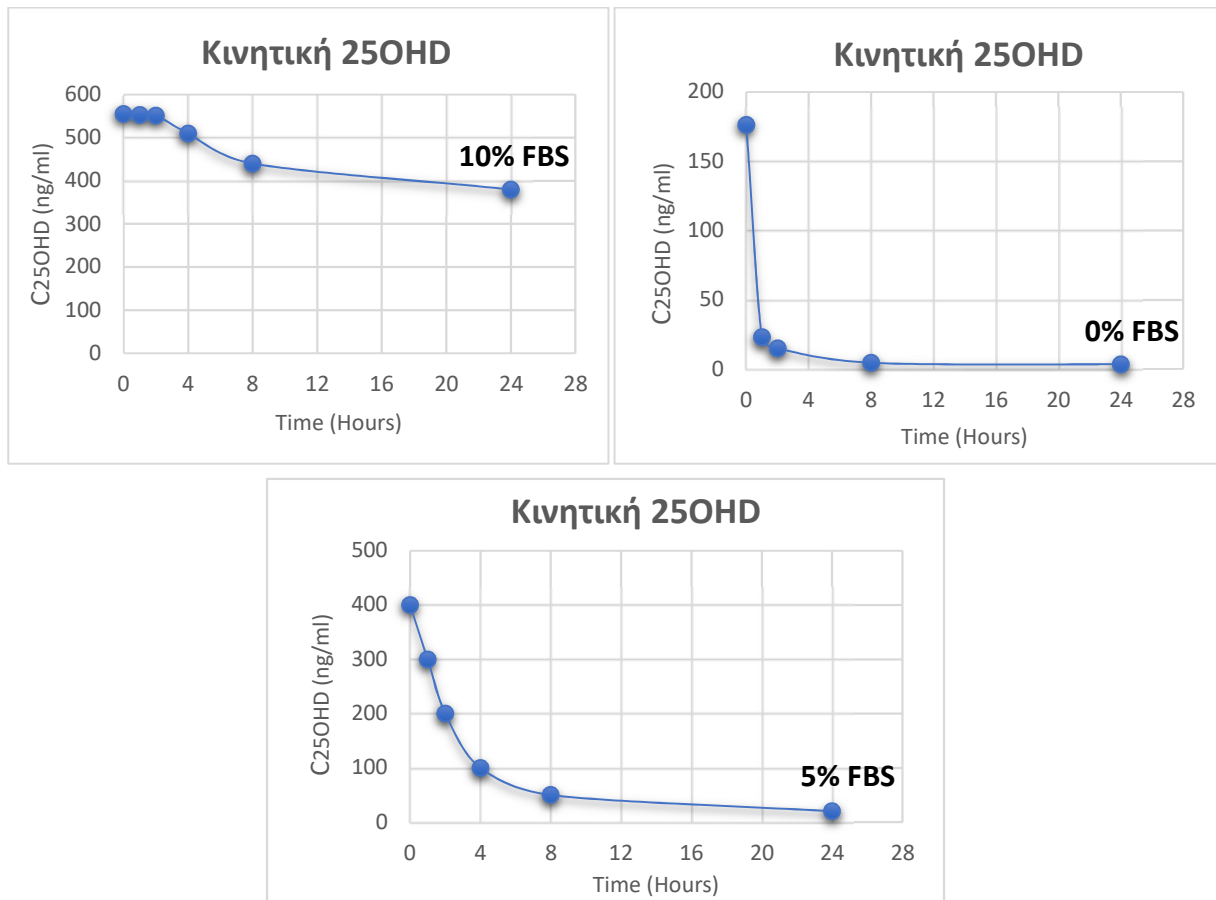
Για την εκτίμηση της διαμεμβρανικής μεταφοράς της 25OHD και ορθής επιλογής των συνθηκών των πειραμάτων της 25OHD και για να εξακριβώσουμε αν εισέρχεται στα κύτταρα πραγματοποιήσαμε προσθήκη της στο θρεπτικό μέσο κυττάρων Huh7 σε συγκέντρωση 2,4μΜ και επώαση των κυττάρων για 0, 1, 2, 4, 8 και 24 ώρες. Μετά την επώαση των κυττάρων με τη βιταμίνη στις παραπάνω ώρες το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε (1ml) για κάθε χρονική στιγμή και έγινε προκατεργασία του για ανάλυση UHPLC με ανιχνευτή σειράς διόδων (DAD) (3.2.7.1). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές με διαφορετική σύσταση του ορού βοός (FBS) στο θρεπτικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε με 10%, 0% και 5% FBS. Κατά τη χρωματογραφική ανάλυση για τον προσδιορισμό της κινητικής της 25OHD σε κάθε συνθήκη υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της με βάση της προ υπάρχουσας μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για την 25OHD (70).

Η 25OHD ανιχνεύεται στα δέκα λεπτά (εικόνα 4.1 α, β) και η ταυτοποίησή της στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση του χαρακτηριστικού χρόνου έκλυσης (συγκράτησης) t_R και φάσματος υπεριώδης-ορατού σε τρία σημεία της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής. Σε όλες τις περιπτώσεις τα φάσματα ήταν ταυτόσημα δείχνοντας απουσία συν-εκλυόμενων ενώσεων και χωρίς παρεμποδίσεις στην εμφάνιση της κορυφής της για κάθε χρονική στιγμή (Εικόνα 4.1α, β).



Εικόνα 4.1 Χρωματογραφήματα που αναπαριστούν την ανίχνευση της 25OHD στα δέκα λεπτά στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων Huh7 στις α) 0 ώρες μετά την προσθήκη της (control) β) στις 8 ώρες μετά την προσθήκη της

Βάση των προσδιορισμών σχεδιάστηκαν οι καμπύλες χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης της 25OHD σε θρεπτικό μέσο (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 Διαγράμματα κινητικής της 25OHD που αναπαριστούν τη μεταβολή της συγκέντρωσής της στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων Huh7 σε σχέση με το χρόνο, σε 10%, 0% και 5% FBS.

Στο θρεπτικό μέσο με 10% FBS δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης της 25OHD στο διάστημα των 24 ωρών. Σε αντίθεση στο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε καθόλου FBS η συγκέντρωση της 25OHD φαίνεται να μειώνεται από την πρώτη ώρα και να ακολουθεί απότομη μείωση. Τέλος με την προσθήκη συγκέντρωσης 5% FBS στο θρεπτικό μέσο η συγκέντρωση της 25OHD μειώνεται σταδιακά και παρατηρείται μια ενδιάμεση εικόνα σε σχέση με τις δυο πρώτες κινητικές.

Για το λόγο αυτό φαίνεται ότι η είσοδος της 25OHD στα κύτταρα παρεμποδίζεται ή γίνεται με αργό τρόπο όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει συγκέντρωση 10% FBS. Η 25OHD είναι υδρόφοβη ουσία και συνήθως κυκλοφορεί δεσμευμένη σε μεγάλο βαθμό σε πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η δεσμεύουσα πρωτεΐνη της βιταμίνης D (DBP) και η αλβουμίνη. Η δέσμευση αυτή επιβραδύνει σημαντικά την μεταφορά της βιταμίνης στο ενδοκυττάριο χώρο. Πιθανόν αυτή η παρεμπόδιση να οφείλεται σε σύνδεση της 25OHD με άλλες πρωτεΐνες που υπάρχουν στο FBS.

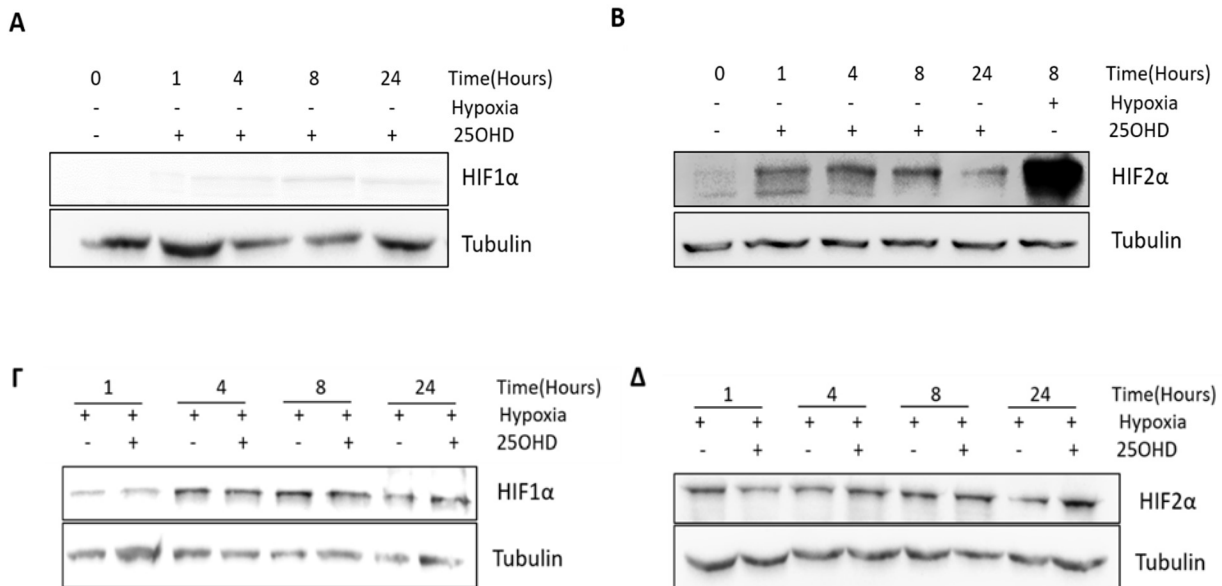
Έτσι, επιλέχθηκε η 25OHD να προστίθεται στα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο 5% FBS για να εξασφαλίζεται η είσοδός της. Το θρεπτικό μέσο με 0% FBS δεν αποτελεί κατάλληλη συνθήκη για το λόγο ότι τα κύτταρα χρειάζονται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους τα θρεπτικά στοιχεία που περιέχονται στον ορό βοός (FBS). Δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί με τη συγκεκριμένη UHPLC-DAD μέθοδο η συγκέντρωση της 25OHD στο ενδοκυττάριο υγρό λόγω συνεκλούμενων ενδοκυτταρικών ενώσεων. Η ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας δεν υπήρξε ως στόχος της συγκεκριμένης εργασίας.

4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΡΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΣΑΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΣΤΟ ΣΗΜΑΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ HIFs.

Η 25OHD είναι βασικός μεταβολίτης και η κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει μεγάλη δομική ομοιότητα με τον τελικό βιοδραστικό μεταβολίτη 1,25 (OH)₂D με αναγνωρισμένη ορμονική δράση. Οι δύο μεταβολίτες, 25(OH)D και 1,25(OH)₂D, διαφέρουν μόνο σε ένα υδροξύλιο, όμως τα επίπεδα της 25(OH)D στην κυκλοφορία βρίσκονται σε συγκέντρωση περίπου 1000 μεγαλύτερη. Βάση της δομικής ομοιότητας μπορεί να υποθέσει κανείς και την ύπαρξη κάποιας ομοιότητας στο βιολογικό ρόλο των δυο μεταβολιτών. Παρόλα αυτά ως σήμερα οι μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στις βιολογικές δράσεις της 1,25(OH)₂D, αγνοώντας ότι στον οργανισμό παράλληλα κυκλοφορεί σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις η 25(OH)D. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της 25(OH)D στη ρύθμιση των HIF για να εξεταστεί ο άγνωστος μέχρι τώρα ρόλος της και η ύπαρξη κοινής δράσης και ρόλου με την 1,25(OH)₂D.

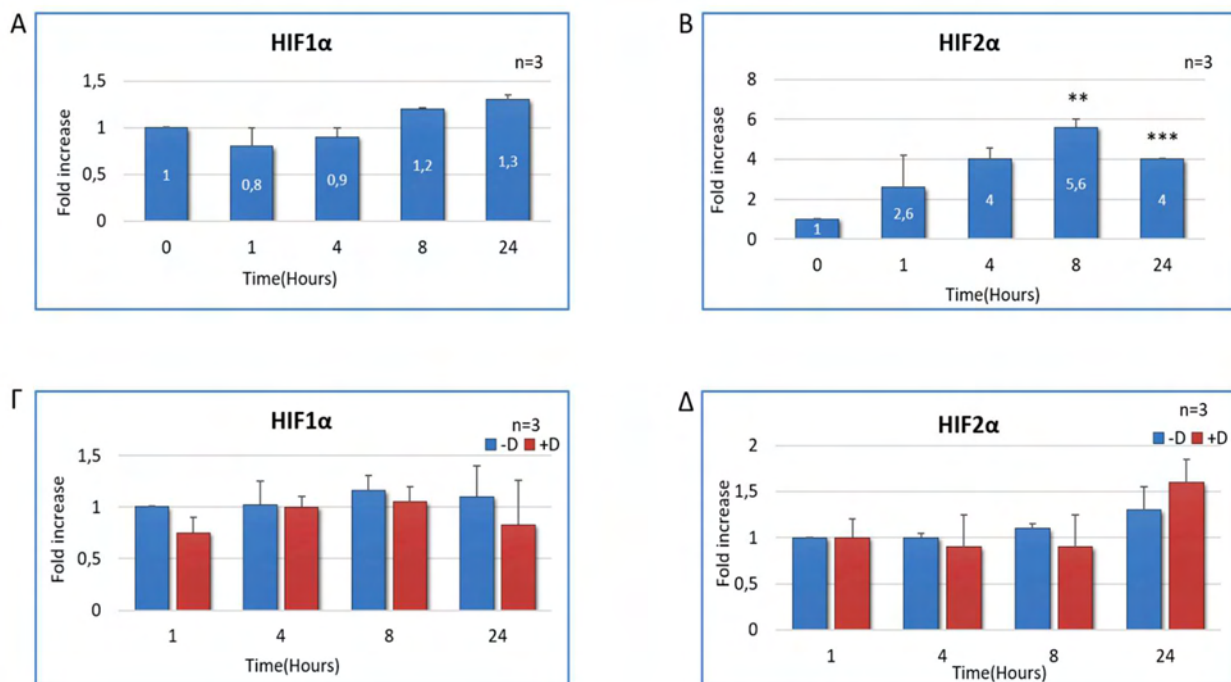
4.2.1 Επίδραση της 25OHD στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF1α και HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Για να ερευνήσουμε αν η 25OHD, η κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D, ασκεί κάποια επίδραση στους παράγοντες HIFs, καρκινικά κύτταρα Huh7 εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 2,4μΜ του μεταβολίτη για 0,1,4,8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας στους 37°C όσο και υποξίας (1% O₂). Μετά την προσθήκη της, ακολούθησε προεπάση 1 ώρας για να εισέλθει στα κύτταρα, όπως δείχθηκε και στην παραπάνω κινητική της, και στη συνέχεια ξεκίνησε η επώαση σε νορμοξία και υποξία. Μετά την επώαση, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο και λύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.2. Στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (3.2.4) χρησιμοποιώντας τα αντισώματα έναντι του HIF1α (αραίωση 1:1000), του HIF2α (αραίωση 1:600) και της τουμπουλίνης (αραίωση 1:10000). Στην Εικόνα 4.3 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τον HIF1α και για τον HIF2α.



Εικόνα 4.3 Ανοσοαποτίπωση κατά Western όπου ελέγχονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α σε κύτταρα Huh7 : A,B) σε συνθήκες νορμοξίας με την πάροδο 0,1,4,8 και 24 ωρών από την προσθήκη 2,4μM 25OHD. Στις 8 ώρες φαίνεται και η control συνθήκη υποξίας χωρίς την προσθήκη 25OHD για την εξακρίβωση έκφρασης του HIF. Γ,Δ) σε συνθήκες υποξίας χωρίς και με την προσθήκη 25OHD για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα.

Παρατηρούμε στις εικόνες 4.3A και 4.3B αντίστοιχα ότι σε συνθήκες νορμοξίας δεν μεταβάλλονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α μετά από 24 ώρες από την προσθήκη της 25OHD, ενώ παρατηρούμε χρονοεξαρτώμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF2α από την πρώτη ώρα προσθήκης της 25OHD. Ενώ σε συνθήκες υποξίας, με ή χωρίς την προσθήκη 25OHD, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF1α και HIF2α δεν παρατηρήθηκε να έχουν συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του μεταβολίτη και της υποξίας (4.3Γ και 4.3Δ). Το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές σε κύτταρα Huh7 και κάθε φορά εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF σε νορμοξία και υποξία με την προσθήκη της 25OHD. Τα αποτελέσματα και των τριών πειραμάτων ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την ένταση του σήματος των ζωνών σε κάθε μεμβράνη ανοσοαποτίπωσης και κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την τουμπουλίνη. Τα αποτελέσματα για κάθε συνθήκη παρουσιάζονται στα διαγράμματα A-Δ στην εικόνα 4.4.



Εικόνα 4.4 Ποσοτικοποίηση με βάση την ένταση του σήματος των ζωνών και κανονικοποίηση σε σχέση με την τουμπουλίνη A, B) σε συνθήκες νορμοξίας για 0,1,4,8 και 24 ώρες μετά την προσθήκη της 25OHD για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α αντίστοιχα και Γ,Δ) σε συνθήκες υποξίας χωρίς και με την προσθήκη 25OHD στα ίδια χρονικά διαστήματα τόσο για τον HIF1α όσο και για τον HIF2α (3 πειράματα).

Με βάση την ποσοτικοποίηση των τριών πειραμάτων φαίνεται ότι σε συνθήκες νορμοξίας υπάρχει μια χρονοεξαρτώμενη στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF2α με την προσθήκη 25OHD με μέγιστο τις 5,6 φορές στις 8 ώρες νορμοξίας και μια μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του HIF1α. Σε συνθήκες υποξίας δεν παρατηρείται μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων για κανέναν από τους HIFs. Συνεπώς φαίνεται ότι υπάρχει διαφορετική επίδραση της 25OHD στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας, ενώ η 25OHD δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση των HIFs σε συνθήκες υποξίας.

Στη συνέχεια των παραπάνω αποτελεσμάτων τέθηκαν τα ερωτήματα αν η 25OHD επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs ή/και την πρωτεϊνική σταθερότητα τους σε συνθήκες νορμοξίας που φυσιολογικά αποικοδομούνται.

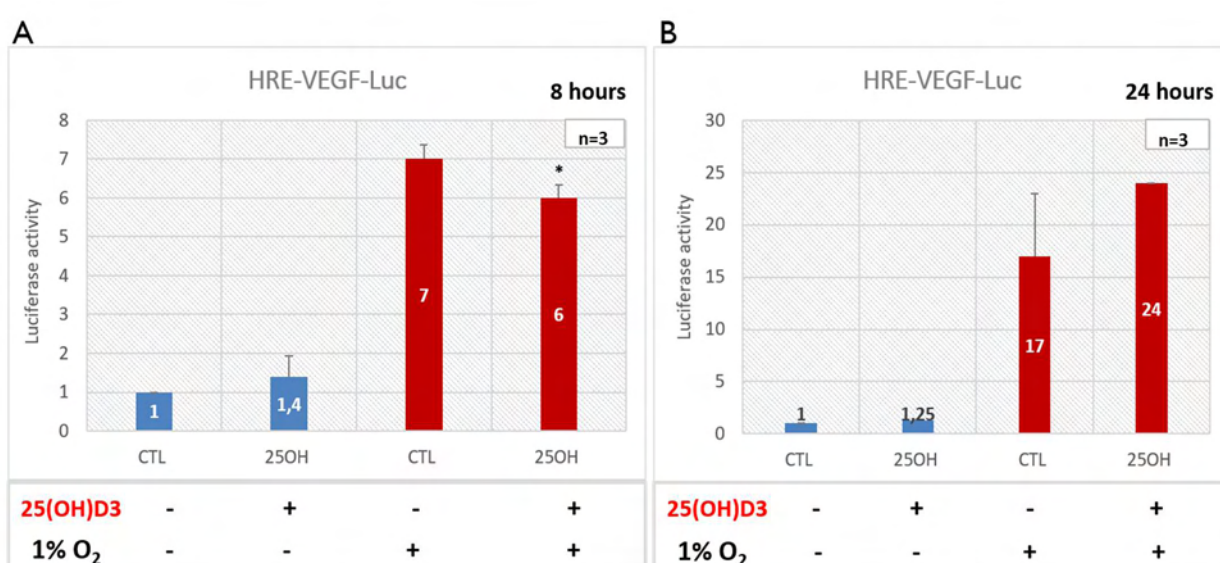
4.2.2 Επίδραση της 25OHD στην μεταγραφική ενεργότητα των HIFs.

Για να απαντηθεί το ερώτημα αν οι HIFs είναι μεταγραφικά ενεργοί ακολουθήθηκε η δοκιμασία λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.8. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με τα δύο πλασμίδια pGL3-VEGF-5HRE και pCI-renilla και στη συνέχεια προστέθηκε 25OHD σε συγκέντρωση 2,4μM για 8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας. Μετά την επώαση συλλέχθηκαν τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.8.1. και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5A και B.

Στην εικόνα 4.5A φαίνεται η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs μετά από 8 ώρες επώασης σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας χωρίς την προσθήκη 25OHD (control) σε σύγκριση με την προσθήκη 25OHD. Τα στατιστικά αποτελέσματα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων δείχνουν ότι η υποξία δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs. Σε συνθήκες νορμοξίας παρατηρείται μικρή αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs με προσθήκη 25OHD.

Αντίστοιχα στην εικόνα 4.5B φαίνεται η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs στις ίδιες συνθήκες με διαφορά ότι μετρήθηκε μετά από 24 ώρες επώασης τόσο σε νορμοξία όσο και υποξία. Κατά την υποξία μετά από 24 ώρες παρατηρείται αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική.

Συνολικά η προσθήκη της 25OHD σε κύτταρα Huh7 δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF σε 8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας.



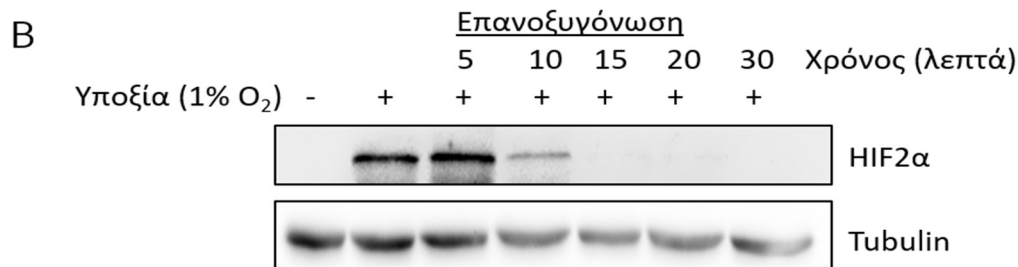
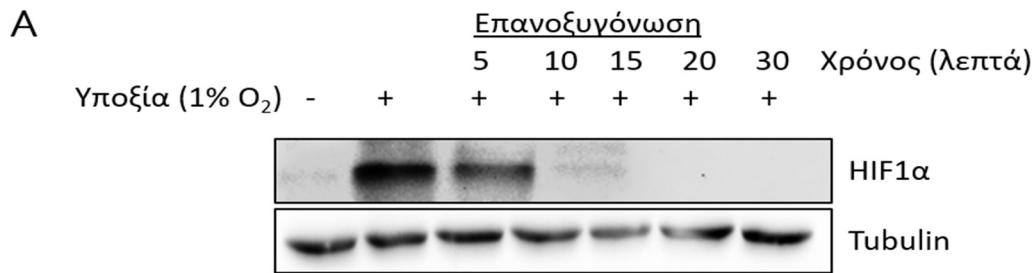
Εικόνα 4.5 Επίδραση της 25OHD στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF με δοκιμασία λουσιφεράσης σε κύτταρα Huh7, συγκρίνοντας τη συνθήκη ελέγχου (control) χωρίς την προσθήκη 25OHD με αυτή με την προσθήκη 2,4μM 25OHD A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία (3 πειράματα)

4.2.3 Σταθερότητα των HIFs παρουσία 25OHD.

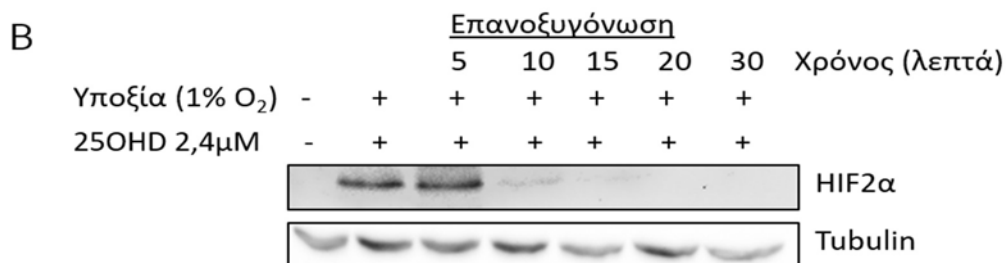
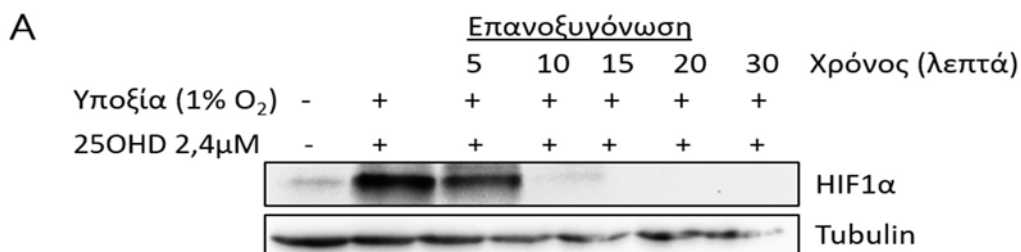
Η παρατηρούμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία 25OHD (4.2.1) έθεσε το ζήτημα του μηχανισμού επαγωγής. Ένας βασικός μηχανισμός είναι η σταθεροποίηση των HIFs, με την αναστολή των προλυλο-υδροξυλασών (1.7.1). Σε συνθήκες νορμοξίας, οι υπομονάδες HIF-α μεταγράφονται συνεχώς και μεταφράζονται. Τα επίπεδα οξυγόνου όμως οδηγούν στην αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα. Συγκεκριμένα, μια οικογένεια προλυλο-υδροξυλάσεων (PHDs), και κυρίως η PHD2, υδροξυλιώνουν τις ευαίσθητες στο οξυγόνο α υπομονάδες. Αυτή η υδροξυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευσή τους από την πρωτεΐνη Von Hippel-Lidau (VHL). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος E3 λιγάσης-ουβικιτίνης, έτσι οι HIFs πολύ-ουβικιτινιώνονται και οδηγούνται για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα. Έτσι μελετήσαμε αν η παρατηρούμενη επαγωγή οφείλεται στην αναστολή των PHDs και συνεπώς στην σταθεροποίηση του HIF2α.

Αρχικά, κύτταρα Huh7 επωάζονται σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για 16 ώρες και υποβλήθηκαν σε επανοξυγόνωση για 5, 10, 15, 20 και 30 λεπτά. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (3.2.2) και έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (3.2.4) χρησιμοποιώντας τα αντισώματα έναντι του HIF1α, του HIF2α και της τουμπουλίνης. Στα πρώτα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης που φαίνονται στην εικόνα 4.6 επιβεβαιώθηκε ότι όταν κύτταρα Huh7 επωάζονται σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και κατόπιν επαναφέρονται σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), ο HIF1α και ο HIF2α που έχουν παραχθεί, αποικοδομούνται με ένα χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πρωτεϊνική σταθερότητα των HIFs με την προσθήκη της 25OHD για 16 ώρες σε συνθήκες υποξίας και υποβλήθηκαν σε επανοξυγόνωση για 5, 10, 15, 20 και 30 λεπτά. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω και τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.7



Εικόνα 4.6 Έλεγχος του χρόνου ημιζωής των HIF1α και HIF2α σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν για 16 ώρες υποξίας και και υποβλήθηκαν σε επανοξυγόνωση για 5, 10, 15, 20 και 30 λεπτά. Φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωση για τα πρωτεϊνικά επίπεδα A) του HIF1α και B) του HIF2α



Εικόνα 4.7 Έλεγχος του χρόνου ημιζωής των HIF1α και HIF2α με την επίδραση 25OHD σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν για 16 ώρες υποξίας και υποβλήθηκαν σε επανοξυγόνωση για 5, 10, 15, 20 και 30 λεπτά. Φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωση για τα πρωτεϊνικά επίπεδα A) του HIF1α και B) του HIF2α

Από τα αποτελέσματα στην εικόνα 4.7 παρατηρείται ότι με την προσθήκη της 25OHD δεν επηρεάζεται η αποικοδόμηση ούτε του HIF1α ούτε του HIF2α, εφόσον αποικοδομούνται στα 10 λεπτά όπως και στην συνθήκη ελέγχου (εικόνα 4.6). Η 25OHD δεν φαίνεται να παρατείνει την σταθεροποίηση των HIFs σε νορμοξία και συνεπώς να επηρεάζει με αυτόν τον τρόπο τη σταθεροποίησή τους.

Συμπερασματικά, διερευνήθηκε η επίδραση της 25OHD, της κύριας κυκλοφορούσας μορφής της βιταμίνης D στον οργανισμό, στα πρωτεϊνικά επίπεδα, στη μεταγραφική ενεργότητα και στην πρωτεϊνική σταθερότητα των HIFs. Δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία για την αντικαρκινική δράση της 25OHD, οπότε τα ευρήματα αυτά θεωρούνται πολύ σημαντικά. Στην παρακάτω ενότητα θα διερευνηθεί η αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)₂D, της ενεργού μορφής της βιταμίνης D, μελετώντας την επίδρασή της στα πρωτεϊνικά επίπεδα, στη μεταγραφική ενεργότητα και στην έκφραση των γονιδίων στόχων των παραγόντων HIFs.

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ 1,25(OH)₂D ΣΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ HIFs.

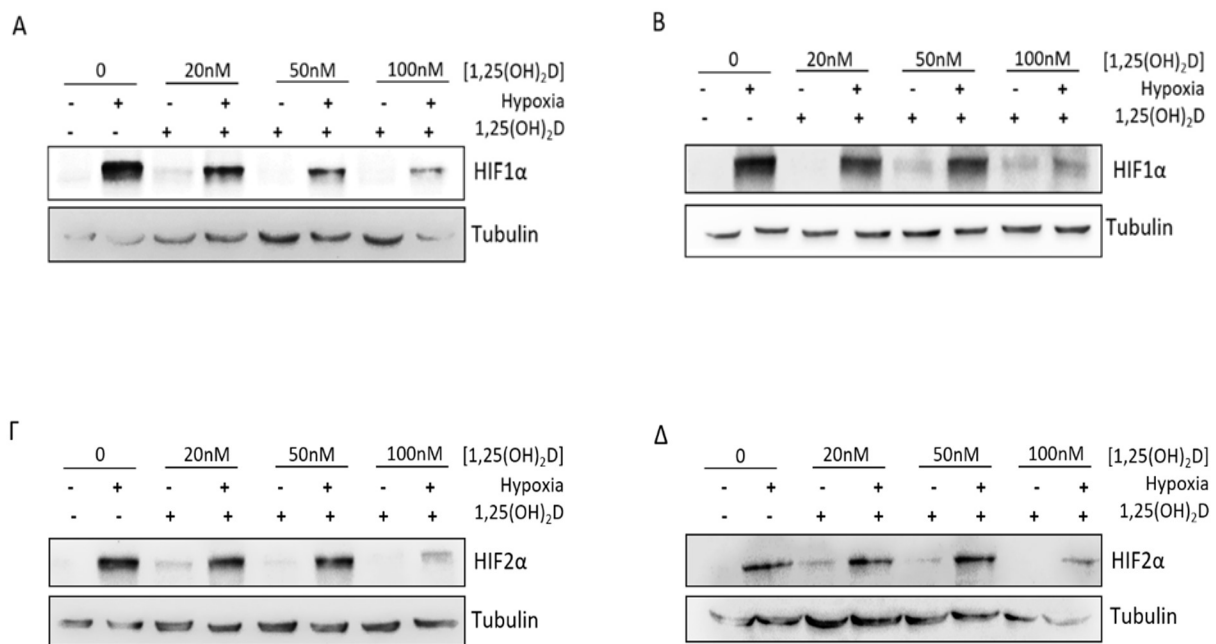
Η 1,25(OH)₂D είναι ο τελικός βιοδραστικός μεταβολίτης της βιταμίνης D με αναγνωρισμένη ορμονική δράση. Όπως αναφέρθηκε υπάρχουν κοινά σημεία στα σηματοδοτικά μονοπάτια της βιταμίνης D και των HIFs (1.9) που δίνουν την δυνατότητα υπόθεσης για την επίδραση της 1,25(OH)₂D στους HIFs και αυτή η υπόθεση μελετήθηκε στην εργασία αυτή.

4.3.1 Επίδραση της 1,25(OH)₂D στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIFs σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

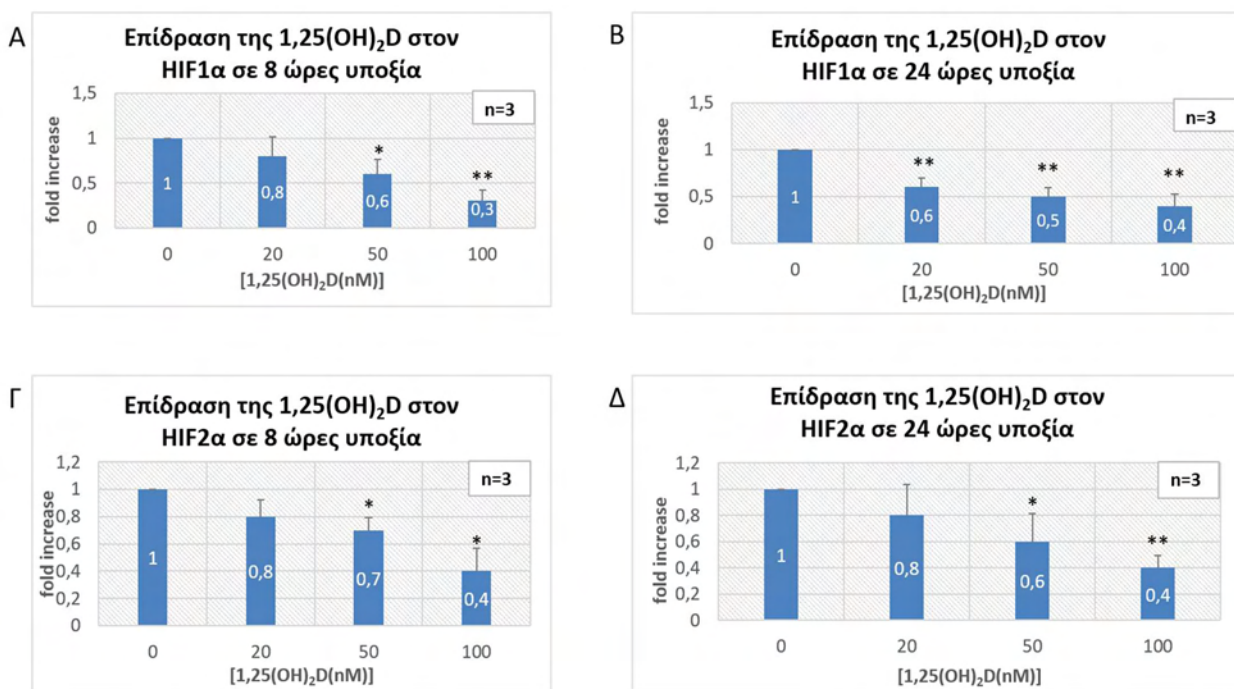
Σε κύτταρα Huh7 προστέθηκε η 1,25(OH)₂D σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 20, 50 και 100nM και επώαστηκαν για 1 ώρα πριν εισέλθουν σε νορμοξία και υποξία. Ακολούθησε επώαση για 8 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας και στη συνέχεια έγινε συλλογή των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.2. Στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (3.2.4) χρησιμοποιώντας τα αντισώματα έναντι του HIF1α, του HIF2α και της τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνονται στην εικόνα 4.6, όπου παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF1α τόσο στις 8 ώρες υποξίας (4.8A) όσο και στις 24 ώρες υποξίας (4.8B). Στην νορμοξία δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή ούτε στις 8 ούτε στις 24 ώρες. Για τον HIF2α παρατηρείται επίσης δόσοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων στις 8 (4.8Γ) και στις 24 ώρες υποξίας (4.8Δ).

Αποδεικνύεται λοιπόν ότι σε επίπεδο πρωτεΐνης η 1,25(OH)₂D αναστέλλει τα επίπεδα τόσο του HIF1α όσο και του HIF2α με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές και τα αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν όπως και παραπάνω σύμφωνα με την ένταση του σήματος της ζώνης και κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την τουμπουλίνη. Στην εικόνα 4.9 (Α-Δ) φαίνονται τα τέσσερα διαγράμματα που δείχνουν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της 1,25(OH)₂D στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α σε υποξία. Συνεπώς η 1,25(OH)₂D μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α ως και τρεις φορές σε σχέση με την συνθήκη ελέγχου στην υποξία.



Εικόνα 4.8 Ανοσοαποτίπωση κατά Western όπου ελέγχονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α και του HIF2α σε κύτταρα Huh7 χωρίς και με την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων 1,25(OH)₂D σε νορμοξία και υποξία και γίνεται έλεγχος Α, Β) με αντίσωμα έναντι του HIF1α και έναντι της τουμπουλίνης σε 8 ώρες και Γ,Δ) με αντίσωμα έναντι του HIF2α και έναντι της τουμπουλίνης σε 24 ώρες.

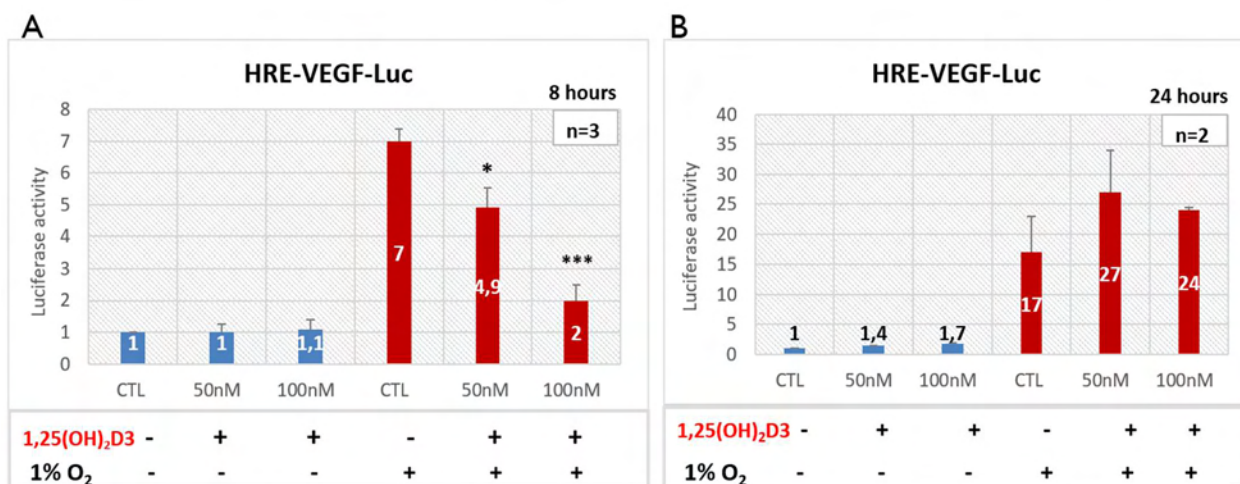


Εικόνα 4.9 Ποσοτικοποίηση με βάση την ένταση του σήματος των ζωνών και κανονικοποίηση σε σχέση με την τουμποουλίνη για 8 και 24 ώρες υποξίας μετά την προσθήκη της 1,25(OH)₂D A, B) για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF1α Γ,Δ) για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF2α

Αφού αποδείχθηκε η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIFs από την 1,25(OH)₂D σε συνθήκες υποξίας τέθηκε το ερώτημα αν επηρεάζει τη μεταγραφική τους ενεργότητα σε νορμοξία και υποξία.

4.3.2 Επίδραση της 1,25(OH)₂D στην μεταγραφική ενεργότητα των HIFs.

Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν αρχικά με δύο πλασμίδια όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.8. Στη συνέχεια προστέθηκε η 1,25(OH)₂D σε συγκεντρώσεις 50 και 100nM και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 και 24 ώρες τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας. Μετά την επώαση συλλέχθηκαν τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.8.1. για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs σε κάθε συνθήκη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα δύο διαγράμματα της εικόνας 4.10, όπου φαίνονται ποσοτικοποιημένα τα αποτελέσματα τριών πειραμάτων δοκιμασίας λουσιφεράσης στις 8 και τις 24 ώρες και η μεταγραφική ενεργότητα συγκρίνεται με την αντίστοιχη στην νορμοξία (συνθήκη control).



Εικόνα 4.10 Επίδραση της 1,25(OH)₂D στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF1α και HIF2α σε κύτταρα Huh7, συγκρίνοντας τη συνθήκη ελέγχου (control) νορμοξίας χωρίς την προσθήκη 1,25(OH)₂D, με αυτή με την προσθήκη 1,25(OH)₂D A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία (3 πειράματα)

Στην εικόνα 4.8A φαίνεται ότι με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D παρατηρείται στατιστικά σημαντική δόσοεξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs σε 8 ώρες υποξίας, συγκεκριμένα πέντε φορές μικρότερη από τη συνθήκη ελέγχου στην υποξία. Αντίστοιχα τα αποτελέσματα για τις 24 ώρες φαίνονται στην εικόνα 4.8B και παρουσιάζουν διαφοροποίηση. Η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs παρουσιάζει μικρή αύξηση με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D αν και όχι στατιστικά σημαντική.

Η διαφορά αυτή μεταξύ των 8 και των 24 ωρών φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs.

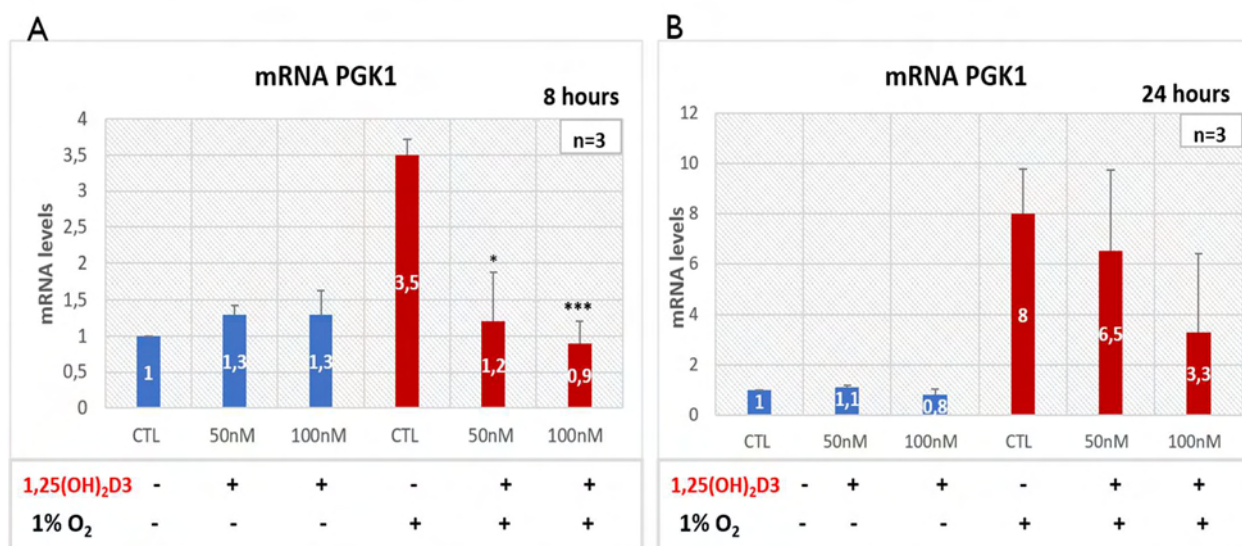
Εφόσον έγινε μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs, στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων στόχων των παραγόντων αυτών. Στα πειράματα δοκιμασίας της λουσιφεράσης χρησιμοποιούνται HRE του υποκινητή του VEGF που αποτελεί κοινό γονίδιο στόχο των HIF, οπότε η μεταγραφική ενεργότητα που μετράται αποδίδεται και στον HIF1α και στον HIF2α. Προκειμένου να διακρίνουμε την διαφορετική μεταγραφική ενεργότητα των HIF1α και HIF2α θα ελέγξουμε με ποσοτική Real time PCR την έκφραση του γονιδίου της κινάσης του φωσφογλυκερικού (PGK1) που αποτελεί ειδικό γονίδιο του HIF1α και την έκφραση των γονιδίων της ερυθροποιητίνης (EPO) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) που είναι ειδικά γονίδια του HIF2α.

4.3.3 Ποσοτική Real time PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των mRNA της PGK1 και της EPO και του PAI-1 με την προσθήκη 1,25(OH)₂D

Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 8 και 24 ώρες, όπως και παραπάνω, αφού προστέθηκε σε αυτά 1,25(OH)₂D σε συγκεντρώσεις 50 και 100nM. Στη συνέχεια η απομόνωση του ολικού κυτταροπλασματικού RNA έγινε με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9.1 και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητά του (3.2.9.2). Τα αποτελέσματα της ποσοτικής

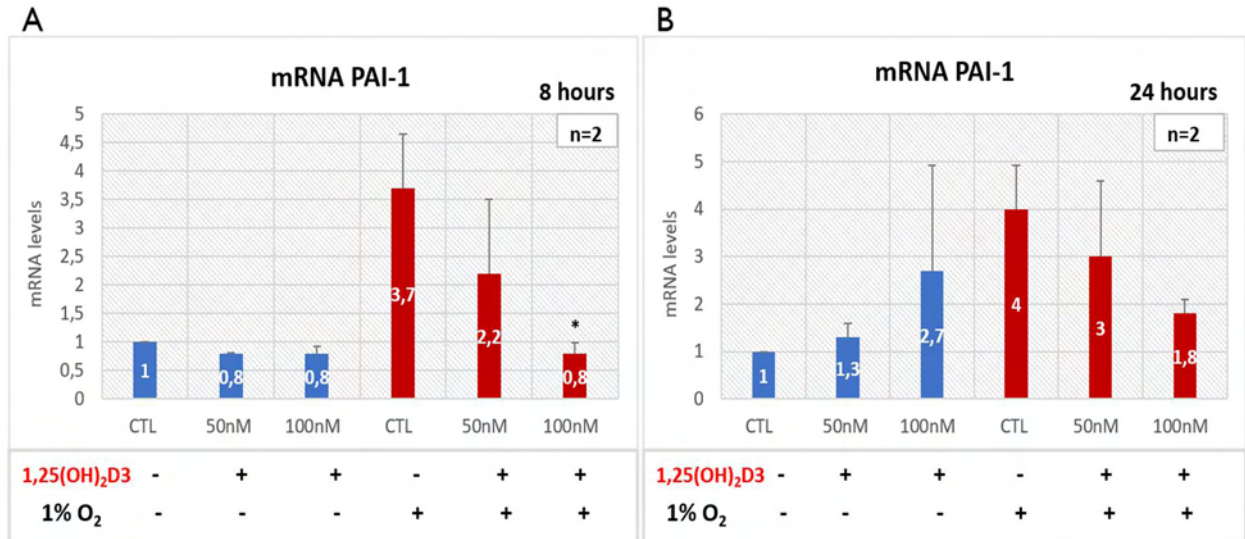
Real-Time PCR ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της διαφοράς της διαφοράς των κύκλων ($2^{\Delta\Delta Ct}$) και εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (νορμοξία) και παρουσιάζονται στις εικόνες 4.11, 4.12 και 4.13.

Σύμφωνα με αυτά ο HIF-1 σε συνθήκες υποξίας επάγει 3,5 φορές τα επίπεδα mRNA της PGK1 στις 8 ώρες και 8 φορές στις 24 ώρες. Με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων του mRNA της PGK1 στις 8 ώρες (εικόνα 4.11A), ενώ στις 24 ώρες δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή (εικόνα 4.11B).



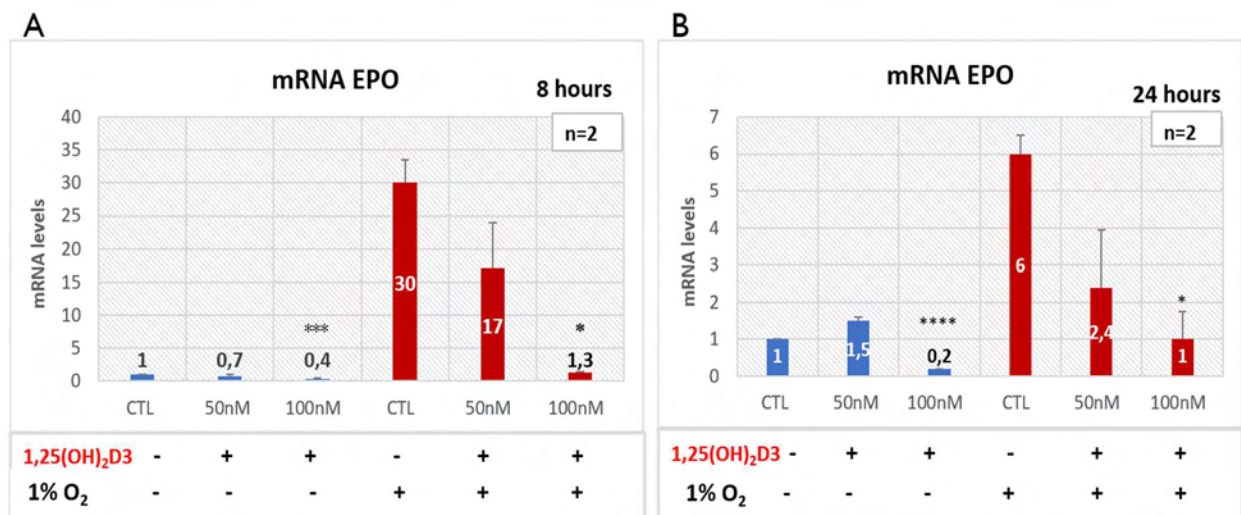
Εικόνα 4.11 Ποσοτική Real time PCR για την μελέτη της έκφρασης του mRNA της PGK1 με την προσθήκη 1,25(OH)₂D σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Όσο αναφορά τα γονίδια στόχους του HIF-2 φαίνεται αρχικά για τον PAI-1 ότι σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2 επάγει 3,7 φορές τα επίπεδα mRNA του στις 8 ώρες και με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη τριπλάσια μείωση των επιπέδων του mRNA (εικόνα 4.12A), ενώ στις 24 ώρες τα επίπεδα mRNA του PAI-1 επάγονται ως και τέσσερις φορές σε υποξία αλλά χωρίς κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D (εικόνα 4.12B).



Εικόνα 4.12 Ποσοτική Real time PCR για την μελέτη της έκφρασης του mRNA της PAI-1 με την προσθήκη 1,25(OH)₂D σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Για τα επίπεδα mRNA της ερυθροποιητίνης (EPO), του δεύτερου γονιδίου στόχου του HIF-2 που μελετήθηκε, παρατηρείται επαγωγή ως και τριάντα φορές στις 8 ώρες υποξίας από τον HIF-2 και δοσοεξαρτώμενη πολύ μεγάλη μείωση των επιπέδων του mRNA της με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D που φτάνει σε επίπεδα των αντίστοιχων της νορμοξίας (εικόνα 4.13A). Στις 24 ώρες τα επίπεδα mRNA της EPO επάγονται ως και έξι φορές σε υποξία και με την προσθήκη της 1,25(OH)₂D φαίνεται επίσης δοσοεξαρτώμενη μείωσή τους (εικόνα 4.13B).



Εικόνα 4.13 Ποσοτική Real time PCR για την μελέτη της έκφρασης του mRNA της EPO με την προσθήκη 1,25(OH)₂D σε κύτταρα Huh7 A) μετά από 8 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία B) μετά από 24 ώρες επώασης σε νορμοξία και υποξία

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D, μειώνει δοσοεξαρτώμενα και στατιστικά σημαντικά την έκφραση τόσο του HIF1α όσο και του HIF2α και στις 8 και στις 24 ώρες. Η 1,25(OH)₂D μειώνει σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF1 και HIF2 στις 8 ώρες και αυτό ελέγχθηκε τόσο με τη χρήση των HRE του υποκινητή του VEGF (κοινό γονίδιο στόχος) όσο και με ειδικά για τους HIF1 και HIF2 γονίδια στόχους PGK1, PAI-1 και EPO. Στις 24 ώρες παρατηρείται ότι η δράση της 1,25(OH)₂D παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις. Η επίδραση της 1,25(OH)₂D στην μεταγραφική ενεργότητα των HIFs σε 24 ώρες είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι δεν επηρεάζει την συνολική μεταγραφική ενεργότητα των HIFs, ενώ διακρίνεται μείωση της έκφρασης των ειδικών γονιδίων του HIF2α (PAI-1, EPO), η οποία είναι στατιστικά σημαντική μόνο για την EPO.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D είναι αναγνωρισμένη από πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες που συγκλίνουν σε αυτήν. Ωστόσο, οι βιοχημικοί μηχανισμοί που προκαλούν την δράση αυτή δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια το πεδίο αυτό αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από υποξία (HIFs) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διεργασίες του καρκίνου (αγγειογένεση, φλεγμονή, μετάσταση). Οι πρωτεΐνες HIF1α και HIF2α υπερεκφράζονται σε 13 από 19 διαφορετικούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του παχέος εντέρου, μαστού, γαστρικού, πνεύμονα, δέρματος, ωοθηκών, παγκρέατος, προστάτη, και νεφρικού καρκινώματος (73). Η έκφραση και των δύο HIFs στο μικροπεριβάλλον του όγκου υποδεικνύει έναν ιδιαίτερα επιθετικό φαινότυπο που σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Επιπλέον, η υποξία και οι HIFs εμπλέκονται στην πλειονότητα των διεργασιών της μεταστατικής οδού. Τα επίπεδα πρωτεΐνης των HIFs είναι υψηλότερα στον μεταστατικό ιστό από τον αντίστοιχο πρωτογενή όγκο. Η σηματοδότηση της υποξίας προάγει την εισβολή σε επίπεδο όγκου, κατευθύνει τα κύτταρα του όγκου προς τα αιμοφόρα αγγεία και αυξάνει την ενδοαγγείωση. Για τους παραπάνω λόγους, η αναστολή των HIFs θεωρείται σήμερα ως εφικτή προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου και οι HIFs είναι αναγνωρισμένοι αντικαρκινικοί στόχοι (62).

Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποδεικνύει δεδομένα που φανερώνουν την ύπαρξη πιθανής αλληλεπίδρασης (cross-talking) μεταξύ της βιταμίνης D και των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (HIFs) (1.9). Πιο συγκεκριμένα, έχουν ταυτοποιηθεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs) στον υποκινητή του γονιδίου του HIF1α. Επιπλέον, ανάμεσα στα πολλά γονίδια στόχους των παραγόντων HIFs ανήκει και το γονίδιο της υπεροξειδικής δισμουτάσης 2 (SOD2), τα επίπεδα mRNA του οποίου επάγονται από την 1,25(OH)₂D. Η βιταμίνη D διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως των ERK1/2, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταφορά και ενεργοποίηση του HIF1α και συμμετέχουν στη ρύθμιση των HIFs. Όλα τα παραπάνω σημεία σύγκλισης υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός βιοχημικού συνδέσμου μεταξύ της βιταμίνης D και των HIF. Μέχρι σήμερα, υπήρχαν ελάχιστα και αντιφατικά δεδομένα για την αλληλεπίδραση αυτή που δεν αποσαφηνίζουν ούτε τη φύση της ούτε το μηχανισμό της.

Η απάντηση στο ερώτημα αυτό αποτέλεσε και τον στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της ήταν να μελετηθεί η επίδραση των δυο βασικών μεταβολιτών του μονοπατιού της βιταμίνης D, της 25(OH)D και της 1,25(OH)₂D, στα μονοπάτια των HIFs και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της πρωτεϊνικής τους έκφραση, της μεταγραφικής τους ενεργότητας και της ρύθμισης των γονιδίων στόχων τους.

Οι δύο μεταβολίτες που μελετήθηκαν είναι η 25(OH)D και η 1,25(OH)₂D. Η δομική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μεταβολιτών συνίσταται στην παρουσία ενός μόνο υδροξυλίου, ωστόσο η 25OHD που αποτελεί και την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D, βρίσκεται στον οργανισμό σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη από την 1,25(OH)₂D (74). Αυτό συμβαίνει γιατί τα επίπεδα της ορμονικής μορφής της βιταμίνης D (1,25(OH)₂D) ρυθμίζονται αυστηρά από ένζυμα και άλλους παράγοντες. Για την 1,25(OH)₂D υπάρχει μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά με σημαντικές ελλείψεις που αποδίδει τη σύνδεσή της με τον HIF1α, ενώ για την 25(OH)D δεν υπάρχουν καθόλου ερευνητικά δεδομένα που να υποδεικνύουν την επίδρασή της στους HIFs και στον καρκίνο.

Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε μια σειρά πειραμάτων που είχαν ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης και των δύο μεταβολιτών στο σηματοδοτικό μονοπάτι των HIFs. Για την 25OHD σημαντικό εύρημα αποτελεί ότι με την προσθήκη της σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος έχουμε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF2α σε συνθήκες νορμοξίας (4.2.1) (μια επαγωγή μέχρι έξι φορές σε οχτώ ώρες) αν και δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs στις ίδιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει ότι ο HIF2α μπορεί να είναι μεταγραφικά ενεργός, καθώς η μεταγραφική ενεργότητα που μετρήθηκε αποδίδεται και στους 2 HIFs, διότι χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η κατασκευή των HREs του κοινού γονιδίου στόχου των HIFs, του VEGF.

Όσο αναφορά την επίδραση της 1,25(OH)₂D στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIFs παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωσή τους και σε 8 και σε 24 ώρες υποξίας, συγκεκριμένα ως και τριπλάσια μείωση σε σύγκριση με την συνθήκη ελέγχου απουσία της 1,25(OH)₂D (4.3.1). Η μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs σε 8 ώρες αναστέλλεται επίσης σημαντικά, ενώ στις 24 ώρες παρατηρείται διαφορετική εικόνα με μικρή μη σημαντική αύξηση της (4.3.2). Σε συνέχεια των πειραμάτων με ποσοτική Real time PCR, αποδεικνύεται ότι στις 8 ώρες υποξίας τα δεδομένα συμφωνούν με της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs, καθώς παρατηρείται και στατιστικά σημαντική αναστολή του mRNA των γονιδίων στόχων τους (4.3.3). Στις 24 ώρες υπάρχει επίσης μείωση στην έκφραση των mRNA των γονιδίων στόχων αν και όχι τόσο σημαντική όσο στις 8 ώρες. Η διαφοροποίηση αυτή από τις 8 ώρες ως τις 24 ώρες παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς μπορεί να υποστηρίξει την υπόθεση της παραγωγής ενός μεταβολίτη, από τους πολλαπλούς που παράγονται κατά τον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Η δράση αυτού του πιθανού μεταβολίτη μετά τις 8 ώρες σύμφωνα με την υπόθεσή μας προκαλεί την αλλαγή στον μηχανισμό επίδρασης των HIFs. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των πειραμάτων της ενότητας 4 παρουσιάζονται για την 25OHD στον πίνακα 5.1 και για την 1,25(OH)₂D στον πίνακα 5.2.

| 25(OH)D | Normoxia | Hypoxia |
|-------------------------------------|-----------------|----------------|
| HIF protein levels | ↑ (HIF2α) | ↔ |
| HRE Transcriptional activity | ↔ | ↔ |

Πίνακας 4.1 Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης 25OHD στους HIFs σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

| 1,25(OH)₂D | Normoxia | Hypoxia 8 hours | Hypoxia 24 hours |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| HIF protein levels | ↔ | ↓ | ↓ |
| HRE Transcriptional activity | ↔ | ↓ | ↔ |
| Target genes | ↔ | ↓ | ↓↔ |

Πίνακας 4.2 Συνολικά αποτελέσματα επίδρασης της 1,25(OH)₂D στους HIFs σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

↑ : αύξηση , ↓ : μείωση , ↔ : μη στατιστικά σημαντική μεταβολή

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής αποδεικνύουν ότι η ρύθμιση των HIF1 και HIF2 στην υποξία μπορεί να συμπεριλαμβάνεται στην αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)₂D, γεγονός που απαντάει στο βασικό στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Παράλληλα, για πρώτη φορά διερευνήθηκε ο ρόλος της 25(OH)D στους HIFs και παρατηρείται ότι έχει ξεχωριστή βιολογική δράση, ειδική για τον HIF2α. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι είναι η πρώτη ολοκληρωμένη μελέτη των επιδράσεων και των δύο μεταβολιτών τόσο για τον HIF1 όσο και για τον HIF2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αναστολής της 1,25(OH)₂D καθώς και της επαγωγής της 25(OH)D και κατ'επέκταση για τη διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών που προσδίδουν την αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση στην βιταμίνης D απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014;21(3):319-29. Epub 2014/02/18.
2. Lindh JD, Bjorkhem-Bergman L, Eliasson E. Vitamin D and drug-metabolising enzymes. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(12):1797-801. Epub 2012/08/21.
3. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):135. Epub 2016/03/08.
4. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010;31(12):1027-34. Epub 2010/09/25.
5. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016;96(1):365-408. Epub 2015/12/19.
6. Bikle DD. Vitamin D and bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(2):151-9. Epub 2012/05/01.
7. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):342-57. Epub 2014/04/08.
8. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control*. 2005;16(2):83-95. Epub 2005/05/04.
9. Pilz S, Kienreich K, Tomaschitz A, Ritz E, Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B, et al. Vitamin D and cancer mortality: systematic review of prospective epidemiological studies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(1):107-17. Epub 2012/10/26.
10. Chakraborti CK. Vitamin D as a promising anticancer agent. *Indian J Pharmacol*. 2011;43(2):113-20. Epub 2011/05/17.
11. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):684-700. Epub 2007/08/28.
12. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J*. 2012;441(1):61-76. Epub 2011/12/16.
13. Stewart LV, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(4):277-84. Epub 2004/03/27.
14. Moreno J, Krishnan AV, Feldman D. Molecular mechanisms mediating the anti-proliferative effects of Vitamin D in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(1-2):31-6. Epub 2005/07/19.
15. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J*. 2010;16(1):1-9. Epub 2010/02/19.
16. Gonzalez-Sancho JM, Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Palmer HG, Munoz A. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Anticancer Res*. 2006;26(4A):2669-81. Epub 2006/08/05.
17. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, Swami S, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: role of anti-inflammatory activity. *J Bone Miner Res*. 2007;22 Suppl 2:V74-80. Epub 2008/03/20.
18. Yang ES, Burnstein KL. Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem*. 2003;278(47):46862-8. Epub 2003/09/05.
19. Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, Weigel NL. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G1. *Endocrinology*. 1997;138(4):1491-7. Epub 1997/04/01.
20. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996;10(2):142-53. Epub 1996/01/15.

21. **Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000;141(1):10-7. Epub 1999/12/30.**
22. **Reitsma PH, Rothberg PG, Astrin SM, Trial J, Bar-Shavit Z, Hall A, et al. Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature*. 1983;306(5942):492-4. Epub 1983/12/01.**
23. **Rohan JN, Weigel NL. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2009;150(5):2046-54. Epub 2009/01/24.**
24. **Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):3-10. Epub 2008/03/08.**
25. **Lucia MS, Torkko KC. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. *J Urol*. 2004;171(2 Pt 2):S30-4; discussion S5. Epub 2004/01/10.**
26. **Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44. Epub 2008/07/25.**
27. **Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(17):7917-25. Epub 2005/09/06.**
28. **Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res*. 2006;66(8):4516-24. Epub 2006/04/19.**
29. **Yu XP, Bellido T, Manolagas SC. Down-regulation of NF-kappa B protein levels in activated human lymphocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):10990-4. Epub 1995/11/21.**
30. **Harant H, Wolff B, Lindley IJ. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 decreases DNA binding of nuclear factor-kappaB in human fibroblasts. *FEBS Lett*. 1998;436(3):329-34. Epub 1998/11/04.**
31. **Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):889-97. Epub 2006/02/04.**
32. **Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1(1):27-31. Epub 1995/01/01.**
33. **Sakamoto S, Ryan AJ, Kyprianou N. Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. *J Cell Biochem*. 2008;103(3):691-708. Epub 2007/08/02.**
34. **Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(10):803-11. Epub 2003/10/04.**
35. **Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):678-85. Epub 2008/02/09.**
36. **Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabeesh NJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(4):1433-9. Epub 2007/04/14.**
37. **Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:311-36. Epub 2010/10/13.**
38. **Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06.**
39. **Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 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 U S A*. 1997;94(9):4273-8. Epub 1997/04/29.
40. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*. 1998;7(3):205-13. Epub 1998/12/05.
 41. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15. Epub 2013/10/09.
 42. Kenneth NS, Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J*. 2008;414(1):19-29. Epub 2008/07/25.
 43. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):402-15. Epub 1999/12/14.
 44. Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1-2):6-13. Epub 2008/05/29.
 45. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5447-54. Epub 1992/12/01.
 46. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:97-106. Epub 2009/04/15.
 47. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 14):3485-93. Epub 2012/04/03.
 48. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniossoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cell Signal*. 2015;27(6):1129-40. Epub 2015/03/07.
 49. 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(24):9361-74. Epub 2003/12/04.
 50. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):7987-92. Epub 1998/07/08.
 51. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15(20):2675-86. Epub 2001/10/20.
 52. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*. 2004;279(11):9899-904. Epub 2004/01/01.
 53. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):343-54. Epub 2004/05/04.
 54. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):281-90. Epub 2007/07/03.
 55. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation. *Essays Biochem*. 2007;43:165-78. Epub 2007/08/21.
 56. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
 57. Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W, et al. A nontranscriptional role for HIF-1alpha as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci Signal*. 2013;6(262):ra10. Epub 2013/02/14.

58. Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):273-9. Epub 2007/04/04.
59. Wigerup C, Pahlman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther.* 2016;164:152-69. Epub 2016/05/04.
60. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* 2007;67(2):563-72. Epub 2007/01/20.
61. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408. Epub 2012/02/07.
62. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207-14. Epub 2012/03/09.
63. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(11):2685-95. Epub 2005/07/09.
64. Lambert JR, Kelly JA, Shim M, Huffer WE, Nordeen SK, Baek SJ, et al. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol.* 2006;208(3):566-74. Epub 2006/06/03.
65. Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, Seto E, Krishnan AV, Brooks JD, et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92(3):131-41. Epub 2004/11/24.
66. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33095-106. Epub 2006/09/07.
67. Jiang Y, Zheng W, Teegarden D. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in untransformed and Harvey-ras transfected breast epithelial cells. *Cancer Lett.* 2010;298(2):159-66. Epub 2010/07/27.
68. Lee B, Kwon E, Kim Y, Kim JH, Son SW, Lee JK, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates HIF-1 and TREM-1 via mTOR signaling. *Immunol Lett.* 2015;163(1):14-21. Epub 2014/12/03.
69. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Pol Pharm.* 2012;69(3):371-80. Epub 2012/05/19.
70. Palaogiannis D, Bekou E, Pazaitou-Panayiotou K, Samanidou V, Tsakalof A. On-line SPE sample treatment as a tool for method automatization and detection limits reduction: Quantification of 25-hydroxyvitamin D3/D2. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1043:219-27. Epub 2016/10/21.
71. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6(4):279-84. Epub 2005/04/09.
72. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125. Epub 2006/02/08.
73. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):523-30. Epub 2005/09/08.
74. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144 Pt A:132-7. Epub 2013/10/08.