



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1 α ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ"**

υπό

ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΚΟΥΡΤΗ

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Μαρία Κούρτη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1η/30-09-2015 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) Δρ. Γεώργιος Σίμος
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης Λιάκος
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ελένη Γεωργιάτσου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ηλίας Μυλωνής
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεωργία Χαχάμη
Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην οικογένειά μου

Στον αγαπητό φίλο και συνεργάτη

Ηλία Μύλωνή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Σίμο για την ανάθεση της διατριβής, για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της διατριβής αλλά και για την υπομονή και επιμονή του. Η συνεργασία μαζί του αποτέλεσε πηγή πολύτιμων γνώσεων για την επιστήμη της Βιοχημείας. Ευχαριστώ επίσης θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο για την άψογη συνεργασία, την προθυμία τους για βοήθεια και για τα εποικοδομητικά τους σχόλια κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, για την υπομονή του στην επίλυση όλων των αποριών μου, για την εκπαίδευσή μου στην πράξη και για την αμέριστη ηθική υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας - Μοριακής Βιολογίας κ. Ελένη Γεωργιάτσου και τη Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας κ. Γεωργία Χαχάμη, μέλη της επταμελούς επιτροπής, για την άψογη συνεργασία και τα εποικοδομητικά τους σχόλια κατά την εκπόνηση της διατριβής, καθώς και τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση της διατριβής και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τους εξωτερικούς συνεργάτες του εργαστηρίου Βιοχημείας οι οποίοι συνέβαλλαν στην διεξαγωγή μέρους των πειραμάτων για την ολοκλήρωση της διατριβής και με τους οποίους η συνεργασία ήταν άψογη. Έτσι, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Βιολογίας κ. Ζωή Λυγερού (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών), που επέτρεψε την διεξαγωγή των πειραμάτων συνεστιακής μικροσκοπίας στο εργαστήριό της, και μαζί με τον Υπ. Διδάκτορα Νικόλαο-Νικηφόρο Γιακουμάκη με εισήγαγαν στον κόσμο της συνεστιακής μικροσκοπίας μεταφέροντάς μου την εμπειρία και τις γνώσεις τους και των οποίων οι συμβουλές ήταν πραγματικά πολύτιμες. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Δρ. Γεωργία Οικονόμου η οποία μου έμαθε την τεχνική *in situ* PLA και τον Καθηγητή κ. Ulf Landegren

(Τμήμα Ανοσολογίας, Ουψάλα, Σουηδία) για την προσφορά όλων των απαραίτητων υλικών για τη συγκεκριμένη μέθοδο καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ακόμη τον Αν. Καθηγητή Ιατρικής Χημείας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ και την Αν. Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας κ. Ευφροσύνη Παρασκευά για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας με τα οποία περάσαμε ευχάριστες αλλά και δύσκολες στιγμές, που πάντα υπήρχε άριστη και δημιουργική συνεργασία μέσα σε ένα φιλικό συναδελφικό περιβάλλον και αμοιβαία ηθική υποστήριξη. Γι' αυτό νιώθω ιδιαίτερη χαρά που συνεργάστηκα με τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χριστίνα Μπεφάνη, τις Υπ. Διδάκτορες Εύα Πάγγου, Σωτηρία Δρακούλη, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου και Αγγελική Καραγιώτα και με τις οποίες θέλω να πιστεύω πως η φιλία θα κρατήσει. Επίσης, ευχαριστώ παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αγγελική Λυμπεροπούλου καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές που εκπόνησαν την πτυχιακή εργασία τους στο εργαστήριο Βιοχημείας και στο εργαστήριο Φυσιολογίας για τη συνεργασία σε ένα ευχάριστο συναδελφικό κλίμα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αρραβωνιαστικό μου Γιώργο και την αδερφή μου για την ηθική συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια μα πάνω από όλα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με ενθάρρυναν συνεχώς να συνεχίσω στις σπουδές μου και έχουν αποτελέσει το πιο σημαντικό ψυχικό και υλικό στήριγμά μου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου και των σπουδών μου, και χωρίς αυτούς τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: **Κούρτη**

Όνομα : **Μαρία**

Όνομα πατρός: Γεώργιος

Ημερομηνία γέννησης: 15-03-1984

Email: maria-kourti@hotmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

Δεκέμβριος 2010 – Οκτώβριος 2015: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σεπτέμβριος 2008 - Σεπτέμβριος 2010: Εκπόνηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης "Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική", Ιατρική Σχολή & Τμήμα Βιολογίας Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

17 Ιανουαρίου 2011: Απονομή Μεταπτυχιακού Διπλώματος με βαθμό 8,1 (Λίαν Καλώς)

Σεπτέμβριος 2002 - Απρίλιος 2008: Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

9 Ιουνίου 2008: Απονομή Πτυχίου Βιολογίας με βαθμό 6,76 (Λίαν Καλώς)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2002 - 2008: Τμήμα Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α.

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τομέας: Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

Τίτλος πτυχιακής: «Μελέτη του μηχανισμού δράσης των νευροστεροειδών σε καρκινικά κύτταρα ».

Επιβλέπουσα: Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων

2008 - 2010: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης « Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική»

Διατμηματικό: Τμήμα Βιολογίας & Ιατρική Σχολή Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τομέας: Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

Τίτλος πτυχιακής: «Διερεύνηση του ρόλου του ασβεστίου κατά την απόκριση νευρικών κυττάρων στην υποξία».

Επιβλέπουσα: Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων

2011-2015: Διδακτορική Διατριβή

Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Εργαστήριο Βιοχημείας

ΘΕΜΑ: Μελέτη της ρύθμισης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης και του ρόλου του στον κυτταρικό μεταβολισμό

Επιβλέπων: Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

Φεβρουάριος 2013 – Σεπτέμβριος 2015: Απασχόληση ως Βιολόγος-Ερευνήτρια με σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ – Εγγενώς εύκαμπτες πυρηνικές πρωτεΐνες (εεπ): μια ολοκληρωμένη ανάλυση της δομής και της λειτουργίας τους σε πραγματικό χρόνο και κυτταρικές συνθήκες με συνδυασμό τεχνολογιών αιχμής»

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Σπυρίδων Γεωργάτος

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ:

- Κυτταροκαλλιέργειες
Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες υποξικού στρες
- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων
- Επιμόλυνση καρκινικών κυτταρικών σειρών ανθρώπου με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

- Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς
- Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας:
 - A) Μέτρηση βιωσιμότητας με χρωστική Trypan Blue,
 - B) Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας (MTT, MTS)
- Μέθοδος ανίχνευσης θραυσμάτων DNA (DNA LADDERING)
 - A) Απομόνωση DNA από κύτταρα
 - B) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.
- Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης
- Δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης (Western Blot),
- Απομόνωση RNA
- Αντίστροφη μεταγραφή (RT),
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR),
- Real-time PCR
- Φθορισμομετρία ασβεστίου
- Μικροσκοπία φθορισμού/ανοσοφθορισμού
- Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας με την αντίδραση λουσιφεράσης
- *In situ* Proximity Ligation Assay (*in situ* PLA): μέθοδος για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών *in situ*
- FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching): *in vivo* τεχνική για την μελέτη της κινητικότητας πρωτεϊνών που είναι σημασμένες με φθορίζοντα μόρια σε ζωντανά κύτταρα
- Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (CHIP)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:

Kourti M., Ikonomidou G., Giakoumakis N.N., Rapsomaniki M.A., Landegren U., Siniouoglou S., Lygerou Z., Simos G. and I. Mylonis, “CK1δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1α/ARNT complex formation” *Cellular Signalling* 27 (2015) 1129–1140

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Ilias Mylonis I., Kourti M., Samiotaki M., Panayotou G. & George Simos (2015) Identification of a new phosphorylation-dependent protein interaction of Hypoxia Inducible Factor-1 α and its involvement in cellular adaptation to hypoxia Hellenic society of biochemistry & molecular biology, 66rd panhellenic congress, 11-13 December, Athens, 61 (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., Drakouli S., Georgatsou E., Thomais Papamarcaki T., Anastasia S. Politou A.S., Georgatos S.D. and George Simos (2014) *The effect of hypoxia or/and glucose deprivation on the expression and localization of nuclear intrinsically disordered proteins*, Hellenic society of biochemistry & molecular biology, 65rd panhellenic congress, 27-30 November, Thessaloniki, 60, 124 (αναρτημένη ανακοίνωση)
Συμμετογή στην οργανωτική επιτροπή του 2^{ου} Πανελλήνιου Forum Νέων Επιστημόνων, 27 Νοεμβρίου, Θεσσαλονίκη
- Kourti Maria, Mylonis Ilias, Giakoumakis Nikiforos-Nikolaos, Ikonomidou Georgia, Landegren Ulf, Lygerou Zoi. and George Simos (2013) *CK1 δ regulates HIF-1 heterodimerization as shown by in vivo and in situ analysis*, Hellenic society of biochemistry & molecular biology, 64rd panhellenic congress, 6-8 December, Athens, **59**, 183 (αναρτημένη ανακοίνωση)
Συμμετογή με προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση στο 1^ο Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων, 5 Δεκεμβρίου, Αθήνα.
- Kourti M., Mylonis I., Ikonomidou G., Landegren U. and G. Simos (2012) *Investigation of HIF-1 α /ARNT complex formation by the in situ proximity ligation assay (PLA) in HeLa cells*, Hellenic society of biochemistry & molecular biology, 63rd panhellenic congress, 9-11 November, Heraklio, Crete Abstracts, **58**, 94 (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Paschalidi M., Mavrofyridi O., Kourti M., Papazafiri P. (2012) *Duration dependent effect of glucose deprivation on SH-SY5Y cells are mediated by endoplasmic reticulum dysfunction*, NEUROSCIENCE DAYS 2012, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 2-3 November (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., I. Mylonis, and G. Simos (2011) *HIF-1 α -MTD peptides inhibit HIF-1 α activity in human hepatocarcinoma Huh7 cells*, Hellenic society of biochemistry & molecular biology,

9-11 December, Athens, Proceedings of the 62nd meeting, Abstracts, 57, 170 (αναρτημένη ανακοίνωση)

- Κούρτη Μ., Παπαζαφείρη Π. (2010) *Παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt σε συνθήκες υποξίας και ισχαιμίας συνοδεύεται από μειωμένη επιβίωση στα κύτταρα SHSY5Y*, Ερευνητική Διημερίδα της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών (HSN), 1-2 Οκτωβρίου, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αθήνα (αναρτημένη ανακοίνωση)
Βραβεύτηκε ανάμεσα στις καλύτερες αναρτημένες ανακοινώσεις
- Kourti Maria, Papazafiri Panagiota_(2010) *Investigation of the mechanisms that enhanced neuronal cell survival during hypoxic conditions*, 32nd Scientific Conference of the Hellenic Society for Biological Sciences, 20-22 May, Karpenisi, Proceedings 157 (προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., Papazafiri P.,(2008) *Investigation of neurosteroids action in cancer cells*, 30rd Scientific Conference of the Hellenic Society for Biological Sciences, 22-24 May, Thessaloniki, Proceedings 239 (προφορική και αναρτημένη ανακοίνωση)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- M. Kourti, I. Mylonis, S. Siniossoglou, G. Simos (2015) *CK1d inhibits HIF-1-dependent induction of lipin-1 and reduces both lipid accumulation and cell proliferation under hypoxia*, FEBS Journal 282, suppl.1, p. 88, 4-9 July, Berlin, Germany (αναρτημένη ανακοίνωση)
Συμμετοχή με υποτροφία στο 15^o FEBS YSF με την παραπάνω αναρτημένη ανακοίνωση
- E. Paraskeva, I. Mylonis, M. Kourti, G. Simos (2015) *Metabolic adaptation of human bronchial smooth muscle cells to hypoxia involves HIF-1 and its regulation by CK1d*, FEBS Journal 282, suppl.1, p. 287, 4-9 July, Berlin, Germany (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Mylonis, M. Kourti, A. Karagiota, G. Simos (2015) *Development of peptide inhibitors that target the ERK-dependent function of HIF-1a*, FEBS Journal 282, suppl.1, p. 287, , 4-9 July, Berlin, Germany (αναρτημένη ανακοίνωση)
- G. Chachami, M. Kourti, I. Mylonis, F. Melchior and G. Simos (2015) *Post-translational protein modifications in the cellular response to hypoxia: the roles of phosphorylation and*

sumoylation, Hypoxia: From basic mechanisms to theurapeutics (E3), 12-17 May, Dublin, Ireland (αναρτημένη ανακοίνωση)

- M. Kourti, I. Mylonis, N.N. Giakoumakis, G. Ikonomidou, U. Landegren, Z. Lygerou and G. Simos (2014) *CK1δ affects cancer cell adaptation to hypoxia by controlling HIF-1α/ARNT complex formation*, FEBS Journal 281, p. 446, FEBS-EMBO, 30 August - 4 September, Paris (αναρτημένη ανακοίνωση)
- M. Kourti, N. N. Giakoumakis, Z. Lygerou, G. Simos, I. Mylonis (2014) *ERK-dependent association of HIF-1α with chromatin via a peptide that can inhibit HIF-1 activity when over-expressed in hepatocellular carcinoma cells*, FEBS Journal 281, p. 462, FEBS-EMBO, 30 August - 4 September, Paris (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., Mylonis I., Giakoumakis N.-N., Lygerou Z. and G. Simos (2013) *Live-cell and in situ imaging analysis demonstrates regulation of HIF1α/ARNT complex formation by CK1δ*, Oxygen 2013, EU COST Action TD0901, 84, June 8-12, Oulu, Finland (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Papazafiri P., Yiaglissi I., Kourti M., Mavrofyridi O., Paschalidi M. (2013) *Enhanced calcium entry could account for the sustained activation of PI3K/Akt in hypoxic-ischemic SH-SY5Y cells*, Oxygen 2013, EU COST Action TD0901, 64, June 8-12, Oulu, Finland (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., Mylonis I., Giakoumakis N.-N., Lygerou Z. and G. Simos (2012) *The MTD peptide of HIF-1α mediates its association with Chromatin and can Efficiently inhibit HIF-1 activity in human cancer cells*, Sensing Hypoxia in the Cell and the Organism, HypoxiaNet EU COST Action TD0901, 86. (αναρτημένη ανακοίνωση)
- Kourti M., Papazafiri P., (2011) *Sustained activation of PI3K/Akt is accompanied by reduced survival of hypoxic-ischemic SH-SY5Y cells*, 23rd Biennial Meeting of ISN-ESN, August 28-September 1, Athens, Greece, **118**, 232 (αναρτημένη ανακοίνωση)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

Συμμετοχή στο Workshop on Cell Imaging and Analysis, Αλεξανδρούπολη 2-6 Οκτωβρίου 2011 για επιμόρφωση σε θέματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Συμμετοχή και με αναρτημένη ανακοίνωση:

Kourti M., Mylonis I., Simos G. "HIF-1αpeptides inhibit HIF-1α activity in human hepatocarcinoma Huh7 cells"

ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- **Καλή γνώση των αγγλικών**
Lower of Michigan, University of Michigan
- **Κάτοχος ECDL Core:** Windows XP, Word, Excel, Access, PowerPoint, Internet & Outlook,
Βασικές Έννοιες της Πληροφορικής
- **Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών**
- **Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1 α ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ "**

ΜΑΡΙΑ ΚΟΥΡΤΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Γεώργιος Σίμος (Επιβλέπων)**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Δρ. Αναστάσιος Γερμενής**, Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου. Ο HIF-1 αποτελείται από μια άλφα υπομονάδα (HIF-1α), που επάγεται από την υποξία, και μια βήτα υπομονάδα (HIF-1β ή ARNT) η οποία εκφράζεται συνεχώς. Η σταθερότητα του HIF-1α εξαρτάται από τη συγκέντρωση οξυγόνου αλλά η δράση του HIF-1 ρυθμίζεται και από ανεξάρτητους του οξυγόνου μηχανισμούς που δρουν μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι η φωσφορυλίωση.

Η κινάση ERK φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην επικράτεια ETD και διεγείρει τη δράση του, αναστέλλοντας την έξοδό του από τον πυρήνα. Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής εξετάστηκε η υπόθεση ότι η έκφραση της επικράτειας ETD ή μεταλλαγμένων μορφών της ως ανασυνδυασμένα ανεξάρτητα πολυπεπίδια, σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε συνθήκες υποξίας είναι δυνατόν να εμποδίσει την φωσφορυλίωση και συνεπώς την ενεργοποίηση του ενδογενούς HIF-1α. Πειράματα με διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης και σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι τα πολυπεπίδια ETD τα οποία περιέχουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης της κινάσης ERK (ETD wt, ETD I→A) ή μετάλλαξη που μιμείται την φωσφορυλίωση (ETD S→E) εντοπίστηκαν κυρίως στον πυρήνα, προκάλεσαν την εξαγωγή του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και μείωσαν σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 στην υποξία. Αντίθετα, το μεταλλαγμένο πολυπεπίδιο που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την ERK (ETD S→A) εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα και δεν επηρέασε σημαντικά τον εντοπισμό και τη δραστηριότητα του HIF-1α. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η επικράτεια ETD μπορεί πράγματι να χρησιμοποιηθεί ως βάση σχεδίασης ειδικών και αποτελεσματικών πεπτιδικών αναστολέων του HIF-1.

Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η επίδραση της κινάσης CK1δ, που φωσφορυλιώνει την επικράτεια PAS του HIF-1α και αναστέλλει τη δράση του, στον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ ARNT σε ακέραια ή ζωντανά κύτταρα, χρησιμοποιώντας τις μικροσκοπικές μεθόδους σύνδεση εγγύτητας *in situ* (*in situ* PLA) και επαναφορά φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση από τη CK1δ εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και την δέσμευσή του στη χρωματίνη. Επιπλέον, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δείχθηκε ότι η αναστολή της CK1δ ενισχύει την

αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον υποκινητή του γονιδίου της λιπίνης-1, ενζύμου που συμμετέχει στη σύνθεση τριγλυκεριδίων στην υποξία. Ταυτόχρονα η αναστολή της CK1δ ενίσχυσε τον σχηματισμό λιποσταγονιδίων και τον πολλαπλασιασμό τόσο καρκινικών όσο και πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, με εξαρτώμενο από τον HIF-1α και τη λιπίνη-1 τρόπο. Τα αποτελέσματα αυτά αποκαλύπτουν την εμπλοκή της CK1δ στη μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και αναδεικνύουν νέους τρόπους ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά την υποξία.

Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα διαλευκαίνουν περαιτέρω τη ρύθμιση της δράσης του HIF-1 μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK και CK1δ και επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, όπου είναι απαραίτητη η καταστολή της δράσης του HIF-1α, ή οι ισχαιμικές παθήσεις, όπου, αντίθετα, είναι επιθυμητή η ενίσχυση της λειτουργίας του HIF-1.

SUMMARY

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor that regulates the adaptation of cells to reduced oxygen level conditions. HIF-1 is composed of an alpha subunit (HIF-1 α) that is induced by hypoxia and a beta subunit (HIF-1 β or ARNT), which is constitutively expressed. HIF-1 α stability depends on oxygen levels but HIF-1 activity is also regulated by oxygen-independent mechanisms, involving post-translational modifications such as phosphorylation.

ERK phosphorylates the ETD domain of HIF-1 α and stimulates its activity by blocking its nuclear export. The first part of this study concerns the investigation of the hypothesis that expression of ETD or its mutant forms as recombinant independent polypeptides in cells that were cultured under hypoxic conditions may inhibit the phosphorylation and subsequent activation of endogenous HIF-1 α . Experiments with different plasmid expression vectors and in different cell lines have shown that ETD peptides containing the ERK phosphorylation sites (ETD wt, ETD I \rightarrow A) or a mutation mimicking this phosphorylation (ETD S \rightarrow E) were localized predominantly inside the nucleus triggered HIF-1 export to the cytoplasm and reduced HIF-1 transcriptional activity. In contrast, a mutant ETD peptide that cannot be modified by ERK (ETD S \rightarrow A) was cytoplasmic and did not affect significantly the activity of HIF-1 α . According to these results ETD can be indeed used as the basis for designing effective and specific peptide inhibitors of HIF-1.

The second part of this study concerns the investigation of the effect of CK1 δ , that modifies the PAS domain of HIF-1 α and inhibits its activity on HIF-1 α /ARNT complex formation in intact or living cells using the microscopical methods *in situ* Proximity Ligation Assay (*in situ* PLA) or the Fluorescence Recovery After Photobleaching assay (FRAP), respectively. The results have shown that phosphorylation by CK1 δ inhibits the heterodimerization of HIF-1 α with ARNT and its binding to chromatin. Furthermore, chromatin immunoprecipitation experiments have shown that inhibition of CK1 δ stimulates the interaction of HIF-1 α with the promoter of the gene for lipin-1, an enzyme involved in synthesis of triglycerides. At the same time, inhibition of CK1 δ promoted the formation of lipid droplets and the proliferation of both cancer and primary human cells under hypoxic conditions in a HIF-1 α and lipin-1 dependent manner. These results provide evidence for the involvement of CK1 δ in the metabolic adaptation of cells to hypoxic conditions and reveal new ways of regulating cellular proliferation under hypoxia.

Overall, this study offers a better understanding of HIF-1 regulation by ERK and CK1 δ and could lead to the development of novel therapeutic approaches for pathological conditions such as cancer, where suppression of HIF-1 activity is necessary or ischemic diseases, where intend promoting of HIF-1 function is desirable.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη
bHLH: Βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας
BSA: Αλβουμίνη ορού βοδιού
CIP: Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μμοσχαριού
cDNA: Συμπληρωματικό DNA
CK1: Κινάση καζεΐνης 1
DAPI: 4', 6-διαμιδινό-2-φενυλινδόλιο
DFO: Δεσφερριζαμίνη
DMOG: Διμεθυλοξαλλο-γλυκίνη
DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
DTT: Διθειοθρεϊτόλη
EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EPO: Ερυθροποιητίνη
ERK1/2: Κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα 1/2
ETD: Επικράτεια του HIF-1α στόχος των κινασών ERK1/2
FBS: Ορός εμβρύου βοός
FITC: Ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη
FRAP: Δοκιμασία επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση
GFP: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GST: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HEPES: N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζινο-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
HRE: Στοιχείο απόκρισης στην υποξία
HIF-1α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α
HIF-2α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2α
HRE: Στοιχείο απόκρισης στην υποξία
HRP: Υπεροξειδάση του αγριοραδικιού
in situ PLA: δοκιμασία σύνδεσης εγγύτητας *in situ*
MCS: Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης

MgcRacGAP: Male germ cell Rac GAP

mTOR: Στόχος της ραπαμυκίνης

PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PGK: Κινάση του φωσφορογλυκερινικού οξέος

PHD: Πρόλυλο-υδροξυλάση

PI3K: Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης

PMSF: Φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

SDS: Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο

SV40: Simian Virus 40

TEMED: N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

Tris: Τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο

VEGF: Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	15
SUMMARY.....	17
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	26
1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....	27
1.1.1 Δομή του HIF-1α.....	28
1.1.2 Δομή του HIF-1β ή ARNT.....	29
1.1.3 Δομή του HIF-2α.....	30
1.1.4 Δομή του HIF-3α.....	30
1.2 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α.....	31
1.2.1 Υδροξυλίωση του HIF-1α.....	31
1.2.2 Ρύθμιση του HIF-1α από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	35
1.3 Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ HIF-1.....	36
1.3.1 Ο ρόλος του HIF-1 στην εμβρυογένεση.....	36
1.3.2 Ο ρόλος του HIF-1 στην σκελετική ανάπτυξη-αγγειογένεση.....	37
1.3.3 Ο ρόλος του HIF-1 στην ανοσολογική απόκριση.....	39
1.3.4 Ο ρόλος του HIF-1 στον μεταβολισμό.....	41
1.3.5 Ο ρόλος του HIF-1 στον μεταβολισμό των λιπιδίων.....	44
1.4 ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α.....	46
1.4.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	46
1.4.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης.....	47
1.4.3 Αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες.....	49
1.4.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	53
1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....	55
1.5.1 HIF-1 και καρκίνος.....	55
1.5.2 HIF-1 και ισχαιμία.....	61
1.5.3 HIF-1 και φλεγμονή.....	63
1.5.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	64

1.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1 ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ	68
1.6.1 Κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α	68
1.6.2 Ρύθμιση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2.....	70
1.6.2.1 Η οικογένεια των κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK)	70
1.6.2.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2.....	74
1.6.3 Ρύθμιση του HIF-1α από την κινάση CK1δ	75
1.6.3.1 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1).....	75
1.6.3.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ	78
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	79
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	80
2. 1 ΥΛΙΚΑ.....	80
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη	80
2.1.2 Κυτταρικές σειρές.....	80
2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	81
2.1.4 Μάρτυρες μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA	84
2.1.5 Αλληλούχηση (sequencing).....	85
2.1.6 Χημικά αντιδραστήρια.....	85
2.1.7 Υλικά μοριακής βιολογίας.....	85
2.1.8 Αντισώματα	85
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
2.2.1 Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.....	86
2.2.1.1 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	86
2.2.1.2 Αποφωσφορυλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA	87
2.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	87
2.2.1.4 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	88
2.2.1.5 Αντίδραση λιγάσης.....	88
2.2.2 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασηματισμό (competent) και μετασηματισμός <i>E.coli</i> Top10	89
2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation).....	90
2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation).....	90
2.2.5 Έλεγχος της ορθότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν ..	91

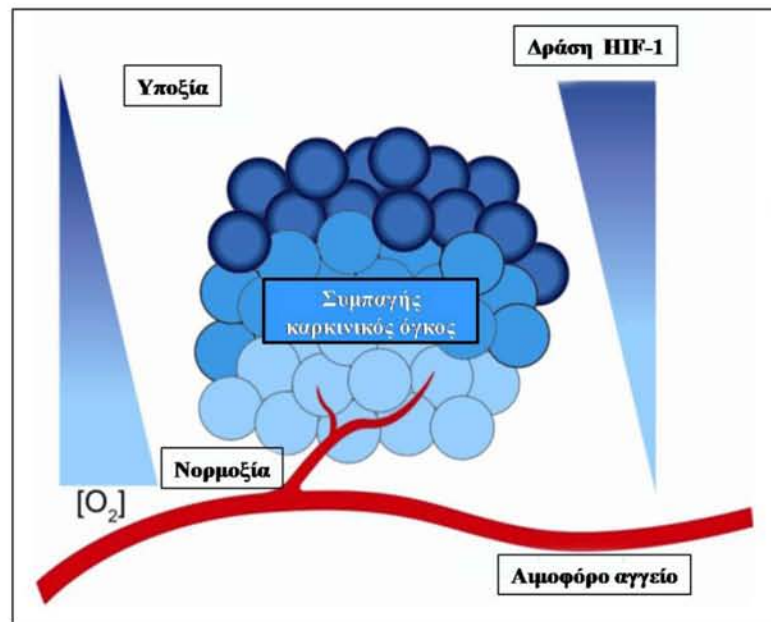
2.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες.....	91
2.2.7 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών	91
2.2.8 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων	92
2.2.9 Επίδραση ουσιών και επαγωγή του HIF-1α	93
2.2.10 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA	93
2.2.11 Σύστημα επαγωγίμης έκφρασης TET OFF.....	94
2.2.11.1 Αρχή λειτουργίας και πλασμιδιακοί φορείς του συστήματος TET.OFF	94
2.2.11.2 Διαδικασία κλωνοποίησης στον πλασμιδιακό φορέα pTRE-Tight	97
2.2.12 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα	98
2.2.13 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	98
2.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	99
2.2.15 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	99
2.2.16 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	101
2.2.17 <i>in situ</i> Proximity Ligation Assay (<i>in situ</i> PLA).....	102
2.2.18 Προσδιορισμός της επιβίωσης-πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.....	104
2.2.19 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.....	105
2.2.20 Δοκιμασία επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP)	106
2.2.21 Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (CHIP).....	107
2.2.22 Ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου <i>LPIN1</i> με PCR.....	109
2.2.23 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR).....	110
2.2.24 Ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων CHIP-real time PCR.....	111
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	113
ΜΕΡΟΣ Α: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ETD ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΕΙΑΣ.....	113
3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ETD ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1.....	113
3.1.1 Κλωνοποίηση των cDNA των επικρατειών ETD σε πλασμιδιακούς φορείς κατάλληλους για τη διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών	114

3.1.2 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των πεπτιδίων FLAG ETD σε φυσιολογικές και σε υποξικές συνθήκες.....	116
3.1.3 Έλεγχος της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του εξωγενούς και του ενδογενούς HIF-1α	119
3.1.4 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1	120
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΙΜΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ FLAG ETD ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1α.....	122
3.2.1 Κατασκευή των κατάλληλων πλασμιδίων για το σύστημα TET OFF	122
3.2.1.1 Κατασκευή του ανασυνδασμένου πλασμιδίου <i>pTRE Tight – GFP</i>	122
3.2.1.2 Κατασκευή των πλασμιδίων <i>pTRE Tight – FLAG ETD</i>	123
3.2.2 Έλεγχος του συστήματος επαγωγίμης έκφρασης TET OFF	124
3.2.3 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πεπτιδίων FLAG ETD μετά από επαγωγή έκφρασή τους σε κύτταρα tTA-HerpG2	126
3.2.4 Μελέτη της επίδρασης της επαγωγίμης έκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α.....	127
3.2.5 Μελέτη της επίδρασης της επαγωγίμης έκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1	128
3.2.6 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων ETD wt και I→A στη μεταβολική λειτουργία του HIF-1α	129
ΜΕΡΟΣ Β: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CK1δ ΣΤΟΝ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟΝ ARNT ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΙΑΣ.....	131
3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HIF-1α/ARNT ΣΕ ΑΚΕΡΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ <i>in situ</i> PLA.....	131
3.3.1 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT και του συμπλόκου τους με τη μέθοδο <i>in situ</i> PLA.....	131
3.3.2 Επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μεθόδου <i>in situ</i> PLA σε κύτταρα HeLa	133
3.3.2.1 Μελέτη της επίδρασης της καμπερόλης στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο <i>in situ</i> PLA	134
3.3.2.2 Κατασκευή και έλεγχος της έκφρασης και της δράσης του ανασυνδασμένου πλασμιδίου <i>pEGFP-HIF-1α 1-347</i>	135
3.3.2.3 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του πεπτιδίου HIF-1α 1-347 στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο <i>in situ</i> PLA.....	137

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CK1δ ΣΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HIF-1α/ARNT ΜΕΣΑ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	138
3.4.1 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της CK1δ στον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT	138
3.4.2 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT	139
3.4.3 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στη δραστικότητα του HIF-1 και στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και ARNT	140
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΗΝ CK1δ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ..	142
3.5.1 Μελέτη της έκφρασης των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α	142
3.5.2 Μελέτη της πυρηνικής κινητικότητας των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α που φωσφορυλιώνονται ή όχι από την CK1δ	143
3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΗΝ CK1δ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....	145
3.6.1 Διερεύνηση της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στην έκφραση της λιπίνης-1 ...	145
3.6.2 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της δράσης της CK1δ στον σχηματισμό λιποσταγονιδίων.....	147
3.6.3 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της CK1δ στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας.....	149
3.6.4 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της δράσης της CK1δ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	151
3.6.5 Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω αναστολής της CK1δ εξαρτάται από τον HIF-1α και τη λιπίνη-1	152
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	154
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	163

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οξυγόνο (O_2) είναι ένα κεντρικής σημασίας στοιχείο για τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών καθώς είναι απαραίτητο στην διαδικασία της αερόβιας αναπνοής. Η συσσώρευσή του στην ατμόσφαιρα άρχισε πριν από 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια και οδήγησε στην εξέλιξη του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Στη διαδικασία αυτή το O_2 λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων από το σύμπλεγμα IV της αναπνευστικής αλυσίδας που προήλθε από την οξείδωση βιολογικών υποστρωμάτων.



Εικόνα 1: Σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης οξυγόνου και των επιπέδων του HIF-1 σε ένα συμπαγή καρκινικό όγκο. Σε περιοχές όπου υπάρχει συνεχής τροφοδότηση μέσω των αιμοφόρων αγγείων επικρατούν φυσιολογικές συνθήκες O_2 και μειωμένα επίπεδα HIF-1. Αντίθετα, προχωρώντας προς το εσωτερικό του όγκου μειώνεται η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο οπότε επάγεται η έκφραση του HIF-1 (1).

Επομένως, ήταν σημαντικό για τους οργανισμούς να αναπτύξουν μηχανισμούς διατήρησης της ομοιοστασίας της συγκέντρωσης οξυγόνου, μέσω των οποίων οι οργανισμοί μπορούν να προσαρμοστούν στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης O_2 . Σε περίπτωση διαταραχής της ομοιοστασίας της συγκέντρωσης O_2 μπορεί να προκληθεί υπεροξία (αυξημένη συγκέντρωση O_2) ή υποξία (μειωμένη συγκέντρωση O_2). Η υπεροξία, μπορεί να προκληθεί, για παράδειγμα, μέσω υπέρμετρης χορήγησης O_2 σε ασθενείς, και μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία ή θάνατο λόγω δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η υποξία σε φυσιολογικές καταστάσεις αποτελεί το απαραίτητο εξωκυττάριο ερέθισμα για την ομαλή εμβρυογένεση και ανάπτυξη. Ωστόσο, αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό πολλών παθολογικών

καταστάσεων όπως της αναιμίας, της πνευμονίας, των οξείων και χρόνιων ισχαιμιών, των φλεγμονών καθώς και των συμπαγών καρκινικών όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα των συμπαγών όγκων χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται υποξικές συνθήκες στο εσωτερικό του όγκου λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης στην περιοχή αυτή (Εικόνα 1).

Τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά κύτταρα για να προσαρμοστούν στο υποξικό περιβάλλον επάγουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό καθώς και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαφοροποίηση και η μετάσταση. Η μεταγραφή αυτών των γονιδίων κατά την υποξία επάγεται από την ενεργοποίηση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF (Hypoxia-Inducible Factors).

1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF ανήκουν στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim, bHLH/PAS). Η περιοχή bHLH βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε ειδικές περιοχές του DNA των γονιδίων στόχων, που καλούνται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia-response elements ή HREs). Το όνομα της περιοχής PAS προήλθε από τα πρώτα γνωστά μέλη της οικογένειας: των γονιδίων period (Per) και single-minded (Sim) της *Drosophila* και των γονιδίων aryl hydrocarbon receptor (AHR) και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) των θηλαστικών. Η περιοχή PAS περιέχει δύο εσωτερικές ομόλογες υποπεριοχές τις A και B που έχουν βασικά αμινοξέα και αποτελεί την περιοχή ετεροδιμερισμού (2).

Οι HIF δρουν ως ετεροδιμερή αποτελούμενοι από μια άλφα και μια βήτα υπομονάδα. Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί διάφορες ισομορφές των άλφα και βήτα υπομονάδων, ωστόσο οι πιο καλά μελετημένες είναι οι ισομορφές HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α και HIF-1β ή ARNT. Οι υπομονάδες άλφα ετεροδιμερίζονται με την υπομονάδα βήτα και σχηματίζουν το ενεργό σύμπλοκο HIF-1, HIF-2 και HIF-3 αντίστοιχα (3).

1.1.1 Δομή του HIF-1α

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων και εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη καθώς εμφανίζει περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Η πρωτεΐνη HIF-1α εκφράζεται συνεχώς μέσα στα κύτταρα ωστόσο η σταθεροποίησή της εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου.

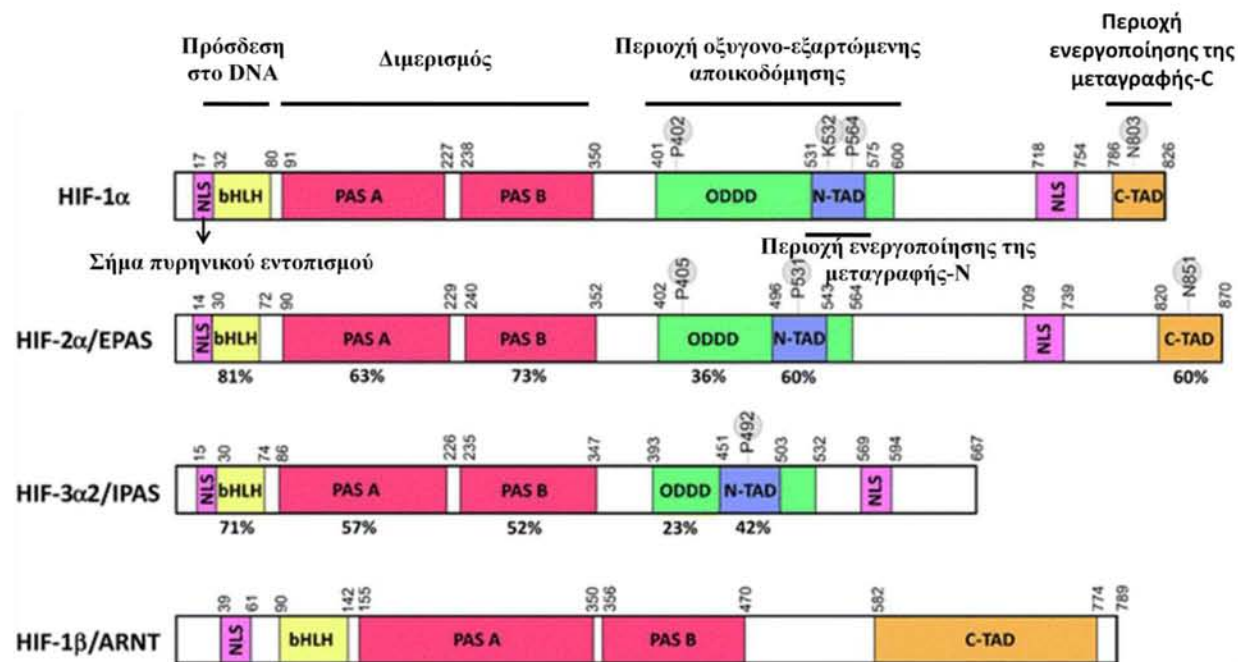
Στο αμινοτελικό του άκρο (αμινοξέα 1-500) περιέχει την περιοχή HLH (αμινοξέα 31-71) και την περιοχή PAS (αμινοξέα 91-350) με τις A (91-227) και B (238-350) υποπεριοχές. Στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α εντοπίζονται δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), η N-TAD (αμινοξέα 531-575) και η C-TAD (αμινοξέα 786-826) ανάμεσα από τις οποίες εντοπίζεται η ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (inhibitory domain, ID) (4). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (Oxygen Dependent Degradation) (αμινοξέα 401-600) που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Η C-TAD περιοχή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300 (5).

Ο HIF-1α έχει δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals) ένα στην αμινοτελική περιοχή (17-30), και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (718-754) (Εικόνα 2) (5). Ωστόσο, φαίνεται ότι η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα μεσολαβείται από το NLS της καρβοξυτελικής περιοχής (6), το οποίο αλληλεπιδρά με τις ιμφορτίνες α/β (7). Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, μετάλλαξη αμινοξέων του καρβοξυτελικού NLS δεν απέκλεισε την είσοδο του HIF-1α από τον πυρήνα, υποδεικνύοντας την πιθανότητα να υπάρχει και άλλος τρόπος εισόδου του στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι οι ιμφορτίνες 4 και 7 οδηγούν τον HIF-1α στον πυρήνα, με την ιμφορτίνη 7 να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του HIF-1α bHLH-PASA (8). Επιπλέον, ο HIF-1α διαθέτει ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES) στην περιοχή 632-639, που ρυθμίζει την εξαγωγή του από τον πυρήνα με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από την CRM1, τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (9). Η έξοδος αυτή του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα αναστέλλεται όταν φωσφορυλιωθούν γειτονικά στο NES κατάλοιπα σερίνης (10).

Ο HIF-1α ετεροδιμερίζεται με τον HIF-1β ή ARNT προκειμένου να σχηματιστεί το ενεργό σύμπλοκο του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, ο οποίος προσδένεται στα στοιχεία HREs (5' - CAGGT-3') του υποκινητή των γονιδίων στόχων του, επάγοντας την έκφρασή τους.

1.1.2 Δομή του HIF-1β ή ARNT

Ο HIF-1β είναι ταυτόσημος με την πρωτεΐνη ARNT, η οποία έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με τον παράγοντα AHR προς σχηματισμό του λειτουργικού υποδοχέα της διοξίνης. Ωστόσο, ο ARNT ετεροδιμερίζεται και με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH-PAS όπως είναι ο HIF-1α, ο HIF-2α, η Single-minded protein 1 και 2 (SIM 1 & 2) και ο παράγοντας Cardiovascular helix-loop-helix factor 1 (CHF1) (11). Ο ARNT αποτελείται από 798 αμινοξέα και στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει ένα NLS, μια περιοχή bHLH και την PAS περιοχή, οι οποίες αντίστοιχα ευθύνονται για τον πυρηνικό του εντοπισμό, την πρόσδεση στο DNA και τον ετεροδιμερισμό του (Εικόνα 2). Στο καρβοξυτελικό του άκρο υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD) η οποία δε φαίνεται να παίζει ρόλο στη μεταγραφική ενεργότητα των ετεροδιμερών HIF 1/2α/ARNT ή AhR/ARNT (12).



Εικόνα 2: Πρωτεϊνικές περιοχές των ισομορφών HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α και HIF-1β ή ARNT. Οι πρωτεΐνες περιέχουν μια περιοχή bHLH που ευθύνεται για την πρόσδεσή τους στο DNA και δύο PAS περιοχές (A και B) που αποτελούν τη θέση ετεροδιμερισμού τους με τον ARNT. Στο καρβοξυτελικό τους άκρο οι HIF-1α και HIF-2α περιέχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής N-TAD και C-TAD (ενώ ο ARNT έχει μια περιοχή TAD), και την περιοχή ODD που είναι υπεύθυνη για την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμησή τους (13).

1.1.3 Δομή του HIF-2α

Ο HIF-2α ανακαλύφθηκε το 1997 από τέσσερα ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια ως endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) (14) ή HIF-related factor (HRF) (15) ή HIF-like factor (HLF) (16) ή MOP2 (member of: PAS family 2) (17). Σε αντίθεση με τον HIF-1α που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ο HIF-2α εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων καθώς και σε επιθηλιακά κύτταρα διαφόρων ιστών σε συνθήκες υποξίας όπως είναι των νεφρών, των πνευμόνων, του παχέος εντέρου. Επιπλέον, εκφράζεται και σε ηπατοκύτταρα, μακροφάγα, μυϊκά κύτταρα και αστροκύτταρα (18). Παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τον HIF-1α κυρίως στις περιοχές του αμινοτελικού τμήματος bHLH (85% ομολογία) και στην περιοχή PAS (70% ομολογία) (14).

Ο HIF-2α έχει κοινές δομικές και βιοχημικές ιδιότητες με τον HIF-1α. Στο μόριο και των δύο υπάρχουν οι περιοχές bHLH και PAS για την πρόσδεση στα HREs των γονιδίων στόχων και για τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT, αντίστοιχα. Επιπλέον, κοινό χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη δύο πιθανών NLS: ένα στο αμινοτελικό τμήμα (N-NLS) κι ένα στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-2α (C-NLS) (19). Όπως ο HIF-1α έτσι και ο HIF-2α διαθέτει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD και C-TAD). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή, έχει μικρή ομολογία ανάμεσα στον HIF-1α και στον HIF-2α (40%) και είναι εκείνη που απονέμει την εξειδίκευση για τα γονίδια στόχους (Εικόνα 2). Η C-TAD περιοχή και στις δύο ισομορφές αλληλεπιδρά με διάφορους συμπαραγόντες όπως ο CBP ή ο p300 για την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων (20).

1.1.4 Δομή του HIF-3α

Ο HIF-3α παρουσιάζει μικρή ομολογία με τις δύο παραπάνω ισομορφές HIF-α. Υπάρχουν πολλές ισομορφές του HIF-3α που διαφέρουν δομικά και οι οποίες προέρχονται από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών, διαφορετικών θέσεων έναρξης της μεταγραφής ή λόγω εναλλακτικού ματίσματος (5). Για παράδειγμα, η ισομορφή HIF-3α1 διαθέτει μία μόνο περιοχή TAD και έχει δύο μοναδικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι εξελικτικά συντηρημένα, την περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα λυσίνης (LZIP) στο καρβοξυτελικό τμήμα και το μοτίβο LXXLL (21).

Ο ρόλος του HIF-3 στην υποξία δεν είναι ξεκάθαρος. Ωστόσο, βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των HIF-1 και HIF-2 στην υποξία.

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η ισομορφή 4 του HIF-3α αναστέλλει την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α (22). Επιπλέον, η ισομορφή IPAS (inhibitory PAS) (Εικόνα 2) σχηματίζει διμερή με τον HIF-1α (23) και η ισομορφή NEPAS (neonatal and embryonic PAS) διμερίζεται με τον ARNT (24), αναστέλλοντας έτσι τη δράση του HIF-1.

Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο HIF-3α σε υποξικές συνθήκες δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και δρα με όμοιο τρόπο με τους HIF-1α και HIF-2α. Συγκεκριμένα σε έμβρυα ψαριού του είδους *Danio rerio* (γνωστό ως zebrafish), έχειδειχθεί ότι οι ισομορφές 1 και 9 του HIF-3α αποικοδομούνται σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, σταθεροποιούνται στην υποξία όπου ετεροδιμερίζονται με τον ARNT σχηματίζοντας το ενεργό σύμπλοκο HIF-3, το οποίο προσδένεται στα HREs γονιδίων στόχων των οποίων επάγει την έκφραση (25).

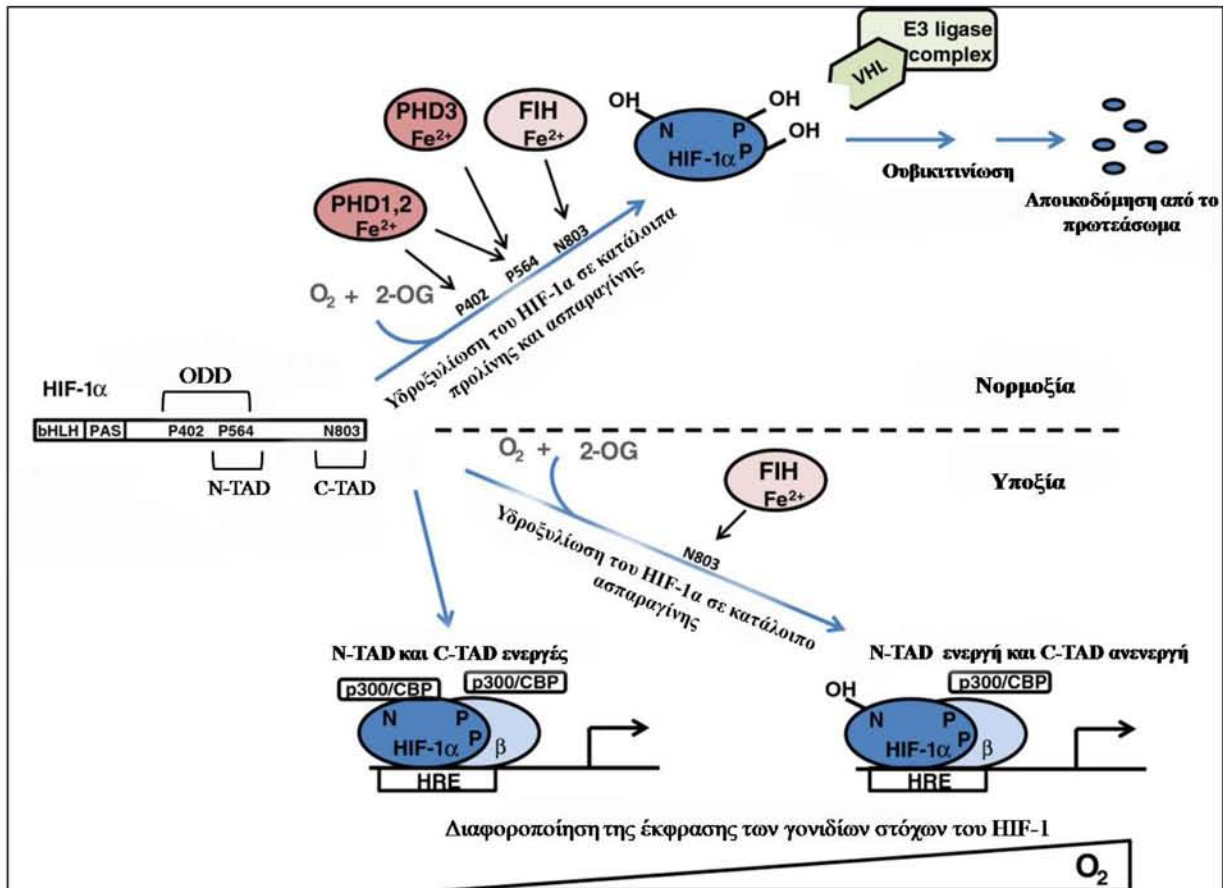
1.2 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

Σε φυσιολογικές συνθήκες O₂ οι δυο υπομονάδες του HIF-1 (HIF-1α και ARNT) μεταγράφονται και μεταφράζονται συνεχώς. Όμως, ο HIF-1α αποικοδομείται γρήγορα από το πρωτεάσωμα (ημιζωή < 5 min) με αποτέλεσμα να μην συγκροτείται το λειτουργικό σύμπλοκο του HIF-1. Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας η αποικοδόμηση του HIF-1α αναστέλλεται με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και την είσοδό του πυρήνα. Εκεί σχηματίζεται το λειτουργικό σύμπλοκο του HIF-1, μετά από την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την υπομονάδα ARNT, το οποίο στη συνέχεια προσδένεται στη χρωματίνη. Στη συνέχεια αλληλεπιδρά με διάφορους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως είναι οι CBP/p300, ο SRC-1 και ο TIF-2 μέσω πρόσδεσής τους στις TAD περιοχές του και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Οι παραπάνω κυτταρικές διαδικασίες ρυθμίζονται τόσο από οξυγονο-εξαρτώμενους μηχανισμούς όσο και από μη οξυγονο-εξαρτώμενους μηχανισμούς (5). Παρακάτω θα περιγραφεί η οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση της υπομονάδας άλφα των HIF.

1.2.1 Υδροξυλίωση του HIF-1α

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ή νορμοξία) ο HIF-1α, και γενικότερα η υπομονάδα άλφα των HIF, παράγεται συνεχώς αλλά αποικοδομείται γρήγορα από το πρωτεάσωμα. Ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της πρωτεϊνικής έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α είναι μέσω υδροξυλίωσης τόσο καταλοίπων προλίνης (Pro) όσο και ασπαραγίνης (Asp).

Η υπομονάδα άλφα των HIFs υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης από τα ένζυμα υδροξυλάσες προλίνης (ή PHD, Prolyl Hydroxylase Domain). Οι PHDs ανήκουν στην υπεροικογένεια των διοξυγενασών και έχουν βρεθεί 3 ισομορφές οι PHD1, PHD2 και PHD3, στα κύτταρα των θηλαστικών. Για τη δράση τους απαιτούν την ύπαρξη δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στο καταλυτικό τους κέντρο και επιπλέον την ύπαρξη O_2 , α -κετογλουταρικού και ασκορβικού οξέος. Ως διοξυγενάσες, διασπών το μοριακό οξυγόνο σε δύο άτομα που το ένα εισάγεται στα κατάλοιπα προλίνης του υποστρώματος, όπως ο HIF-1 α , οξειδώνοντάς το. Το άλλο άτομο O_2 χρησιμοποιείται για την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 2-κετογλουταρικού σε ηλεκτρικό οξύ και CO_2 . Το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του σιδήρου στην μορφή Fe^{2+} ώστε να χρησιμοποιηθεί σε επόμενο καταλυτικό κύκλο (21, 26, 27).



Εικόνα 3: Ρύθμιση του HIF-1 α μέσω υδροξυλίωσης. Κατά τη νορμοξία οι υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 υδροξυλιώνουν τον HIF-1 α στις προλίνες 402 και 564, γεγονός που προκαλεί την πρόσδεση της πρωτεΐνης VHL σε αυτές. Στη συνέχεια, ο HIF-1 α ουβικιτινώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 803 του HIF-1 α από το ένζυμο FIH (Factor Inhibiting HIF-1) εμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών p300 και CBP στον HIF-1 α και έτσι αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (27).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι HIF-α υδροξυλιώνονται από τις PHDs σε προλίνες που βρίσκονται στο γενικό μοτίβο LXXLAP της περιοχής ODD. Όλες οι PHDs υδροξυλιώνουν την καρβοξυτελική περιοχή της ODD (C-ODD) πιο αποτελεσματικά από την αμινοτελική περιοχή της ODD (N-ODD), ενώ η PHD3 δεν έχει καθόλου δραστηριότητα στην N-ODD (28). Πιο συγκεκριμένα ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης, Pro-402 και Pro-564, ο HIF-2α στα κατάλοιπα Pro-405 και Pro-531 και ο HIF-3α στο Pro-492. Η υδροξυλίωση στα κατάλοιπα προλίνης επιτρέπει την πρόσδεση σε αυτές της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης Von Hippel Lindau (ή pVHL), η οποία αποτελεί μέρος του συμπλέγματος της λιγάσης της ουβικιτίνης E3 και περιλαμβάνει τους παράγοντες Cullin2, elongin C και Ring Box1. Η πρόσδεση της pVHL στις υδροξυλιωμένες προλίνες της περιοχής ODD οδηγεί στην ουβικιτινίωση της α υπομονάδας και στην τελική αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεόσωμα (Εικόνα 3) (21, 27, 29).

Τα τρία ένζυμα PHD1, PHD2 και PHD3 έχειδειχθεί ότι παρουσιάζουν διαφορετική ιστική κατανομή και διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό. Όσον αφορά την ιστική κατανομή, η PHD1 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς αλλά εμφανίζει υψηλά επίπεδα στους όρχεις, η PHD2 εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στον λιπώδη ιστό και η PHD3 εκφράζεται κυρίως στην καρδιά και στον πλακούντα (30). Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό, η PHD1 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD2 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και η PHD3 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (31).

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργότητα των PHDs ρυθμίζεται εκτός από το οξυγόνο και από το α-κετογλουταρικό που δρα ως συν-υπόστρωμα και από τα Fe^{2+} και ασκορβικό που δρουν ως συμπάροντες. Εφόσον το α-κετογλουταρικό είναι μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs, η ενεργότητα των PHDs ρυθμίζεται από τη λειτουργία του κύκλου. Το ηλεκτρικό οξύ και το φουμαρικό οξύ αναστέλλουν και τις τρεις ισομορφές των PHDs (32). Μεταλλάξεις στα ένζυμα του κύκλου του Krebs όπως η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (33-35) και η φουμαράση (36) συνδέονται με ογκογένεση. Τα παραπάνω ένζυμα του κύκλου του Krebs έχουν αναγνωριστεί σαν ογκοκατασταλτικά και μεταλλάξεις που τα απενεργοποιούν οδηγούν σε συσσώρευση ηλεκτρικού και φουμαρικού που αναστέλλουν τις PHDs και προκαλούν σταθεροποίηση του HIF-1α (33).

Άλλοι παράγοντες που απενεργοποιούν τις PHDs είναι ουσίες ανάλογα του α-κετογλουταρικού όπως η διμεθυλοξαυλο-γλυκίνη (DMOG), παράγοντες που μεταβάλλουν την

ενδοκυττάρια συγκέντρωση Fe^{2+} όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και η δεσφериοξαμίνη (DFO), τα οξειδία του αζώτου (NO) και τα δισθενή ιόντα όπως το νικέλιο (Ni^{2+}) και το κοβάλτιο (Co^{2+}). Η DFO δεσμεύει το Fe^{2+} ενώ οι ROS και τα οξειδία του αζώτου (NO) οδηγούν στη μετατροπή του Fe^{2+} , που είναι απαραίτητο για τη δράση των PHDs, σε Fe^{3+} με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές (37). Έχουν προταθεί ποικίλοι μηχανισμοί δράσης του Co^{2+} που οδηγούν σε συσσώρευση του HIF-1α στα κύτταρα. Ένας τέτοιος μηχανισμός που οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α είναι η αδρανοποίηση των PHDs, καθώς το Co^{2+} αντικαθιστά το Fe^{2+} , το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση τους (30). Άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων το Co^{2+} απενεργοποιεί τις PHDs είναι η μείωση της συγκέντρωσης του ασκορβικού ή η παρεμπόδιση της εισόδου του στο κύτταρο (26, 37). Έχει προταθεί επίσης ότι το Co^{2+} δεσμεύεται στον HIF-1α με αποτέλεσμα να εμποδίζει την πρόσδεση του pVHL σ' αυτόν οδηγώντας σε σταθεροποίηση του HIF-1α (38). Άλλες μελέτες εμπλέκουν τη δράση του Co^{2+} με την αυξημένη παραγωγή ROS και την μεσολάβηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως του PI3K μονοπατιού (39, 40) και του μονοπατιού των MAP κινασών (40) για την σταθεροποίηση του HIF-1α.

Σε υποξικές συνθήκες οι PHDs απενεργοποιούνται με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται η υπομονάδα άλφα των HIF (Εικόνα 3). Ωστόσο, βρέθηκε ότι τα γονίδια *PHD2* και *PHD3* περιέχουν HRE στον υποκινητή τους και η έκφραση των πρωτεϊνών τους επάγεται σε συνθήκες υποξίας, γεγονός που υποδεικνύει ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης των HIF-1/2α έπειτα από παρατεταμένη υποξία. Πιθανόν, η επαγωγή των PHDs από την υποξία να έχει σχέση με διαφορετική ρύθμιση των HIF-1/2α σε σύντομη και παρατεταμένη υποξία. Αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα (30). Επίσης σε υποξικές συνθήκες οι PHD1 και PHD3 υπόκεινται σε αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος μέσω των λιγασών ουβικιτίνης Siah1α και Siah2 (41).

Εκτός από τις PHDs, οι HIF-1α και HIF-2α υδροξυλιώνονται από ένα άλλο ένζυμο που ονομάζεται παράγοντας αναστολής του HIF (FIH, Factor Inhibiting HIF) που και αυτό ανήκει στην υπεροικογένεια των διοξυγενασών. Η FIH υδροξυλιώνει τον HIF-1α και τον HIF-2α σε κατάλοιπο ασπαραγίνης που βρίσκεται στην περιοχή C-TAD και συγκεκριμένα στο κατάλοιπο Asn-803 (HIF-1α) και στο Asn-847 (HIF-2α) (Εικόνα 3). Η υδροξυλιωμένη ασπαραγίνη παρεμποδίζει την πρόσδεση του συμπαράγοντα CBP/p300 στη περιοχή C-TAD με αποτέλεσμα ο

HIF-1α να απενεργοποιείται και να μην επάγονται γονίδια που εξαρτώνται από τη δράση της C-TAD (21).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υδροξυλάσες PHDs και FIH έχουν διαφορετικές απαιτήσεις σε O_2 . Έχει δειχθεί ότι το K_m των PHDs για το O_2 είναι 3 φορές μεγαλύτερο από της FIH (32). Αυτό σημαίνει ότι οι PHDs αδρανοποιούνται σε πιο ήπια υποξία σε σύγκριση με την FIH, η οποία έχει βρεθεί ότι παραμένει ενεργή σε 0,2% O_2 όπου ο HIF-1α έχει σταθεροποιηθεί λόγω πλήρους αδρανοποίησης των PHDs (42). Επομένως, σε έναν συμπαγή καρκινικό όγκο υπάρχουν περιοχές ήπιας υποξίας που ο HIF-1α σταθεροποιείται λόγω αδρανοποίησης των PHDs και παράλληλα αναστέλλεται μερικώς η ενεργότητά του λόγω της δράσης της FIH. Στις περιοχές αυτές επάγονται γονίδια στόχοι του HIF-1 που εξαρτώνται από τη δράση της περιοχής N-TAD. Σε περιοχές του όγκου με μεγαλύτερη υποξία η FIH αδρανοποιείται με αποτέλεσμα να δρα και η περιοχή C-TAD. Ο μηχανισμός αυτός προσδίδει ένα νέο ρόλο στην FIH, που έως τώρα αναφερόταν ως αναστολέας του HIF, αυτό του διαχωριστή των γονιδίων που επάγονται από την περιοχή N-TAD από αυτά που επάγονται από την C-TAD (Εικόνα 3) (43).

1.2.2 Ρύθμιση του HIF-1α από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι ROS δημιουργούνται φυσιολογικά ως παραπροϊόντα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούν O_2 , του κυτοχρώματος P450, των οξειδασών των αμινοξέων, των οξειδασών NADH/NADPH, των κυκλοξυγενασών και των λιποξυγενασών. Οι πιο κοινές μορφές ROS είναι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{\bullet}), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου (HO^{\bullet}) και το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\bullet}). Η υψηλή συγκέντρωση ROS οδηγεί σε καταστροφή του DNA. Έτσι, τα κύτταρα για να αμυνθούν στην αύξηση αυτή ενεργοποιούν αποπτωτικά μονοπάτια ή αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις ROS σε μη τοξικά προϊόντα (44, 45).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ROS σταθεροποιούν τον HIF-1α τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) όσο και σε υποξικές συνθήκες. Στην νορμοξία, χορήγηση H_2O_2 εξωγενώς ή οξειδάσης της γλυκόζης που οδηγεί στο σχηματισμό H_2O_2 από τα κύτταρα οδήγησε σε σταθεροποίηση του HIF-1α (46, 47). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για το αποτέλεσμα αυτό είναι η αδρανοποίηση των υδροξυλασών PHD από τις ROS λόγω οξείδωσης του Fe^{2+} , οπότε αποτρέπεται η υδροξυλίωση του HIF-1α. Επιπλέον, οι ROS επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια

όπως των ERK, PI3K/AKT και p38 MAPK, τα οποία οδηγούν στη μεταγραφή και την σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-1α (45).

Κύριο ρόλο στην παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια και στη σταθεροποίηση του HIF-1α φαίνεται ότι έχει το σύμπλεγμα III της αναπνευστικής αλυσίδας (46) και συγκεκριμένα η πρωτεΐνη RISP (Rieske iron sulfur protein) η οποία είναι η καταλυτική υπομονάδα του συμπλέγματος III (47). Επίσης, το κυτόχρωμα c έχει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του HIF-1α στην υποξία, καθώς διατηρεί τη RISP οξειδωμένη και ικανή να παράγει ROS (46). Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι ολόκληρο το σύστημα της αναπνευστικής αλυσίδας ευθύνεται για τη σταθεροποίηση του HIF-1α και όχι μόνο το σύμπλεγμα III (48).

Τα οξειδία του αζώτου (NO) επίσης σταθεροποιούν τον HIF-1α στην νορμοξία όσο και στην υποξία. Εκτός του μηχανισμού αδρανοποίησης των υδροξυλασών PHD, τα NO επάγουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η S-νιτροζυλίωση, η οποία οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α (31, 49).

Επιπλέον, στη ρύθμιση του HIF-1α από τα ROS εμπλέκεται η δράση των microRNAs (ή miR) και φλεγμονωδών παραγόντων. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι σταθεροποίηση του HIF-1α προκαλείται και μέσω επαγωγής του miR-21 από το H₂O₂ λόγω ενεργοποίησης των μονοπατιών AKT και ERK. Επιπλέον, η επαγωγή του miR-210 από την υποξία επάγει τον HIF-1α μέσω αναστολής του συμπλέγματος II και πιθανόν μέσω ROS, γεγονός που είναι κυτταροειδικό (45). Οι παράγοντες φλεγμονής, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-αλφα (ή TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1β (ή IL-1β) επάγονται από τη χορήγηση H₂O₂ και οδηγούν σε ενίσχυση της μεταγραφής και της σύνθεσης της πρωτεΐνης HIF-1α στην νορμοξία (50). Οι παραπάνω δράσεις των ROS που οδηγούν στη σταθεροποίηση του HIF-1α συνδέονται με την καρκινογένεση και την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου, καθώς προκαλείται έκφραση γονιδίων στόχων του.

1.3 Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ HIF-1

1.3.1 Ο ρόλος του HIF-1 στην εμβρυογένεση

Η συγκέντρωση οξυγόνου στους υπό διαφοροποίηση ιστούς παίζει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη των συστημάτων μεταφοράς οξυγόνου κατά την εμβρυογένεση. Έχει παρατηρηθεί ότι το υποξικό περιβάλλον (1%-5% O₂) κατά την εμβρυογένεση συμβάλλει στη διαμόρφωση του

καρδιαγγειακού, του αναπνευστικού, του νευρικού συστήματος και στην ανάπτυξη του πλακούντα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις προήλθαν από πειράματα που έγιναν σε έμβρυα ποντικών στα οποία έγινε απαλοιφή γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι της υποξίας και ειδικότερα των γονιδίων του HIF-1α, HIF-2α και ARNT.

Σε φυσιολογικά έμβρυα ποντικού η πρωτεΐνη HIF-1α είναι ανιχνεύσιμη μεταξύ των ημερών 8,5 και 9,5. Η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α (Hif-1α^{-/-}) προκάλεσε θάνατο των εμβρύων την 11^η μέρα εξαιτίας αδυναμίας σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων, μειωμένου αριθμού σωμιτών, ελαττωματικού σχηματισμού νευρικού ιστού, ανωμαλιών στο σχηματισμό αγγείων της καρδιάς και αυξημένης ιστικής υποξίας (51, 52). Όμοιο φαινότυπο είχαν και τα έμβρυα ποντικών στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον ARNT, προκαλώντας το θάνατό τους τη 10,5 μέρα (53).

Η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α (Hif-2α^{-/-}) σε ποντίκια επιχειρήθηκε από αρκετές ερευνητικές ομάδες και παρουσίασε διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τη σειρά πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκε. Η πρώτη ερευνητική ομάδα που δημιούργησε ποντίκια Hif-2α^{-/-} παρατήρησε ότι η απαλοιφή του γονιδίου Hif-2α οδήγησε σε θάνατο των εμβρύων ποντικών στο μέσο της κύησης λόγω βραδυκαρδίας προκαλούμενης από ανεπαρκή παραγωγή κατεχολαμινών ή ακόμα και μετά τη γέννησή τους τα νεογνά πέθαιναν λόγω ατελούς ωρίμανσης των πνευμόνων (54). Μελέτες μιας άλλης ομάδας έδειξαν ότι τα μισά έμβρυα ποντικών Hif-2α^{-/-} πέθαναν μετά την ημέρα 13,5, ενώ αυτά που επέζησαν πέθαναν 2-3 ημέρες μετά τη γέννηση λόγω συνδρόμου αναπνευστικής δυσφορίας (55). Μια τρίτη ομάδα ανέφερε ότι τα ποντίκια Hif-2α^{-/-} πέθαναν λόγω πολυοργανισμικής δυσλειτουργίας που προκλήθηκε μέσω της δράσης των παραγόμενων ROS (56). Συμπερασματικά, η φυσιολογική υποξία και η δράση των HIF-1 και HIF-2 είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του καρδιαγγειακού-αναπνευστικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση.

1.3.2 Ο ρόλος του HIF-1 στην σκελετική ανάπτυξη-αγγειογένεση

Η οστεογένεση στα θηλαστικά πραγματοποιείται μέσω διαφοροποίησης των μεσεγχαματικών κυττάρων της περιοχής όπου πρόκειται να σχηματιστεί το οστό, είτε απευθείας σε οστεοκύτταρα (ενδομεμβρανική οστεοποίηση) είτε μέσω διαφοροποίησής τους αρχικά προς χονδροκύτταρα τα οποία θα αντικατασταθούν στη συνέχεια από οστεοκύτταρα. Τα τελευταία

προέρχονται από οστεοπρογονικά κύτταρα που μεταφέρονται στην περιοχή μέσω των αγγείων (ενδοχόνδρια οστεοποίηση).

Η οστεοποίηση και η αγγειογένεση είναι διαδικασίες στενά συνδεδεμένες χρονικά και χωρικά, καθώς τα αιμοφόρα αγγεία αναλαμβάνουν τη μεταφορά O_2 και θρεπτικών συστατικών στο υπό ανάπτυξη οστό και συμβάλλουν επίσης στην μεταφορά διαφόρων κυττάρων του οστίτη ιστού. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο HIF-1α προάγει την αγγειογένεση και την οστεογένεση μέσω επαγωγής της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) στους οστεοβλάστες. Άλλοι προ-αγγειογόνοι παράγοντες που επάγονται από τον HIF-1α είναι η συνθάση οξειδίων του αζώτου (NOS2), η οξυγενάση της αίμης, η ενδοθηλίνη 1 (ET1), με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων στις υποξικές περιοχές και τον εφοδιασμό τους με O_2 και θρεπτικά συστατικά (57). Οι παραπάνω μελέτες που αφορούν το ρόλο του HIF-1α στην οστεογένεση έγιναν σε οστεοβλάστες ποντικών $Vhl^{-/-}$ (που στερούνταν της έκφραση Vhl) αλλά που υπερέκφραζαν HIF-1α και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων VEGF και αυξημένη αγγείωση στα μακρά οστά. Αντίθετα, στα ίδια ποντίκια η απουσία έκφρασης του HIF-1α οδήγησε στο σχηματισμό λεπτών οστών τα οποία είχαν μικρότερη αγγείωση (57).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος (MSCs) είναι πολυδύναμα κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και μυοβλάστες. Είναι απαραίτητα για την αναδόμηση και επιδιόρθωση κατεστραμμένων ιστών και μεταφέρονται στις περιοχές όπου υπάρχει ανάγκη οστικής αναδόμησης μέσω των αιμοφόρων αγγείων. Στις περιοχές αυτές τα κύτταρα αυτά μπορούν να βρεθούν σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης O_2 και θρεπτικών συστατικών λόγω ελλιπούς αγγείωσης. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η υποξία και κατ'επέκταση ο HIF-1 ευνοεί τη διαφοροποίηση των MSCs προς χονδροκύτταρα (58) και οστεοκύτταρα και αυξάνει έτσι την ικανότητα αναδόμησης του οστού (59, 60), αλλά υπάρχουν και ορισμένες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η επαγωγή του HIF-1α στα κύτταρα αυτά σε συνθήκες υποξίας αναστέλλει την ικανότητα διαφοροποίησής τους σε λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα (61, 62). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο HIF-1 έχει σημαντικό ρόλο στη σκελετική ανάπτυξη των θηλαστικών καθώς και στην ιστική αναδόμηση όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις τραυματισμού.

1.3.3 Ο ρόλος του HIF-1 στην ανοσολογική απόκριση

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της ζωής τους εκτίθενται σε χαμηλές συνθήκες O_2 καθώς αναπτύσσονται και καθώς μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους διάφορους ιστούς. Όμως, οι μηχανισμοί προσαρμογής τους στις συνθήκες αυτές δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.

Έχει προταθεί ότι ο HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και δράση των κυττάρων της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης (B- και T-λεμφοκύτταρα) καθώς και στη δράση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας (φαγοκύτταρα). Ο HIF-1α φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων όπως έχει δειχθεί με πειράματα σε ποντίκια $Hif-1\alpha^{-/-}$, στα οποία παρατηρήθηκε ανώμαλη ανάπτυξη και ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων στον μυελό των οστών (63).

Πολυάριθμες είναι οι μελέτες που αναφέρονται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της δράσης των T-λεμφοκυττάρων από τον HIF-1α. Δύο σημαντικές υποκατηγορίες T-λεμφοκυττάρων των οποίων η διαφοροποίηση φαίνεται ότι καθορίζεται από τον HIF-1α είναι τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (Treg) και τα T_H17 . Και οι δύο κυτταρικοί τύποι προέρχονται από ένα κοινό πρόδρομο $CD4^+$ T-κύτταρο αλλά επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. Τα κύτταρα Treg καταστέλλουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και βοηθούν στην ανοσοαντοχή στα αυτοαντιγόνα. Χαρακτηριστικό γνώρισμά τους είναι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3. Τα κύτταρα T_H17 έχουν σημαντικό ρόλο στις αποκρίσεις εναντίον βακτηριακών μολύνσεων αλλά έχουν συσχετιστεί και με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα. Ο HIF-1 φαίνεται ότι ενισχύει την ανάπτυξη των κυττάρων T_H17 και μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων Treg (64). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα ROR γ t (retinoid-related orphan receptor γ t) από τον HIF-1 και δημιουργίας συμπλόκου ROR γ t / HIF-1/ p300 στον υποκινητή της IL-17, η οποία είναι χαρακτηριστική των κυττάρων T_H17 . Αντίθετα, ο HIF-1 εξασθενεί την ανάπτυξη των κυττάρων Treg μέσω δέσμευσης στον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 του οποίου προκαλεί την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η παραπάνω ρύθμιση παρατηρήθηκε τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποξικές συνθήκες (64).

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου ο HIF-1α καθορίζει τη διαφοροποίηση των δύο παραπάνω υποομάδων T-λεμφοκυττάρων είναι μέσω ρύθμισης του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού τους. Πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας τη 2-δεοξυγλυκόζη, έναν

αναστολέα της διαδικασίας της γλυκόλυσης, προκάλεσαν αναστολή της διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων σε T_H17 και ενίσχυση της διαφοροποίησής τους προς Treg (65). Επιπλέον, απώλεια της δράσης του HIF-1α σε T-λεμφοκύτταρα ανέστειλε την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων και έτσι ευνοήθηκε η παραγωγή των κυττάρων Treg. Επομένως, ο HIF-1α συμβάλει στο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των T-λεμφοκυττάρων ο οποίος κατευθύνει τη διαφοροποίησή τους (65). Ακόμη μια μελέτη υποστηρίζει την αύξηση του αριθμού και της δράσης των κυττάρων Treg από τον HIF-1α λόγω επαγωγής της έκφρασης του χαρακτηριστικού τους μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (66).

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την αρνητική ρύθμιση της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων από τον HIF-1α. Οι πρώτες μελέτες έγιναν σε T-λεμφοκύτταρα ποντικών Hif-1α^{-/-}, τα οποία παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και ιντερφερόνης γ (IFN-γ) σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (67). Επόμενη μελέτη χρησιμοποιώντας επίσης ποντίκια Hif-1α^{-/-}, επιβεβαίωσε την αρνητική επίδραση της δράσης του HIF-1α, καθώς τα T-λεμφοκύτταρα των ποντικών αυτών εξέφραζαν υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών και είχαν ενισχυμένη αντιβακτηριακή δράση και πολλαπλασιασμό λόγω αυξημένης δράσης του NF-κB (68). Η αρνητική επίδραση του HIF-1α μπορεί να εκδηλωθεί επίσης και μέσω καταστολής της Ca²⁺-εξαρτώμενης σηματοδότησης που ξεκινά από τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων TCR, όπως φάνηκε σε θυμοκύτταρα ποντικών Vhl^{-/-} στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της αντλίας Ca²⁺ SERCA2 (69). Επιπλέον, η επαγωγή του HIF-1α και της γλυκόλυσης σε υποξικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσουν σε απόπτωση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων (70).

Εκτός από τη δράση των κυττάρων της προσαρμοστικής ανοσίας, ο HIF-1α επηρεάζει και τη δράση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας, όπως είναι τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Μελέτες που έγιναν σε ποντίκια Hif-1α^{-/-} έδειξαν ότι τα μακροφάγα των ποντικών αυτών αδυνατούσαν να φαγοκυτταρώσουν βακτήρια σε αντίθεση με τα μακροφάγα αγρίου τύπου (71, 72). Γενικά, ο HIF-1α ενισχύει τη δράση των φαγοκυττάρων σε περιοχές με χαμηλά επίπεδα O₂, μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων προφλεγμονωδών παραγόντων και προάγει τη φαγοκυττάρωση μέσω έκκρισης αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως είναι οι καδελιδικίνες, και πρωτεασών με αντιμικροβιακή δράση (73).

1.3.4 Ο ρόλος του HIF-1 στον μεταβολισμό

Στα φυσιολογικά κύτταρα η απαιτούμενη ενέργεια παράγεται στα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης η οποία εξαρτάται από την επάρκεια σε O_2 . Η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στα μιτοχόνδρια όπου μετατρέπεται σε ακετυλοσυνένζυμο Α (ακετυλο-coA). Αυτό στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) όπου θα οξειδωθεί για την παραγωγή ATP. Στην συγκεκριμένη μεταβολική οδό το O_2 λειτουργεί ως ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων (e^-) της αλυσίδας μεταφοράς e^- . Στη διαδικασία αυτή τα e^- μεταφέρονται από το σύμπλεγμα I ή II στο σύμπλεγμα III στη συνέχεια στο σύμπλεγμα IV και τελικά στο O_2 το οποίο ανάγεται σε νερό. Σε αυτή τη πορεία κάποια e^- μπορεί να δεσμευθούν πρόωρα στο O_2 με αποτέλεσμα τη παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (ROS), τα επίπεδα των οποίων δεν επηρεάζουν τη κυτταρική λειτουργία, και τα οποία ανάγονται στη συνέχεια σε υπεροξειδίο, από τη δράση του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου. Όταν μεταβληθεί η συγκέντρωση O_2 παρατηρείται ανωμαλία στη ροή e^- και αυξάνεται η παραγωγή ROS, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατο. Ως απόκριση στο αποτέλεσμα αυτό τα κύτταρα προσαρμόζονται στην υποξία μέσω της δράσης του HIF-1, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων που ευνοούν τη μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση για την παραγωγή ATP και μηχανισμών που μειώνουν τη δράση των μιτοχονδρίων οπότε και της παραγωγής ROS (74).

Η έκθεση των ινοβλαστών εμβρύων ποντικών (MEFs) σε υποξία (0,5-1% O_2) αύξησε τα επίπεδα ROS μέσα σε λίγα λεπτά, ενώ η έκθεσή τους για μερικές ημέρες σε υποξία (0,5-1% O_2) δεν μετέβαλε σημαντικά τα επίπεδα ROS σε σύγκριση με των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (20% O_2) (75, 76). Όταν τα πειράματα αυτά έγιναν σε ποντίκια που δεν εξέφραζαν HIF-1α, η χρόνια υποξία προκάλεσε αύξηση των επιπέδων ROS οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Τα κύτταρα MEFs των ποντικών αυτών σε συνθήκες υποξίας (1% O_2) είχαν αυξημένα επίπεδα ATP σε σύγκριση με τους μάρτυρες (20% O_2), υποδηλώνοντας ότι η συγκέντρωση O_2 δεν επηρεάζει την παραγωγή ενέργειας αλλά την παραγωγή ROS, οι οποίες αυξήθηκαν αρκετά και προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο (76). Επομένως, η μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην γλυκόλυση στην υποξία δεν ωφελεί την παραγωγή ενέργειας αλλά τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας (74).

Οι MEFs προσαρμόζονται σε συνθήκες χρόνιας υποξίας μέσω της δράσης του HIF-1 με ποικίλους τρόπους. Επειδή η κυτταροπλασματική γλυκόλυση είναι λιγότερο αποδοτική ενεργειακά τα υποξικά κύτταρα για να καλύψουν τις ενεργειακές τους απαιτήσεις καταναλώνουν μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς γλυκόζης 1 και 3 (GLUT1, GLUT3) σε συνθήκες υποξίας, εξασφαλίζοντας έτσι την επαρκή πρόσληψη γλυκόζης (77, 78). Η ενίσχυση της γλυκόλυσης σε υποξικές συνθήκες, υποβοηθείται από τον HIF-1 καθώς ενεργοποιεί την κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PK1), η οποία αναστέλλει τη δράση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης και αποτρέπει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο συνένζυμο Α για την είσοδό του στον κύκλο του Krebs (75, 79). Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια, γεγονός που αναστέλλει την παραγωγή ROS, προάγοντας έτσι την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Ο HIF-1, επίσης, προάγει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, μέσω επαγωγής της έκφρασης του ενζύμου αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος Α (LDHA) (80). Επιπλέον, ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων, όπως είναι οι εξοκινάσες 1 και 2 (HK1 και HK2) και η κινάση του φωσφογλυκερινικού 1 (PGK1) οδηγώντας στην ενίσχυση της πορείας της γλυκόλυσης (81, 82).

Ένας άλλος τρόπος αναστολής της παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια είναι η αναστολή της δράσης των συστατικών της αλυσίδας μεταφοράς e- από τον HIF-1, όπως είναι η ρυθμιστική υπομονάδα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c 4-1 (COX4-1) (83). Τα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας δεν εκφράζουν πλέον την υπομονάδα COX4-1 αλλά ο HIF-1 επάγει την έκφραση της COX4-2 και της LON, που είναι μια μιτοχονδριακή πρωτεάση που απαιτείται για την αποικοδόμηση της COX4-1 (83).

Ένας ακόμη μηχανισμός παρεμπόδισης της παραγωγής ATP από τα μιτοχόνδρια, είναι η επίδραση του HIF-1 στην βιογένεση των οργανιδίων αυτών. Υπάρχουν διάφοροι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο HIF-1 μειώνει τον αριθμό των μιτοχονδρίων. Σύμφωνα με μια έρευνα, αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της δράσης του c-myc (84), ενώ μια άλλη βιβλιογραφική πηγή υποστηρίζει ότι η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών BNIP3 και BNIP3L από τον HIF-1 σε συνθήκες υποξίας επάγει την μιτοχονδριακή αυτοφαγία συμβάλλοντας έτσι στη μείωση των μιτοχονδρίων και έτσι της κατανάλωσης O₂ (76). Αντίθετα,

η μιτοχονδριακή αυτοφαγία που επάγεται σε συνθήκες ανοξίας δεν μεσολαβείται από το μονοπάτι HIF-1-BNIP3-BNIP3L (85). Στο ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή στην αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας, οδηγεί και η επαγωγή της μεταγραφής του miR-120 από τον HIF-1 σε συνθήκες υποξίας, που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών ISCU1/2 (iron-sulfur cluster assembly protein) και της οξειδάσης του κυτοχρώματος c 10 (COX10), που είναι βασικά συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς e⁻ και του κύκλου Krebs (86).

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας χρησιμοποιούν και άλλες μεταβολικές οδούς για να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωσή τους. Σε πολλά κύτταρα η 6-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται κατά το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης, μπορεί να μεταβολιστεί από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Τα τελικά προϊόντα του μονοπατιού αυτού είναι η παραγωγή NADPH, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την αναγωγική σύνθεση των λιπαρών οξέων και των στερολών, και 5 φωσφορικής ριβόζης, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και νουκλεϊκών οξέων και άλλα ενδιάμεσα μόρια. Σε μερικούς τύπους κυττάρων έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 επάγει την έκφραση της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στην υποξία, που είναι το ένζυμο που καταλύει την είσοδο της 6-φωσφορικής γλυκόζης στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (87). Επιπλέον, σε κάποιους κυτταρικούς τύπους βρέθηκε ότι ο HIF-1 επάγει την έκφραση των τρανσκετολασών (TKT, TLTL2) (88), που είναι ένζυμα του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών, η αναστολή των οποίων επάγει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην ιματινίβη (imatinib) που χρησιμοποιείται στην θεραπεία της χρόνιας μυελοειδούς θεραπείας και στοχεύει την κινάση τυροσίνης BCR-ABL (89).

Η συσσώρευση γλυκογόνου είναι ένας ακόμη τρόπος κάλυψης των κυτταρικών ενεργειακών αναγκών κυττάρων σε υποξικές συνθήκες (90, 91). Ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι της σύνθεσης γλυκογόνου έχουν χαρακτηριστεί ως στόχοι του HIF-1, όπως είναι η φωσφογλυκομουτάση 1 (το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού), η 2 πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης (που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού της UDP-γλυκόζης που είναι το πρόδρομο μόριο σύνθεσης του γλυκογόνου) και η συνθάση του γλυκογόνου (GYS1) (90, 91). Έχει προταθεί ότι η συσσώρευση γλυκογόνου είναι μια αντίδραση προσαρμογής σε πιθανή μελλοντική έλλειψη ενέργειας και μια αντίδραση που προάγει την κυτταρική επιβίωση σε δυσμενείς συνθήκες, όπως είναι η υποξία και η στέρηση γλυκόζης (90, 91). Σε συνθήκες υποξίας

επάγεται επιπλέον και η ισομορφή PYGL της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του (92).

1.3.5 Ο ρόλος του HIF-1 στον μεταβολισμό των λιπιδίων

Τα λιπίδια αποτελούν πλούσια πηγή ενέργειας για ιστούς όπως η καρδιά και το ήπαρ αλλά και για τα καρκινικά κύτταρα. Σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα η πηγή λιπιδίων για τη σύνθεση νέων είναι συνήθως εξωγενής (μέσω της διατροφής), ενώ η *de novo* σύνθεση λιπαρών οξέων καταστέλλεται εκτός από τα ηπατοκύτταρα και τα λιποκύτταρα. Έχει προταθεί ότι η υποξία διεγείρει τη σύνθεση λιπαρών οξέων, την αποθήκευση λιπιδίων και αναστέλλει τον καταβολισμό τους μέσω β-οξειδωσης (93). Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος των HIF στις διαδικασίες αυτές.

Τα ηπατοκύτταρα μέσω της δράσης του ενζύμου συνθάση των λιπαρών οξέων (FAS), το οποίο καταλύει τη *de novo* σύνθεση λιπαρών οξέων, αποθηκεύουν λιπίδια ως πηγή ενέργειας, ως συστατικά των μεμβρανών ή ως τριγλυκερίδια τα οποία αποθηκεύονται στα λιποσταγονίδια. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 επάγει την έκφραση του γονιδίου *LPIN1*, που κωδικοποιεί το ένζυμο λιπίνη-1 (lipin-1) (94). Η λιπίνη-1 είναι το ένζυμο που συμμετέχει στη διαδικασία σύνθεσης των τριγλυκεριδίων και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του φωσφατιδικού οξέος (PA) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) (95, 96).

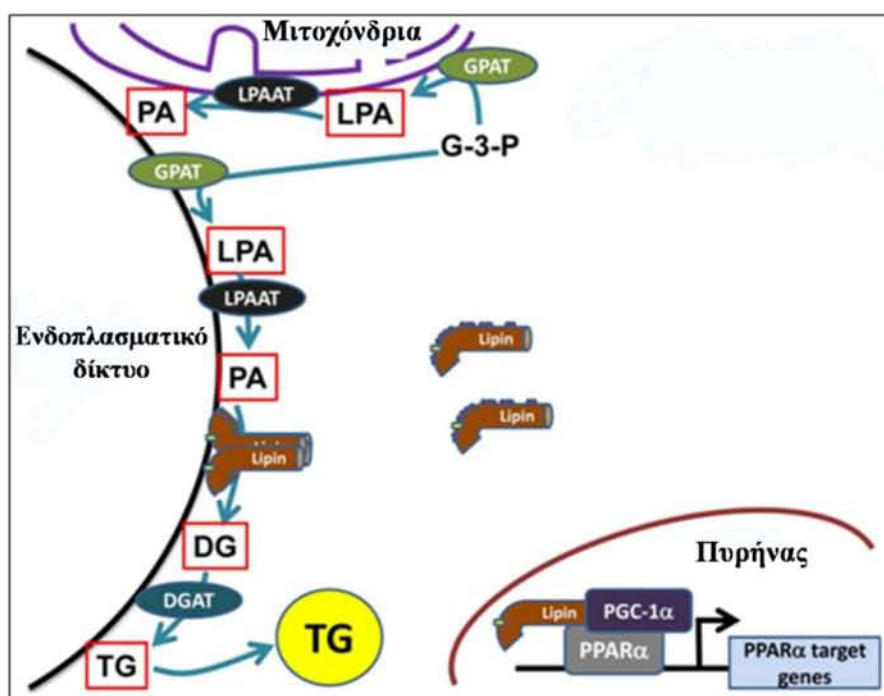
Η οικογένεια των λιπινών

Η οικογένεια των λιπινών περιέχει τρία μέλη, τη λιπίνη-1, τη λιπίνη-2 και τη λιπίνη-3. Η λιπίνη-1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον λιπώδη ιστό, στους σκελετικούς μύες και στους όρχεις όπως επίσης και στο ήπαρ, στην καρδιά και αλλού. Η λιπίνη-2 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στον εγκέφαλο και η λιπίνη-3 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στον γαστρεντερικό σωλήνα.

Η δομή των λιπινών είναι εξελικτικά συντηρημένη σε όλους τους οργανισμούς. Αποτελούνται από την αμινοτελική περιοχή (N-LIP) και την καρβοξυτελική περιοχή (C-LIP) η οποία περιέχει δύο χαρακτηριστικά μοτίβα. Το πρώτο είναι το μοτίβο DIDGT το οποίο εντοπίζεται σε όλους τους οργανισμούς και αποτελεί την καταλυτική περιοχή για την ενζυμική δράση φωσφατάσης φωσφατιδικού οξέος. Το δεύτερο είναι το μοτίβο LXXIL το οποίο

εντοπίζεται στις λιπίνες των θηλαστικών και απαιτείται για τη δράση ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Όλες οι λιπίνες φέρουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (97).

Η αντίδραση που καταλύουν είναι η μετατροπή του φωσφατιδικού οξέος (PA) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) το οποίο είναι το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Έτσι, τα μέλη της οικογένειας των λιπινών εντοπίζονται στο κυτοσόλιο και μεταβαίνουν στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου ως διμερή, για να δεσμεύσουν φωσφατιδικό οξύ και να καταλύσουν την αντίδραση μετατροπής του σε διάκυλογλυκερόλη (DAG) (Εικόνα 4) (98).



Εικόνα 4: Ο ρόλος των λιπινών στον κυτταρικό μεταβολισμό. Οι λιπίνες είναι φωσφατάσες του φωσφατιδικού οξέος και εμπλέκονται στο μονοπάτι σύνθεσης τριγλυκεριδίων. Το μονοπάτι αυτό ξεκινά με ακετυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (G-3-P) από τις ακετυλοτρανσφεράσες GPATs και στη συνέχεια το παραγόμενο λυσοφωσφατιδικό οξύ ακετυλιώνεται από τις LPAATs. Το παραγόμενο φωσφατιδικό οξύ (PA) αποφωσφορυλιώνεται από τις λιπίνες και σχηματίζεται η διακυλογλυκερόλη (DG), η οποία ακετυλιώνεται από τις DGAT προς σχηματισμό τριγλυκεριδίων (TG). Επιπλέον, οι λιπίνες δρουν και ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές σχηματίζοντας σύμπλοκο με τους παράγοντες PPARα και PGC-1α ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων στόχων .

Επιπλέον, οι λιπίνες δρουν και ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές. Όπως έχει προταθεί η λιπίνη-1 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α) και PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1α) σχηματίζοντας σύμπλοκο το οποίο ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων. Ενίσχυση της έκφρασης της

λιπίνης-1 σε ηπατοκύτταρα αύξησε την έκφραση γονιδίων στόχων που εμπλέκονται στην οξείδωση λιπαρών οξέων και κατέστειλε την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη *de novo* λιπογένεση (97). Επιπλέον, η λιπίνη-1 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τους παράγοντες HNF4α, PPARβ και PPARγ καθώς και με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (97).

Η δράση της λιπίνης-1 ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, μέσω φωσφορυλίωσης και τροποποίησης του υποκυτταρικού εντοπισμού της. Μελέτες έχουν δείξει ότι επώαση πρωτογενών ηπατοκυττάρων αρουραίου και ποντικού με γλυκοκορτικοειδή αύξησε τα επίπεδα mRNA της λιπίνης-1, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε μετά από επώαση με ινσουλίνη (100). Αρνητικοί ρυθμιστές της έκφρασης του γονιδίου *LPINI* είναι οι κυτταροκίνες και η λιπίνη-2. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της λιπίνης-1 μειώνεται μετά από επώαση λιποκυττάρων με τον παράγοντα TNF-α (101). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η λιπίνη-1 και η λιπίνη-2 ρυθμίζουν αρνητικά η μια την άλλη (102). Τέλος, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση και η σουμοϋλίωση επηρεάζουν τη δράση της λιπίνης-1 τροποποιώντας τον υποκυτταρικό εντοπισμό της (103, 104).

Ο ρόλος της λιπίνης-1 έχει μελετηθεί εκτενώς στον λιπώδη ιστό διαγονιδιακών ποντικών στα οποία είχε αποσιωπηθεί η έκφρασή της (*fld*). Τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν δυστροφία λιπώδους ήπατος και προοδευτική νευροπάθεια (105). Αντίθετα, υπερέκφραση της λιπίνης-1 στον λιπώδη ιστό οδήγησε σε παχυσαρκία (106). Η παθογένεια στα ποντίκια που στερούνται την δράση της λιπίνης-1 εξηγείται με δύο τρόπους. Πρώτον, η αδυναμία σύνθεσης τριγλυκεριδίων μπορεί να επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία των ιστών που αποθηκεύουν λιπίδια και δεύτερον η συσσώρευση φωσφατιδικού οξέος μπορεί να επηρεάζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (98). Ωστόσο, στους ανθρώπους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος της.

1.4 ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

1.4.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Ένα σηματοδοτικό μονοπάτι ρύθμισης της μεταγραφής του HIF-1α είναι αυτό του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος παίζει κυρίαρχο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB (Inhibitory κB) και η επακόλουθη ενεργοποίηση των υπομονάδων του NF-κB (υπομονάδες p50 και p65) επηρεάζει τα

βασικά επίπεδα mRNA και της πρωτεΐνης του HIF-1α έπειτα από απόκριση στη θρομβίνη, το H₂O₂ και την βραχείας διάρκειας υποξία (107-109). Η αλληλουχία πρόσδεσης του NF-κB στον υποκινητή του HIF-1α είναι συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη υποδεικνύοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο μονοπατιών (108). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την άμεση επαγωγή της μεταγραφής του HIF-1β από τον NF-κB, ο οποίος ως μεταγραφικός παράγων προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *HIF1B* (110).

Ακόμη, οι κυτταροκίνες από τα βοηθητικά T κύτταρα (Th1) όπως η ιντερφερόνη γ (IFNγ) ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-κB-HIF-1α με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α. Ενώ, κυτταροκίνες των Th2 όπως η ιντερλευκίνη 4 και 10 (IL-4 και IL-10) επάγουν με διαφορετικό τρόπο την έκφραση του *HIF*-2α (111). Ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται δεν είναι γνωστός.

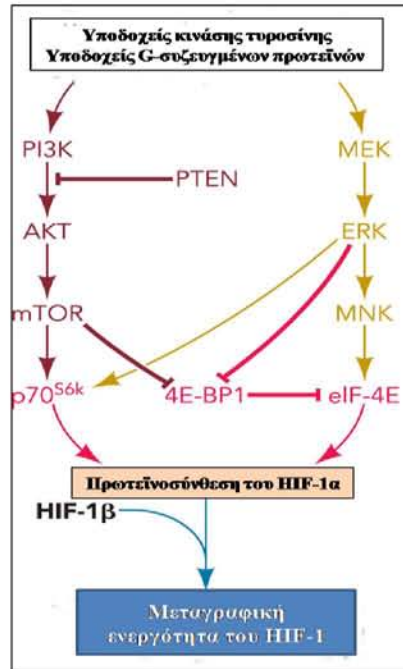
Η μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A* επάγεται από τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος επάγεται σε συνθήκες υποξίας και όπως έχει βρεθεί προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *HIF1A*, με αποτέλεσμα να επάγει τη μεταγραφή του σε καρκινικά κύτταρα και σε μυελοειδή κύτταρα που υπάρχουν στο γειτονικό περιβάλλον του όγκου (112). Η εμπλοκή του STAT3 στην μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A* αποδείχθηκε και από μετέπειτα μελέτη, στην οποία βρέθηκε ότι η πρωτεϊνική κινάση R (PKR) δρα ως μεταγραφικός καταστολέας του HIF-1α μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης του STAT3, καθώς η PKR ενεργοποιεί την φωσφατάση τυροσίνης των T-κυττάρων (TC-PTP) (113). Τα παραπάνω ευρήματα μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στην αντικαρκινική θεραπεία στοχεύοντας έτσι την αναστολή της έκφρασης και της δράσης του HIF-1.

Η έκφραση του γονιδίου *HIF1A*, σε αντίθεση με εκείνη του *HIF2A*, ρυθμίζεται και από το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF μέσω της πρωτεΐνης BAF57, η οποία είναι γνωστή και ως SMARCE1 (114).

1.4.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α ρυθμίζεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποξικές συνθήκες από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία δεν επηρεάζονται από τα επίπεδα O₂. Ποικιλία ογκοπρωτεϊνών, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών διεγείρουν την μετάφραση του mRNA του HIF-1α ιστοειδικά και μέσω ενεργοποίησης δύο κύριων σηματοδοτικών

μονοπατιών, της κινάσης τριφωσφορικής ινοσιτόλης PI3K/AKT και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK). Η σηματοδότηση μέσω αυτών των μονοπατιών προάγει την κυτταρική επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 5: Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α: Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί τα μονοπάτια της PI3K/AKT και των MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT και την mTOR. Τα μονοπάτια mTOR και MAPK οδηγούν στη μετάφραση του mRNA του HIF-1α (3).

Γενικά, η ενεργοποίηση των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών ξεκινά όταν κάποιο μόριο, από τα προαναφερθέντα στη προηγούμενη παράγραφο, δεσμευθεί σε έναν υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης της κυτταρικής μεμβράνης ή σε υποδοχείς G-συζευγμένων πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης-θρεονίνης AKT (γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη mTOR (mammalian target of rapamycin). Στο μονοπάτι των MAPK, η ERK1/2, η οποία έχει ενεργοποιηθεί από τη MEK, ενεργοποιεί με τη σειρά της την MNK. Η ενεργοποιημένη mTOR και η ERK1/2 προάγουν την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης δύο κύριων ρυθμιστών της μετάφρασης: της προσδεδεόμενης στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E) πρωτεΐνη (4E-BP1) και της κινάσης p70S6 (p70^{S6K}). Η φωσφορυλίωση της 4E-BP1 προάγει την πρωτεϊνική σύνθεση καθώς μειώνεται η συγγένεια, για την πρωτεΐνη eIF4E, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο

5' κάλυμμα του mRNA, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης eIF4F και να επάγεται η μετάφραση του mRNA της πρωτεΐνης, στη προκειμένη περίπτωση του HIF-1α (3, 115). Η φωσφορυλίωση του δεύτερου υποστρώματος, της κινάσης p70^{S6K}, οδηγεί στη φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 η οποία διεγείρει την μετάφραση μέσω αύξησης της συγγένειας πρόσδεσης του ριβοσώματος στο μοτίβο 5'-TOP (terminal oligoguanine tract) το οποίο έχει βρεθεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του HIF-1α (Εικόνα 4) (116, 117) αν και αυτό αμφισβητείται από μετέπειτα μελέτη (118).

Σημαντικό ρόλο, επίσης, στην έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α παίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω ρυθμίζει την έκφραση του HIF-1α και σε επίπεδο μεταγραφής. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υποξία ενεργοποιεί τον STAT3 σε καρκινικά κύτταρα συμβάλλοντας στη σταθερότητα και στη σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-1α (119). Έχει προταθεί ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης της κινάσης AKT από τον STAT3, η οποία δρα με τον τρόπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο (120).

Σε συνθήκες υποξίας η μετάφραση του mRNA, στην προκειμένη περίπτωση του HIF-1α, μπορεί να ανασταλεί από δύο μονοπάτια. Το πρώτο μονοπάτι UPR (unfolded protein response) ενεργοποιείται γρήγορα σε συγκέντρωση <1% O₂ και διεγείρει την κινάση PERK (PKR-like ER kinase) η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α. Η φωσφορυλίωση αυτή αποτρέπει την πρόσδεση της υπομονάδας 40S του ριβοσώματος στο σύμπλοκο eIF2-GTP-met-tRNA που απαιτείται για την έναρξη της μεταγραφής. Το δεύτερο μονοπάτι ενεργοποιείται από παρατεταμένη υποξία και ελέγχεται από τον παράγοντα mTOR οπότε η μετάφραση αναστέλλεται μέσω καταστροφής του συμπλόκου eIF4F (115).

1.4.3 Αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

Η έμμεση ή άμεση αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες επηρεάζει την πρωτεϊνική του σταθερότητα και δράση, και σε ορισμένες περιπτώσεις και τη δράση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Τέτοιες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις περιγράφονται παρακάτω:

- **HSP90-RACK1**

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (HSP90) είναι μια μοριακή συνοδός που προστατεύει τις πρωτεΐνες από εσφαλμένη αναδίπλωση και αποικοδόμηση. Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την HSP90, γεγονός που απαιτείται για την επαγωγή του στην υποξία (121). Αναστολείς της HSP90,

όπως η γκελνταναμυκίνη και το παράγωγό της 17-αλλυλαμινογκελνταναμυκίνη (17-AAG), εκδηλώνουν αντικαρκινική δράση καθώς επάγουν την ουβικιτινίωση και την αποικοδόμηση του HIF-1α ακόμη και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον pVHL (122). Η δέσμευση του αναστολέα 17-AAG στην HSP90 αποτρέπει τη δέσμευσή της στην PAS A περιοχή του HIF-1α κι έτσι επιτρέπει την πρωτεΐνη RACK1 να δεσμευθεί στον HIF-1α, γεγονός που στρατολογεί το σύμπλεγμα λιγάσης - ουβικιτίνης για να ουβικιτινώσει τον HIF-1α (123). Έτσι, η RACK1 ανταγωνίζεται την HSP90 για δέσμευση στον HIF-1α και μεσολαβεί στην αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω ενός μονοπατιού που δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση O₂. Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζεται από την καλσινευρίνη, η οποία προάγει την έκφραση του HIF-1α μέσω αποφωσφορυλίωσης της RACK1, εμποδίζοντας έτσι το διμερισμό της, ο οποίος απαιτείται για την ουβικιτινίωση και άρα την αποικοδόμηση του HIF-1α (124).

- **MgcRacGap**

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη δράση των μικρών G-πρωτεϊνών Rho που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Με *in vitro* και *in vivo* πειράματα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη MgcRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein) αλληλεπιδρά με την περιοχή PAS-B (αμινοξέα 244-352) του HIF-1α. Η αλληλεπίδραση αυτή ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, χωρίς όμως να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του (125). Η αρνητική ρύθμιση της δράσης του HIF-1 οφείλεται, όπως αποδείχθηκε αργότερα, στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού του HIF-1α με τον ARNT (126).

- **p53**

Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται εκτός των άλλων στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων. Ποικίλες μελέτες έχουν δείξει ότι στις υποξικές περιοχές των συμπαγών όγκων παρατηρείται συσσώρευση της p53. Έχει προταθεί ότι ο μεταγραφικά ενεργός p53 σταθεροποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με τον HIF-1α και ότι η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται μέσω των περιοχών ODD και N-TAD σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (127). Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες προτείνουν ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά άμεσα με τον παράγοντα MDM2 με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η ουβικιτινίωση της p53 από αυτόν και να επάγεται έτσι η μεταγραφή γονιδίων στόχων της (128).

Τέλος έχει προταθεί ότι ο p53 επάγει την μεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη MDM2 ουβικιτινίωση του HIF-1α και την τελική αποικοδόμησή του σε συνθήκες υποξίας, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την περιοχή ODD (129, 130).

- **c-MYC**

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην βιογένεση των ριβοσωμάτων, στον ενεργειακό μεταβολισμό, στη βιογένεση των μιτοχονδρίων και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε φυσιολογικές συνθήκες O₂ το c-MYC μπορεί να επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων του σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τη πρωτεΐνη MAX τα οποία δεσμεύονται στον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ή μπορεί να καταστέλλει την έκφραση άλλων γονιδίων, όπως αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs), μέσω δέσμευσης στον μεταγραφικό παράγοντα MIZ1 (131).

Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του c-MYC μέσω αλληλεπίδρασης με τις παραπάνω πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη δράση του c-MYC. Έτσι, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη Sp1 μέσω της PAS B περιοχής, αποτρέπει την πρόσδεση του c-MYC στον υποκινητή γονιδίων στόχων του (132, 133). Επιπλέον, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη MAX και με τη MIZ1, οπότε εμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους με τον παράγοντα c-MYC, για το σχηματισμό λειτουργικών ετεροδιμερών, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα του c-MYC (134). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο HIF-2α δρα αντίθετα καθώς επάγει τη δράση του c-MYC, καθώς η αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη MAX σταθεροποιεί τα σύμπλοκα c-MYC/ MAX και c-MYC/ MAX/ Sp1 (134).

- **HAF (Hypoxia Activated Factor)**

Ο παράγοντας που επάγεται από την υποξία HAF, γνωστός και ως SART1₈₀₀, παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση ώριμων σωματίων συναρμογής (spliceosomes). Ο HAF θεωρείται ένας σημαντικός ρυθμιστής του HIF-1α καθώς όπως έχει βρεθεί αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στην περιοχή 296-400, *in vitro* και *in vivo*, και λειτουργεί ως E3 λιγάση ουβικιτίνης. Η ουβικιτινίωση του HIF-1α από τον HAF οδηγεί στην αποικοδόμησή του, μέσω ενός μονοπατιού που δεν εξαρτάται από τον pVHL και από τη συγκέντρωση O₂. Ωστόσο, ο HAF ουβικιτινιώνει μόνο τον HIF-1α και όχι τον HIF-2α (135). Μετέπειτα μελέτη έδειξε ότι ο HAF δεσμεύεται και

στον HIF-2α και αυξάνει τη μεταγραφική του ενεργότητα και δεν προκαλεί την αποικοδόμησή του όπως συμβαίνει με τον HIF-1α (136). Με τον τρόπο αυτό ο HIF συμβάλει στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία μέσω επαγωγής της μεταγραφής γονιδίων στόχων του HIF-2 που εμπλέκονται στην διήθηση, όπως η MMP9 και OCT3/4, και ευνοεί μια πιο επιθετική αύξηση των καρκινικών όγκων σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας (136).

- **Σιρτουίνες**

Οι σιρτουίνες (Sirt) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που δρουν ως απακετυλάσες των ιστονών και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, το μεταβολισμό και την επιδιόρθωση του DNA. Τα ένζυμα αυτά αποκρίνονται σε διαταραχές της αναλογίας $NAD^+/NADH$ και αποτελούν αισθητήρες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (137).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι σιρτουίνες ρυθμίζουν διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και η ερυθροποίηση μέσω αλληλεπίδρασης με τους HIF-1α και HIF-2α. Συγκεκριμένα η Sirt6 δεσμεύεται στον HIF-1α και καταστέλλει τη δράση του (138). Σε κύτταρα και σε ποντίκια που δεν εξέφραζαν τη Sirt6 (Sirt6^{-/-}) παρατηρήθηκε αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης και αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν γλυκολυτικά ένζυμα, πολλά από τα οποία αποτελούν στόχους του HIF-1α. Επιπλέον, έλλειψη της Sirt6 διεγείρει την έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η Sirt6 ρυθμίζει την ομοιοσταση γλυκόζης αναστέλλοντας τη δράση του HIF-1α και την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων. Η διαδικασία της ερυθροποίησης βρέθηκε ότι ρυθμίζεται από την Sirt1 μέσω αλληλεπίδρασής της με τον HIF-2α, που οδηγεί σε απακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης στην περιοχή N-TAD. Η δράση αυτή της Sirt1 ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α *in vitro* και *in vivo* (139). Έχει αναφερθεί ότι η Sirt1 απακετυλιώνει κατάλοιπα λυσίνης και στον HIF-1α, γεγονός που προκάλεσε καταστολή της δράσης του (140), ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε άλλη ερευνητική μελέτη (139).

- **CDK8**

Η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 8 ή CDK8 είναι μέλος του συμπλέγματος που μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της RNA πολυμεράσης II και έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε πρόσφατη μελέτη προτάθηκε ένας μηχανισμός με βάση τον οποίο η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την CDK8 οδηγεί σε μεταγραφή των γονιδίων στόχων

του στην υποξία. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι στην υποξία η CDK8 αλληλεπιδρά με τη C-TAD περιοχή του HIF-1α, γεγονός που πυροδοτεί την πρόσδεση του συμπλέγματος ενεργοποίησης της RNA πολυμεράσης II, του οποίου μέλος είναι η CDK8, και του συμπλέγματος επιμήκυνσης της μεταγραφής SEC που είναι απαραίτητα για την διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων. Αντίθετα, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η RNA πολυμεράση II είναι ανενεργή, καθώς δεν υπάρχει η αλληλεπίδραση CDK8/HIF-1α οπότε δε μπορεί να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-1 (141).

Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και επηρεάζουν την πρωτεϊνική σταθερότητά του είναι η πρωτεΐνη Jab1, η αλληλεπίδραση με την οποία σταθεροποιεί και αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α (142) και η πρωτεΐνη OS-9, η αλληλεπίδραση με την οποία ενισχύει την υδροξυλίωση οπότε και την αποικοδόμηση του HIF-1α (143).

1.4.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία γίνεται προσθήκη μίας ακετυλομάδας σε κατάλοιπα λυσίνης (K) μέσω των ακετυλοτρανσφερασών. Κατά την αντίστροφη διαδικασία που ονομάζεται απακετυλίωση η ακετυλομάδα αφαιρείται με την βοήθεια των απακετυλασών.

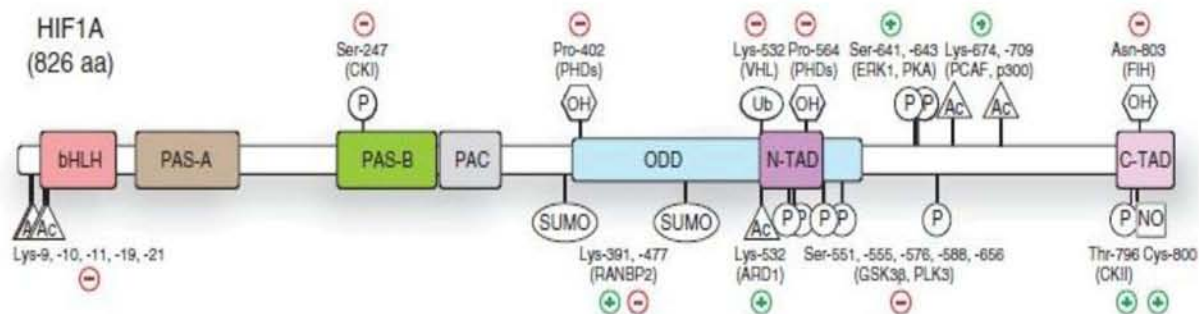
Η ακετυλίωση και η απακετυλίωση της πρωτεΐνης HIF-1α αυξάνουν ή μειώνουν τη μεταγραφική της ενεργότητα ανάλογα με τη θέση του τροποποιημένου καταλοίπου. Η ακετυλίωση του HIF-1α στην αμινοτελική περιοχή (K9, K10, K11, K19 και K21) μειώνει την σταθερότητα της πρωτεΐνης και τη μεταγραφική της ενεργότητα, ενώ η απακετυλίωση αυτών των καταλοίπων από την απακετυλάση HDAC4 έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (144). Αντίθετα, ακετυλίωση των καταλοίπων K674 και K709 στην καρβοξυτελική περιοχή του HIF-1α ενισχύει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα του μέσω παρεμπόδισης της αποικοδόμησής του (140, 145) (Εικόνα 6). Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης των HIF παίζουν και οι σιρτουίνες μέσω απακετυλίωσης καταλοίπων λυσίνης, η δράση των οποίων περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ακετυλοτρανσφεράση ARD1 αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή ODD του HIF-1α και ακετυλιώνει το κατάλοιπο K532 με οξυγονοεξαρθώσιμο τρόπο. Σε *in vitro* δοκιμές βρέθηκε ότι η ακετυλίωση αυτή ενισχύει τη δέσμευση του παράγοντα pVHL οδηγώντας

τελικά στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης HIF-1α (Εικόνα 6) (146). Ωστόσο, η ακετυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο δεν επιβεβαιώθηκε από μετέπειτα μελέτες ακόμη και στις ίδιες κυτταρικές σειρές (147, 148).

S-Νιτροζυλίωση

Η συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η ομοιοπολική ενσωμάτωση μορίων μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε σουλφυδρυλομάδες. Έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στο κατάλοιπο κυστεΐνης 800, γεγονός που ενισχύει την πρόσδεση του συμπαράγοντα p300 στον HIF-1α, αυξάνοντας έτσι τη μεταγραφική του ενεργότητα (Εικόνα 6) (149). Τα αποτελέσματα αυτά αντικρούονται από μεταγενέστερη μελέτη στην οποία έδειξαν ότι η νιτροζυλίωση του ίδιου καταλοίπου κυστεΐνης παρεμπόδισε την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους συμπαράγοντες CBP/p300 (150). Άλλη θέση νιτροζυλίωσης έχει προταθεί το κατάλοιπο κυστεΐνης 533, που έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω αναστολής της δέσμευσης του pVHL στην περιοχή ODD του HIF-1α (151).



Εικόνα 6: Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο πρωτεϊνικό μόριο του HIF-1α. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται με (+) οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που αυξάνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και με (-) αυτές που τη μειώνουν(21).

Σουμοϋλίωση

Άλλη μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται ο HIF-1α είναι η σουμοϋλίωση. Η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικιτίνη στη δομή και προσδένεται σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων με ένα παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό.

Η σουμοϋλίωση του HIF-1α σε διάφορες θέσεις ρυθμίζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και τη μεταγραφική της ενεργότητα. Ο HIF-1α σουμοϋλιώνεται στα κατάλοιπα K391 και K477 από την RanBP2 λιγάση *in vitro* (Εικόνα 6), ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενα συμπεράσματα για

την επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (142, 152). Μελέτες έχουν δείξει ότι η σουμοϋλίωση του HIF-1α από την PIASy E3 λιγάση οδηγεί σε μείωση της σταθερότητας και της δραστηριότητάς του (153), ενώ η αποσουμοϋλίωση από την SENP1 έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (154). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η προσθήκη SUMO πρωτεϊνών προάγει την πρόσδεση του pVHL στον HIF-1α οδηγώντας στην ουβικιτινίωση και στην αποικοδόμησή του (154).

Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση είναι μια κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ρυθμίζει την σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α θετικά ή αρνητικά (Εικόνα 6). Οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α και το αποτέλεσμα της κάθε φωσφορυλίωσης θα περιγραφούν στο κεφάλαιο 1.6.

1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

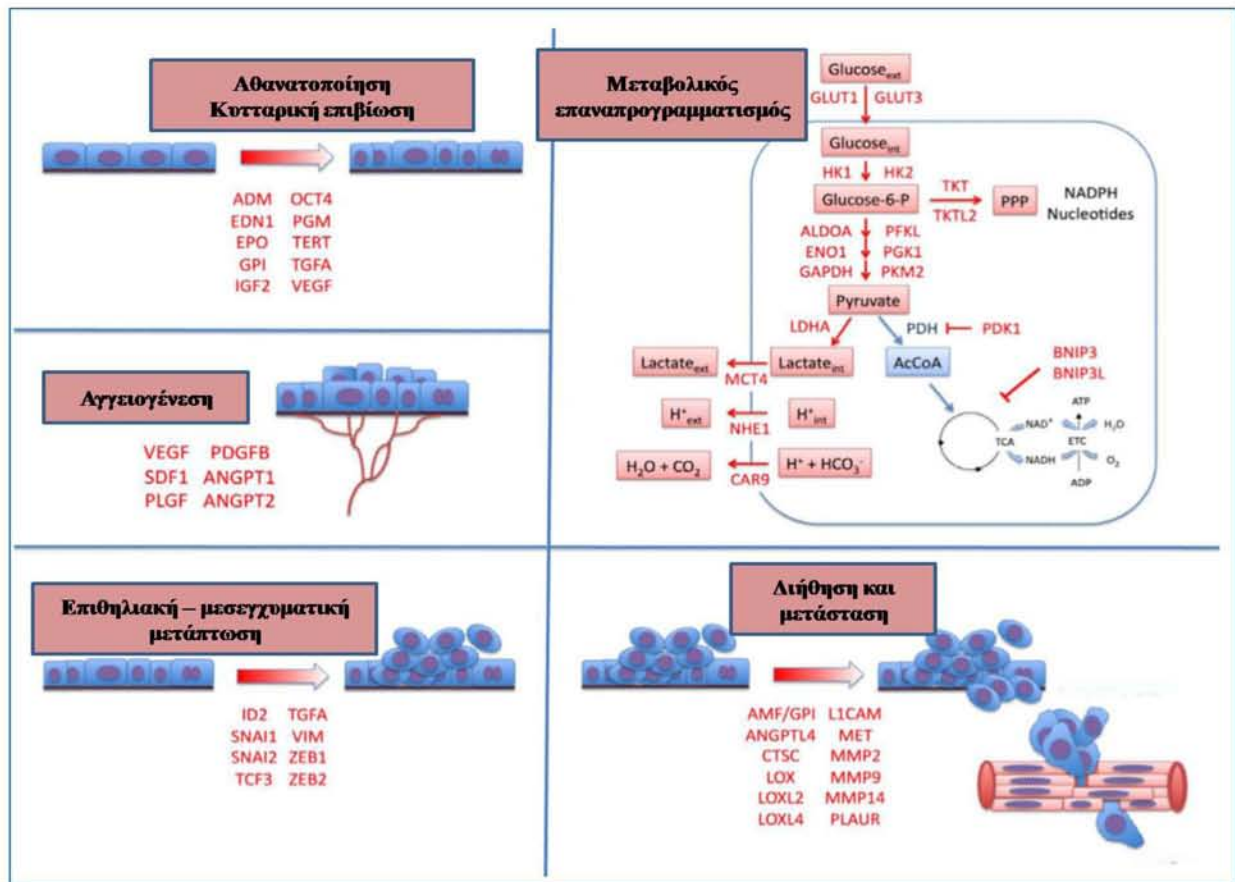
1.5.1 HIF-1 και καρκίνος

Στους περισσότερους τύπους ανθρώπινων καρκινικών όγκων, όπως ήπατος, προστάτη, πνεύμονα, μαστού, παχέος εντέρου και πολλών άλλων, παρατηρείται υπερέκφραση των HIF-1α και HIF-2α. Όμως σε κάποιους τύπους καρκίνου παρατηρείται υπερέκφραση μόνο του HIF-1α (καρκίνος του παχέος εντέρου) ή μόνο του HIF-2α (καρκίνος νεφρών) (88). Η επαγωγή της έκφρασής τους οφείλεται στην υποξία που σχηματίζεται στο εσωτερικό του όγκου ή σε μεταλλάξεις γονιδίων. Η υποξία στο εσωτερικό των όγκων είναι αποτέλεσμα του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων και των μειωμένων επιπέδων κυτταρικού θανάτου που τα χαρακτηρίζουν σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, καθώς και στην μειωμένη τροφοδότηση με O₂ και θρεπτικών συστατικών λόγω ελλειπούς αγγείωσης.

Εκτός από την υποξία η επαγωγή των HIF στον καρκίνο οφείλεται και σε μεταλλάξεις γονιδίων. Για παράδειγμα απώλεια της δράσης του pVHL, που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *VHL*, οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α και επαγωγή των γονιδίων στόχων του. Επίσης, απώλεια της δράσης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως των PTEN και p53 ή ενίσχυση της δράσης ογκογονιδίων αυξάνουν τη δραστηριότητα του HIF-1 (155, 156). Ωστόσο,

σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στον καρκίνο των νεφρών, η πρόοδος της ασθένειας οφείλεται στον HIF-2α, ενώ ο HIF-1α αποσιωπάται μέσω έλλειψης στο γονίδιο που τον κωδικοποιεί (157).

Επιπλέον, η απορρύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών συμβάλλει στην υπερέκφραση του HIF-1α και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου HIF-1. Έχει παρατηρηθεί ότι καρκινικά κύτταρα που έχουν συνεχώς ενεργοποιημένα τα μονοπάτια Ras/MAPK (158) ή PI3K/AKT/mTOR παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του HIF-1α (159). Η υψηλή έκφραση του HIF-1α συνδέεται με κακή πρόγνωση για διάφορους τύπους καρκίνου και με αυξημένη επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων αλλά όμως σε κάποιες περιπτώσεις καρκινικών όγκων η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με καλή πρόγνωση (160).



Εικόνα 7: Γονίδια στόχοι των HIF που εμπλέκονται στην καρκινική ανάπτυξη. Με κόκκινα γράμματα αναφέρονται τα ονόματα των γονιδίων στόχων που προάγουν την κυτταρική αθανατοποίηση και επιβίωση, την αγγειογένεση, τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, την μετάπτωση από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση και γονίδια που ευνοούν τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (156).

Παρακάτω θα περιγραφούν γονίδια στόχοι των HIF που προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου και αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, τον μεταβολικό

επαναπρογραμματισμό, την αγγειογένεση, τη μετάβαση των κυττάρων από τον επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των διηθητικών καρκινικών κυττάρων και γονίδια που ευνοούν τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 7) .

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επιβίωση

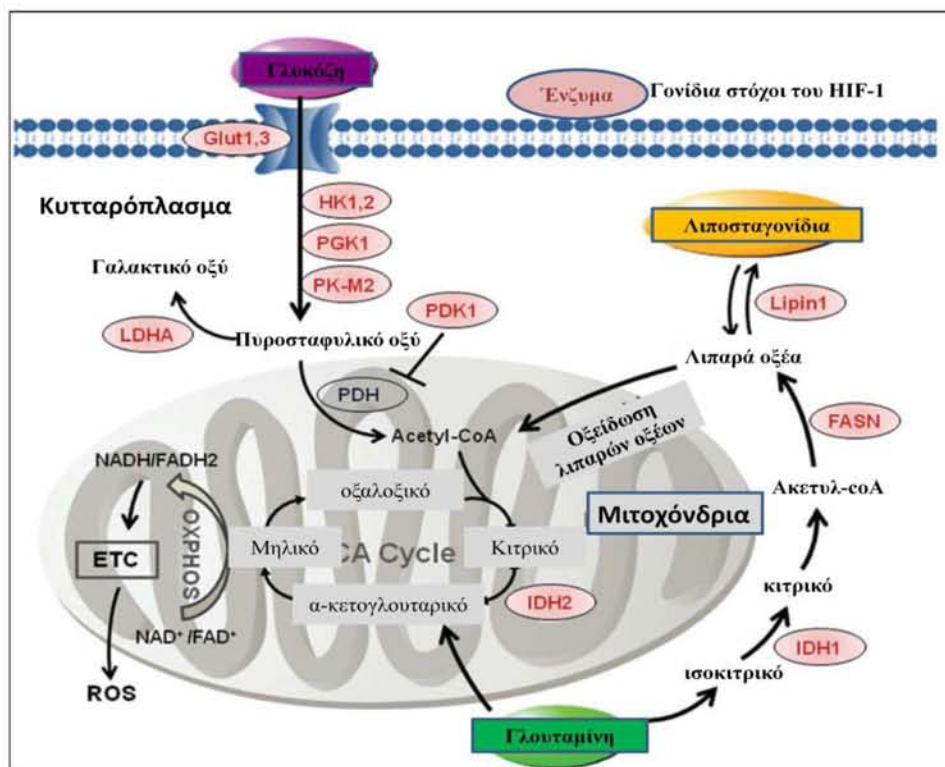
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους και ο μειωμένος κυτταρικός θάνατος σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, λόγω αυξημένης έκφρασης αυξητικών παραγόντων. Συχνά τα ίδια τα κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς αυτών των παραγόντων επάγοντας την αυτοκρινή σηματοδότηση. Τέτοιοι παράγοντες που κωδικοποιούνται από γονίδια στόχους των HIF είναι: ο παράγοντας μετασχηματισμού α (*TGFα*) σε καρκίνο των νεφρών, ο τύπου ινσουλίνης αυξητικός παράγων-1 (*IGF1*) σε καρκίνο παχέος εντέρου, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (*VEGF*) σε καρκίνο παχέος εντέρου, στομάχου και παγκρέατος, η ενδοθηλίνη 1 (*EDN1*) σε καρκίνο μαστού, προστάτη και ωοθηκών, η αδρενομεδουλίνη σε καρκίνο του παγκρέατος και του προστάτη, και η ερυθροποιητίνη σε καρκίνο μαστού, προστάτη και μελανώματος. Επιπλέον, οι HIF μπορούν να προκαλέσουν αθανατοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω επαγωγής της έκφρασης της τελομεράσης (*TERT*) και παραγόντων που εμποδίζουν τη κυτταρική γήρανση (156).

Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.3.4 τα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας όπως και τα καρκινικά κύτταρα αλλάζουν μεταβολικό χαρακτήρα. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η απαιτούμενη ενέργεια για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους προέρχεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα υποξικά κύτταρα όπως και τα καρκινικά παρουσιάζουν έντονη γλυκόλυση για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες, μια διαδικασία που ενεργειακά είναι πολύ λιγότερο αποδοτική σε σύγκριση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η διαφορά όμως είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα η παραπάνω διαδικασία εξακολουθεί να συμβαίνει και σε φυσιολογικές συνθήκες O₂. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg και πήρε το όνομά του από τον Otto Warburg, ο οποίος ήταν ο πρώτος που το 1923 περιέγραψε αυτή την αλλαγή στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων προτείνοντάς την ως κύρια αιτία ογκογένεσης (161).

Ο HIF-1 ρυθμίζει τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων καθώς και των φυσιολογικών κυττάρων στην υποξία, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.3.4. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές διεργασίες προσαρμογής των καρκινικών κύτταρων που προάγονται από τον HIF-1. Με την επικράτηση του αναερόβιου μεταβολισμού στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει ο κίνδυνος τοξικότητας λόγω μείωσης του ενδοκυττάρου pH εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων από τον HIF-1, τα οποία έχουν ως στόχο την απομάκρυνση των όξινων ουσιών από το κύτταρο με αποτέλεσμα την δημιουργία όξινου εξωκυττάρου περιβάλλοντος. Για παράδειγμα ο HIF-1 επάγει την έκφραση του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα 4 (MCT4) μέσω του οποίου το γαλακτικό οξύ μεταφέρεται εκτός του κυττάρου (162). Επιπλέον, επάγεται η έκφραση του γονιδίου CAR9 το οποίο κωδικοποιεί την καρβονική ανυδράση 9 (CA9) η οποία καταλύει την αντίδραση $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, με επακόλουθη μεταφορά των ιόντων H^+ εκτός του κυττάρου (163). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την επικράτηση αλκαλικού pH στον ενδοκυττάριο χώρο, γεγονός που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και την επικράτηση όξινου pH στον εξωκυττάριο χώρο των καρκινικών κυττάρων βοηθώντας την διήθηση στους ιστούς (164).

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται είτε ενδογενώς από το κιτρικό οξύ είτε εξωγενώς μέσω πρόσληψής τους από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η διαδικασία της *de novo* σύνθεσης των λιπαρών οξέων ξεκινά από το κυτταροπλασματικό ακετυλο-coA. Όπως αναφέρθηκε, στα καρκινικά κύτταρα, το παραγόμενο πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπεται κυρίως σε γαλακτικό οξύ. Όμως ένα τμήμα του μετατρέπεται σε ακετυλο-coA το οποίο μέσω του κύκλου TCA μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί θα μετατραπεί εκ νέου σε κυτταροπλασματικό ακετυλο-coA, αντίδραση που καταλύει το ένζυμο λύαση του κιτρικού οξέος, το οποίο καρβοξυλιώνεται προς μαλονυλ-coA, μέσω του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετυλο-coA (ACC). Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια παράγονται μέσω προσθήκης μορίων μαλονυλ-coA στην ανθρακική αλυσίδα μέσω αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο συνθάση των λιπαρών οξέων (FASN) (Εικόνα 8) (27, 88).



Εικόνα 8: Ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, των λιπιδίων και της γλουταμίνης από τον HIF-1 στα καρκινικά κύτταρα. Ο HIF-1 διεγείρει την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων ενισχύοντας έτσι τη διαδικασία της γλυκόλυσης, μέσω της οποίας η γλυκόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και αποτρέπεται έτσι η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, η γλουταμίνη μπορεί είτε να εισέλθει στον κύκλο τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) μετά από καρβοξυλίωση, είτε να οδηγήσει στη παραγωγή λιπαρών οξέων που θα χρησιμοποιηθούν για την ταχεία κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση (165).

Μερικές πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τα παραπάνω δεδομένα και το θετικό αποτέλεσμα της συσσώρευσης λιπιδίων και της αναστολής της β-οξειδωσης στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, μέσω μηχανισμών στους οποίους εμπλέκεται ο HIF-1α. Σε ορισμένους καρκινικούς όγκους όπως προστάτη, ωοθηκών, πνεύμονα, παχέος εντέρου, ενδομητρίου και στόματος έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του ενζύμου FASN (166). Τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου FASN και του ενεργοποιημένου παράγοντα SREBP1 (sterol regulatory element bonding protein 1), που είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επάγει τη σύνθεση ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση στερολών σε συνθήκες υποξίας, ρυθμίζονται από τον HIF-1α (167). Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο HIF-1α καταστέλλει την έκφραση των ακετυλο-coA αφυδρογονασών MCAD και LCAD, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Το αποτέλεσμα αυτό ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων λόγω αναστολής του σχηματισμού ROS (165).

Η διαδικασία της *de novo* σύνθεσης των λιπαρών οξέων ενισχύεται στα καρκινικά κύτταρα και από τον μεταβολισμό γλουταμίνης, που αποτελεί μια εναλλακτική πηγή ενέργειας. Στα υποξικά καρκινικά κύτταρα η γλουταμίνη οδηγεί στην παραγωγή α-κετογλουταρικού το οποίο μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ τροφοδοτώντας έτσι την διαδικασία της *de novo* σύνθεσης των λιπαρών οξέων (168, 169). Η εναλλαγή από τον οξειδωτικό μεταβολισμό στον μεταβολισμό γλουταμίνης ως πηγή ακετυλ-coA για τη σύνθεση λιπιδίων στην υποξία εξαρτάται από τους HIF (169). Ωστόσο, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η χρήση της γλουταμίνης για τη σύνθεση λιπαρών οξέων δεν αποτελεί αποκλειστικότητα των καρκινικών κυττάρων, αλλά έχει παρατηρηθεί ως ειδικό μονοπάτι προσαρμογής πρωτογενών νευρικών κυττάρων στην υποξία, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε μη νευρικά κύτταρα (170).

Ωστόσο, ενδιαφέρον αποτελεί το αποτέλεσμα πρόσφατης μελέτης που προτείνει ότι η συσσώρευση των λιπαρών οξέων στην υποξία οφείλεται όχι στην αυξημένη σύνθεσή τους αλλά στην αυξημένη πρόσληψή τους από το θρεπτικό υλικό, μέσω επαγωγής της έκφρασης πρωτεϊνών από τον HIF-1α που απαιτούνται για τη μεταφορά των λιπαρών οξέων. Το γεγονός αυτό προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τον θάνατο που μπορεί να προκληθεί στην υποξία λόγω συσσώρευσης των ROS (171).

Τα λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα για τη σύνθεση νέων μεμβρανών, ως πηγή ενέργειας ή για τη σύνθεση τριγλυκεριδίων και λιποσταγονιδίων ως αποθηκευτικό μέσο. Τα τριγλυκερίδια αποθηκεύονται στα λιποσταγονίδια που είναι η κύρια αποθήκη ουδέτερων λιπών σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Όπως αναφέρθηκε, ο HIF-1 επάγει την έκφραση του γονιδίου *LPINI*, που κωδικοποιεί το ένζυμο λιπίνη-1, που είναι το ένζυμο που συμμετέχει στη διαδικασία σύνθεσης των τριγλυκεριδίων και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του φωσφατιδικού οξέος (PA) σε διάκυλογλυκερόλη (DAG) (94).

Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ προ-αγγειογόνων και αντι-αγγειογόνων παραγόντων. Στα καρκινικά κύτταρα αυτή η ισορροπία διαταράσσεται με αποτέλεσμα η αγγείωση να χαρακτηρίζεται από χαώδη αρχιτεκτονική. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι αναστολή της έκφρασης του HIF-1 ανέστειλε δραματικά της αγγείωση του όγκου (172). Ο HIF-1 ελέγχει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αγγειογόνους αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF, ο αυξητικός παράγοντας στρώματος

(SDF1), ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (PGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGFB), η αγγειοποιητίνη-1 και 2 (ANGPT) (156).

Διήθηση και Μετάσταση

Ο μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά χαρακτηρίζει τα διηθητικά κύτταρα τα οποία χάνουν την επιθηλιακή διακυτταρική επαφή και αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων. Η υποξία και οι HIF επάγουν την έκφραση πολλών γονιδίων που βοηθούν την παραπάνω μετατροπή και επάγουν έτσι τη μετάσταση. Ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν ως καταστολείς της έκφρασης των E-καδχερινών και άλλων γονιδίων που συμβάλλουν στην ακαμψία του κυτταροσκελετού, της διακυτταρικής επαφής και άλλων χαρακτηριστικών των επιθηλιακών κυττάρων (*SNAIL1*, *SNAIL2*, *TCF3*, *ZEB1*, *ZEB2*). Ο HIF-1 επάγει, επίσης, την έκφραση γονιδίων (*TGFA*, *VIM*) που προάγουν την ελαστικότητα του κυτταροσκελετού και άλλων χαρακτηριστικών των μεσεγχυματικών κυττάρων (156).

Η διευκόλυνση της διήθησης και της μετάστασης γίνεται μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεάσες που αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα των ιστών (*MMP2*, *MMP9*, *MMP14*, *PLAUR*), ή που την τροποποιούν (*LOX*, *LOXL2*, *LOXL4*). Επιπλέον, ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες που βοηθούν την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία (*VEGF*, *ANGPT*) και πρωτεΐνες (*LICAM*, *ANGPTL4*) που βοηθούν την εγκατάσταση των καρκινικών κυττάρων στο παρέγχυμα των μεταστατικών περιοχών (156).

1.5.2 HIF-1 και ισχαιμία

Έχει βρεθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF-1 και HIF-2 επηρεάζουν την προσαρμογή των κυττάρων σε ισχαιμικές ασθένειες όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η πνευμονική υπέρταση. Ο όρος ισχαιμία αναφέρεται στην παθολογική κατάσταση κατά την οποία η αιματική ροή προς έναν ιστό είναι ελαττωμένη προκαλώντας μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων O₂ και των θρεπτικών συστατικών, όπως είναι η γλυκόζη. Τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν κάτω από αυτές τις συνθήκες για μικρό χρονικό διάστημα, αλλά αν η διάρκεια του ισχαιμικού επεισοδίου υπερβεί ένα κρίσιμο όριο, τότε η ιστική υποξία και η οξέωση οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης και/ή μέσω απόπτωσης. Οι

παράγοντες που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο από ισχαιμία είναι: η απώλεια οξυγόνου, η ιστική οξέωση, η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, η κατανάλωση του γλυκογόνου, βλάβη των μιτοχονδρίων και οι οξειδωτικές βλάβες στο DNA (173).

Η πρώτη μελέτη που πρότεινε την εμπλοκή του HIF-1α σε ισχαιμικά επεισόδια έγινε το 1999 όπου παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α σε ισχαιμικούς εγκεφάλους ενήλικων αρουραίων (174). Πολλές μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση και η ενεργότητα του HIF-1α επάγεται σε ισχαιμικούς εγκεφάλους και εκδηλώνει νευροπροστατευτική δράση. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί νευροπροστατευτικής δράσης του HIF-1α είναι μέσω της επαγωγής της έκφρασης της ερυθροποιητίνης και του VEGF, μέσω παρεμπόδισης της απόπτωσης λόγω αναστολής της έκκρισης κυροχρώματος c και της ενεργοποίησης των κασπασών, μέσω καταστολής της δράσης του p53 και μέσω επαγωγής των μεταφορέων γλυκόζης (175). Μελέτες έδειξαν ότι μετά από αποσιώπηση του HIF-1α σε νευρώνες ποντικών που είχαν υποστεί 30 λεπτά ήπιας ισχαιμίας με απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, προκλήθηκε αυξημένη ιστική βλάβη και μείωση της επιβίωσης ποντικών (176). Αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν από μια άλλη μελέτη όπου έδειξαν ότι η αποσιώπηση του HIF-1α προκάλεσε μείωση της βλάβης που προκλήθηκε από έντονη ισχαιμία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (75 λεπτά), προτείνοντας ότι τα μειωμένα επίπεδα του HIF-1α δρουν νευροπροστατευτικά (177). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο HIF-1α μπορεί να επάγει κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες έντονης και παρατεταμένης ισχαιμίας ενώ αντίθετα μπορεί να επάγει την κυτταρική επιβίωση σε συνθήκες ήπιας ισχαιμίας (175).

Στην κλινική πράξη, η θεραπεία για τα ισχαιμικά επεισόδια περιλαμβάνει την επαναφορά της αιματικής ροής στον ισχαιμικό ιστό. Έχει δειχθεί ότι η ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning), δηλαδή η επαναλαμβανόμενη έκθεση ιστών σε μικρής διάρκειας ισχαιμία (5 λεπτά) προστατεύει τον ιστό από ένα επερχόμενο επεισόδιο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (178). Στη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι εμπλέκεται ο HIF-1. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι τα αγρίου τύπου ποντίκια, σε αντίθεση με τα HIF-1α^{+/-}, παρουσίασαν βελτίωση της ιστικής βλάβης που υπέστη το μυοκάρδιο, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο που παίζει ο HIF-1α στην επιβίωση των ιστών έπειτα από ισχαιμικά επεισόδια (179). Επιπλέον, προεπόωση με DMOG, το οποίο όπως προαναφέρθηκε σταθεροποιεί την πρωτεΐνη HIF-1α δρα καρδιοπροστατευτικά δείχνοντας έτσι τον θετικό ρόλο της επαγωγής του HIF-1 στις συνθήκες αυτές (180). Επιπλέον,

ο HIF-1 ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που οδηγούν στην παραγωγή αδενοσίνης, ένα σηματοδοτικό μόριο που συμβάλει στην καρδιοπροστασία (180).

Άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο HIF-1 εκδηλώνει καρδιοπροστατευτική δράση είναι μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοδική πρωτεΐνη 2 του κερκαδικού κύκλου (PER2) η οποία ενισχύει την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων και επομένως την αναερόβια γλυκόλυση στην ισχαιμική καρδιά (181) και μέσω επαγωγής της έκφρασης της IL-10 η οποία είναι απαραίτητη για την καρδιοπροστασία μέσω ισχαιμικής προετοιμασίας (182).

1.5.3 HIF-1 και φλεγμονή

Η φλεγμονή συνοδεύεται από συνθήκες υποξίας στους πάσχοντες ιστούς λόγω ενισχυμένης μεταβολικής δράσης των κυττάρων της περιοχής και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που φθάνουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Έτσι, η υποξία στις φλεγμονώδεις περιοχές οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση O₂ από τα κύτταρα της φλεγμονής και από παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μειωμένη παροχή O₂ λόγω αγγειοπάθειας. Οι υποξικές συνθήκες οδηγούν σε σταθεροποίηση των HIF. Για παράδειγμα στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, όπως είναι η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn, επικρατεί οξύτατη υποξία στην βλεννογόνο επιφάνεια του εντέρου και σταθεροποίηση των HIF (178).

Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, όπως είναι η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn αποτελούν ένα συχνό μοντέλο μελέτης του ρόλου των HIF στη φλεγμονή. Μελέτες έχουν δείξει ότι η σταθεροποίηση του HIF-1α έχει προστατευτική δράση. Χρησιμοποιώντας μέσα πρόκλησης κολίτιδας σε ποντίκια όπως είναι χημικές ή βακτηριακές τοξίνες, φάνηκε ότι η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνεται στα ποντίκια που στερούνται την έκφραση του HIF-1α. Επώση ποντικών αγρίου τύπου με DMOG, το οποίο αναστέλλει τις υδροξυλάσες PHD και FIH και σταθεροποιεί τους HIF, μείωσε την εμφάνιση κολίτιδας από χημικές (183) ή βακτηριακές τοξίνες (184). Νεότερες μελέτες εμπλέκουν την αναστολή της δράσης των υδροξυλασών στη ρύθμιση της φλεγμονής μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο μονοπάτι της IL-1β, το οποίο είναι απαραίτητο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (185). Έτσι, λοιπόν, η χρήση αναστολέων της δράσης των υδροξυλασών έχει προταθεί για τη θεραπεία φλεγμονωδών νόσων.

Η ενεργοποίηση του HIF-1 στη φλεγμονή μπορεί να γίνει και από πληθώρα παραγόντων της φλεγμονής. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και η σηματοδότηση μέσω

των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) οδηγούν σε σταθεροποίηση των HIF (186), ενώ συμβαίνει και η αντίστροφη πορεία, δηλαδή οι HIF επάγουν τη σηματοδότηση μέσω των TLRs (187). Ο TNF α , επίσης, ρυθμίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα και το mRNA του HIF-1 α στην φλεγμονή. Όπως έδειξε πρόσφατη μελέτη η αύξηση αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-kB, αλλά μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα λόγω παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης με τον ARNT (188).

Το μονοπάτι NF-kB έχει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και συνδέεται με τη ρύθμιση του HIF-1. Η υποξία επάγει τη δράση του NF-kB μέσω αναστολής της ενεργοποίησης της IKK β , λόγω αναστολής της υδροξυλίωσής από την PHD1 (189). Η ενεργοποίηση του NF-kB εμποδίζει την απόπτωση του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας και προάγει περαιτέρω την υποξική φλεγμονή μέσω παραγωγής κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και διαφόρων ενζύμων (178). Από την άλλη πλευρά, μελέτες έχουν δείξει ότι ο NF-kB επάγει τα επίπεδα mRNA του HIF-1 α στη φλεγμονή (190).

Η σταθεροποίηση των HIF στη φλεγμονή και η ενισχυμένη ενεργότητά τους επηρεάζει τη δράση των κυττάρων της φλεγμονής, όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα δενδριτικά κύτταρα. Μακροφάγα κύτταρα που δεν εκφράζουν HIF-1 α χαρακτηρίζονται από μειωμένη κινητικότητα, διεισδυτικότητα και αντιβακτηριακή δράση (72). Όμοιο αποτέλεσμα έχει και η απώλεια της έκφρασης του HIF-2 α στα μακροφάγα (191). Τα ουδετερόφιλα στη φλεγμονή εκφράζουν HIF-1 α αλλά όχι HIF-2 α (191). Η έκφραση του HIF-1 α στα κύτταρα αυτά απαιτείται για την επιβίωσή τους και για τη δράση τους ενάντια σε παθογόνους παράγοντες (72, 192). Η έκφραση του HIF-1 α στα δενδριτικά κύτταρα απαιτείται για την ενεργοποίησή τους και τη δράση τους ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που θα ενεργοποιήσουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων (193). Επιπλέον, στα μαστοκύτταρα η έκφραση του HIF-1 α ρυθμίζει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1 β) και αγγειοδιαστολέων όπως ο VEGF (137).

1.5.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Αφού οι HIFs έχουν κεντρικό ρόλο τόσο σε ισχαιμικές και φλεγμονώδεις νόσους όσο και στην προσαρμογή και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων κρίνεται απαραίτητη η χρήση διαφορετικών θεραπευτικών προσεγγίσεων σε κάθε περίπτωση. Αυτό οφείλεται στο διαφορετικό ρόλο της επαγωγής της δράσης του HIF-1 σε κάθε περίπτωση, καθώς η επαγωγή του σε

περιπτώσεις ισχαιμίας και φλεγμονής δρα προστατευτικά ενώ η μείωση της έκφρασης και της δράσης του είναι στόχοι της αντικαρκινικής θεραπείας.

Οι μέθοδοι επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α σε ισχαιμικές ασθένειες περιλαμβάνουν την γονιδιακή θεραπεία και την αναστολή της δράσης των υδροξυλασών PHD. Η ενίσχυση της δράσης του HIF-1 σε ισχαιμικές ασθένειες, όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, επάγει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων στην περιοχή στόχο, μέσω αύξησης της έκφρασης του VEGF, παρέχοντας έτσι αυξημένη αιματική ροή και οξυγόνο (173, 175). Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται πειραματικά σε μοντέλα ποντικών η γονιδιακή θεραπεία κατά την οποία γίνεται μεταφορά της ενεργούς μορφής του γονιδίου *HIF1A*, μέσω αδενοϊών, για την υπερέκφρασή της στα κύτταρα στόχους, μόνη της ή σε συνδυασμό με αγγειογόνα κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών (194, 195). Η παραπάνω θεραπεία με τη χρήση αδενοϊών είχε αντι-ισχαιμικά αποτελέσματα σε ηλικιωμένα και διαβητικά ποντίκια (194, 196). Τα ευρήματα αυτά είναι σημαντικά καθώς πολύ μεγάλος αριθμός ασθενών που εμφανίζουν αθηροσκλήρωση και άλλες σχετικές ισχαιμικές νόσους είναι διαβητικοί και ηλικιωμένοι. Όμοιες προσεγγίσεις έχουν γίνει με τη χρήση υβριδικών μορίων HIF-1α/ VP16 σε κουνέλια και διαβητικούς αρουραίους και έχουν περάσει στις φάσεις I και II των κλινικών δοκιμών σε ασθενείς με οξεία περιφερική αρτηριακή νόσο (197, 198).

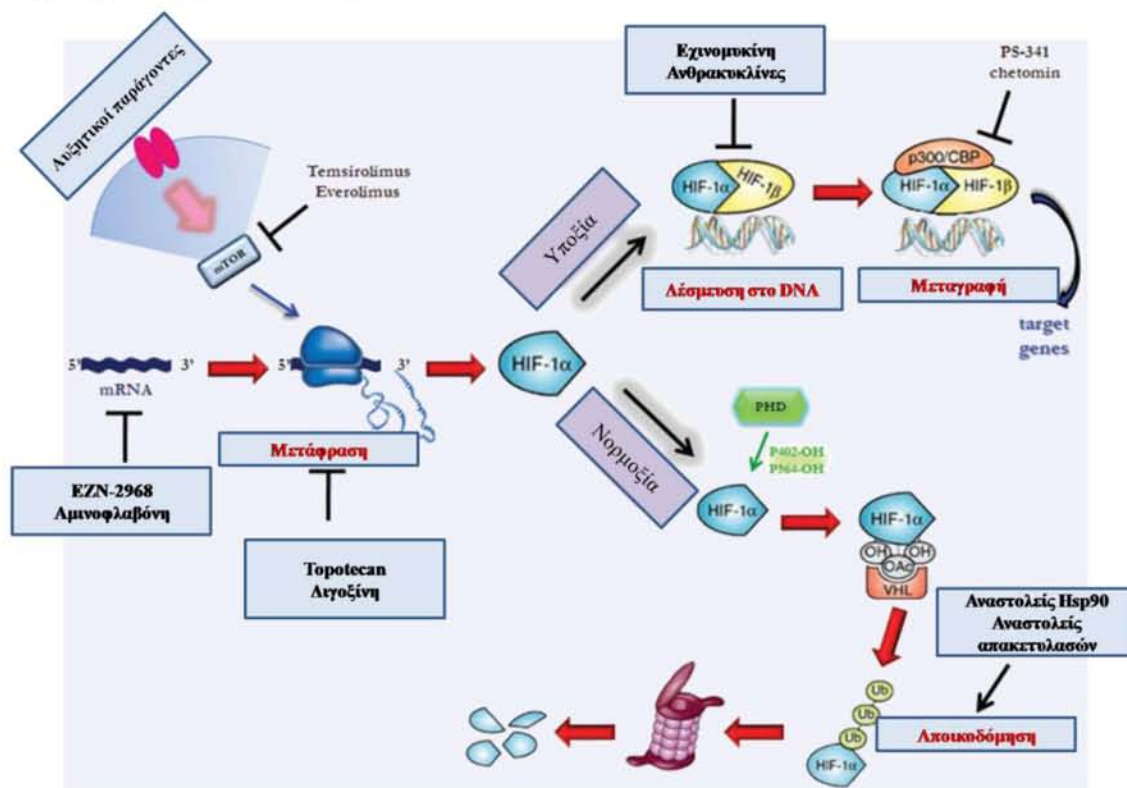
Σε πειραματικά μοντέλα η αύξηση της ειδικότητας στόχευσης και έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί μέσω συστημάτων επαγωγίσιμης έκφρασης, κατά τα οποία ενεργοποιείται η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Παράδειγμα αποτελούν τα εξαρτώμενα από την τετρακυκλίνη συστήματα επαγωγίσιμης έκφρασης TET ON και TET OFF. Χρησιμοποιώντας κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς επιτυγχάνεται έκφραση του επιθυμητού γονιδίου παρουσία ή απουσία του αντιβιοτικού τετρακυκλίνης αντίστοιχα, ή του παράγωγου της δοξυκυκλίνης (Dox) (199).

Επιπρόσθετα της γονιδιακής θεραπείας, η σταθεροποίηση των HIF γίνεται και μέσω αναστολέων των υδροξυλασών PHDs και FIH. Ως αναστολείς αυτών των ενζύμων χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες που δεσμεύουν το Fe^{2+} ή μιμητές του 2 κετογλουταρικού οξέος (2-OG) τα οποία είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες για τη δράση των ενζύμων. Τέτοια δράση έχει το DMOG το οποίο μιμείται δομικά το 2-OG εμποδίζοντας τη δέσμευσή του στην καταλυτική περιοχή των υδροξυλασών. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν την αποτελεσματικότητα της επαγωγής του HIF-1 στη θεραπεία ισχαιμικών νόσων σε προκλινικές

δοκιμές, και αξίζει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητά τους και σε ασθενείς με ισχαιμικές νόσους (137).

Αντίθετα στην αντικαρκινική θεραπεία στόχος είναι η αναστολή της έκφρασης και της δράσης του HIF-1. Οι αναστολείς του HIF-1 δρουν στοχεύοντας σε πέντε σημεία: το mRNA του HIF-1α, την μετάφραση του mRNA του HIF-1α, την αποικοδόμησή του, την δέσμευσή του στο DNA και τη μεταγραφική του ενεργότητα (200).

Η χρήση αντινοσηματικών νουκλεοτιδίων, όπως το EZN-2968, τα οποία στοχεύουν το mRNA του HIF-1α οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασής του (201). Το EZN-2968 δεσμεύεται ειδικά στο mRNA του HIF-1α και μειώνει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα *in vitro* και *in vivo* οδηγώντας σε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και σε μείωση της έκφρασης γονιδίων-στόχων του HIF-1, όπως ο VEGF. Άλλος παράγοντας που επηρεάζει σε επίπεδο mRNA και αποτρέπει τη συσσώρευση του HIF-1 είναι η αμινοφλαβόνη (aminoflavone), ωστόσο είναι άγνωστος ο ακριβής μηχανισμός δράσης της (200).



Εικόνα 9: Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης διάφορων αναστολέων του HIF-1 (200).

Για την αναστολή της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α χρησιμοποιούνται αναστολείς των τοποϊσομερασών I και II, καρδιακοί γλυκοζίτες και αναστολείς ογκογόνων μονοπατιών

(Εικόνα 9). Από τους πρώτους παράγοντες που περιγράφηκαν ότι αναστέλλουν τη μετάφραση του HIF-1α είναι η τοποτεκάνη (topotecan), η οποία αναστέλλει την ικανότητα της τοποϊσομεράσης I να ξεδιπλώνει τις αλυσίδες του DNA οδηγώντας σε μη αντιστρεπτή διάσπαση του DNA. Καθημερινή χορήγηση μικρής δόσης topotecan σε ποντίκια με γλοίωμα ανέστειλε την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-1α, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη του όγκου (202). Πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι συνδυαστική χορήγηση τοποτεκάνης (topotecan) και ενός αναστολέα της αγγειογένεσης, μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab), είχε συνδυαστική αντικαρκινική δράση σε ξενομοσχεύματα (203). Επίσης, καρδιακοί γλυκοζίτες, όπως η διγοξίνη, αναστέλλουν τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α ωστόσο το μειονέκτημά της είναι η τοξικότητα (204). Ένα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει τη μετάφραση μέσω αυξητικών παραγόντων είναι το μονοπάτι mTOR. Γι αυτό έχουν αναπτυχθεί αναστολείς του συγκεκριμένου μονοπατιού, όπως οι temsirolimus και everolimus, οι οποίοι έχουν εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του καρκίνου των νεφρών (200). Επίσης, η αναστολή των ERK1/2 από τον αναστολέα PD-98059 και από ουσίες που ανήκουν στα φλαβονοειδή όπως η καμπφερόλη αναστέλλουν τη δράση του HIF-1 εμποδίζοντας τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα (205, 206).

Επιπλέον, η αναστολή του HIF-1α στην αντικαρκινική θεραπεία επιτυγχάνεται μέσω ενίσχυσης της αποικοδόμησής του. Γι αυτό χρησιμοποιούνται αναστολείς της πρωτεΐνης Hsp90 η οποία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HIF-1α και την σταθεροποιεί (Εικόνα 9) (200). Τέτοιοι αναστολείς είναι η γκαελνταναμυκίνη (gaeldanamycin) και το 17-AAG. Επιπλέον, οι αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών επάγουν την αποικοδόμηση του HIF-1α και ρυθμίζουν τη μεταγραφική του ενεργότητα (207).

Εκτός από τα παραπάνω, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 αναστέλλεται χρησιμοποιώντας αναστολείς της δέσμευσής του στα στοιχεία HREs ή αναστολείς του πρωτεασώματος. Για παράδειγμα η εχινομυκίνη (echinomycin) προσδένεται στο DNA σε ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αποτρέπει τη δέσμευση του HIF-1 στα HREs του υποκινητή των γονιδίων στόχων. Επίσης, οι ανθρακυκλίνες, όπως είναι η δοξορουβικίνη, εκδηλώνουν κυτταροτοξική δράση με όμοιο τρόπο (172). Ο αναστολέας του πρωτεασώματος βορτεζομίδη (bortezomib), έχει προταθεί ότι αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, ενισχύει τη δέσμευση της υδροξυλάσης FIH και εμποδίζει έτσι την αλληλεπίδραση του μεταγραφικού συμπλέγματος p300 (208). Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η βορτεζομίδη καταστέλλει

την πρωτεϊνική έκφραση και τη συσσώρευση του HIF-1α μέσω αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και MAPK (209). Εκτός από αναστολείς μικρού μοριακού βάρους έχει αναφερθεί ότι τμήματα του HIF-1α μπορούν να δρουν σαν επικρατείς αναστολείς του (210).

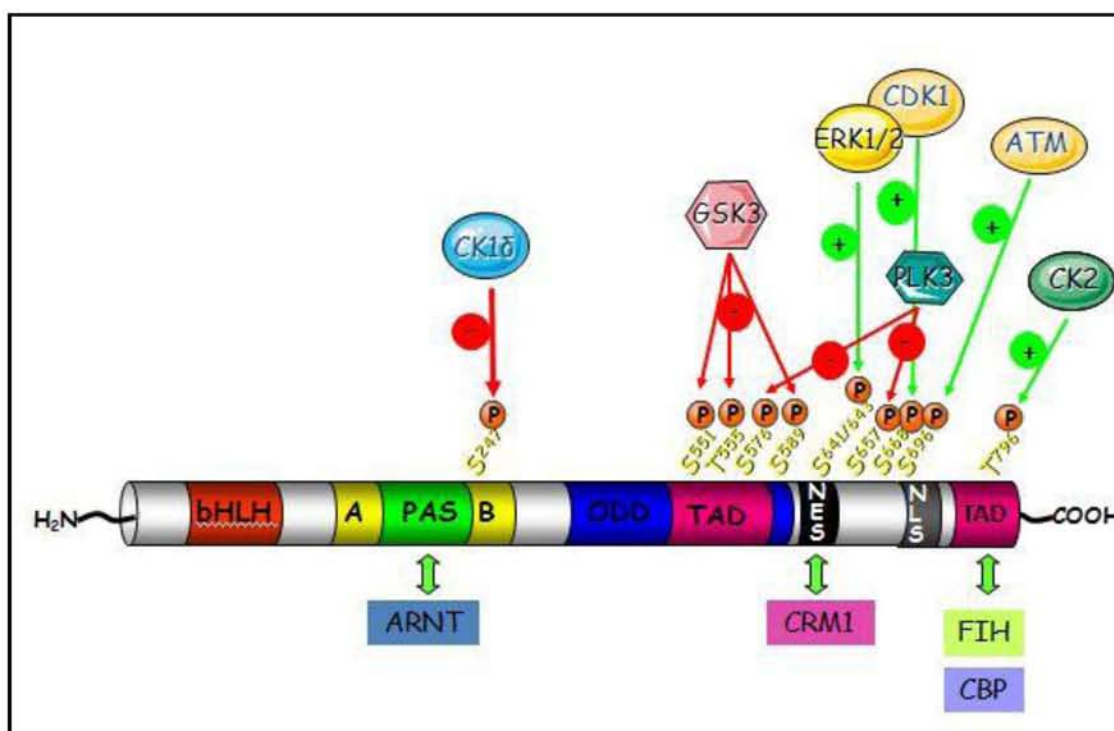
Παρά το γεγονός, λοιπόν, ότι έχει αναπτυχθεί πληθώρα χημικών αντικαρκινικών φαρμάκων, παρατηρούνται αρκετά και σημαντικά μειονεκτήματα από τη χρήση τους, όπως είναι η ανθεκτικότητα στα φάρμακα αυτά, η καταστροφή υγιών κυττάρων και άλλες μη ειδικές παρενέργειες. Για την εξάλειψη αυτών των προβλημάτων και για την ενίσχυση της ειδικότητας της αντικαρκινικής θεραπείας τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται στο σχηματισμό πεπτιδίων με αντικαρκινική δράση. Τέτοια πεπτίδια μπορεί να προέρχονται από κάποια γνωστή πρωτεΐνη η οποία έχει έμφυτη ικανότητα δέσμευσης στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματισμού πόρων ή καταστροφής της μεμβράνης εκδηλώνοντας έτσι την τοξική τους δράση. Άλλη κατηγορία πεπτιδίων αποτελούν εκείνα που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσω της περιοχής Tat του ιού HIV που δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής και τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθούν πεπτίδια ειδικά για κάποιο δείκτη της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων όπως για παράδειγμα για κάποιον μεμβρανικό υποδοχέα (211). Κρίνεται λοιπόν απαραίτητος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη τέτοιων πεπτιδίων για πιο ειδική και αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων και κυρίως του καρκίνου.

1.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1 ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

1.6.1 Κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α

Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ρυθμίζει την σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α θετικά ή αρνητικά. Η φωσφορυλίωση μπορεί να ενισχύσει τη δραστικότητα του HIF-1α είτε εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τον pVHL κι έτσι να αποτρέπεται η αποικοδόμησή του, είτε αυξάνοντας τη συγγένεια του HIF-1α για πρόσδεση με μεταγραφικούς συμπαράγοντες (Εικόνα 10) (21). Έχει αναφερθεί ότι η CK2 είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στη θρεονίνη 796, και δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής p300 (150) αλλά πιθανόν να επηρεάζει την αλληλεπίδραση με την FIH (212) με αποτέλεσμα την διατήρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α.

Σε συνθήκες διακοπόμενης υποξίας έχει βρεθεί ότι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α (213). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 1 (CDK1) σταθεροποιεί την πρωτεΐνη HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες O₂ μέσω φωσφορυλίωσης στη Ser-668 οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων (214). Μια ακόμη φωσφορυλίωση που είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και τη δράση του HIF-1α στην υποξία είναι στη Ser-696 από την κινάση ATM (ataxia telangiectasia mutated) μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η αναστολή του μονοπατιού mTORC1 το οποίο είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 10) (215).



Εικόνα 10: Ρύθμιση του HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης. Απεικονίζονται οι διάφορες κινάσες και τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνουν στο πρωτεϊνικό μόριο του HIF-1α. Με πράσινο βελάκι υποδηλώνεται η θετική επίδραση της φωσφορυλίωσης (+) ενώ με κόκκινο η αρνητική επίδραση (-) στη δραστηριότητα του HIF-1.

Η φωσφορυλίωση από την ERK1/2 σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) στα κατάλοιπα Ser-641 και 643 της καρβοξυτελικής περιοχής του HIF-1α (10), η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, οδηγεί στην κάλυψη ενός σήματος πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES), αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (Εικόνα 10). Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα οπότε ενισχύεται η μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-1 (9).

Φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες οδηγεί σε μείωση της πρωτεϊνικής σταθερότητας και της δραστηριότητας του HIF-1α. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ισομορφή δ της κινάσης της καζεΐνης 1 (CK1δ) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην περιοχή PAS B στο κατάλοιπο Ser-247. Το αποτέλεσμα αυτής της τροποποίησης όπως φάνηκε με *in vitro* δοκιμές ήταν η αναστολή της αλληλεπίδρασης με τον ARNT οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (216). Άλλη μια φωσφορυλίωση που ρυθμίζει αρνητικά την πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-1α είναι από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3β, σε διάφορα κατάλοιπα σερίνης στην περιοχή ODD (Ser-551, 555 και 589), οδηγώντας στην αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα (217). Ομοίως, η PLK3 (polo-like kinase 3), σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα Ser-576 και Ser-659 (Εικόνα 10) (218).

1.6.2 Ρύθμιση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2

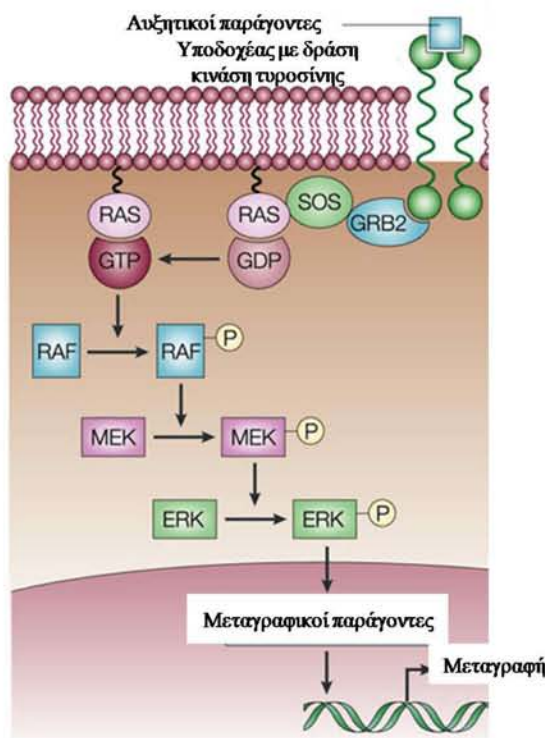
1.6.2.1 Η οικογένεια των κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK)

Ενεργοποίηση των ERK1/2

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAP κινάσες). Η οικογένεια των ERK κινασών περιλαμβάνει δύο ισομορφές, τις ERK1 και ERK2 (γνωστές και ως p42/44 MAPK), οι οποίες είναι όμοιες δομικά και διεγείρονται από ποικίλα ερεθίσματα όπως είναι η ενεργοποίηση υποδοχέων με δράση κινάση τυροσίνης ή υποδοχέων G-συζευγμένων πρωτεϊνών, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, ιοί όπως οι HBV και HCV και καρκινογόνα. Ανάλογα με τη διάρκεια της διέγερσης και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους η ενεργοποίηση των ERK1/2 ρυθμίζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (219).

Η σηματοδότηση ξεκινά μετά την ενεργοποίηση συνήθως ενός υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης από ένα μόριο-προσδέτη. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα γίνεται με αυτοφωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης της καρβοξυτελικής του περιοχής και αυτά προσδένονται στη συνέχεια σε πρωτεΐνες μετασχηματισμού, όπως η GRB2. Έπειτα, η GRB2 προσελκύει την πρωτεΐνη SOS (son of sevenless), η οποία όταν πλησιάζει τη GTPάση

Ras που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, αυτή μεταβαίνει από την GDP-δεσμευμένη αδρανή μορφή στην GTP-δεσμευμένη ενεργό μορφή, που αποτελεί το σηματοδοτικό μόριο. Η ενεργοποιημένη Ras με τη σειρά της ενεργοποιεί μια από τις κινάσες Raf (A-Raf, B-Raf, C-Raf). Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις κινάσες MEK1/2 (mitogen protein kinase 1 και 2) οι οποίες ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης του μοτίβου Thr-Glu-Thr τις ERK1/2 (Εικόνα 11). Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν περισσότερες από 160 γνωστές πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, ορισμένες από τις οποίες θα περιγραφούν παρακάτω (220).



Εικόνα 11: Το μονοπάτι ενεργοποίησης των ERK κινασών (221).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας των ERK1/2 παίζουν και οι φωσφατάσες, οι οποίες τις αποφωσφορυλιώνουν και τις απενεργοποιούν. Οι φωσφατάσες αυτές αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης των ERK1/2 και εμποδίζουν την ενεργοποίησή τους. Ωστόσο, η έκφραση των ίδιων φωσφατάσων επάγεται από τις ενεργοποιημένες ERK1/2. Τέτοιες φωσφατάσες είναι οι MKP-1/DUSP1, PAC-1/DUSP2, MKP-2/DUSP4, οι οποίες είναι πυρηνικές και οι MKP-3/DUSP6, MKP-X/DUSP7, MKP-4/DUSP9 οι οποίες είναι κυτταροπλασματικές (222, 223). Οι φωσφατάσες αυτές αποφωσφορυλιώνουν και άλλα μέλη της οικογένειας των MAP κινασών και μόνο η πυρηνική φωσφατάση B23/DUSP5

αποφωσφορυλιώνει ειδικά τις ERK1/2 (223). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και άλλες φωσφατάσες μικρού μοριακού βάρους που αποφωσφορυλιώνουν τις ERK1/2 όπως οι VHR/DUSP3 και MKP-6/DUSP14 οι οποίες είναι κυτταροπλασματικές αλλά η δράση τους είναι άγνωστη (223).

Η παραγωγή ROS επίσης επάγει τις ERK1/2 με τους εξής μηχανισμούς: α) μέσω οξείδωσης του Ras που οδηγεί σε αυτοενεργοποίηση των κινασών Raf, β) αυξάνουν τη δραστικότητα των υποδοχέων με δράση κινάση τυροσίνης και γ) αναστέλλουν τη δράση των φωσφατασών των ERK1/2 (220).

Η ενεργοποίηση των MAPK κινασών από την υποξία/ισχαιμία παραμένει ακόμη ένα αμφιλεγόμενο θέμα. Υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας επάγεται η φωσφορυλίωση, οπότε και η ενεργοποίηση, των ERK1/2, η οποία επάγεται ακόμη περισσότερο μετά από προσθήκη νουκλεοσιδίων πουρινών (224, 225). Η ενεργοποίηση αυτή έχει προστατευτική δράση για τα νευρικά κύτταρα και τους πρωτογενείς νευρώνες που αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας, καθώς η αναστολή του μονοπατιού μέσω ενός φαρμακευτικού αναστολέα της MEK1, PD098059, προκάλεσε μείωση της αύξησης και της επιβίωσης των νευριτών (225). Παλαιότερες αναφορές επίσης υποστηρίζουν την επαγωγή της ενεργοποίησης των MAP κινασών από την αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου που παρατηρήθηκε σε νευρώνες σε συνθήκες υποξίας (226, 227).

Υποκυτταρικός εντοπισμός

Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, σε φυσιολογικά κύτταρα οι ERK1/2 εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα λόγω της αλληλεπίδρασης με τις MEK1/2, το δίκτυο μικροσωληνίσκων ή με τις φωσφατάσες. Μετά την ενεργοποίησή τους η μεταφορά τους στον πυρήνα γίνεται μέσα σε 15 λεπτά, ενώ η μεταφορά αυτή αντιστρέφεται όταν απομακρυνθεί το ερέθισμα. Η μετακίνηση των ERK1/2 στον πυρήνα περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωσή τους σε κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης που οδηγεί στην απομάκρυνσή τους από τις MEK1/2. Οι ERK1/2 εισέρχονται στον πυρήνα με παθητική διάχυση του μονομερούς, ενεργητική μεταφορά του διμερούς ή με άμεση αλληλεπίδραση με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου (228). Αξίζει να σημειωθεί ότι η υποξία ενεργοποιεί τις ERK1/2, οι οποίες οδηγούνται στον πυρήνα για να δράσουν (229).

Ο ρόλος των ERK1/2 στην κυτταρική λειτουργία

Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν διάφορα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά υποστρώματα και ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνονται από τις ενεργές ERK1/2 ανήκουν οι κινάσες DAPK (death-associated protein kinase), οι κινάσες RSK (ribosomal S6 kinase), φωσφατάσες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η φωσφοδιεστεράση cAMP (PDE4), η κυτοσολική φωσφολιπάση A2, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, αποπτωτικές πρωτεΐνες και ρυθμιστικά σηματοδοτικά μόρια (219). Στον πυρήνα πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνονται από τις ενεργές ERK1/2 είναι οι κινάσες MNK (MAPK-interacting kinases 1 και 2), MK2/3 (MAPK-activated kinase 2 και 3) και οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας Elk και οι c-Fos και STAT3 (και ο HIF-1α όπως προαναφέρθηκε) (219).

Οι ERK1/2 έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε φυσιολογικά κύτταρα είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση των ERK1/2, που διεγείρεται από μιτογόνα ερεθίσματα, για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο και την εξέλιξη της G1 φάσης καθώς και για την μετάβαση στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (230, 231). Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα Elk1 ο οποίος εμπλέκεται στη μεταγραφή γονιδίων όπως το c-MYC και c-Fos. Οι ERK1/2 σταθεροποιούν τον c-Fos μέσω άμεσης φωσφορυλίωσής του και αυτό οδηγεί στην αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη c-Jun ώστε να σχηματιστεί το ενεργό σύμπλοκο AP-1. Το σύμπλοκο αυτό απαιτείται για την έκφραση της κυκλίνης D1, η οποία αλληλεπιδρά με τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDK) ώστε να παραγματοποιηθεί η μετάβαση από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (232).

Επιπλέον, οι ERK1/2 προάγουν την κυτταρική επιβίωση μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, απενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεϊνών και αύξησης της μεταγραφής προ-επιβιωτικών γονιδίων (228). Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 επάγουν το μονοπάτι κυτταρικής επιβίωσης PI3K/AKT, ενεργοποιούν αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι Bcl-2 και Bcl-xL, και καταστέλλουν τη δράση προαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως είναι οι πρωτεΐνες Bad και Bim (220). Λόγω αυτής της δράσης τους έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και την ενίσχυση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, καθώς το μονοπάτι Ras/Raf/ERK είναι ενεργό σε πάρα πολλές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε πρωτογενείς

καρκινικούς όγκους από διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου και του ηπατοκαρκινώματος (233).

Ωστόσο, παρόλο που γενικά η ενεργοποίηση των ERK1/2 σχετίζεται με ενίσχυση της κυτταρικής επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού, διάφορες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι ανάλογα με τον τύπο του ερεθίσματος και του κυττάρου, η ενεργοποίηση των ERK1/2 μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω του ενδογενούς ή του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού. Σε περιπτώσεις που το ερέθισμα προκαλεί βλάβη στο DNA, όπως για παράδειγμα επώαση με ετοποσίδιο, δοξορουβικίνη ή γ-ακτινοβολία, επάγεται η ενεργοποίηση των ERK1/2, οι οποίες συνήθως ενεργοποιούν στην περίπτωση αυτή το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Επιπλέον, η απόπτωση λόγω βλάβης στο DNA σχετίζεται και με τη συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 που προκαλείται από τις ERK1/2, οι οποίες τη φωσφορυλιώνουν και τη σταθεροποιούν. Ακόμη, πολλά αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως η οιστραδιόλη και η ιντερφερόνη α, αναστέλλουν το μονοπάτι Ras/Raf/ERK. Σε άλλες περιπτώσεις η ενεργοποιημένη ERK1/2 μειώνει τη δράση της κινάσης AKT, η οποία επάγει την κυτταρική επιβίωση, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο (220, 228). Η επαγωγή των ERK1/2 από τα ROS έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση συνήθως μέσω του ενδογενούς μονοπατιού. Το εξωγενές μονοπάτι επάγεται από τις ERK1/2 ως απόκριση στην επώαση με H₂O₂, ψευδάργυρο και NO (220).

1.6.2.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2

Όπως προαναφέρθηκε, ο νεοσυντιθέμενος HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT ώστε να συγκροτηθεί το λειτουργικό μεταγραφικό σύμπλοκο του HIF-1. Εκτός από το σήμα εισόδου στον πυρήνα, ο πυρηνικός εντοπισμός του HIF-1α εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή του από τις κινάσες ERK1/2 στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643 (10). Το αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι να καλύπτει μια περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 632-639 που λειτουργεί ως σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES), οπότε να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με την CRM1, που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (9). Έτσι ο φωσφορυλιωμένος HIF-1α παραμένει στον πυρήνα και μπορεί πλέον να προσδεθεί με τον ARNT για να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Η ελάχιστη επικράτεια του HIF-1α που περιέχει τόσο την περιοχή NES όσο και τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 καλείται ETD (616-658) (ERK1/2 Target Domain) και είναι εξελικτικά συντηρημένη. Πειράματα υπερέκφρασης GFP-συζευγμένων πεπτιδίων ETD έδειξαν

ότι τα πεπτίδια τα οποία φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 είναι πυρηνικά, όπως είναι η αγρίου τύπου μορφή ETD (ETD wt) και η μορφή στην οποία έχει μεταλλαχθεί το NES αλλά μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις ERK1/2 (ETD I→A). Αντίθετα, η μορφή που δεν φωσφορυλιώνεται από την κινάση ETD S→A είναι κυτταροπλασματική. Μελετώντας την επίδραση της υπερέκφρασης των ETD wt και ETD S→A στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας, φάνηκε ότι το ETD wt δρα ανασταλτικά σε αντίθεση με το ETD S→A το οποίο δεν επηρεάζει τη δράση του HIF-1 (9) (Εικόνα 23).

1.6.3 Ρύθμιση του HIF-1α από την κινάση CK1δ

1.6.3.1 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1)

Η CK1δ ανήκει στην οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1), η οποία περιλαμβάνει επιπλέον 6 ισομορφές τις α, β, ε, γ1, γ2 και γ3 και τα μετάγραφα που προκύπτουν μετά από μετα-μεταγραφική επεξεργασία. Τα μέλη της οικογένειας CK1 εκφράζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι εξελικτικά συντηρημένα.

Η δομή των κινασών CK1 περιλαμβάνει μια μικρή αμινοτελική επικράτεια, μια μεγαλύτερη καρβοξυτελική επικράτεια και μια ενδιάμεση καταλυτική σχισμή όπου προσδένεται το ATP καθώς και τα υποστρώματά τους. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των κινασών CK1 είναι ότι χρειάζονται απαραίτητα ATP για να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους και δεν απαιτούν άλλους συμπράγοντες. Διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μέγεθος και την πρωτοταγή δομή της ρυθμιστικής καρβοξυτελικής περιοχής. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 32 kDa (CK1α) - 52,2 kDa (CK1γ3), με τη CK1δ να έχει μοριακό βάρος ~47 kDa (234).

Η *in vitro* ειδικότητα των κινασών CK1 για το υπόστρωμα μπορεί να διαφέρει από την *in vivo*, υποδηλώνοντας ότι η *in vivo* ειδικότητα ελέγχεται από διάφορους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις κινάσες, από αυτοφωσφορυλίωση ή από τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (235).

Ρύθμιση της έκφρασης και της δράσης

Η έκφραση και η δράση των κινασών CK1 ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες και μηχανισμούς. Επώαση με διάφορους παράγοντες τροποποιεί την έκφραση των κινασών CK1, όπως για παράδειγμα η παρουσία ινσουλίνης, αναστολέων τοποϊσομερασών, γ-ακτινοβολία και

ο ικός μετασηματισμός ενισχύουν τη δραστηριότητα των κινασών. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους ρυθμίζεται κυρίως μέσω δέσμευσης σε ενδοκυττάρειες δομές ή σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα και αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην αναγνώριση του υποστρώματος και στη δράση των κινασών (234, 235).

Η ενεργότητά τους ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ποικίλα μετάγραφα προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA. Στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις περιλαμβάνονται φωσφορυλιώσεις ή πρωτεόλυση. Έχουν βρεθεί διάφορες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τα μέλη της οικογένειας κινασών CK1 όπως για παράδειγμα οι κινάσες PKA (cAMP-dependent protein kinase), AKT, CLK2 (CDC-like kinase 2), PKC α (protein kinase C isoform α), Chk1 (checkpoint kinase 1) οι οποίες φωσφορυλιώνουν την CK1 δ ρυθμίζοντας έτσι τη δράση της θετικά ή αρνητικά (234). Σε αύξηση της ενεργότητας των κινασών CK1 οδηγεί η αποφωσφορυλίωσή τους ή επώαση με H₂O₂ και η πρωτεόλυση της καρβοξυτελικής περιοχής. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι ισομορφές CK1 δ και CK1 ϵ αυτοφωσφορυλιώνονται με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση τους. Η CK1 δ σχηματίζει διμερή με αποτέλεσμα την αναστολή της δέσμευσης του ATP στην καταλυτική περιοχή οπότε μειώνεται η δραστηριότητά της. Επιπλέον, οι κινάσες CK1 υπόκεινται σε αλλοστερική ρύθμιση από διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες (234, 235).

Βιολογικές δράσεις

Τα μέλη της οικογένειας κινασών CK1 ελέγχουν πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως την ανοσοαπόκριση και τη φλεγμονή, τη συγκρότηση και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, την απόκριση στην καταστροφή του DNA, τον κυτταρικό κύκλο, τη βιογένεση ριβοσωμάτων, τον κερκάδιο ρυθμό και την απόπτωση. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι η CK1 δ ρυθμίζει τη συγκρότηση και τη δυναμική των μικροσωληνίσκων καθώς μεσολαβεί στη φωσφορυλίωση της α - β - και γ -τουμπουλίνης καθώς και των σχετιζόμενων με τους μικροσωληνίσκους πρωτεϊνών (MAPs, microtubule associated proteins), της σταθμίνης και των πρωτεϊνών tau (235). Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η CK1 δ προάγει τη σιλιόγνεση με διάφορους μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων της επίδρασής της στην οργάνωση των κεντροσωμάτων και στην οργάνωση και λειτουργία του συμπλέγματος Golgi (236). Επίσης, η CK1 δ έχει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού καθώς φωσφορυλιώνει τις

πρωτεΐνες PER1 και PER2 (period circadian protein) οι οποίες ρυθμίζουν τον περιοδικό ρυθμό (237, 238).

Διάφορες μελέτες προτείνουν την εμπλοκή των κινασών CK1 στην ογκογένεση όμως δεν είναι ξεκάθαρο αν προάγουν την δημιουργία και την ανάπτυξη όγκων ή αν διάφορες κυτταρικές ογκογόνες διαδικασίες οδηγούν στην τροποποίηση της έκφρασή τους. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα mRNA των CK1δ/ε αυξάνονται σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως του εγκεφάλου, του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη και του αιμοποιητικού συστήματος καθώς και σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως στη νόσο Alzheimer (234, 235, 239).

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι κινάσες CK1 εμπλέκονται στην καρκινογένεση είναι ποικίλοι, ωστόσο δεν έχουν διεκρινιστεί πλήρως. Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί είναι η επίδραση των διαφόρων ισομορφών στη σταθερότητα και τη δράση της πρωτεΐνης p53. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση της p53 από την CK1α, τη CK1δ και τη CK1ε σε φυσιολογικές συνθήκες και στρεσογόνες συνθήκες οδηγεί στην ενεργοποίησή της με διαφορετικούς μηχανισμούς (234, 239). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση του παράγοντα MDM2, που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της p53, από τις CK1δ/ε επάγει την αποικοδόμηση της p53 (240). Οι CK1δ/ε εμπλέκονται στην πρόοδο των καρκίνων παγκρέατος, ορθού και μαστού μέσω καταστολής της απόπτωσης, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποίησης του μονοπατιού των β-κατενινών (241).

Ωστόσο, παραμένει άγνωστος ο ρόλος της CK1δ στην κύρια προσαρμοστική διαδικασία των καρκινικών κυττάρων μέσω μεταβολικού επαναπρογραμματισμού σε συνθήκες υποξίας και παραμένουν ερωτηματικά σχετικά με τον τρόπο δράσης των ισομορφών των κινασών CK1 στους διάφορους τύπους καρκίνου.

Αναστολείς

Εξαιτίας της εμπλοκής των CK1 ισομορφών σε πολλές παθολογικές καταστάσεις εκτός του καρκίνου, όπως είναι οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στρέφεται το ενδιαφέρον στη δημιουργία πιο ειδικών και ισχυρών αναστολέων των διαφόρων ισομορφών. Οι περισσότεροι αναστολείς που έχουν αναπτυχθεί ως σήμερα δρουν ως ανταγωνιστές του ATP για δέσμευση στην καταλυτική περιοχή των κινασών και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου (234, 235).

Ο πρώτος αναστολέας των CK1 που χαρακτηρίστηκε ήταν ο CKI-7 και ακολούθησαν οι αναστολείς IC261 και D4476 ως πιο ισχυροί και ειδικοί αναστολείς. Διάφορες μελέτες παρουσιάζοντας μια συγκριτική μελέτη της ειδικότητας και της δυναμικότητας των παραπάνω τριών αναστολέων απέδειξαν ότι ο D4476 (4-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-5-(2-pyridinyl)-1*H*-imidazol-2-yl]benzamide), είναι ο πιο ειδικός και ισχυρός αναστολέας της CK1δ (242-244). Συγκρίνοντας τη δράση των αναστολέων CKI-7, IC261 και D4476, έδειξαν ότι ο D4476 έχει το μικρότερο IC₅₀ (0,3 μM) και ότι σε συγκέντρωση 10 μM αναστέλει την CK1δ σε ποσοστό >90%, χωρίς να επηρεάζει τη δράση άλλων κινασών εκτός των ALK5 (ή υποδοχέας 1 του TGF B, TGFBR1) και p38. Ωστόσο, η κινάση ALK5 είναι αδρανής απουσία του TGF B από το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων και η p38 κινάση είναι ανενεργή σε κύτταρα που δεν εκτίθενται σε στρεσογόνες συνθήκες ή σε προφλεγμονώδης κυτοκίνες, οπότε εκτός από τις παραπάνω συνθήκες δεν επηρεάζονται από την προσθήκη του αναστολέα D4476 (242).

1.6.3.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ

Μετά την είσοδο του στον πυρήνα, ο HIF-1α ετεροδιμερίζεται με τον ARNT μέσω των PAS περιοχών τους, προκειμένου να συγκροτήσουν το λειτουργικό σύμπλοκο HIF-1 που θα επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Όπως προαναφέρθηκε, πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας *in vitro* δοκιμές έδειξε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τη CK1δ στο κατάλοιπο σερίνης 247 της περιοχής PAS B, και αυτή η φωσφορυλίωση παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον ARNT (216). Πειράματα υπερέκφρασης σε κύτταρα HEK293T της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α που δεν φωσφορυλιώνεται από την κινάση (HIF-1α S247A) ή επώαση με τους χημικούς αναστολείς της κινάσης CK1δ όπως είναι οι CKI7, IC261 και PF670462 σε κύτταρα HeLa σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂) προκάλεσαν αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Αντίθετα, υπερέκφραση της δραστικής μορφής της κινάσης CK1δ (CK1δ wt) ή της φωσφομιμητικής μορφής του HIF-1α (HIF-1α S247D) οδήγησε σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της αδρανούς μορφής της κινάσης (CK1δ K38M) δεν επηρέασε τη δραστηριότητα του HIF-1 (216).

1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η υποξία, δηλαδή η μειωμένη συγκέντρωση O_2 , παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η εμβρυογένεση, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, οι ισχαιμικές και φλεγμονώδεις ασθένειες. Στις συνθήκες αυτές επάγεται η έκφραση και η δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, ο οποίος είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων στόχων του που εμπλέκονται σε ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Όπως είναι γνωστό η δράση του HIF-1 ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την ERK1/2 γεγονός που επιδρά θετικά στη μεταγραφική του ενεργότητα, ενώ η υπερέκφραση της επικράτειας ETD του HIF-1α έχει το αντίθετο αποτέλεσμα στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας (9). Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η κινάση CK1δ φωσφορυλιώνει τον HIF-1α γεγονός που μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Όπως προέκυψε με *in vitro* δοκιμές αυτή η παρατηρούμενη μείωση της δραστηριότητάς του οφείλεται σε παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού HIF-1α/ARNT (216).

Ως συνέχεια των παραπάνω μελετών, πρώτος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί εάν είναι εφικτή η κατασκευή ειδικών ανασταλτικών πεπτιδίων της φωσφορυλίωσης και της δραστηριότητας του HIF-1α. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης διαφόρων μορφών της επικράτειας ETD του HIF-1α στον υποκυτταρικό εντοπισμό και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, καθώς και στην μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

Δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της CK1δ στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT μέσα στα κύτταρα, καθώς και η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας της δράσης αυτής στην μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το:

- TOP10 (Invitrogen) με γονότυπο: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και αυξοτροφία στη λευκίνη. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης.

2.1.2 Κυτταρικές σειρές

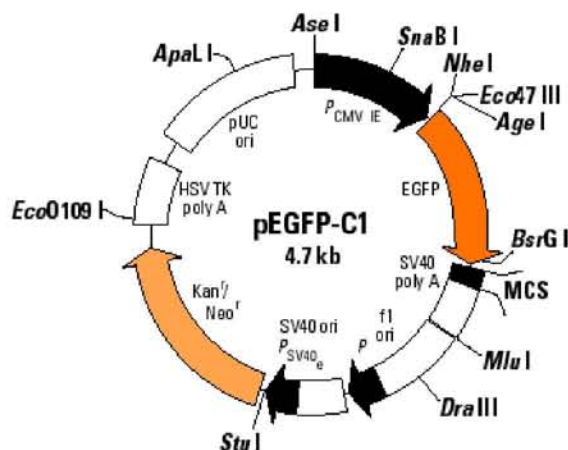
Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές:

- HeLa: ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας
- Huh7: κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, σταθερά διαμολυσμένες με τον πλασμιδιακό φορέα pTET OFF ώστε να εκφράζουν τον καταστολέα tTA. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή έκφραση των πεπτιδίων ETD μέσω του συστήματος TET OFF. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος tTA-Huh7 και tTA-HepG2 και η κυτταρική σειρά tTA-H1299 από μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές είναι ευγενική χορηγία του Καθηγητή Κώστα Παντόπουλου, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου McGill (245).
- HEK293T (Human Embryonic Kidney T antigen): ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού τα οποία εκφράζουν το T αντιγόνο του κυτταρομεγαλοϊού SV40, το οποίο, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τα κατάλληλα πλασμίδια που φέρουν ενισχυτές SV40, δεσμεύεται σ' αυτούς, επιτρέποντας την έκφραση των επιθυμητών γονιδίων.
- hBSM (human Bronchial Smooth Muscle): ανθρώπινα πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (Lonza)

2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

- pEGFP-C1 (Clontech)

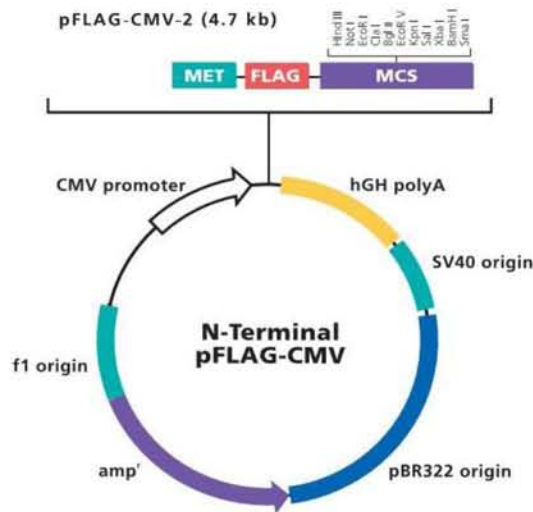
Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει. Επίσης, περιέχει αλληλουχία που κωδικοποιεί τη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS) και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Εικόνα 12). Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του cDNA του αμινοτελικού τμήματος του HIF-1α (1-347) στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, που βρίσκεται εντός της MCS και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη GFP.



Εικόνα 12: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pEGFP-C1

- pFLAG-CMVTM-2 (Sigma)

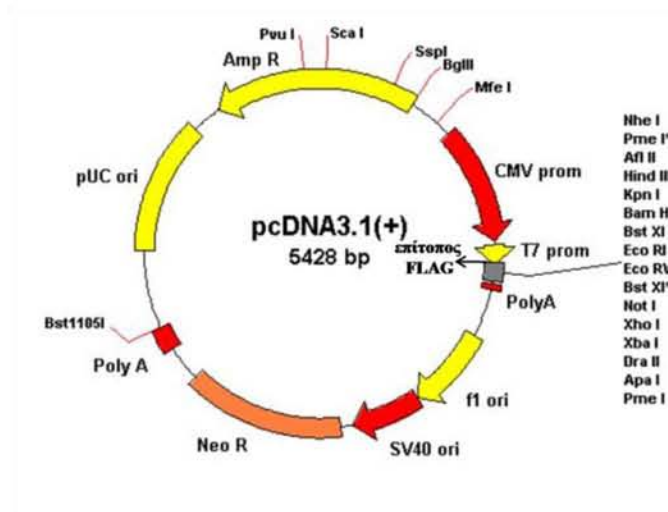
Ένας ακόμη πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει είναι ο pFLAG-CMVTM-2, ο οποίος περιέχει αλληλουχία που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG (που αποτελείται από 8 αμινοξέα) στη 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη. (Εικόνα 13). Στον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών της ETD επικράτειας του HIF-1α (ETD IA, IA/SA, SE) στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, που βρίσκεται εντός της MCS.



Εικόνα 13: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pFLAG-CMV

- pCDNA3.1 (+) FLAG C

Ο παραπάνω ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας προέρχεται από την κλωνοποίηση του cDNA του επιτόπου FLAG στην 5' περιοχή της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα.



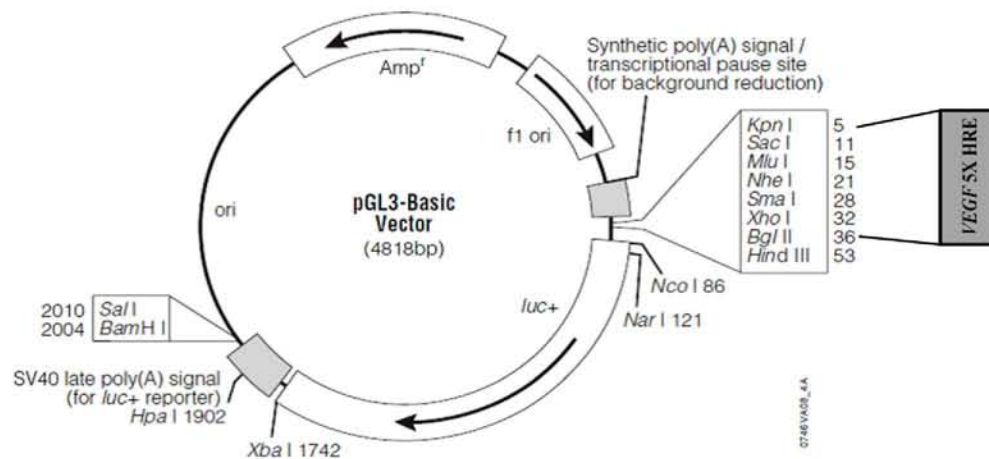
Εικόνα 14: Ο χάρτης του πλασμιδίου pCDNA3.1 FLAG C

pCDNA3.1 και αποτελεί ευγενική χορηγία του εργαστηρίου της Καθηγήτριας Frauke Melchior (Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης) (246, 247). Ο pCDNA3.1 χρησιμοποιείται για την έκφραση της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης χωρίς επίτοπο σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού

υποκινητή CMV και περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη για την επιλογή βακτηριακών κλώνων και στην νεομυκίνη ή G418 για την κατασκευή σταθερά διαμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων (Εικόνα 14). Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιήθηκε για τη κλωνοποίηση του cDNA της αγρίου τύπου μορφής της ETD επικράτειας του HIF-1α καθώς και μεταλλαγμάτων της (ETD wt, S→A, I→A) στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, που βρίσκεται εντός της MCS.

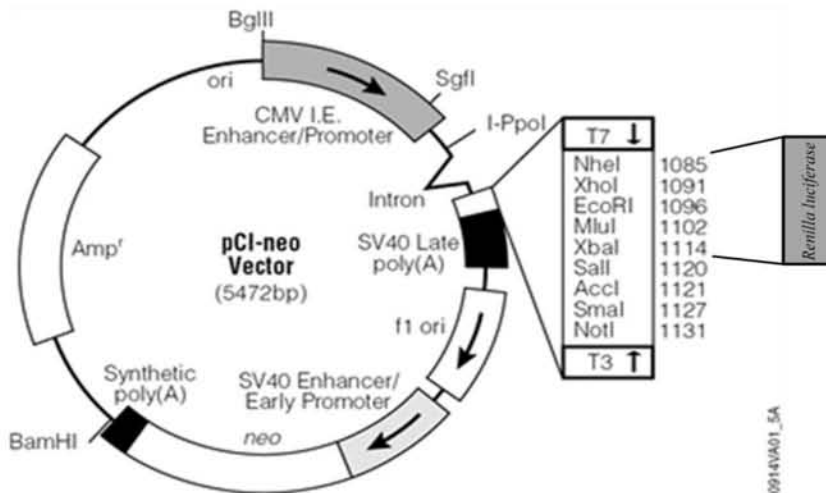
- pGL3-VEGF-5HRE και pCI-Renilla

Ο pGL3-VEGF-5HRE χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (Εικόνα 15). Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου *VEGF* στις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων *Kpn*I και *Bgl*II, οι οποίες ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (248).



Εικόνα 15: Ο χάρτης του πλασμιδίου pGL3-VEGF-5HRE

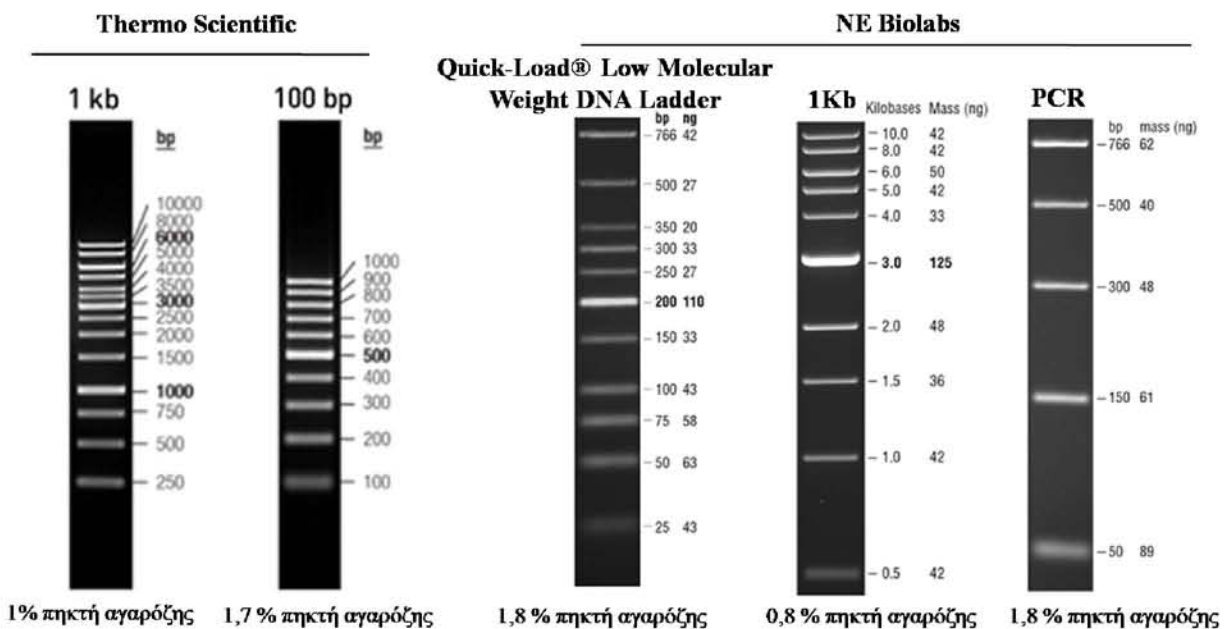
Όσον αφορά το πλασμίδιο pCI-Renilla, όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla και χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας για τον έλεγχο της διαμόλυνσης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16, το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε με κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί τη λουσιφεράσης της Renilla στις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων *Nhe*I και *Xba*I του πλασμιδιακού φορέα pCI-neo (249).



Εικόνα 16: Ο χάρτης του πλασμιδίου pCI-Renilla

2.1.4 Μάρτυρες μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA

Οι συγκεκριμένοι μάρτυρες είναι μίγμα θραυσμάτων DNA γνωστού μεγέθους και διαχωρίζονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με βάση το μέγεθός τους. Χρησιμοποιούνται για



Εικόνα 17: Μάρτυρες μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία.

τον προσδιορισμό του μεγέθους επιθυμητών τμημάτων DNA και για την κατά προσέγγιση ποσοτικοποίησή τους. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται όλοι οι μάρτυρες DNA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.1.5 Αλληλούχηση (sequencing)

Η αλληλούχηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών pFLAG-CMV-2-ETD (wt, S→A, I→A), pcDNA3.1 FLAG- ETD (wt, S→A, I→A) και pTRE Tight-FLAG ETD (wt, S→A, I→A, S→E) έγινε από την εταιρεία CEMIA DNA Sequencing.

2.1.6 Χημικά αντιδραστήρια

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

2.1.7 Υλικά μοριακής βιολογίας

Τα υλικά μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

2.1.8 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντι-HIF-1α αντίσωμα (125) από ορό κουνελιού σε αραιώση 1:1000 για όλες τις μεθόδους εκτός από τη μέθοδο in situ PLA που χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:200.
- Μονοκλωνικό αντι-ARNT αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρείας BD Biosciences σε αραιώση 1:1000 για όλες τις μεθόδους εκτός από τη μέθοδο in situ PLA που χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:80.
- Πολυκλωνικό αντι-CK1δ αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρείας Santa Cruz σε αραιώση 1:200.
- Πολυκλωνικό αντι-Iipin 1 αντίσωμα από ορό κουνελιού (102) σε αραιώση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντί-Iipin 2 αντίσωμα από ορό κουνελιού (102) σε αραιώση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντι-GFP αντίσωμα από ορό κατσίκας της εταιρείας SICGEN σε αραιώση 1:10.000
- Μονοκλωνικό αντι-actin αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρείας Cell Signalling σε αραιώση 1:1000.

- Πολυκλωνικό αντι- α/β tubulin αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρείας Cell Signalling σε αραιώση 1:10.000
- Μονοκλωνικό αντι-FLAG M5 αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρείας SIGMA-ALDRICH σε αραιώση 1:10.000.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz) ή με Cy3 ή FITC (για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντικό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Κλωνοποίηση cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Για να κλωνοποιηθεί το cDNA του επιθυμητού γονιδίου σε πλασμιδιακούς φορείς γίνεται πέψη του πλασμιδιακού DNA σε συγκεκριμένες θέσεις από κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού, στις οποίες θέσεις μπορεί να προσδεθεί ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια επεξεργασία. Το πλασμίδιο το οποίο θα προκύψει μπορεί να εισαχθεί σε βακτηριακά κύτταρα, τα οποία αναπτύσσονται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων έναντι των κυττάρων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.

2.2.1.1 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα την πέψη του DNA σε μικρότερα τμήματα.

Για την απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA για κλωνοποίηση η αντίδραση έγινε σε 50 μ l τελικού όγκου χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα πλασμίδια. Συγκεκριμένα, για την κλωνοποίηση του cDNA του αμινοτελικού τμήματος του HIF-1 α (1-347) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1, το επιθυμητό τμήμα DNA απομονώθηκε από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBS-SK(+)-HIF-1 α 1-347 μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BamHI*.

Για την κλωνοποίηση του cDNA του ETD I \rightarrow A στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV2, το ένθεμα απομονώθηκε από το πλασμίδιο pEGFP-C1-ETD I \rightarrow A (9) μετά από πέψη με το

ένζυμο περιορισμού *BamHI* (NE Biolabs) και κλωνοποιήθηκε στην ίδια θέση του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMV2. Σε κάθε άλλη περίπτωση κλωνοποίησης των διαφόρων μορφών ETD στους πλασμιδιακούς φορείς pFLAG-CMV2 και pcDNA3.1-FLAG C στη θέση πέψης του ενζύμου περιορισμού *BamHI*, τα ενθέματα προήλθαν από τα αντίστοιχα πλασμίδια pGEX-4T-1 ETD (9). Τόσο τα πλασμίδια όσο και οι κενοί πλασμιδιακοί φορείς υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BamHI* για 2 ώρες συνολικά στους 37°C. Το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 10 µg DNA από το πλασμίδιο/ή από τον κάθε κενό πλασμιδιακό φορέα
- 1x Buffer *BamHI* (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,9)
- 10 Units *BamHI*
- H₂O

2.2.1.2 Αποφωσφορλίωση του γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Μετά από 1 ώρα πέψης παρουσία κατάλληλων ενζύμων περιορισμού ακολούθησε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του κενού πλασμιδιακού φορέα για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι προστέθηκαν 1 Unit ενζύμου CIP (NE Biolabs) για 30 λεπτά στους 37°C και προσθήκη άλλου 0,5 Unit CIP για άλλα 30 λεπτά στους 37°C. Τέλος το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75°C για 10 λεπτά.

2.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Για την παρασκευή πηκτών αγαρόζης προστίθεται αγαρόζη σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και μετά από θέρμανση σχηματίζεται ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του συγκεκριμένου διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητά του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από: το μέγεθος των τμημάτων του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία η ηλεκτροφόρηση των πλασμιδίων έγινε σε 1% πηκτή αγαρόζης σε 1X ρυθμιστικού διαλύματος TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA pH 8.0) όπου μετά τη θέρμανση για την τήξη της αγαρόζης και την μείωση της θερμοκρασίας του διαλύματος προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται για να ανιχνεύονται τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή, καθώς παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και την εκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα. Το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων στην πηκτή αποτελείται από 5% γλυκερόλη, 0.42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.42% κυανούν του ξυλενίου. Ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα των δειγμάτων στα 90 V και με το τέλος της ηλεκτροφόρησης ήταν δυνατή η παρατήρηση των ζωνών DNA με τη βοήθεια λυχνίας UV (364nm).

2.2.1.4 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση των ζωνών DNA από την πηκτή έγινε με τη χρήση του κιτ QIAquick Gel Extraction της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά το κομμάτι αγαρόζης που περιείχε το προς απομόνωση DNA αφαιρέθηκε από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Το κομμάτι θερμάνθηκε με διάλυμα QG (5,5 M θειοκυανική γουανιδίνη, 20 mM Tris-HCl pH 6,6) στους 50°C για 10 λεπτά για τον αποπολυμερισμό της αγαρόζης και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Προστέθηκε στη συνέχεια ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύτηκε κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Ακολούθησε απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών με πλύση με διάλυμα PE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% αιθανόλη). Η έκλουση του δεσμευμένου στη στήλη DNA έγινε με 30 μl αποστειρωμένου απιονισμένου H₂O.

2.2.1.5 Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση λιγάσης αποσκοπεί στη σύνδεση 2 τμημάτων DNA με συμπληρωματικά 3' και 5' άκρα. Για την αντίδραση της λιγάσης, ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα σε αναλογία 1:3 (απομονωμένα και καθαρισμένα από πηκτή αγαρόζης) προστέθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με 1X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,5), 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/μl, Fermentas) και H₂O. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα ελέγχου, αντίδραση που περιείχε τον κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο

πλασμιδιακό φορέα με λιγάση, χωρίς ένθεμα έτσι ώστε να ελεγχθεί αν ο φορέας έχει αποφωσφορυλιωθεί πλήρως. Οι αντιδράσεις λιγάσης επώαστηκαν ολονύχτια στους 16°C.

2.2.2 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός *E.coli* Top10

Κατά την παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, τα βακτήρια εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις κατιόντων προκειμένου οι κυτταρικές μεμβράνες τους να γίνουν διαπερατές σε ξένο DNA.

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 ήταν η εξής: Έγινε εμβολιασμός 5 ml θρεπτικού TYM (2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄) παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής στρεπτομυκίνη, με αποικίες από αρχικές καλλιέργειες Top10 και έγινε ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα έγινε αραίωση των καλλιεργειών 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml TYM παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής στρεπτομυκίνη και ακολούθησε επώαση για άλλες 2-3 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Ακολούθησε νέα αραίωση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό και επώαση της καλλιέργειας στους 37°C μέχρι η απορρόφηση (OD) στα 600 nm να είναι OD_{600nm}=0,350-0,400, η οποία δείχνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Τότε οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 3220xg για 5 min στους 4°C, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 7,0) και επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 3220xg για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7,0). Έγινε επώαση στον πάγο για 60 λεπτά και τέλος 50 μl διαλύματος από την προηγούμενη επαναιώρηση μοιράστηκαν σε σωληνάκια και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 0,5-1 μg/ml πλασμιδίου ή 10 μl από αντίδραση λιγάσης σε κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό και αμέσως μετά προστέθηκαν 450 μl θρεπτικού LB (1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl) χωρίς αντιβιοτικά και επώαστηκαν στους 37°C για 45 λεπτά. Τέλος, 50 μl κυττάρων επιστρώθηκαν σε πιάτα LB_{amp} ή

LB_{kan} ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου. Τέλος, τα τρυβλία επωάστηκαν ολονύκτια στους 37°C.

τρυβλία LB_{amp} :1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml αμπικιλίνη

τρυβλία LB_{kan} : 1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml καναμυκίνη

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Με την τεχνική αυτή απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA από μικρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων. Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με 3 ml LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής του πλασμιδίου, προστέθηκε η αποικία που περιείχε το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια επωάστηκε για 16 ώρες στους 37°C υπο συνεχή ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε λύση των βακτηριακών κυττάρων με 300 μl διαλύματος TENS (0,1N NaCl, 0,5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7,5). Στη συνέχεια προστέθηκαν 150 μl διαλύματος 3 M οξικού νατρίου, pH 5,2, και μετά από έντονη ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 20.800xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου και ακολούθησε προσθήκη αιθανόλης τελικής συγκέντρωσης 70% και επώαση στους -20°C για 30 λεπτά για την κατακρήμνιση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στα 20.800xg για 15 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 30 μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)

Μετά από ολονύκτια επώαση καλλιεργειών μετασχηματισμένων *E.coli* Top10 σε 100 ml θρεπτικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής του πλασμιδίου στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση, φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στα 3220 g για 15 λεπτά στους 4°C. Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το κιτ της Qiagen (Qiagen Plasmid Midi kit) για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας και ακολούθησε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.5 Έλεγχος της ορθότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν

Η ορθότητα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που απομονώθηκαν με τη διαδικασία της mini ή της midi επιβεβαιώθηκε με πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Η αντίδραση πέψης έγινε σε 20 μl τελικού όγκου και περιείχε 0,5μg πλασμιδιακού DNA, 0,5 Units του αντίστοιχου ενζύμου (NE Biolabs), 1X ρυθμιστικού διαλύματος που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρία παρασκευής και νερό. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα δείγματα στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% όπως περιγράφηκε πιο πάνω.

2.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι καρκινικές κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ενώ τα πρωτογενή κύτταρα hBSM σε θρεπτικό υλικό DMEM-F12. Και στις δύο περιπτώσεις το θρεπτικό υλικό περιείχε και 10% ορό εμβρύου βωός (Fetal Bovine Serum, FBS) και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Στις σταθερά διαμολυσμένες για το πλασμίδιο pTet-Off κυτταρικές σειρές tTA-Huh7, tTA-HepG2 και tTA-H1299 προστέθηκε στο θρεπτικό καλλιέργειας και το αντιβιοτικό γενετισίνη (G418) 200 μg/ml. Το αντιβιοτικό αυτό εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα που επιβιώνουν είναι σταθερά διαμολυσμένα με το παραπάνω πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη tTA. Για την επαγωγή έκφραση των πεπτιδίων FLAG ETD, οι tTA κυτταρικές σειρές μετά τη διαμόλυνση καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό απουσία ή παρουσία του αντιβιοτικού 1 μg/ml Dox (Δοξυκυκλίνη, Doxycycline) για 48 ώρες. Όλες οι κυτταρικές σειρές επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

2.2.7 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών

Η διαδικασία για το πάγωμα των κυττάρων ήταν η εξής: τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS (Phosphate-buffered saline) (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4) και στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.2% τρυψίνης. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν με ορισμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml θρεπτικού υλικού ψύξης που περιείχε 10% DMSO

(διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε FBS. Ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C .

Για την επανέναρξη των καλλιεργειών, τα παραπάνω αποθηκευμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανσή τους στους 37°C και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 10 ml θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 200xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρες θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO_2 .

2.2.8 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων.

- Μέθοδος με τη χρήση μη λιπιδικού πολυμερούς [Πολυαιθυλεναμίνη (Polyethylenimine, PEI) και Turbofect]

Στη μέθοδο αυτή το DNA εισέρχεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω ενός ιζήματος που σχηματίζεται με το διάλυμα ενός μη λιπιδικού κατιονικού πολυμερούς που προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

Πρώτα γίνεται προετοιμασία του ιζήματος. Η γενική αναλογία DNA:μέσο διαμόλυνσης είναι 1:2 σε ένα σωληνάκι με θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά και ορό. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι όγκοι των αντιδραστηρίων (Πίνακας 1). Μετά την προσθήκη του DNA και του μέσου διαμόλυνσης ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα: 8 λεπτά στην περίπτωση της πολυαιθυλεναμίνης (PEI) και 20 λεπτά για το Turbofect. Κατόπιν στο μίγμα με πολυαιθυλεναμίνη (PEI) προστίθεται DMEM με 5% FBS ενώ στο μίγμα με το Turbofect προστίθεται DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Στη συνέχεια το μίγμα προστίθεται προσεκτικά πάνω από τα κύτταρα (που καλύπτουν περίπου το 50% της επιφάνειας του τρυβλίου) και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες παρουσία πολυαιθυλεναμίνης (PEI) και 4 ώρες παρουσία Turbofect σε 37°C , 5% CO_2 . Μετά το τέλος της επώασης αντικαθίσταται το θρεπτικό υλικό με πλήρες και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C , 5% CO_2 . Την επόμενη μέρα γίνεται κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

Πίνακας 1: Όγκοι των διαλυμάτων για τη διαμόλυνση κυττάρων σε τρυβλία ποικίλου μεγέθους

Διάμετρος Τρυβλίων	Ποσότητα πλασμιδιακού DNA	Όγκος μέσου διαμόλυνσης	Όγκος DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά	Προστιθέμενος όγκος DMEM μετά τη συμπλοκοποίηση
1,2 cm (12-well)	1 µg	2 µl	50 µl	450 µl
2,4 cm (6-well)	2 µg	4 µl	100 µl	900 µl
10 cm	10 µg	20 µl	500 µl	4.500 µl

2.2.9 Επίδραση ουσιών και επαγωγή του HIF-1α

Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α στις διάφορες κυτταρικές σειρές έγινε με επώαση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες (1% O₂) οι οποίες αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO₂ (Baker Ruskinn). Για την αναστολή της δράσης της κινάσης καζεΐνης 1 (CK1) χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της, D4476 (10 µM, Cayman Chemical) για 4 έως 48 ώρες. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν με 50-100 µM καμπερόλη. Τα παραπάνω χημικά αντιδραστήρια διαλύονται σε διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO, Applichem) και διατηρούνται σε αποθηκευμένα διαλύματα συγκέντρωσης 10 mM στους -20°C.

2.2.10 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA

Με τον όρο “RNA παρέμβαση” (RNA interference-RNAi) ή αποσιώπηση αναφερόμαστε σε έναν θεμελιώδη βιολογικό μηχανισμό κυτταρικής ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων μετα-μεταγραφικά. Η εκκίνησή του γίνεται από πρόδρομα δίκλιωνα μόρια RNA (double-stranded RNA-dsRNA) των οποίων το μέγεθος και η προέλευση ποικίλει. Στη συνέχεια συμμετέχουν

στην αναγνώριση των συμπληρωματικών τους μονόκλωνων μορίων RNA και οδηγούν είτε στη διάσπαση ή τη μεταφραστική καταστολή των τελευταίων (250).

Ρόλο κλειδί στη διαδικασία της RNAi έχουν οι μονόκλωνες αλυσίδες των «μικρών παρεμβατικών RNAs» (short-interfering RNA-siRNA) που έχουν συμπληρωματική νουκλεοτιδική αλληλουχία με τις αλυσίδες των mRNA στόχων τους. Τα siRNAs κατευθύνουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι της RNAi στο στοχευόμενο mRNA προκειμένου αυτές να αποικοδομήσουν το στοχευόμενο mRNA σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν σε λειτουργικό πολυπεπτίδιο (250).

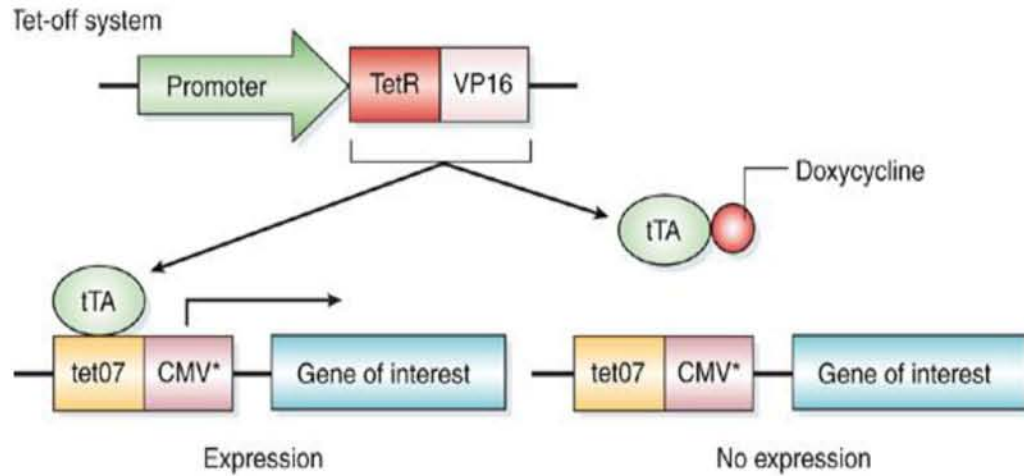
Για την αποσίωψη της έκφρασης των HIF-1α και λιπίνης-1 έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το αντίστοιχο ολιγοριβονουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εγκλεισμού σε λιποσώματα με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen). Ως αρνητικό δείγμα siRNA χρησιμοποιήθηκε το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών. Αρχικά έγινε προετοιμασία των λιποσωμάτων. Σε ένα σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκαν τα siRNA. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκε 1,5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX, ανακινήθηκε καλά και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το περιεχόμενο από τα δυο σωληνάκια ενώθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά για να δημιουργηθούν λιποσώματα που να περιέχουν το εκάστοτε siRNA. Στη συνέχεια τα λιποσώματα μαζί με 400 μl DMEM, χωρίς ορό και αντιβιοτικά, τοποθετήθηκαν πάνω από την επιφάνεια κυττάρων (40-50% επικάλυψη επιφάνειας τρυβλίου) και έγινε επώαση για 4 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Μετά το πέρας των 4 ωρών έγινε αλλαγή σε πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επώαστηκαν εκ νέου στους 37°C, 5% CO₂ για 16 ώρες οπότε την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επεξεργάστηκαν κατάλληλα ανάλογα με την μετέπειτα πειραματική διαδικασία.

2.2.11 Σύστημα επαγωγικής έκφρασης TET OFF

2.2.11.1 Αρχή λειτουργίας και πλασμιδιακοί φορείς του συστήματος TET OFF

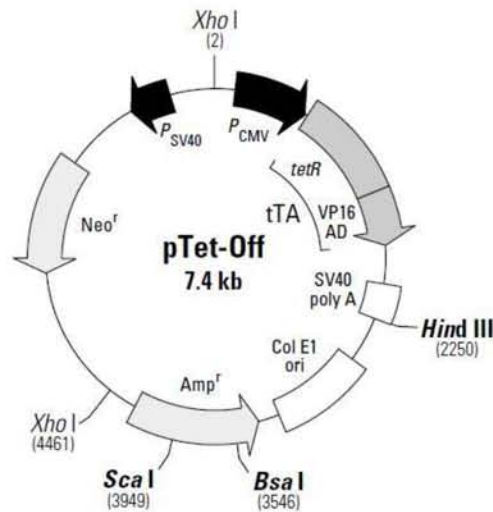
Το σύστημα επαγωγικής έκφρασης TET OFF, καθώς και οι σταθερά διαμολυσμένες TET OFF κυτταρικές σειρές, δίνουν τη δυνατότητα της ρυθμιζόμενης έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου (251). Μέσω του συγκεκριμένου συστήματος επιτυγχάνεται υψηλή και ειδική έκφραση του γονιδίου όταν το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (Tc) ή το παράγωγό του δοξκυκλίνη (Dox)

απουσιάζει από το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων, ενώ παρουσία αντιβιοτικού δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου.



Εικόνα 18: Η αρχή λειτουργίας του συστήματος επαγωγικής έκφρασης TET OFF.

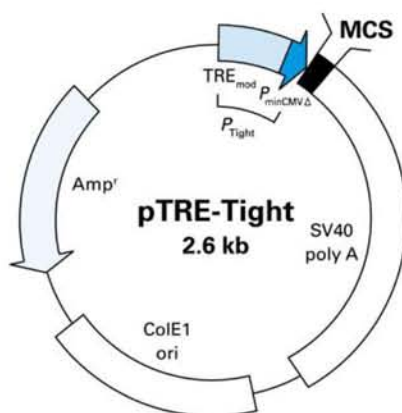
Η λειτουργία του συστήματος στηρίζεται σε δύο κύρια συστατικά: τη ρυθμιστική πρωτεΐνη tTA (tetracycline-controlled transactivator) και τα αποκρινόμενα στοιχεία στην τετρακυκλίνη ή TRE (tetracycline-response element) (Εικόνα 18). Η tTA ρυθμιστική υβριδική πρωτεΐνη έχει μέγεθος 37 kDa και αποτελείται από τα 207 πρώτα αμινοξέα της κατασταλτικής πρωτεΐνης TetR και από την ιϊκή πρωτεΐνη VP16 μήκους 127 αμινοξέων της καρβοξυτελικής περιοχής του ιού του έρπητα που περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η πρωτεΐνη TetR στα βακτήρια *E.coli* αποτρέπει την μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχονται από το οπερόνιο



Εικόνα 19: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTET-OFF

ανθεκτικότητας στην Tc όταν απουσιάζει η Tc από το θρεπτικό, μέσω πρόσδεσής της στον χειριστή tet (*tetO*). Ο ρόλος της ιικής πρωτεΐνης VP16 είναι να μετατρέπει την πρωτεΐνη TetR από μεταγραφικό καταστολέα σε μεταγραφικό ενεργοποιητή. Έτσι, λοιπόν, η παραγόμενη υβριδική πρωτεΐνη είναι γνωστή ως συνενεργοποιητής που ελέγχεται από την Tc ή αλλιώς tTA (Εικόνα 18). Η πρωτεΐνη tTA κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pTet-OFF (Clontech), το οποίο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη για την επιλογή μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων και γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη για την επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων κυττάρων θηλαστικών (Εικόνα 19).

Το δεύτερο σημαντικό λειτουργικό συστατικό είναι τα στοιχεία TRE τα οποία αποτελούν επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 42 bp και τα οποία κωδικοποιούνται από το πλασμίδιο pTRE-Tight. Ο πλασμιδιακός φορέας pTRE Tight δίνει τη δυνατότητα έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που βρίσκεται στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS), στην οποία μπορεί να κλωνοποιηθεί το υπό μελέτη γονίδιο. Πριν από τον υποκινητή CMV, ο πλασμιδιακός φορέας φέρει την αλληλουχία για τα αποκρινόμενα στοιχεία στην τετρακυκλική (TRE), η οποία αποτελείται από 7 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 32 ζευγών βάσεων, στις οποίες περιέχεται η αλληλουχία του χειριστή tetO. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη για την επιλογή βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTRE-Tight

Έτσι, λοιπόν, απουσία του αντιβιοτικού Tc ή Dox από το θρεπτικό υλικό ο ενεργοποιητής tTA προσδέεται στα TRE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου, το οποίο έχει προηγουμένως κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pTRE-Tight. Αντίθετα, όταν υπάρχει το

αντιβιοτικό Tc ή Dox στο θρεπτικό μέσο προσδένεται στον tTA, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η δέσμευσή του στα στοιχεία TRE και να καταστέλλεται η μεταγραφή του κλωνοποιημένου γονιδίου.

Το αντιβιοτικό καταστολής της έκφρασης του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η Δοξυκυκλίνη (Dox) καθώς πλεονεκτεί έναντι της Τετρακυκλίνης (Tc). Συγκεκριμένα, απαιτείται πολύ μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Dox (0,01-1 μg/ml) συγκριτικά με την Tc (1-2 μg/ml). Επιπλέον, ο χρόνος ημιζωής της Dox είναι 24 ώρες ενώ της Tc είναι 12 ώρες. Σε κάθε περίπτωση οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται δεν είναι κυτταροτοξικές.

Στη παρούσα εργασία προστέθηκε 1 μg/ml Dox στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας για να καταστείλει την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου. Μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pTRE Tight-FLAG ETD, τα κύτταρα καλλιεργούνταν απουσία ή παρουσία 1 μg/ml Dox για 48 ώρες στους 37°C, 5% CO₂, ώστε να επαχθεί η έκφραση μόνο στα δείγματα όπου απουσίαζε το αντιβιοτικό από το θρεπτικό μέσο.

2.2.11.2 Διαδικασία κλωνοποίησης στον πλασμιδιακό φορέα pTRE-Tight

Για τη λειτουργία του συστήματος επαγωγίμης έκφρασης TET OFF έγινε κλωνοποίηση του cDNA της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP ή του cDNA των πεπτιδίων FLAG ETD (wt, SA, IA SE) στον πλασμιδιακό φορέα pTRE Tight ως εξής:

- pTRE Tight-GFP: Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pBenvy-GU-GFP, για την απομόνωση του ενθέματος (GFP), το οποίο μαζί με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pTRE-Tight υπέστησαν ταυτόχρονη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού KpnI και BamHI.
- pTRE Tight-FLAG ETD (wt, S→A, I→A, S→E): Στην περίπτωση αυτή η διαδικασία ήταν ως εξής: Απομόνωση του τμήματος FLAG ETD από τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pFLAG-CMV2-ETD (wt, S→A, I→A, S→E), μετά από πέψη 2μg του κάθε πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού SacI για 1,5 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε επώαση στους 12°C για 20 λεπτά παρουσία 10 Units T4 DNA Polymerase και περίσσειας 100 μM dNTPs ώστε να δημιουργηθούν αμβλέα άκρα, καθώς στις συνθήκες αυτές η T4 πολυμεράση δρα ως 3'-5' εξωνουκλέαση.

Παράλληλα ο άδειος πλασμιδιακός φορέας pTRE Tight (5 μ g) υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού PvuII, το οποίο δημιουργεί και αυτό αμβλέα άκρα, για 2 ώρες συνολικά στους 37°C. Η αντίδραση διεκόπη με επώαση στους 75°C για 10 λεπτά.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και η διαδικασία που ακολούθησε μετά την αντίδραση λιγάσης είναι όμοιες όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 2.2.1.

2.2.12 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μετά από πλύση των κυττάρων με κρύο 1X PBS, ακολούθησε απόξυσή τους από το τρυβλίο σε 150 μ l διαλύματος λύσης (25 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PMSF). Ο αναστολέας PMSF (αναστολέας πρωτεασών) προστέθηκε στο διάλυμα λύσης πριν τη χρήση. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για 10 λεπτά στους 4°C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και ακολούθησε θέρμανσή τους στους 95°C για 5 λεπτά.

2.2.13 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford, η οποία στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου της πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Μετά την ανάμειξη του αντιδραστηρίου, που περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad), με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστέθηκε το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

2.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (Sodium dodecyl sulfate, SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές και τα σύμπλοκα που σχηματίζονται έχουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα πηκτή διαχωρισμού 10% w/v (10% w/v separating gel): 10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% w/v υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% v/v TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% w/v υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED v/v σε H₂O. Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή. Η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1% SDS). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120 V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

2.2.15 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτή αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8,5 (125 mM Tris, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας βορικού οξέως) για 10 λεπτά και μετά στην συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) των πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη συσκευή τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς).

Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη η μεταφορά έγινε στα 10 V για 75 min.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S (0.5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ), και ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-0,1% Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα, για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20. Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολούθησαν 4 ξεπλύματα των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20. Ακολούθως έγινε επώαση με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδέεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 4 ξεπλύματα των 5 λεπτών με PBS-0,1% Tween 20.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 30 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, αντίδραση μέσω της οποίας εκπέμπεται φως. Η λήψη εικόνων έγινε στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος Alliance Software (έκδοση 16.06).

PBS Phosphate Buffer Saline: 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4

PBS-Tween 20: 0.1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

2.2.16 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού

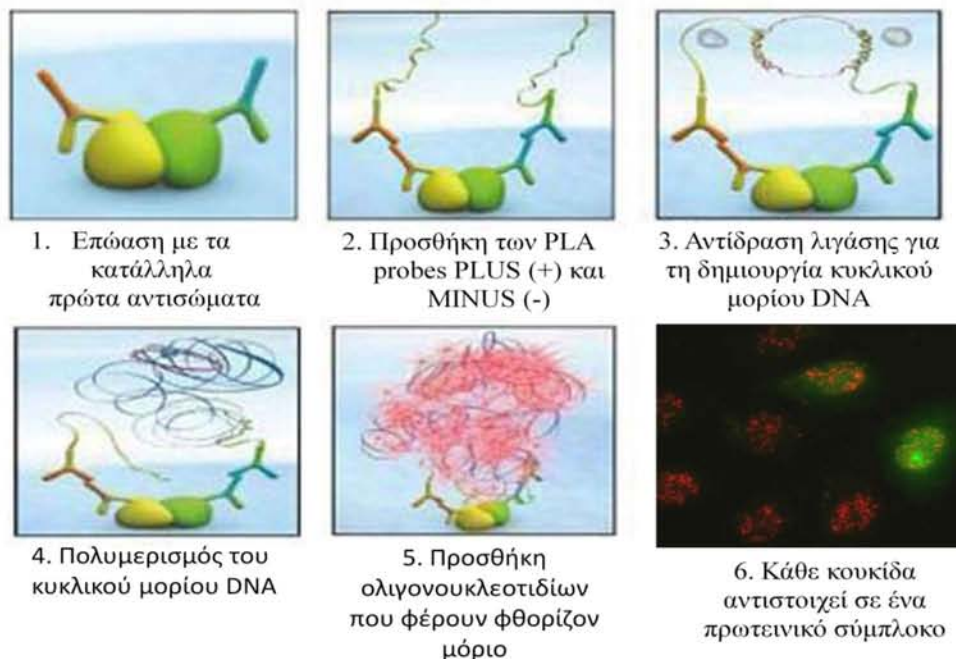
Με τη χρήση τεχνικών όπως ο φθορισμός και ο ανοσοφθορισμός είναι δυνατός ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Στην πρώτη περίπτωση είναι εφικτή η παρατήρηση της υπό μελέτης πρωτεΐνης σε σύζευξη με φθορίζοντα επίτοπο (όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, GFP) μετά από διαμόλυνση των κυττάρων και δίνει πληροφορίες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Στη δεύτερη περίπτωση είναι δυνατή η παρατήρηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι συζευγμένα με μια φθορίζουσα ουσία (άμεσος ανοσοφθορισμός) είτε να αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει τη φθορίζουσα ομάδα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Σε κάθε περίπτωση ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση του HIF-1α και των πεπτιδίων FLAG-ETD. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm σε πληρότητα περίπου 70%. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με 1X PBS και μονιμοποιήθηκαν με 1X PBS/3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 1X PBS και επώαση με διάλυμα 1X PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 1X PBS και στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα, όπου στην περίπτωση του HIF-1α η επώαση ήταν για 16 ώρες στους 4°C, ενώ στην περίπτωση επώασης έναντι του επιτόπου FLAG η επώαση ήταν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα αντισώματα προστέθηκαν σε διάλυμα 1X PBS-0.1% Tween/1% BSA. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 4 διαδοχικά πλυσίματα με 1X PBS 0.1% Tween. Ακολούθησε επώαση με το 2^ο αντίσωμα (έναντι της IgG κουνελιού συζευγμένο με FITC σε αραιώση 1:500 για τον HIF-1α, έναντι της IgG ποντικού συζευγμένο με Cy3 σε αραιώση 1:500 για τον επίτοπο FLAG) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Στην περίπτωση ανίχνευσης των λιποσταγονιδίων, πριν τις τελευταίες

πλύσεις, τα δείγματα επώαστηκαν με τη χρωστική Nile Red (Sigma: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε PBS) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν οι πλύσεις με PBS και H_2O . Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 5 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories ή Mowiol) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη), η οποία έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο DNA οπότε έτσι διακρίνονται οι πυρήνες. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan χρησιμοποιώντας τον αισθητήρα AxioCam MRm CCD σε μεγεθυντικό φακό 40X με φίλτρα για DAPI, FITC και Cy3.

2.2.17 *in situ* Proximity Ligation Assay (*in situ* PLA)

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό και τη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Γενικά, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η εξής: Δύο πρώτα αντισώματα από ορούς διαφορετικών ειδών (πχ το ένα από ορό κουνελιού και το άλλο από ορό ποντικού) αναγνωρίζουν τους αντίστοιχους επιτόπους-στόχους τους (Εικόνα 21.1).



Εικόνα 21. Τα στάδια της μεθόδου *in situ* PLA .

Στη συνέχεια δεύτερα αντισώματα (ή PLA probes) ειδικά για το κάθε είδος, που φέρουν το καθένα μια μοναδική αλληλουχία DNA, προσδένονται στα αντίστοιχα πρώτα αντισώματα

(Εικόνα 21.2). Όταν οι επίτοποι, τους οποίους αναγνωρίζουν τα πρώτα αντισώματα, βρεθούν σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους (<40 nm) τότε οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA των PLA probes προσδένονται μέσω αντίδρασης λιγάσης και σχηματίζεται ένα κυκλικό μόριο DNA (Εικόνα 21.3). Το κυκλικό αυτό μόριο DNA, ενισχύεται με τη δράση πολυμεράσης εκατοντάδες φορές μόνο στον έναν από τους δύο PLA probes, τον PLUS(+) PLA probe, ενώ ο MINUS(-) PLA probe απελευθερώνεται (Εικόνα 21.4). Μετά από προσθήκη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων με φθορίζουσα ουσία που υβριδοποιούνται με τα αντίγραφα του κυκλικού μορίου DNA (Εικόνα 21.5), το τελικό αποτέλεσμα είναι τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα να οδηγούν στο σχηματισμό φθορίζουσων κουκίδων (Εικόνα 21.6) (253).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT σε συνθήκες που αναστέλλουν ή που επάγουν το σχηματισμό τους χρησιμοποιώντας το kit Duolink II Fluorescence Kit (Olink Bioscience). Κύτταρα HeLa επιστρώθηκαν στις γυάλινες πλάκες PLA (8 πηγαδάκια) ή σε καλυπτρίδες. Μετά από κατάλληλη επώαση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1X PBS και μονιμοποιήθηκαν με 1X PBS/3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 1X PBS και κατεργασία με διάλυμα 1X PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C, προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Στη συνέχεια, έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης του kit για 1 ώρα στους 37°C. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια προέρχονται από το παραπάνω kit. Ακολούθησε συνεπώαση των κυττάρων με τα αντισώματα αντι-HIF-1α και αντι-ARNT (σε αραιώσεις 1:200 και 1:80, αντίστοιχα) σε ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρείας για 16 ώρες στους 4°C. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου και των αντισωμάτων, στα οποία τα κύτταρα επώαστηκαν με τα πρώτα αντισώματα αντι-HIF-1α ή αντι-ARNT ή απουσία πρώτων αντισωμάτων. Την επόμενη ημέρα, ακολούθησε αφαίρεση των πρώτων αντισωμάτων με 4 πλύσεις των 5 λεπτών με το Buffer A. Έπειτα όλα τα δείγματα επώαστηκαν με το συνδυασμό των PLA probes r^+m^- για 1 ώρα στους 37°C, αφού προηγήθηκε επώαση των PLA probes με ρυθμιστικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ο PLA probe r^+ (r: rabbit, +: πάνω σε αυτόν θα γίνει ο πολυμερισμός του κυκλικού μορίου DNA) αναγνωρίζει το αντι-HIF-1α αντίσωμα από ορό κουνελιού και ο m^- (m: mouse, -: δεν γίνεται ο πολυμερισμός) αναγνωρίζει το αντι-ARNT αντίσωμα από ορό ποντικού (Εικόνα 20.3). Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα A και αντίδραση

λιγάνης με επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 min με διάλυμα Α και αντίδραση πολυμερισμού για 100 λεπτά στους 37°C με ταυτόχρονο υβριδισμό των σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων με τη φθορίζουσα ουσία Cy3. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα Β και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι πλάκες PLA ή οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε 5 ml υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories) το οποίο περιείχε και την ουσία DAPI για τη παρατήρηση των πυρήνων των κυττάρων. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan χρησιμοποιώντας τον αισθητήρα AxioCam MRm CCD με μεγεθυντικό φακό 40X με φίλτρα για DAPI και Cy3, όπου το κάθε σύμπλοκο HIF-1α/ARNT φαίνεται ως μια κόκκινη κουκίδα.

Για των ποσοτικοποίηση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο ITCN του λογισμικού ανάλυσης εικόνων ImageJ (254). Για τη κάθε συνθήκη μετρήθηκε ο αριθμός κουκίδων σε 50 κύτταρα.

2.2.18 Προσδιορισμός της επιβίωσης-πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS

Για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTS που στηρίζεται στην αναγωγή της ένωσης του τετραζολίου MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium σε ένα έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης μέσω του NADPH ή NADH, που παράγονται από αφυδρογονάσεις σε μεταβολικώς ενεργά κύτταρα. Η φορμαζάνη είναι διαλυτή στο θρεπτικό υλικό οπότε η ποσότητά της μετράται με οπτική απορρόφηση στα 490 nm και είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια (255).

Έτσι, επιστρώθηκαν κύτταρα HeLa ή hBSM (1.000 ή 2.000 κύτταρα/πηγαδάκι, αντίστοιχα) σε 3 πηγαδάκια ανά πείραμα σε πλάκα 96 θέσεων και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476 10 μM σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες (1% O₂) για άλλες 24 ώρες (HeLa) ή 48 ώρες (hBSM). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με DMSO, που είναι ο διαλύτης του χημικού αναστολέα D4476. Στο τέλος του χρόνου επώασης προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό (100 μl) 20 μl από το αντιδραστήριο MTS από το "CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit" (Promega), το οποίο περιέχει εκτός της ένωσης MTS και

τον παράγοντα σύζευξης ηλεκτρονίων φαιναζίνη (PES, phenazine ethosulfate) για τη δημιουργία σταθερού προϊόντος, και ακολούθησε επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C, 5% CO₂. Τέλος, η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 490 nm σε ειδικό φωτόμετρο. Οι τιμές των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με τις τιμές των απορροφήσεων του θρεπτικού υλικού παρουσία DMSO ή D4476 που τοποθετήθηκαν εξαρχής σε πηγαδάκια χωρίς κύτταρα. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές οπότε προέκυψαν 9 τιμές για κάθε συνθήκη.

2.2.19 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg²⁺. Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF-5HRE και σαν πλασμίδιο μάρτυρα για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το μη λιπιδικό πολυμερές PEI. Τα κύτταρα λύθηκαν με 100-150 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay system kit της Promega) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολούθησε στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20.000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα, 10 μl από το διάλυμα stop & glo (του luciferase assay reagent, Promega) προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παράχθηκε μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glo σταματάει την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και ταυτόχρονα περιέχει το υπόστρωμα για τη δράση της λουσιφεράσης Renilla.

2.2.20 Δοκιμασία επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP)

Η δοκιμασία επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP) χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη της κινητικότητας πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα. Κατά την τεχνική FRAP ορίζεται μια συγκεκριμένη περιοχή (Region Of Interest-ROI) στο εσωτερικό ενός κυττάρου το οποίο φέρει σημασμένη με φθοριόχρωμα ή με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP την προς μελέτη πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση οι προς μελέτη πρωτεΐνες ήταν συζευγμένες με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP) και ακτινοβολείται από δέσμη laser υψηλής έντασης και συγκεκριμένης διαμέτρου, με αποτέλεσμα τη φωτολεύκανση των μορίων του φθοριοχρώματος ή της GFP της ROI. Ακολούθως, καταγράφεται η αποκατάσταση του φθορισμού στην περιοχή της φωτολεύκανσης σε σχέση με το χρόνο που οφείλεται στη διάχυση πρωτεϊνικών μορίων από γειτονικές περιοχές (256).

Τα πειράματα FRAP πραγματοποιήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 με 63X1.4 ανοίγματος φακού στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών με υπεύθυνη την καθηγήτρια κα. Ζωή Λυγερού. Κύτταρα HeLa επιστρώθηκαν σε 35-mm γυάλινα Ibidi μ-τρυβλία, σε θρεπτικό χωρίς τη χρωστική phenol-red, και διαμολύνθηκαν με διάφορες μορφές του HIF-1α συζευγμένων με τη πρωτεΐνη GFP, η οποία διεγείρεται σε 488 nm Argon laser. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της FRAP τα κύτταρα διατηρούνταν σε επωαστικό θάλαμο 37°C, 5% CO₂. Ως ROI1 οριοθετήθηκε μια κυκλική περιοχή διαμέτρου 2 μm στον πυρήνα των κυττάρων και στη συνέχεια λήφθηκαν 50 απεικονίσεις πριν από τη φωτολεύκανση, ακολούθησε φωτολεύκανση των 0,066 sec χρησιμοποιώντας δέσμη laser των 476 nm και 488 nm και 300 απεικονίσεις μετά από αυτή. Μετά το πέρας της δοκιμασίας FRAP λαμβάνονται δύο ακόμα ROIs: ROI2: το σύνολο της περιοχής όπου κατανέμεται η προς μελέτη πρωτεΐνη όπου στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν ολόκληρος ο πυρήνας και ROI3: μια περιοχή εκτός του κυττάρου. Οι απεικονίσεις πριν και μετά τη φωτολεύκανση καταγράφησαν με τη χρήση της 488 nm γραμμής του Argon laser, ενώ η φωτολεύκανση προκλήθηκε με το 100% της έντασης και των γραμμών 476 nm και 488 nm του ίδιου laser, και δύο διαδοχικά χτυπήματα ώστε να είναι δυνατή η μέγιστη απόδοση φωτολεύκανσης. Η καταγραφή των εικόνων πραγματοποιήθηκε με καταδυτικό αντικειμενικό φακό λαδιού 63x1.4, μεγέθυνση σάρωσης 10X, και μέγιστη διάμετρο pinhole.

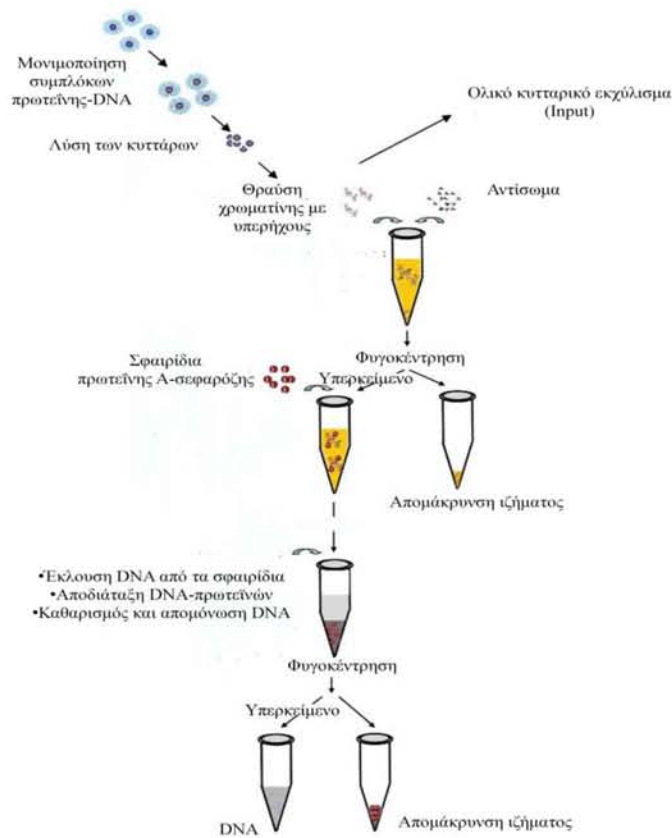
Η ποσοτική ανάλυση των καμπυλών που προέκυψαν από τη δοκιμασία FRAP έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα easyFRAP (257).

2.2.21 Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (CHIP)

Η μέθοδος CHIP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μιας επιθυμητής πρωτεΐνης με συγκεκριμένες περιοχές του DNA, όπως για παράδειγμα η δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή γονιδίων-στόχων ή σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Συνοπτικά η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αρχική μονιμοποίηση των συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA, θραύση της χρωματίνης σε μικρότερα τμήματα (~500 bp) με υπερήχους, ανοσοκατακρήμνιση των συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα για την επιθυμητή πρωτεΐνη, έκλυση του DNA από τα σφαιρίδια και απομόνωσή του μετά από αποδιάταξη των συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών (Εικόνα 22). Το DNA αυτό στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με PCR ή real time-PCR (258).

Κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία έγινε επίστρωση κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm, ώστε την επόμενη ημέρα η πληρότητά τους να είναι 70-80%. Ακολούθησε επώαση για 8 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂) απουσία (DMSO) ή παρουσία του αναστολέα D4476 10 μM. Μετά το τέλος της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τρυψινοποίηση, μετρήθηκαν και έγινε αραίωση με κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού ώστε να αντιστοιχούν 2x10⁶ κύτταρα/ml. Ακολούθησε μονιμοποίηση, με προσθήκη του 1/10 του συνολικού όγκου του παραπάνω κυτταροδιαλύματος, με διάλυμα A (11% HCHO, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 20mM HEPES pH 8.0) υπό συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 1,25M γλυκίνης για 5 λεπτά σε RT. Μετά από μια πλύση με κρύο PBS και φυγοκέντρηση στις 500g για 10 λεπτά στους 4°C, ακολούθησε επώαση με το διάλυμα B (0,25% Triton-X100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8,0) υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση στις 500g για 10 λεπτά στους 4°C, το ίζημα ξεπλένεται με 1 ml διαλύματος C (0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8,0). Μετά από ίδια φυγοκέντρηση το ίζημα που αντιστοιχεί στην χρωματίνη με τις δεσμευμένες σ' αυτή πρωτεΐνες, επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος CHIP (0,15% SDS, 1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8,0) και ακολούθησε θραύση της χρωματίνης με υπερήχους (2x10 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση παύση 30 δευτερόλεπτα, 9x10 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 50 δευτερολέπτων) με ένταση 40% στη συσκευή Vibra cell VC40. Στη συνέχεια, μετά από φυγοκέντρηση 14.000g για 5 λεπτά στους 4°C και επαναιώρηση σε διάλυμα CHIP, 30 μl

χρησιμοποιήθηκαν ως δείγμα που αντιστοιχεί στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Input) και το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμιση (CHIP) για κάθε συνθήκη.



Εικόνα 22: Η δοκιμασία ανοσοκατακρήμισης χροματίνης (CHIP).

Στα δείγματα CHIP προστέθηκε DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA) και 0,1% BSA και χωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη. Στο ένα προστέθηκε 1 μg πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α και στο άλλο που θα αποτελούσε τον αρνητικό μάρτυρα (background) κάθε δείγματος προστέθηκε αντίσωμα IgG. Παράλληλα, έγινε επώαση σφαιριδίων πρωτεΐνης A/G-σεφαροζης (SIGMA), σε αναλογία 3:1, με ssDNA και 0,1% BSA για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων δέσμευσης στο αντίσωμα. Τα παραπάνω επώαστηκαν για 2 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση των σφαιριδίων με τα δείγματα CHIP στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση.

Αφού ολοκληρώθηκε η δέσμευση των συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA στα σφαιρίδια μέσω του αντιστοιχου αντισώματος ακολούθησαν πλύσεις, αρχικά με το διάλυμα 1 (0.1% SDS, 0.1% Deoxycholate (DOC), 1% Triton-X100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8.0) και στη συνέχεια με το διάλυμα 2 (1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8.0). Ακολούθησε έκλυση του DNA από τα σφαιρίδια με το διάλυμα έκλυσης (1%

SDS, 0.1 M NaHCO₃) για 20 λεπτά σε RT. Μετά από φυγοκέντρηση 14.000g για 1 λεπτό συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA. Η αποδιάταξη των συμπλόκων αυτών έγινε με επώαση στους 65°C για 4-5 ώρες παρουσία 0,2 M NaCl. Για το διαχωρισμό του DNA από τα υπόλοιπα μακρομόρια έγιναν πλύσεις αρχικά με διάλυμα φαινόλης/χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης και στη συνέχεια με διάλυμα χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με 70% αιθανόλη μετά από 20 λεπτά επώασης στους -20 °C και φυγοκέντρηση 14.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Τέλος, το DNA επαναδιαλύθηκε σε νερό και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με real-time PCR.

2.2.22 Ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *LPINI* με 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 παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Η κλασική PCR περιλαμβάνει 3 στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA – στόχου σε υψηλή θερμοκρασία όπου μπορεί να δράσει η πολυμεράση (Denaturation)
2. Σύνδεση των εκκινητών στα άκρα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA (Annealing)
3. Επιμήκυνση των εκκινητών και δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων με τη δράση της πολυμεράσης (Extension).

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό του υποκινητή του γονιδίου *LPINI*, και συγκεκριμένα της περιοχής -2916-2686 που περιέχει το HRE-στόχο του HIF-1, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το DNA ολικών δειγμάτων (Input) κυττάρων HeLa που είχαν επεξεργαστεί όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα (2.2.21). Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (94):

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
hLPIN1CHIPF1	tgggatcctttctgcccggg
hLPIN1CHIPR1	cactgctgagcccagctggt

Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

100 ng DNA

1X Thermopol Buffer

1 unit Taq πολυμεράση

50 pmoles/μl πρόσθιου εκκινητή

50 pmoles/μl οπίσθιου εκκινητή

10 mM dNTPs mix

H₂O έως ο τελικός όγκος να είναι 50 μl.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mastercycler gradient (Eppendorf) και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Αρχική αποδιάταξη → 94°C για 4 min

1. 94°C για 1 min → αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
2. 60°C για 1 min → υβριδοποίηση εκκινητών
3. 72°C για 30 sec → επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 30

Τελική επιμήκυνση → 72°C για 4 min

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (T_m) Oligo Calculator. Στο τέλος 5 μl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.

2.2.23 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) βασίζεται στην κλασική PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός επιθυμητού τμήματος DNA. Κατά την real-time PCR η ποσότητα του προϊόντος ανιχνεύεται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται σε κάθε κύκλο, δηλαδή σε πραγματικό

χρόνο, και όχι στο τέλος της όπως στην κλασική PCR. Η ανίχνευση των προϊόντων μπορεί να γίνει με μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (πχ Sybr Green I) που ενσωματώνονται στη διπλή έλικα του DNA (μη ειδική σήμανση) ή με φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια, που επιτρέπουν μόνο την ανίχνευση του συμπληρωματικού DNA στόχου (ειδική σήμανση). Η ποσότητα του φθορίζοντος σήματος είναι ανάλογη με τη ποσότητα του γονιδιακού προϊόντος που έχει πολλαπλασιαστεί με την αντίδραση.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, η real-time PCR πραγματοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της περιοχής -2916-2686 που περιέχει το HRE-στόχο του HIF-1, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το DNA των παραπάνω δειγμάτων CHIP. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφηκαν στην προηγούμενη υποενότητα (2.2.22). Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή Mini Opticon System της εταιρίας BioRad.

Αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Αυτό περιλαμβάνει το ζεύγος των δύο εκκινητών, το SYBR Green Master Mix (Kapa Biosystems) το οποίο περιέχει: τη DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green και 2,5 mM MgCl₂ και H₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0,5 pmol/μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά πλαστικά 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 15 μl από το master mix και 5μl δείγματος DNA. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται δύο φορές. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου, δείγμα στο οποίο αντί DNA προστίθεται H₂O (NTC). Συνολικά πραγματοποιούνται 40 κύκλοι ενίσχυσης.

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 2 min → 50°C → θερμική ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης
- 10 min → 94°C → αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
 1. 15 sec → 95°C → αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
 2. 1 min → 60°C → υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 40

- 2 sec → 60°C → τελική επιμήκυνση

2.2.24 Ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων CHIP-real time PCR

Η ποσοτικοποίηση του προϊόντος της real time PCR για το τμήμα του υποκινητή του γονιδίου *LPIN1*, έγινε με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως φορές εμπλουτισμού (fold enrichment) σύμφωνα με τον τύπο $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Ως Ct ορίζεται ο αριθμός των κύκλων κατά τον οποίο υπάρχει επαρκής ποσότητα προϊόντος, ώστε το σήμα φθορισμού να είναι ανιχνεύσιμο και να βρίσκεται στη γραμμική φάση της καμπύλης ενίσχυσης. Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και σ' αυτές στηρίζεται ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του mRNA. Τα επίπεδα Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα προς την ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα και συγκεκριμένα όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου τόσο πιο χαμηλή θα είναι η τιμή του Ct.

Ως $\Delta\Delta Ct$ ορίζεται η διαφορά των $\Delta Ct1$ και $\Delta Ct2$ όπου:

Ως $\Delta Ct1$ ορίζεται η διαφορά του Ct των δειγμάτων CHIP και του Ct των αντίστοιχων ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (Input). Οι τιμές των δειγμάτων Input αντιστοιχούν στην ποσότητα χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα CHIP. Ως $\Delta Ct2$ ορίζεται η διαφορά του Ct των δειγμάτων IgG και του Ct των αντίστοιχων δειγμάτων Input.

Οι φορές εμπλουτισμού (fold enrichment) που προκύπτουν από τον τύπο $2^{-\Delta\Delta Ct}$ εκφράζουν τις φορές αύξησης του ειδικού σήματος για το επιθυμητό γονίδιο σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (259).

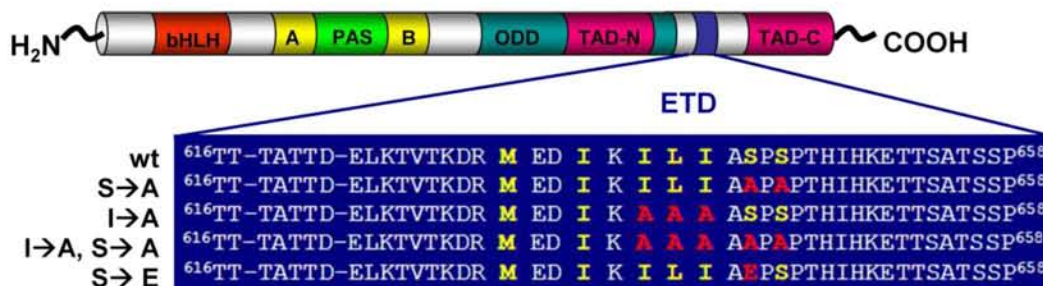
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ETD ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΙΑΣ

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ETD ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1

Για να διερευνηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της επικράτειας ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α καθώς και στη μεταβολική λειτουργία του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μορφές της επικράτειας ETD (Εικόνα 23):

- η μορφή ETD wt η οποία αποτελείται από 42 αμινοξέα (616-658) και περιέχει το NES και τις δύο θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Ser641/643),



Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του HIF-1α και της αμινοξικής αλληλουχίας της αγρίου τύπου (wt) επικράτειας ETD και των μεταλλαγμένων μορφών της. Τα αμινοξικά κατάλοιπα με κίτρινο χρώμα υποδηλώνουν την περιοχή NES και με κόκκινο χρώμα τα μεταλλαγμένα κατάλοιπα.

- η μορφή ETD S→A στην οποία οι δύο σερίνες 641 και 643 έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνη οπότε δεν μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τις ERK1/2,

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το πεπτίδιο ETD wt προκάλεσε μερικό εντοπισμό του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και μείωση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα σε συνθήκες

υποξίας (1% O₂), ενώ αντίθετα το πεπτιδίο ETD S→A δεν είχε καμιά επίδραση στις ίδιες συνθήκες (9).

- η μορφή ETD I→A στην οποία έχουν μεταλλαχθεί τρία κατάλοιπα στην περιοχή NES, οπότε δεν μπορεί να εξέλθει από τον πυρήνα, και περιέχει τις δύο θέσεις φωσφορυλίωσης (Ser641/643) από τις ERK1/2,
- η μορφή ETD I→A/S→A στο οποίο είναι ταυτόχρονα μεταλλαγμένο το NES (I→A) και οι δύο σερίνες 641 και 643 σε αλανίνη, οπότε δεν μπορούν να εξέλθει από τον πυρήνα ούτε να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες ERK1/2,
- και η φωσφομιμητική μορφή ETD S→E, στην οποία η σερίνη 641 έχει αντικατασταθεί από Γλουταμινικό οξύ (E), το οποίο μιμείται το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο λόγω αρνητικού φορτίου.

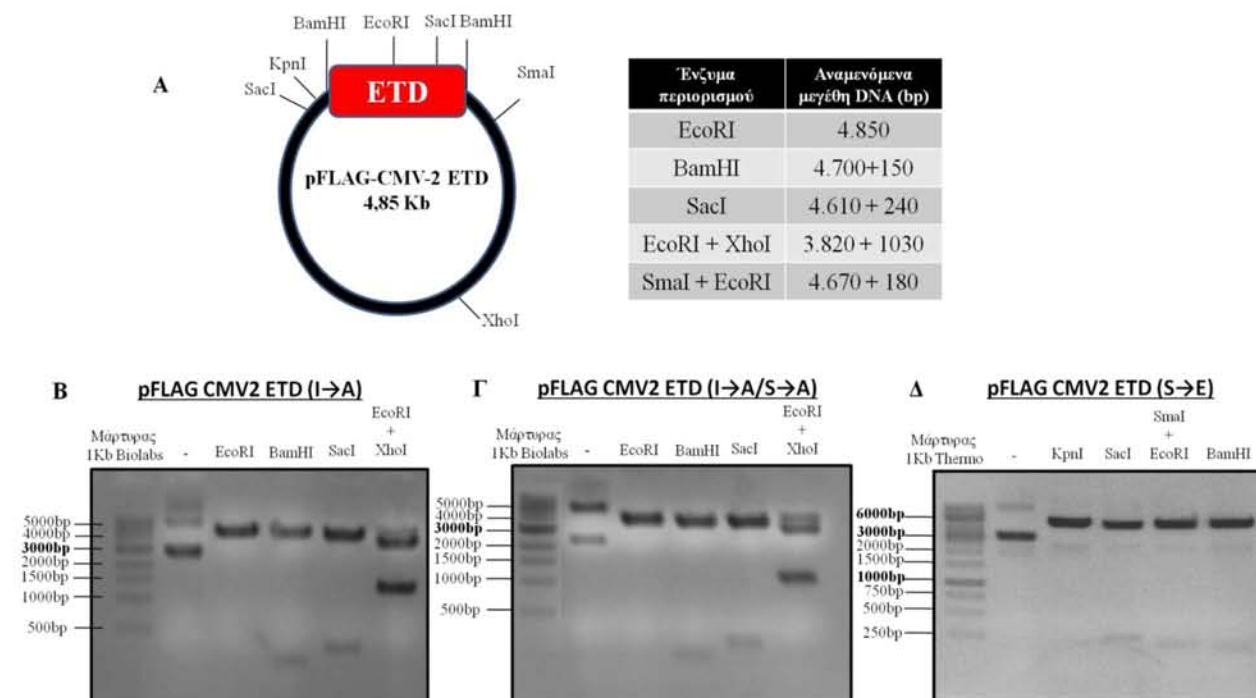
3.1.1 Κλωνοποίηση των cDNA των επικρατειών ETD σε πλασμιδιακούς φορείς κατάλληλους για τη διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών

Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία τα cDNA των ETD wt και S→A είχαν κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης στα θηλαστικά pFLAG-CMV-2, που φέρει τον επίτοπο FLAG (9). Για να συνεχιστεί η μελέτη αυτή, στη παρούσα εργασία τα cDNA των υπόλοιπων μορφών ETD κλωνοποιήθηκαν στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα. Τα πλεονεκτήματα του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMV-2 είναι η έκφραση του επιτόπου FLAG στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης, γεγονός που επιτρέπει τον εντοπισμό των χημικών πρωτεϊνών με κατάλληλο αντίσωμα για τον επίτοπο FLAG. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος επίτοπος έχει πολύ μικρό μέγεθος (8 αμινοξέα) και έτσι δεν επηρεάζεται η τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών.

Τα cDNA των ETD I→A, I→A/S→A και S→E του HIF-1α κλωνοποιήθηκαν ως ενθέματα στη θέση BamHI του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMV-2. Το κάθε νέο πλασμίδιο (pFLAG-CMV-2-ETD I→A, I→A/S→A και S→E) ελέγχθηκε με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ορθότητα της κατασκευής με βάση τον χάρτη του κάθε πλασμιδίου (Εικόνα 24A). Τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα της Εικόνας 24A.

Πιο αναλυτικά, για κάθε πλασμίδιο επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του ενθέματος και του σωστού προσανατολισμού μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και SacI, αντίστοιχα.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και KpnI που αναγνωρίζουν μία θέση πέψης εσωτερικά του ενθέματος καθώς και ο συνδυασμός άλλων ενζύμων περιορισμού όπως ECoRI+XhoI και SmaI + ECoRI που επιβεβαιώνουν την ορθότητα της κατασκευής (Εικόνα 24B, Γ, Δ).

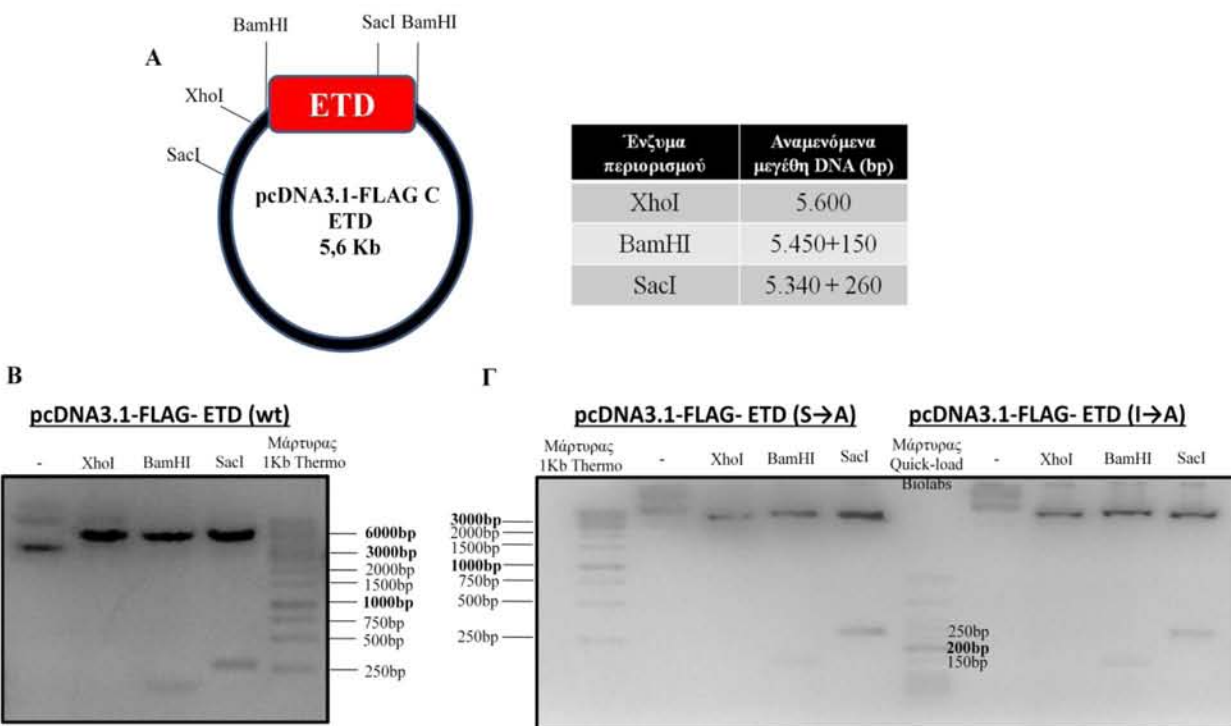


Εικόνα 24: Κατασκευή και έλεγχος των πλασμιδίων pFLAG CMV2 ETD I→A, I→A/S→A και S→E. Α) Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Δεξιά: Συγκεντρωτικός πίνακας των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Β-Δ) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pFLAG CMV2 ETD I→A (B), pFLAG CMV2 ETD I→A/ S→A (Γ) και pFLAG CMV2 ETD S→E (Δ) με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού. Σε κάθε περίπτωση ηλεκτροφορήθηκε ποσότητα πλασμιδίου που δεν είχε υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (-).

Τα cDNA των πεπτιδίων ETD wt, S→A και I→A κλωνοποιήθηκαν, επίσης, στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-FLAG, ο οποίος έχει το πλεονέκτημα ότι φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό νεομυκίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή διαμολυσμένων αποικιών, ώστε να δημιουργηθούν κυτταρικές σειρές που θα εκφράζουν σταθερά τα πεπίδια ETD. Τα παραπάνω ενθέματα απομονώθηκαν μετά από πέψη με BamHI από τα αντίστοιχα πλασμίδια pFLAG-CMV-2 ETD (wt, S→A και I→A) και κλωνοποιήθηκαν στην ίδια θέση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1- FLAG.

Το κάθε νέο πλασμίδιο pcDNA3.1- FLAG C-ETD (wt, S→A και I→A) ελέγχθηκε με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και τα αναμενόμενα τμήματα DNA παρουσιάζονται στον

Πίνακα της Εικόνας 25Α. Πέψη με το ένζυμο XhoI δημιουργεί γραμμικό μόριο DNA, καθώς αναγνωρίζει μία θέση πέψης στον πλασμιδιακό φορέα και με τα ένζυμα BamHI και SacI ελέγχθηκε η ύπαρξη ενθέματος και σωστού προσανατολισμού, αντίστοιχα (Εικόνα 25B, Γ, Δ).



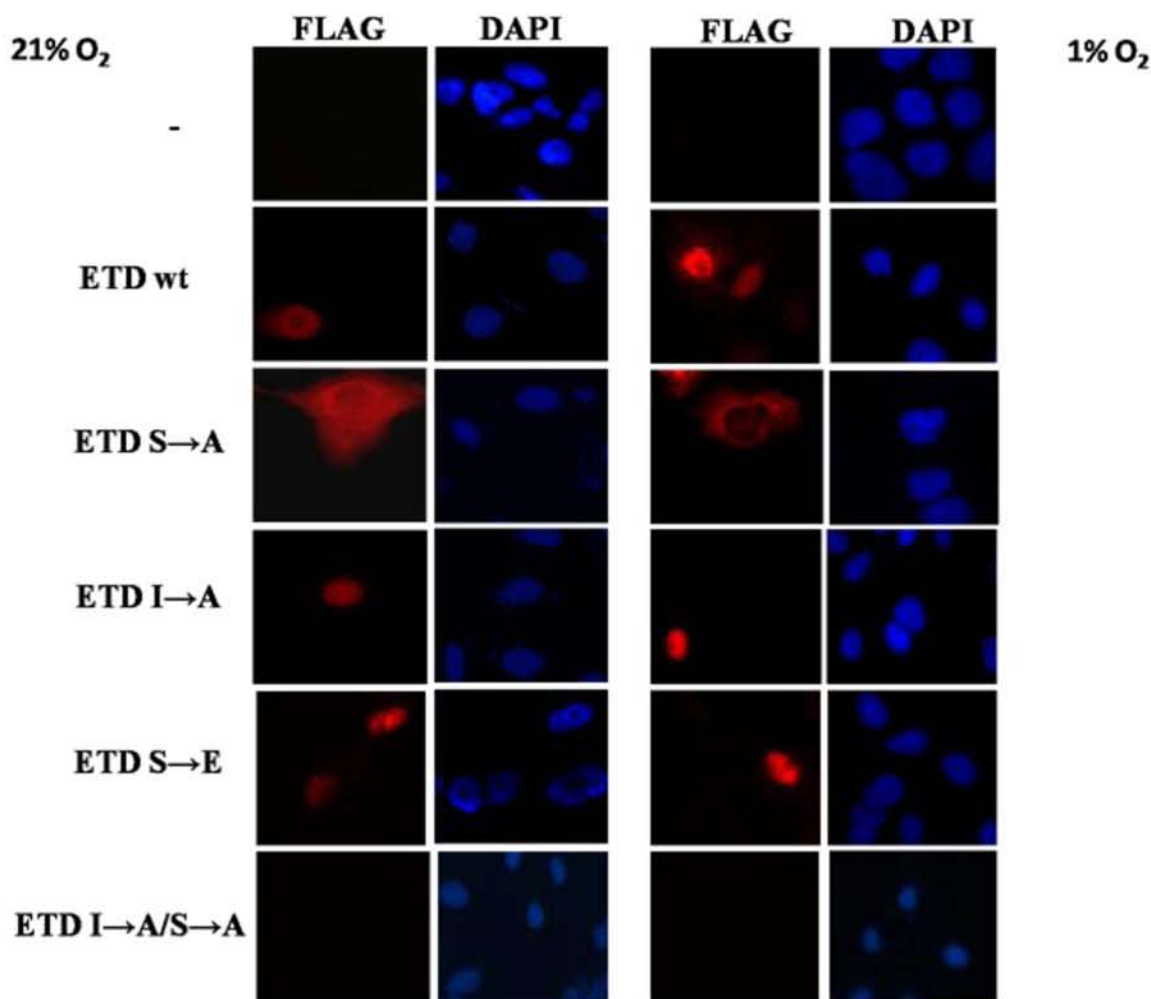
Εικόνα 25: Κατασκευή και έλεγχος των πλασμιδίων pcDNA3.1-FLAG - ETD wt, S→A και I→A. Α) Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Δεξιά: Συγκεντρωτικός πίνακας των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Β-Δ) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pcDNA3.1-FLAG - ETD wt (B), pcDNA3.1-FLAG - ETD S→A και pcDNA3.1-FLAG - ETD I→A (Γ) με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού. Σε κάθε περίπτωση ηλεκτροφορήθηκε ποσότητα πλασμιδίου που δεν είχε υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (-).

Σε κάθε περίπτωση διαπιστώθηκε η ορθότητα των πλασμιδιακών κατασκευών με βάση το μέγεθος των προϊόντων πέψης με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

3.1.2 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των πεπτιδίων FLAG ETD σε φυσιολογικές και σε υποξικές συνθήκες.

Τα παραπάνω πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών, ώστε να μελετηθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων FLAG ETD σε φυσιολογικές (21% O₂) και σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, τα οποία υπέστησαν διαμόλυνση με τα πλασμίδια pFLAG-

CMV-2-ETD wt, S→A I→A, S→E και I→A/S→A ή με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV-2 ως μάρτυρα και υποβλήθηκαν σε υποξία (1% O₂). Ακολούθησε ανίχνευση των πεπτιδίων ETD με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG (Εικόνα 26).

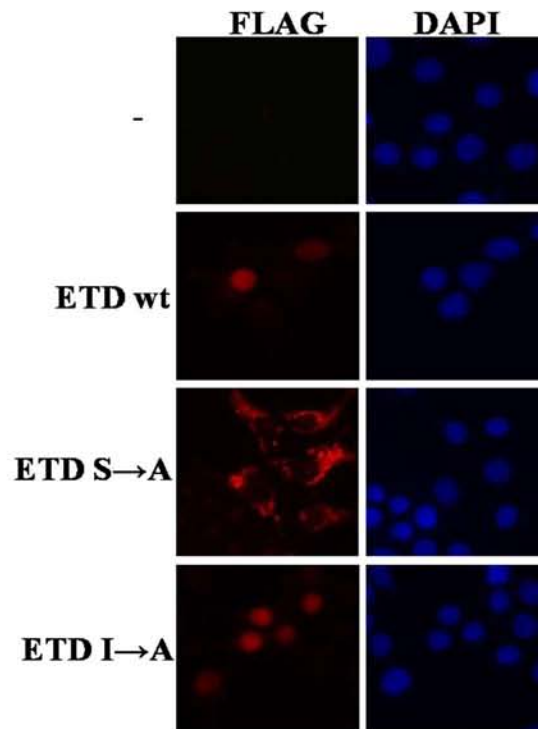


Εικόνα 26: Υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων FLAG ETD σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Έγινε διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με τα πλασμίδια pFLAG CMV2 ETD wt, S→A, I→A, S→E και I→A/S→A. 20 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αντι-FLAG αντίσωμα. Για την ανίχνευση των πυρήνων έγινε χρώση με DAPI που βάζει το DNA.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων ETD παρέμεινε ο ίδιος τόσο σε φυσιολογικές (21% O₂) όσο και σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Πιο αναλυτικά τα πεπτιδία ETD wt και ETD S→E εντοπίστηκαν κυρίως στον πυρήνα ενώ το πεπτιδίο ETD I→A ήταν αποκλειστικά πυρηνικό. Αντίθετα, το πεπτιδίο ETD S→A εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα. Δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση του διπλά μεταλλαγμένου πεπτιδίου ETD

I→A/S→A πιθανόν λόγω τοξικής του δράσης και γι'αυτό δε χρησιμοποιήθηκε σε επόμενα πειράματα.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε σε μη καρκινικά κύτταρα HEK293T, τα οποία διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA3.1-FLAG - ETD wt, S→A και I→A ή με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1- FLAG ως μάρτυρα και επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂) (Εικόνα 27).

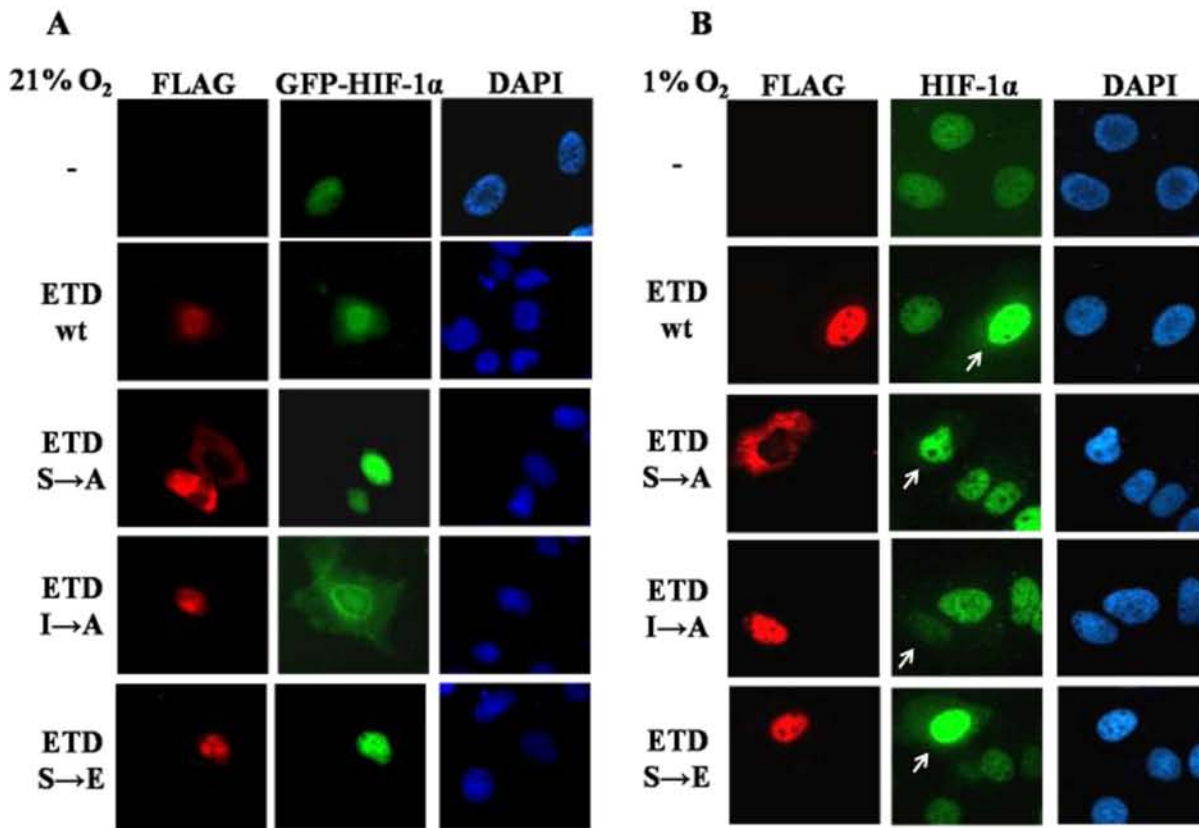


Εικόνα 27: Υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων FLAG ETD σε κύτταρα HEK293T. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA3.1 FLAG C ή pcDNA3.1 FLAG C-ETD wt, S→A και I→A και επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂). Ακολούθησε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αντι-FLAG αντίσωμα.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων ETD wt, S→A και I→A στα κύτταρα HEK293T ήταν όμοιος με αυτόν που παρατηρήθηκε στα καρκινικά κύτταρα Huh7 και επομένως δεν εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο ή από τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Συμπερασματικά, λοιπόν, τα πεπτίδια ETD που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 (wt, I→A) ή που περιέχουν μετάλλαξη που μιμούνται τη φωσφορυλίωση αυτή (S→E) εντοπίζονται στον πυρήνα, ενώ η μορφή που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί (S→A) είναι κυτταροπλασματική τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποξικές συνθήκες.

3.1.3 Έλεγχος της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του εξωγενούς και του ενδογενούς HIF-1α

Για να μελετηθεί η επίδραση των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του εξωγενούς HIF-1α έγινε συνδιαμόλυνση κυττάρων Huh7 με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2 ή pFLAG-CMV2-ETD (wt, S→A, I→A, S→E) και pEGFP-HIF-1α. Χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία φθορισμού για την παρατήρηση του GFP-HIF-1α και του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων ETD.



Εικόνα 28: Επίδραση της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του εξωγενούς και του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα Huh7. Α) Κύτταρα που υπερεκφράζουν τα πεπτιδία FLAG ETD και GFP-HIF-1α επωάστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂). Χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία φθορισμού για την παρατήρηση του GFP-HIF-1α και του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων ETD επωάζοντας με αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Β) 20 ώρες μετά τη διαμόλυνση κυττάρων Huh7 ακολούθησε επώαση για 4 ώρες στην υποξία (1% O₂). Ακολούθησε διπλός ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α με το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-HIF-1α και για τα πεπτιδία ETD με το αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο FLAG. Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: αντίσωμα συζευγμένο με FITC που δεσμεύεται στο πρωταρχικό αντί-HIF-1α και αντίσωμα συζευγμένο με Cy3 που δεσμεύεται στο αντι-FLAG.

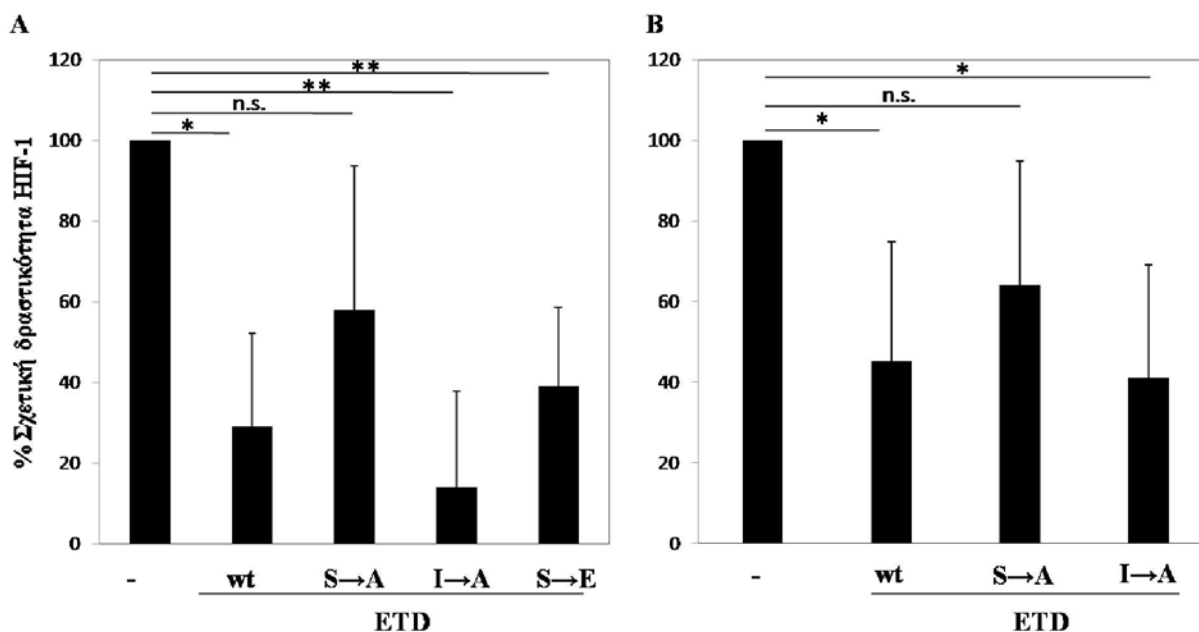
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28Α, ο GFP-HIF-1α εντοπίστηκε στον πυρήνα στο δείγμα μάρτυρα. Όμως, η υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD wt προκάλεσε την μερική εξαγωγή του

GFP-HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Ακόμη ισχυρότερη ήταν η επίδραση του πεπτιδίου ETD I→A, το οποίο προκάλεσε πλήρη μετακίνηση του GFP-HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, η υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD S→A και του ETD S→E δεν επηρέασε τον πυρηνικό εντοπισμό του GFP-HIF-1α.

Για να μελετηθεί η επίδραση των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α, κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2 ή pFLAG-CMV2-ETD (wt, S→A, I→A, S→E) και επώαστηκαν στην υποξία (1% O₂). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τον ενδογενή HIF-1α ήταν παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν για τον GFP-HIF-1α όσον αφορά τα πεπτίδια ETD wt και ETD S→A, καθώς παρουσία του πεπτιδίου ETD wt ο ενδογενής HIF-1α εντοπίστηκε και στο κυτταρόπλασμα, ενώ η υπερέκφραση του ETD S→A δεν είχε καμιά επίδραση. Ωστόσο, υπήρξαν και κάποιες διαφορές. Συγκεκριμένα, παρουσία του πεπτιδίου ETD I→A παρατηρήθηκε αρκετά μειωμένο σήμα για τον ενδογενή HIF-1α, ενώ παρουσία του πεπτιδίου ETD S→E ο ενδογενής HIF-1α εντοπίστηκε και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 28B).

3.1.4 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των πεπτιδίων FLAG ETD, στη δραστικότητα του ενεργού συμπλόκου HIF-1 στις κυτταρικές σειρές Huh7 και HEK293T. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla και στην περίπτωση των κυττάρων Huh7 μαζί με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2 ή pFLAG-CMV2-ETD (wt, S→A, I→A, S→E), ενώ στην περίπτωση των κυττάρων HEK293T μαζί με τα πλασμίδια pcDNA3.1 FLAG C ή pcDNA3.1 FLAG C-ETD wt, S→A και I→A. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή σε υποξικές συνθήκες (1% O₂) και ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Επίδραση της υπερέκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1. Α) Μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α μετά την υπερέκφραση των πεπτιδίων ETD σε κύτταρα Huh7. Β) Μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α μετά την υπερέκφραση των πεπτιδίων ETD σε κύτταρα HEK293T. Σε κάθε περίπτωση 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση κυττάρων ακολούθησε επώαση για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) και σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το % ποσοστό σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα (-) και αποτελούν τον μέσο όρο 9 τιμών για κάθε δείγμα, από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01, *P<0,05, ^{n.s.}P>0,05).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια για τις δύο κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD wt μείωσε τη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 κατά 60% στα καρκινικά κύτταρα (Huh7), όπως και στα μη καρκινικά κύτταρα (HEK293T) (Εικόνα 29A, B). Παρόμοια ανασταλτική ισχύ με του αγρίου τύπου ETD εκδήλωσε το πεπτίδιο ETD S→E στα κύτταρα Huh7 (Εικόνα 29A). Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση είχε το πεπτίδιο ETD I→A και στους δύο κυτταρικούς τύπους, η οποία είναι πιο ισχυρή στα καρκινικά κύτταρα (90%). Αντίθετα, το πεπτίδιο ETD S→A δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη δράση του HIF-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 29A, B).

Από τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αναστολή της δράσης του HIF-1 συνδέεται με την έξοδο του στο κυτταρόπλασμα παρουσία των πεπτιδίων ETD wt, I→A και S→E, τα οποία περιέχουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης ή μιμούνται τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2.

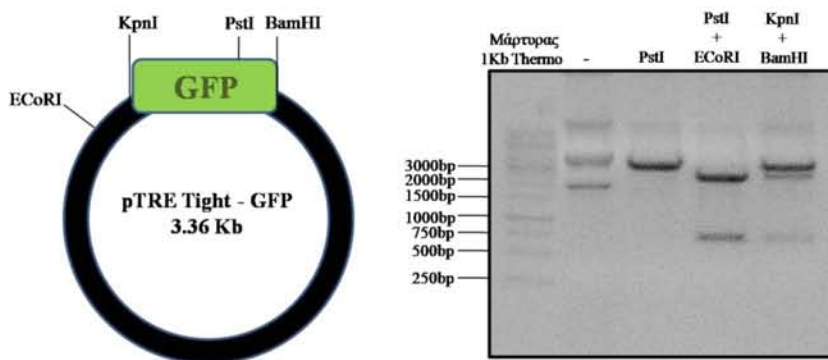
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΙΜΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ FLAG ETD ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1 α

Για να μελετηθεί η επαγωγή έκφραση των πεπτιδίων ETD χρησιμοποιήθηκε το σύστημα TET OFF, με το οποίο, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pTRE Tight - ETD, η έκφραση των πεπτιδίων ETD επάγεται απουσία του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνης (Dox) από το θρεπτικό μέσο ενώ η έκφρασή τους καταστέλλεται όταν προστεθεί στο θρεπτικό δοξυκυκλίνη (Dox).

3.2.1 Κατασκευή των κατάλληλων πλασμιδίων για το σύστημα TET OFF

3.2.1.1 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pTRE Tight – GFP

Προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος TET OFF



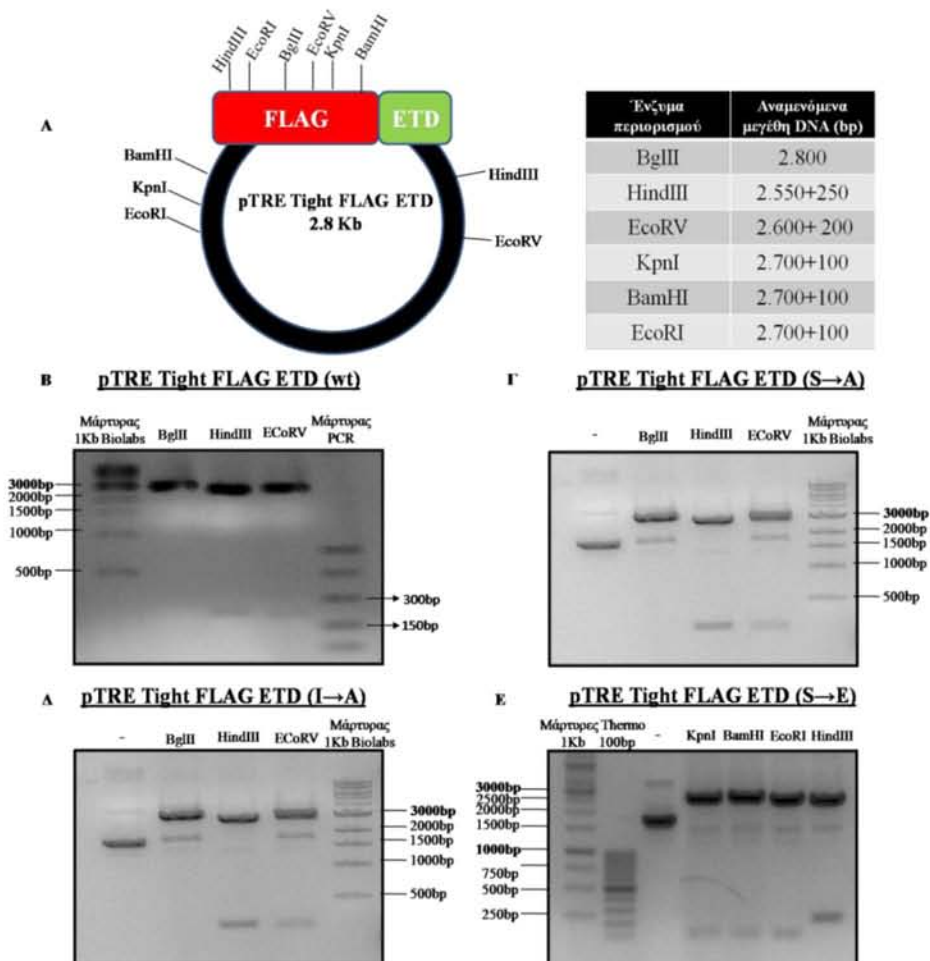
Ένζυμα περιορισμού	Αναμενόμενα μεγέθη DNA (bp)
PstI	3.360
PstI+ EcoRI	2.600 + 760
KpnI+BamHI	2.680 + 680

Εικόνα 30: Κατασκευή και έλεγχος του πλασμιδίου pTRE Tight – GFP *Αριστερά:* Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου pTRE Tight – GFP με τις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Το cDNA της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP κλωνοποιήθηκε στις θέσεις KpnI-BamHI του πλασμιδιακού φορέα pTRE Tight. *Δεξιά:* Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα. Πέψη με το ένζυμο περιορισμού PstI δημιούργησε γραμμικό μόριο DNA, γιατί κόβει μία φορά στο εσωτερικό της GFP. Η ύπαρξη ενθέματος ελέγχθηκε με ταυτόχρονη πέψη με KpnI και BamHI και ο έλεγχος για τον σωστό προσανατολισμό του ενθέματος έγινε με ταυτόχρονη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού PstI και EcoRI. Επιπλέον, ηλεκτροφορήθηκε ποσότητα πλασμιδίου που δεν είχε υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (-). *Κάτω:* Συγκεντρωτικός πίνακας του μεγέθους των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού.

κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pTRE Tight – GFP. Το cDNA της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP κλωνοποιήθηκε στις θέσεις KpnI-BamHI του πλασμιαδικού φορέα pTRE Tight και ακολούθησε απομόνωση μεσαίας κλίμακας DNA και έλεγχος με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για να εξακριβωθεί η ορθότητα της πλασμιαδικής κατασκευής (Εικόνα 30).

3.2.1.2 Κατασκευή των πλασμιδίων pTRE Tight – FLAG ETD

Στη συνέχεια έγινε κλωνοποίηση του cDNA των FLAG ETD (wt, S→A, I→A και S→E)



Εικόνα 31: Κατασκευή και έλεγχος των πλασμιδίων pTRE Tight – FLAG ETD. *Αριστερά:* Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Το cDNA των FLAG ETD (wt, S→A, I→A και S→E) κλωνοποιήθηκε στη θέση PvuII του πλασμιαδικού φορέα pTRE Tight όπως περιγράφηκε στην υποενότητα 2.2.11.2. *Δεξιά:* Συγκεντρωτικός πίνακας των τμημάτων DNA των πλασμιδίων που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. B-E) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pTRE Tight-FLAG ETD wt (B), pTRE Tight-FLAG ETD S→A (Γ), pTRE Tight-FLAG ETD I→A (Δ) και pTRE Tight-FLAG ETD S→E (E) με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Σε κάθε περίπτωση ηλεκτροφορήθηκε ποσότητα πλασμιδίου που δεν είχε υποστεί πέψη με κάποιο ένζυμο περιορισμού (-).

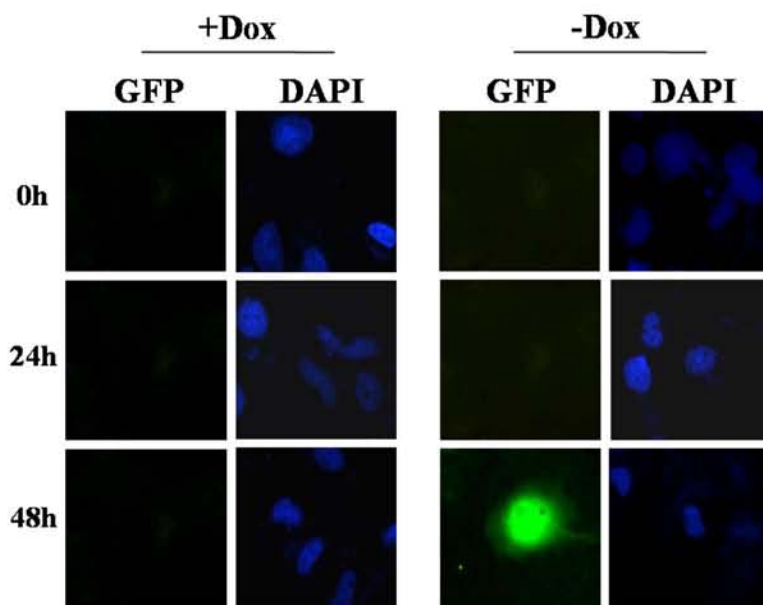
στον πλασμιδιακό φορέα pTRE Tight ώστε να επιτευχθεί επαγωγίμη έκφρασή τους σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Η ορθότητα των πλασμιδίων pTRE Tight – FLAG ETD ελέγχθηκε με πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, μετά από πέψη των πλασμιδίων pTRE Tight – FLAG ETD (wt, S→A, I→A και S→E) με τα κατάλληλα ένζυμα επιβεβαιώθηκε η ορθότητά τους.

3.2.2 Έλεγχος του συστήματος επαγωγίμης έκφρασης TET OFF

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω πλασμίδια διερευνήθηκε κατά πόσο και μετά από πόσο χρόνο είναι εφικτή η επαγωγίμη έκφραση είτε της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP είτε των πεπτιδίων FLAG ETD, όταν απουσιάζει από το θρεπτικό υλικό το αντιβιοτικό Dox.

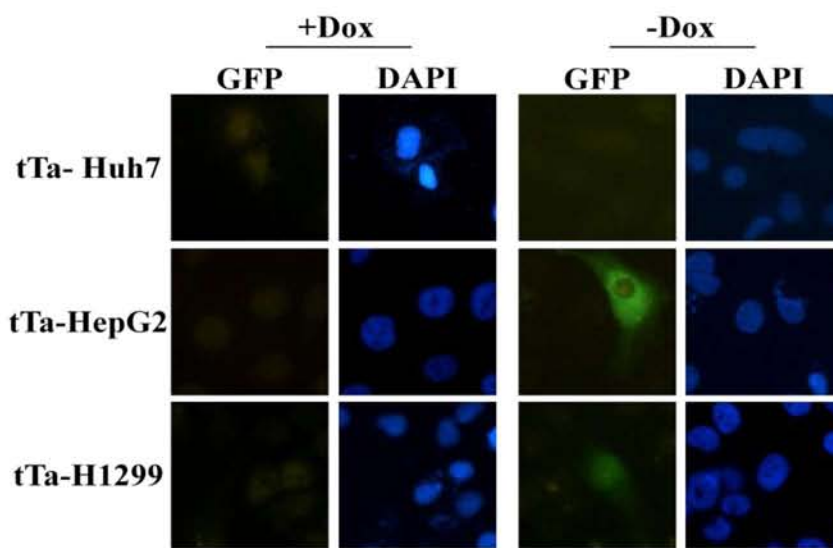
Σε κύτταρα Huh7 έγινε συνδιαμόλυνση με τα πλασμίδια pTRE Tight – GFP και pTET OFF, το οποίο κωδικοποιεί τον καταστολέα tTA. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂) για 16, 24, 48 και 72 ώρες, απουσία ή παρουσία 1 μg/ml Dox, με ανανέωση του θρεπτικού μέσου ανά 24 ώρες, που είναι ο χρόνος ημίσειας ζωής του αντιβιοτικού Dox.



Εικόνα 32: Επαγωγίμη έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP σε κύτταρα Huh7 μέσω του συστήματος TET OFF. Μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pTRE Tight – GFP και pTET OFF ακολούθησε επώασή τους για 24 και 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂), απουσία ή παρουσία του αντιβιοτικού Dox (1 μg/ml). Ακολούθησε η διαδικασία του φθορισμού για την παρατήρηση της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, έκφραση της πρωτεΐνης GFP παρατηρήθηκε μετά από 48 ώρες επώασης και μόνο στα δείγματα όπου δεν υπήρχε Dox στο θρεπτικό μέσο.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι tTA-Huh7, tTA-HepG2 και tTA-H1299, οι οποίες είναι σταθερά διαμολυσμένες με το πλασμίδιο pTET OFF και εκφράζουν συνεχώς τον καταστολέα tTA. Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο είναι εφικτή η επαγωγίμη έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά, έγινε συνδιαμόλυνση και των τριών κυτταρικών σειρών με το πλασμίδιο pTRE Tight – GFP. Ακολούθησε επώαση για 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂), απουσία ή παρουσία Dox 1μg/ml και η έκφραση της πρωτεΐνης GFP ελέγχθηκε με μικροσκοπία φθορισμού.

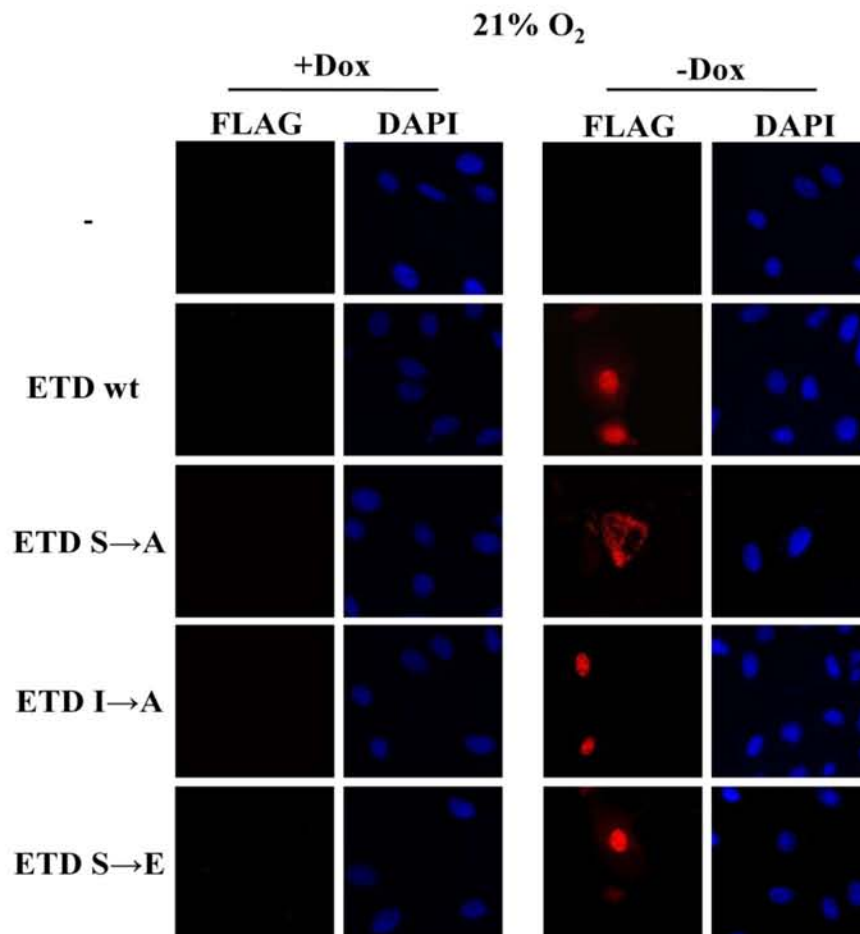


Εικόνα 33: Επαγωγίμη έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές για το πλασμίδιο pTET OFF. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pTRE Tight – GFP και επώαστηκαν για 48 ώρες απουσία ή παρουσία Dox (1 μg/ml) σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂). Ακολούθησε η διαδικασία του φθορισμού για τον εντοπισμό της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 33, έκφραση της GFP παρατηρήθηκε μόνο στα δείγματα όπου έλλειπε η Dox από το θρεπτικό μέσο, στις κυτταρικές σειρές tTA-HepG2 και tTA-H1299. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σήμα σε καμιά συνθήκη στα κύτταρα tTA-Huh7. Άρα, το διαθέσιμο σύστημα TET OFF είναι λειτουργικό για την πρωτεΐνη GFP στις κυτταρικές σειρές tTA-HepG2 και tTA-H1299. Επειδή όλα τα προηγούμενα πειράματα έγιναν σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, προτιμήθηκαν τα κύτταρα tTA-HepG2 για τα επόμενα πειράματα.

3.2.3 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πεπτιδίων FLAG ETD μετά από επαγωγή έκφρασή τους σε κύτταρα tTA-HepG2

Για να μελετηθεί η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων FLAG ETD σε κύτταρα tTA-HepG2, έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pTRE Tight - FLAG ETD wt, S→A, I→A και S→E και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες (21% O₂), παρουσία ή απουσία Dox στο θρεπτικό μέσο.



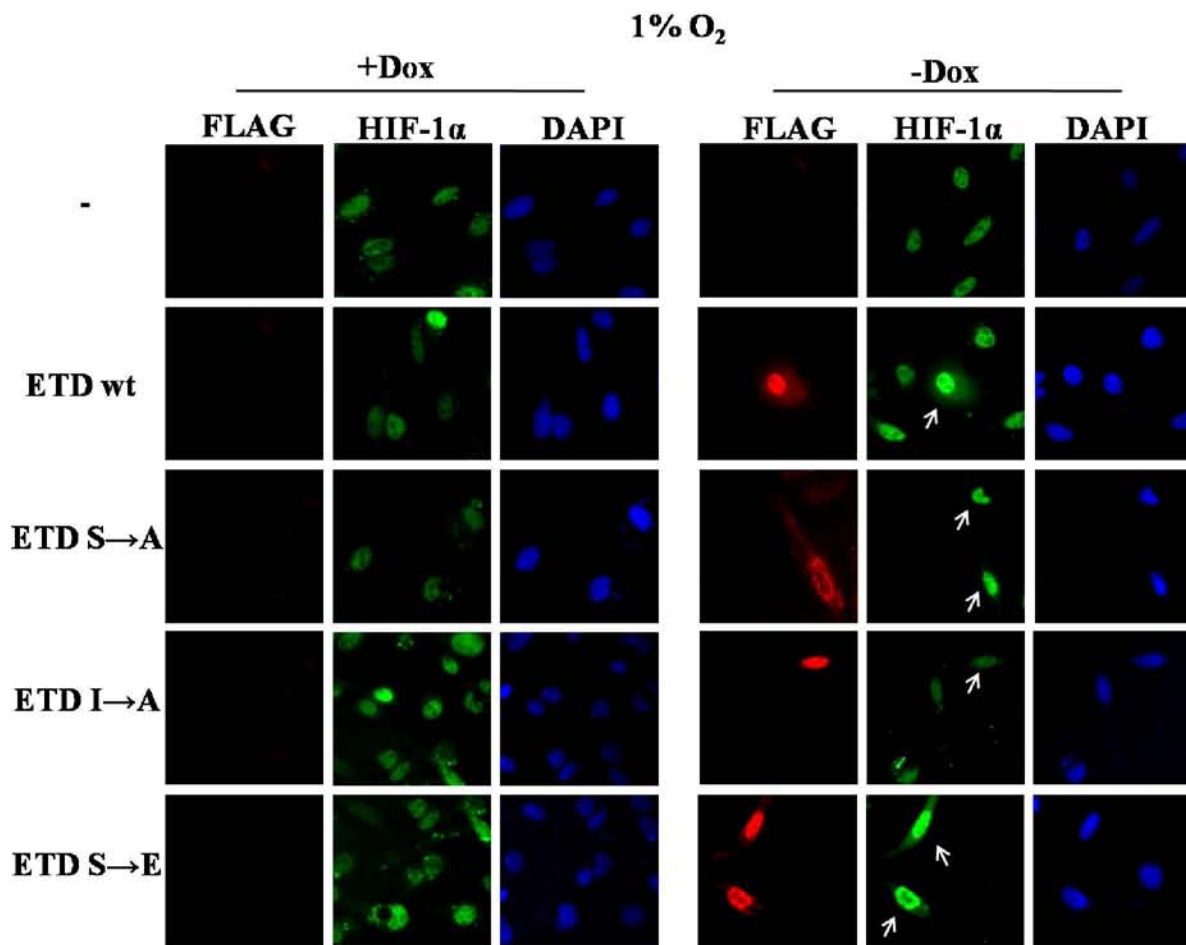
Εικόνα 34: Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πεπτιδίων FLAG ETD μετά από επαγωγή έκφρασή τους σε κύτταρα tTA-HepG2. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pTRE Tight - FLAG ETD wt, S→A, I→A και S→E και επώαστηκαν για 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂), απουσία ή παρουσία 1 μg/ml Dox. Ακολούθησε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34, δεν παρατηρήθηκε έκφραση των πεπτιδίων παρουσία του αντιβιοτικού Dox. Απουσία του αντιβιοτικού, τα πεπτίδια FLAG ETD wt και S→E εντοπίστηκαν κυρίως στον πυρήνα και αποκλειστικά πυρηνικό ήταν το πεπτίδιο FLAG ETD I→A. Αντίθετα, το πεπτίδιο FLAG ETD S→A ήταν κυτταροπλασματικό. Τα αποτελέσματα

αυτά συμφωνούν με τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πεπτιδίων μετά από μη επαγωγίμη έκφρασή τους σε κύτταρα Huh7, όπως περιγράφηκε πιο πάνω.

3.2.4 Μελέτη της επίδρασης της επαγωγίμης έκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α

Στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο η επαγωγίμη έκφραση των πεπτιδίων μπορεί να προκαλέσει έξοδο του ενδογενούς HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, όπως παρατηρήθηκε μετά από μη επαγωγίμη έκφρασή τους. Γι'αυτό σε κύτταρα tTA-HepG2 έγινε διαμόλυνση με τα



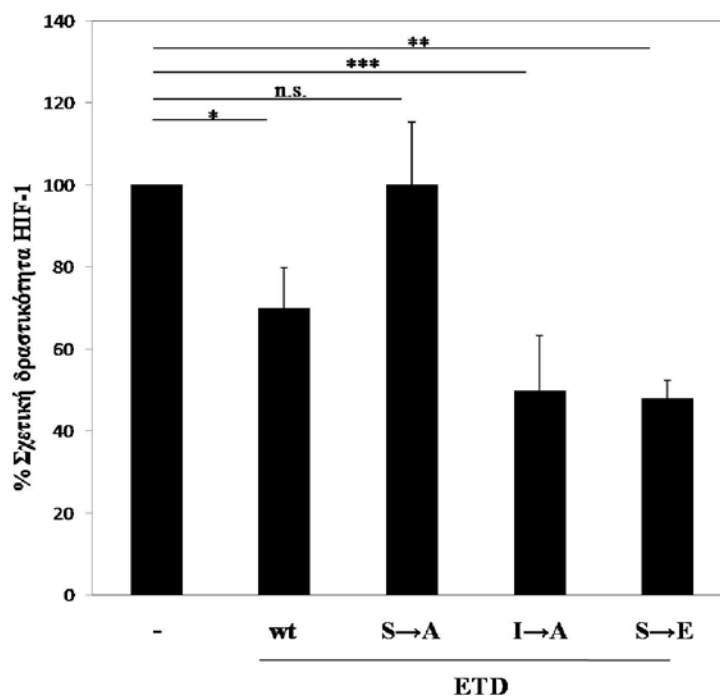
Εικόνα 35: Επίδραση της επαγωγίμης έκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα tTA-HepG2. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pTRE Tight ή pTRE Tight – FLAG ETD wt, S→A I→A και S→E και επωάστηκαν για 48 ώρες απουσία ή παρουσία 1 μg/ml Dox, σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του HIF-1α με το αντίστοιχο πολυκλωνικό αντίσωμα (από ορό κουνελιού) και των FLAG-ETD πεπτιδίων με αντίσωμα που ανιχνεύει τον επίτοπο FLAG (μονοκλωνικό από ορό ποντικού). Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: αντίσωμα συζευγμένο με FITC για την παρατήρηση του HIF-1α ή με Cy3 για την παρατήρηση των πεπτιδίων FLAG ETD.

πλασμίδια pTRE Tight ή pTRE Tight – FLAG ETD wt, S→A I→A και S→E και επώστηκαν για 48 ώρες σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία Dox. Ακολούθησε διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του HIF-1α και των FLAG-ETD πεπτιδίων.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 35, παρουσία των πεπτιδίων FLAG ETD wt και S→E ο ενδογενής HIF-1α παρατηρήθηκε και στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, η έκφραση του πεπτιδίου FLAG ETD S→A όπως και του πεπτιδίου ETD I→A, δεν επηρέασε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α, ο οποίος ήταν πυρηνικός.

3.2.5 Μελέτη της επίδρασης της επαγωγίσιμης έκφρασης των πεπτιδίων FLAG ETD στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση των πεπτιδίων FLAG ETD που εκφράζονται με επαγωγίμο τρόπο στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα tTA-HepG2 στα οποία έγινε συνδιαμόλυνση με τα πλασμίδια pTRE Tight ή pTRE-



Εικόνα 36: Μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α μετά από επαγωγίμη έκφραση των πεπτιδίων FLAG ETD. 32 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων tTA-HepG2 με τα πλασμίδια pTRE Tight ή pTRE Tight – FLAG ETD wt, S→A I→A και S→E και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla, ακολούθησε επώση για 16 ώρες στην υποξία (1% O₂), απουσία του αντιβιοτικού Dox στο θρεπτικό μέσο. Οι τιμές αποτελούν το % ποσοστό μεταβολής της δράσης του HIF-1 σε σύγκριση με τον μάρτυρα και αποτελούν τον μέσο όρο 9 τιμών για κάθε δείγμα από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001, ** P<0,01, * P<0,05, n.s P>0,05).

Tight – FLAG ETD wt, S→A, I→A και S→E και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla. 32 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν για 16 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία Dox στο θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 36, μετά από επαγωγική έκφραση των πεπτιδίων ETD που φέρουν τον επίτοπο FLAG, η αγρίου τύπου μορφή (wt) προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς HIF-1, η οποία ήταν ακόμη μεγαλύτερη στην περίπτωση των πεπτιδίων ETD I→A και S→E. Αντίθετα, το πεπτίδιο ETD S→A δεν είχε καμιά επίδραση στη δράση του HIF-1. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά που προέκυψαν μετά από μη επαγωγική έκφραση των πεπτιδίων.

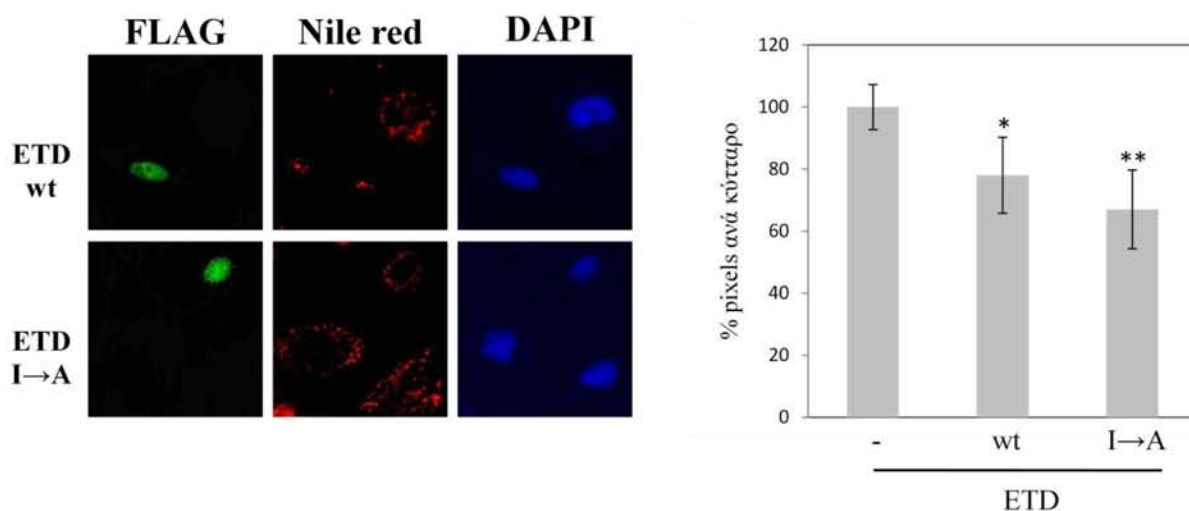
Συμπερασματικά, λοιπόν, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η ανασταλτική δράση των πεπτιδίων ETD εκδηλώνεται μετά από επαγωγική ή μη επαγωγική έκφρασή τους και φαίνεται ότι το κυρίως ανασταλτικό πεπτίδιο και στις δύο περιπτώσεις είναι το ETD I→A, ενώ αντίθετα το ETD S→A δεν έχει καμιά επίδραση στον υποκυτταρικό εντοπισμό και στη δράση του HIF-1.

3.2.6 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των πεπτιδίων ETD wt και I→A στη μεταβολική λειτουργία του HIF-1α

Σε συνθήκες υποξίας επάγεται ο σχηματισμός λιποσταγονιδίων που είναι η κύρια αποθήκη τριγλυκεριδίων σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων παίζει η λιπίνη-1 που είναι το ένζυμο που καταλύει το προτελευταίο στάδιο για τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων τα οποία αποθηκεύονται στο εσωτερικό των λιποσταγονιδίων. Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη ο HIF-1 προσδένεται σε HRE του υποκινητή του γονιδίου *LPIN1* και επάγει την έκφραση της λιπίνης-1 σε συνθήκες υποξίας (94). Η ικανότητα αυτή πρόσδεσης του HIF-1 αναστέλλεται μετά από υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD wt, ενώ αντίθετα δεν έχει καμιά επίδραση η υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD S→A (94).

Με βάση τα δεδομένα αυτά στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο σχηματισμός λιποσταγονιδίων σε κύτταρα Huh7 μετά από υπερέκφραση των πεπτιδίων ETD wt και ETD I→A, τα οποία όπως φάνηκε με τα παραπάνω πειράματα ανέστειλαν τη δράση του HIF-1. Έγινε

διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2-ETD wt και I→A και επώασή τους στην υποξία (1% O₂).



Εικόνα 37: Επίδραση της υπερέκφρασης των πεπτιδίων ETD wt και I→A στη μεταβολική λειτουργία του HIF-1. *Αριστερά:* Σε κύτταρα Huh7 έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2-ETD wt και I→A και 16 ώρες μετά επώαστηκαν για 24 ώρες στην υποξία (1% O₂). Ακολούθησε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αντίσωμα ενάντια στον επίτοπο FLAG και ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το FITC. Ο εντοπισμός των λιποσταγονιδίων έγινε με χρώση με Nile Red. *Δεξιά:* Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των λιποσταγονιδίων με βάση το πρόγραμμα ImageJ. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο των pixels ανά κύτταρο (συνολικά 20 κύτταρα). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37, η υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD wt προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στο σχηματισμό των λιποσταγονιδίων, η οποία ήταν ακόμη μεγαλύτερη παρουσία του πεπτιδίου ETD I→A, για το οποίο παρατηρήθηκε ισχυρότερη ανασταλτική δράση στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.

Συμπερασματικά, η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 παρουσία των πεπτιδίων που έχουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, όπως είναι τα πεπτίδια ETD wt και I→A, είναι πιθανό να οφείλεται στον ανταγωνισμό του HIF-1α με τα πεπτίδια αυτά για φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2, γεγονός που προκαλεί μείωση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α, αυξημένη μετακίνησή του εκτός του πυρήνα, και τελικά αναστολή της δράσης του και της έκφρασης γονιδίων στόχων του με αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταβολική προσαρμογή στην υποξία.

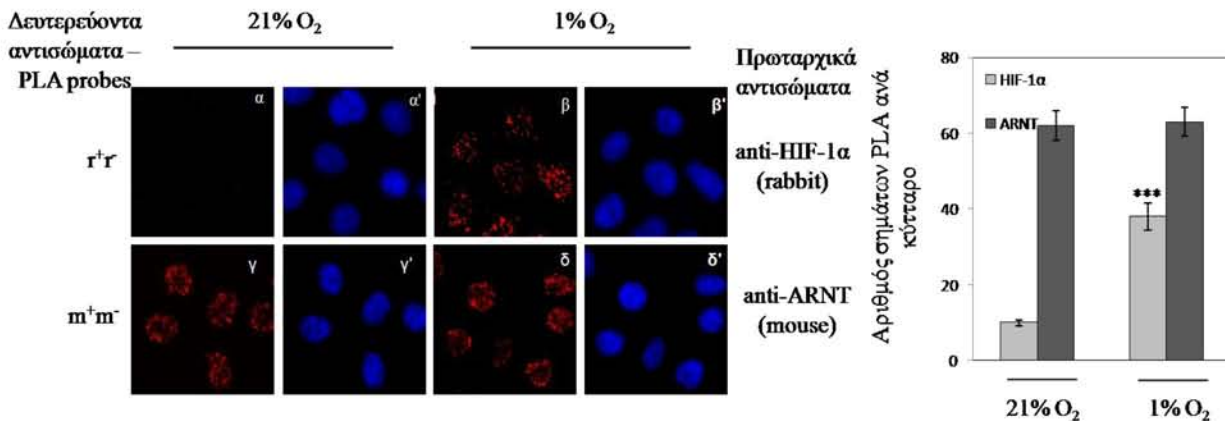
ΜΕΡΟΣ Β: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CK1δ ΣΤΟΝ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟΝ ARNT ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΠΟΞΙΑΣ

3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HIF-1α/ARNT ΣΕ ΑΚΕΡΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ *in situ* PLA

Σε πρόσφατη μελέτη έχει δειχθεί ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την CK1δ στη θέση S247 και η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας του HIF-1 καθώς, όπως δείχθηκε με *in vitro* πειράματα, παρεμποδίζεται ο ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT (216). Ως συνέχεια των παραπάνω, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινιστεί η ρύθμιση του σχηματισμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT από την CK1δ μέσα στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *in situ* PLA, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, στην προκειμένη περίπτωση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT, σε ακέραια κύτταρα.

3.3.1 Ανίχνευση των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT και του συμπλόκου τους με τη μέθοδο *in situ* PLA

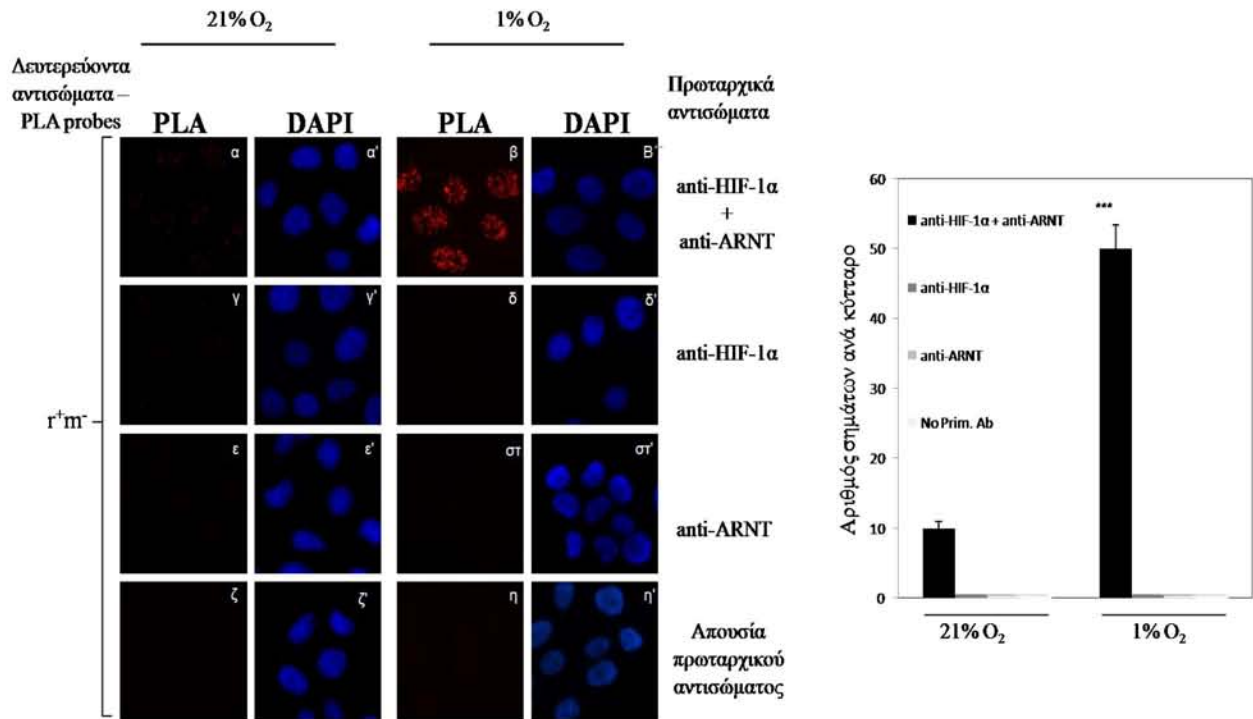
Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου *in situ* PLA, κατά την οποία στο αντίσωμα που χρησιμοποιείται για τη κάθε πρωτεΐνη, δηλαδή στο αντίσωμα έναντι του HIF-1α από ορό κουνελιού (r, rabbit) ή στο αντίσωμα έναντι του ARNT από ορό ποντικού (m, mouse), προσδένονται οι δύο PLA probes r^+r^- ή m^+m^- , αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία επώαστηκαν για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε η διαδικασία της *in situ* PLA και μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, έγινε σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA ανά κύτταρο.



Εικόνα 38: Ανίχνευση των ενδογενών πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT με τη μέθοδο *in situ* PLA και ποσοτικοποίηση του σήματος. *Αριστερά:* Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες και ακολούθησε η μέθοδος της *in situ* PLA. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του HIF-1α από ορό κουνελιού (anti-rabbit) και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ARNT από ορό ποντικού (anti-mouse). Ως δεύτερα αντισώματα, που καλούνται PLA probes, χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί r⁺r⁻ και m⁺m⁻ για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT, αντίστοιχα. *Δεξιά:* Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA, που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού πρωτεϊνικών μορίων HIF-1α και ARNT που ανιχνεύονται ανά κύτταρο στις συγκεκριμένες συνθήκες. Μετρήθηκαν συνολικά 50 κύτταρα για κάθε συνθήκη (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, μετά από σχετική ποσοτικοποίηση των πυρηνικών σημάτων που προέκυψαν με τη μέθοδο *in situ* PLA, παρατηρήθηκε αύξηση του σήματος του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή για την πρωτεΐνη ARNT, όπως αναμενόταν, καθώς η πρωτεΐνη HIF-1α αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας, ενώ η πρωτεΐνη ARNT δεν μεταβάλλεται. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανίχνευση και των δύο πρωτεϊνών με τα διαθέσιμα αντισώματα έχοντας το σωστό πυρηνικό εντοπισμό με τη συγκεκριμένη μέθοδο, οπότε τα συγκεκριμένα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος *in situ* PLA σε κύτταρα HeLa, για την ανίχνευση του συμπλόκου HIF-1α/ARNT σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Για να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν μη ειδικού σήματος τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία των αντισωμάτων έναντι του HIF-1α ή του ARNT ή απουσία αντισωμάτων, σε συνδυασμό με τους PLA probes.



Εικόνα 39: Ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT με τη μέθοδο *in situ* PLA. Αριστερά: Κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες για 4 ώρες και ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα ως πρωταρχικά αντισώματα τα αντι-HIF-1α και αντι-ARNT. Οι PLA probes που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο συνδυασμός r⁺m⁻ καθώς ο r⁺ αναγνωρίζει το πολυκλωνικό αντίσωμα για τον HIF-1α από ορό κουνελιού και ο m⁻ αναγνωρίζει το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ARNT από ορό ποντικού. Για τον έλεγχο μη ειδικού σήματος τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ενός μόνο (γ-στ') ή απουσία (ζ-η') πρωταρχικών αντισωμάτων και στη συνέχεια με τους PLA probes r⁺m⁻. Δεξιά: Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύονται ανά κύτταρο στις συγκεκριμένες συνθήκες (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 39, η ανίχνευση συμπλόκων HIF-1α/ARNT κατέστη εφικτή με τη μέθοδο *in situ* PLA και μετά από σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων που παρατηρήθηκαν στον πυρήνα των κυττάρων, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT σε συνθήκες υποξίας σε σύγκριση με το σήμα που παρατηρήθηκε σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Το γεγονός ότι στα τρία αρνητικά δείγματα δεν εντοπίστηκε σήμα επιβεβαιώνει την ειδικότητα της μέθοδο *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT.

3.3.2 Επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μεθόδου *in situ* PLA σε κύτταρα HeLa

Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων που δίνει η μέθοδος *in situ* PLA, ώστε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια των πειραμάτων, έγινε με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η καμπερόλη, ένα φλαβονοειδές το οποίο αδρανοποιεί τις κινάσες ERK1/2

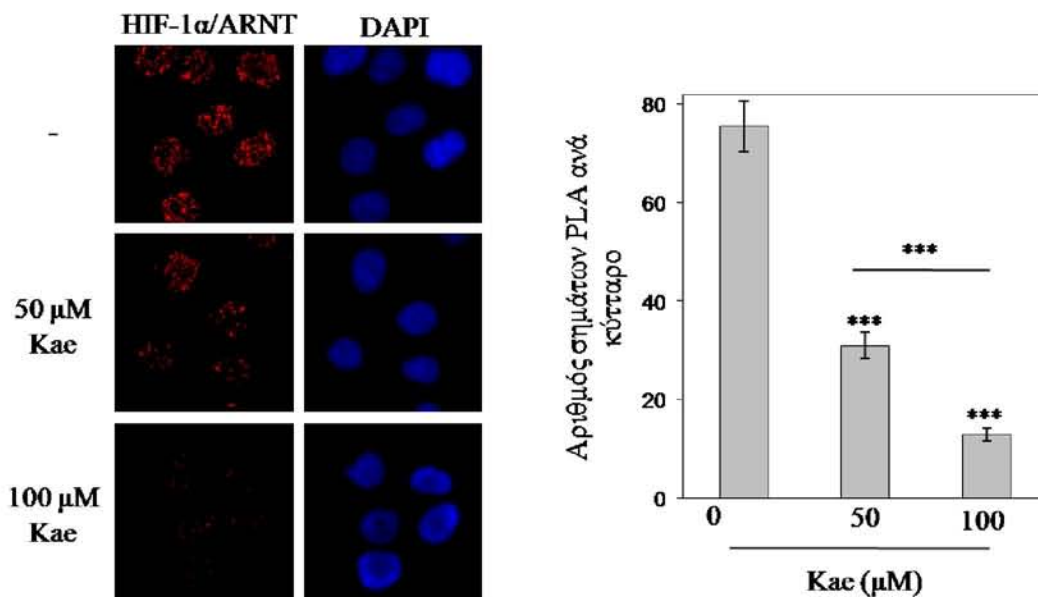
και παρουσία του οποίου ο HIF-1α εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες υποξίας (206). Ως δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε η αναστολή της δημιουργίας συμπλόκων HIF-1α/ARNT όταν και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται ταυτόχρονα μέσα στον πυρήνα. Γι' αυτό υπερεκφράστηκε στα κύτταρα το αμινοτελικό τμήμα 1-347 του HIF-1α, το οποίο περιέχει την περιοχή PAS, οπότε ανταγωνίζεται τον ενδογενή HIF-1α για ετεροδιμερισμό με τον ARNT (Εικόνα 40), αλλά δεν μπορεί να ανιχνευθεί από το διαθέσιμο αντίσωμα έναντι του HIF-1α.



Εικόνα 40: Σχηματική απεικόνιση του αμινοτελικού τμήματος του HIF-1α (1-347).

3.3.2.1 Μελέτη της επίδρασης της καμπερόλης στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA

Για τη διερεύνηση της πρώτης προσέγγισης, κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 4 ώρες απουσία ή παρουσία 50 και 100 μM καμπερόλης σε υποξικές συνθήκες (1% O_2) και ακολούθησε ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT με τη μέθοδο *in situ* PLA.

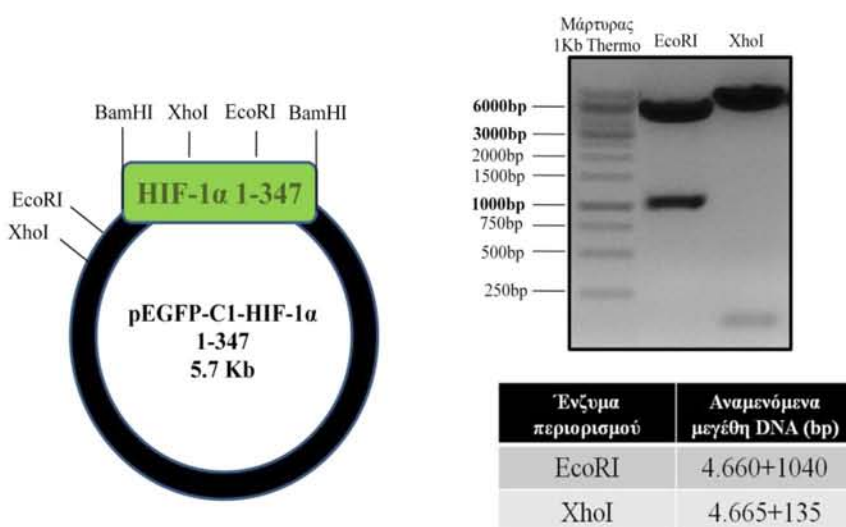


Εικόνα 41: Επίδραση της καμπερόλης στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA. Αριστερά: Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 4 ώρες απουσία ή παρουσία 50 και 100 μM καμπερόλης σε υποξικές συνθήκες (1% O_2) και ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT με τη μέθοδο *in situ* PLA. Δεξιά: Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύονται ανά κύτταρο στις συγκεκριμένες συνθήκες (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 41, ο αριθμός των συμπλόκων HIF-1α/ARNT μειώθηκε σημαντικά παρουσία καμπερόλης και η μείωση αυτή ήταν πιο έντονη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση καμπερόλης (100 μM). Εφόσον παρουσία καμπερόλης ο HIF-1α εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και παρεμποδίζεται ο ετεροδιμερισμός του με τον ARNT, ο αριθμός των συμπλόκων HIF-1α/ARNT πρέπει να μειωθεί, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε με τη μέθοδο *in situ* PLA. Συνεπώς, η ένταση του σήματος PLA πράγματι αντιπροσωπεύει την ένταση σχηματισμού συμπλόκου HIF-1α/ARNT.

3.3.2.2 Κατασκευή και έλεγχος της έκφρασης και της δράσης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pEGFP-HIF-1α 1-347

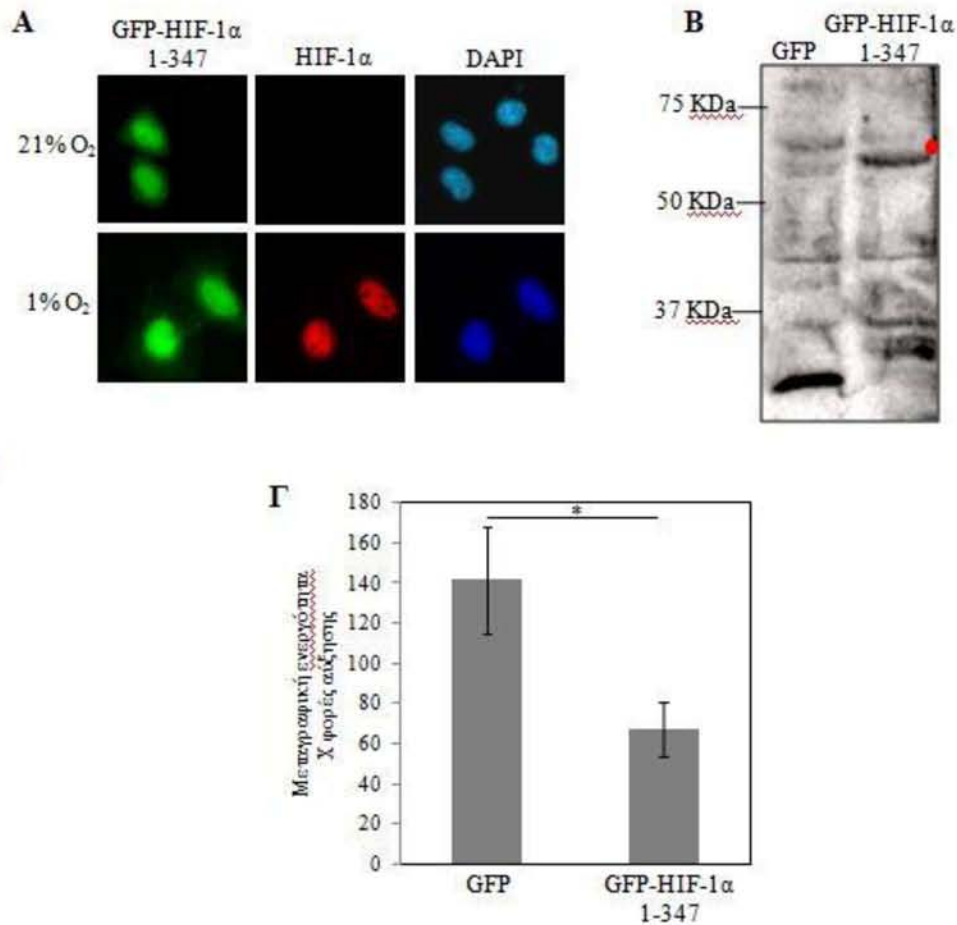
Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της μεθόδου *in situ* PLA, χρησιμοποιήθηκε μια δεύτερη προσέγγιση κατά την οποία επιχειρήθηκε η αναστολή της δημιουργίας συμπλόκων HIF-1α/ARNT όταν και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται ταυτόχρονα μέσα στον πυρήνα, χρησιμοποιώντας το αμινοτελικό τμήμα του HIF-1α (1-347) (Εικόνα 40). Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 με κλωνοποίηση του cDNA του HIF-1α 1-347 στη θέση BamHI του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1.



Εικόνα 42: Κατασκευή και έλεγχος της ορθότητας του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pEGFP-C1-HIF-1α 1-347. Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου με τις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Το cDNA του HIF-1α 1-347 κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1. Δεξιά (πάνω): Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XhoI, για τον έλεγχο του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος. (κάτω): Συγκεντρωτικός πίνακας των τμημάτων DNA του πλασμιδίου pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού.

Ακολούθησε έλεγχος του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και XhoI (Εικόνα 42).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση του παραπάνω πλασμιδίου με τις μεθόδους του φθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης. Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 43).

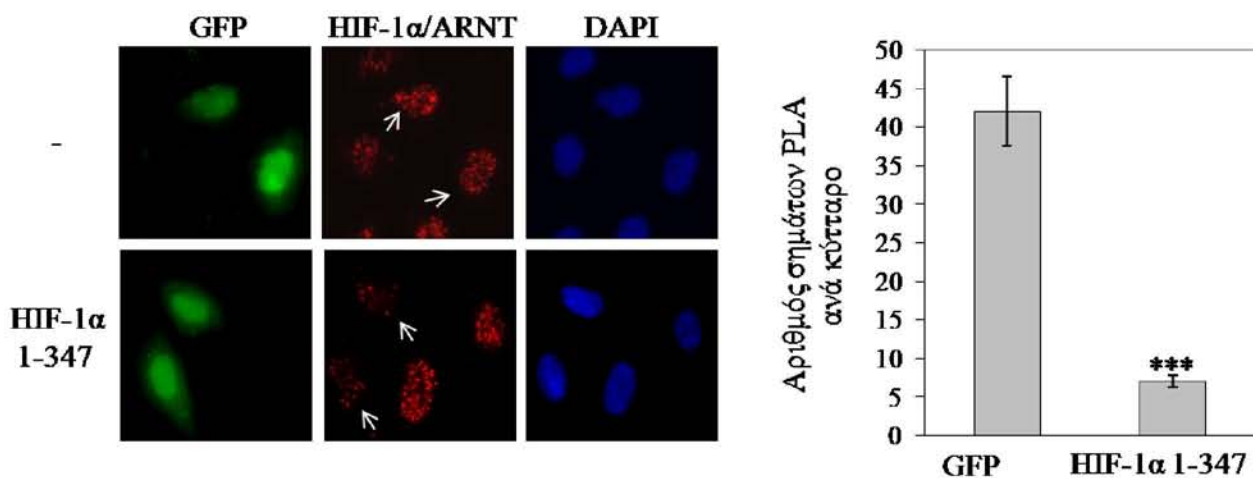


Εικόνα 43: Έλεγχος της έκφρασης και της επίδρασης της υπερέκφρασης του **GFP-HIF-1α 1-347** στη δράση του ενδογενούς **HIF-1**. Α) Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 και 20 ώρες αργότερα επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Ακολούθησε η μέθοδος του φθορισμού για την παρατήρηση του GFP-HIF-1α 1-347 και του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την παρατήρηση του ενδογενούς HIF-1α. Β) Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 και 24 ώρες μετά συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP. Γ) Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς HIF-1, έπειτα από συνδιαμόλυνση κυττάρων HeLa με GFP ή GFP-HIF-1α 1-347 και τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla και επώασή τους για 16 ώρες στην υποξία (1% O₂). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43Α, το πεπτιδίο GFP-HIF-1α 1-347 εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές (21% O₂) όσο και σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Η έκφρασή του, επίσης, επιβεβαιώθηκε και με ανίχνευση των πρωτεϊνικών του επιπέδων στο σωστό μοριακό βάρος (63 KDa) μετά από επώαση με αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 43Β). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς HIF-1 παρουσία του πεπτιδίου στην υποξία, λόγω παρεμπόδισης του ετεροδιμερισμού του ενδογενούς HIF-1α με τον ARNT και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Εικόνα 43Γ) (4).

3.3.2.3 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του πεπτιδίου HIF-1α 1-347 στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA

Ακολούθησαν πειράματα μελέτης της επίδρασης της υπερέκφρασης του πεπτιδίου GFP-HIF-1α 1-347 στο σχηματισμό του συμπλόκου HIF-1α/ARNT με τη μέθοδο *in situ* PLA. Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pEGFP-C1 ή pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 και 20 ώρες μετά τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Ακολούθησε η



Εικόνα 44: Επίδραση της υπερέκφρασης του GFP-HIF-1α 1-347 στο σχηματισμό συμπλόκου HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA. Αριστερά: Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pEGFP-C1 ή pEGFP-C1-HIF-1α 1-347 και 20 ώρες μετά τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT. Τα λευκά βέλη δείχνουν τα διαμολυσμένα κύτταρα. Δεξιά: Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύονται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν GFP ή GFP-HIF-1α 1-347 στις συγκεκριμένες συνθήκες (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT και σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA στα κύτταρα που εκφράζουν είτε το πεπτίδιο GFP-HIF-1α 1-347 είτε τη πρωτεΐνη GFP ως μάρτυρα.

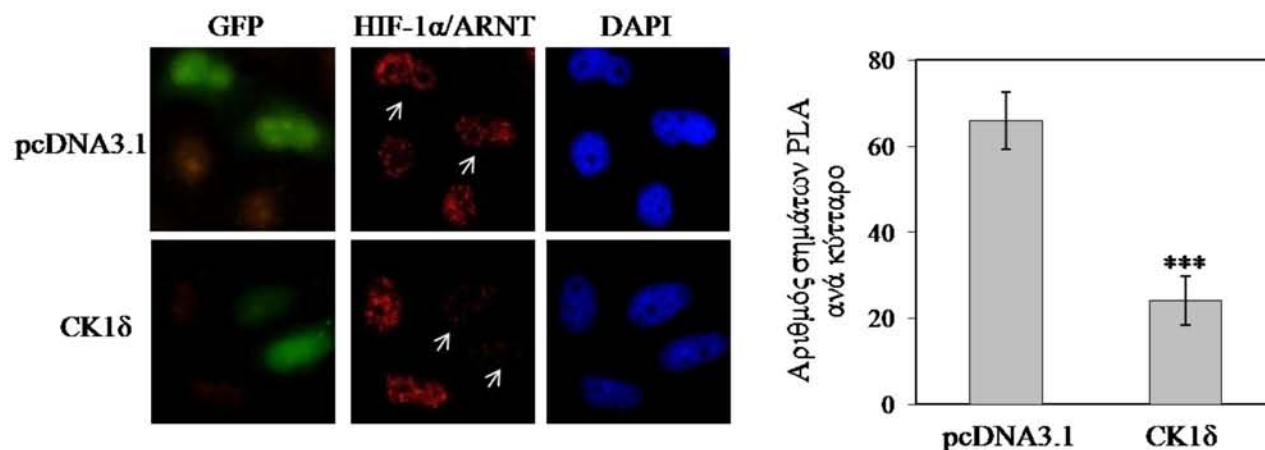
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 44, ο αριθμός συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το πεπτίδιο HIF-1α 1-347 μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τη GFP. Αυτό είναι σε συμφωνία με την παρεμπόδιση του σχηματισμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT, καθώς το συγκεκριμένο πεπτίδιο ανταγωνίζεται τον ενδογενή HIF-1α για ετεροδιμερισμό με τον ARNT.

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω αποτελέσματα, η μέθοδος *in situ* PLA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα πειράματα γιατί παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα όχι μόνο για τον εντοπισμό αλλά και για την σχετική ικανότητα σχηματισμού των συμπλόκων HIF-1α/ARNT μέσα στα κύτταρα.

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ CK1δ ΣΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HIF-1α/ARNT ΜΕΣΑ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

3.4.1 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της CK1δ στον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT

Για τη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασμένης δραστικής μορφής της CK1δ στον ετεροδιμερισμό HIF-1α/ARNT, σε κύτταρα HeLa έγινε συνδιαμόλυνση με τα πλασμίδια pcDNA3.1 ή pcDNA3.1-CK1δ και με το πλασμίδιο pEGFP-C1 και επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT.

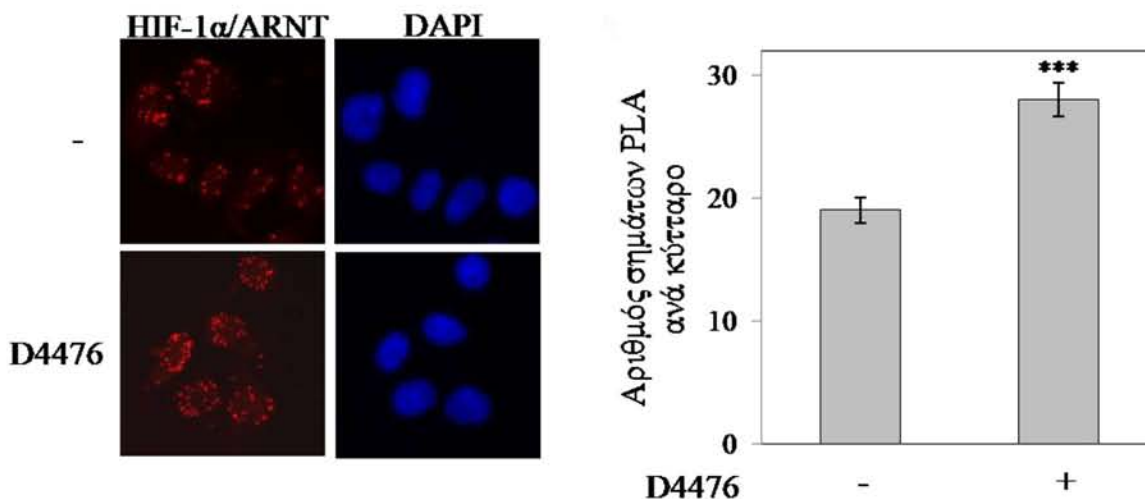


Εικόνα 45: Επίδραση της υπερέκφρασης της CK1δ στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA. Αριστερά: Σε κύτταρα HeLa έγινε συνδιαμόλυνση με τα πλασμίδια pcDNA3.1 ή pcDNA3.1-CK1δ και με το πλασμίδιο pEGFP-C1 και 20 ώρες μετά τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες στην υποξία (1% O₂). Ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT. Δεξιά: Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύονται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν ή όχι τη CK1δ, τις συγκεκριμένες συνθήκες (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Μετά από σχετική ποσοτικοποίηση των πυρηνικών σημάτων στα διαμολυσμένα κύτταρα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των συμπλόκων HIF-1α/ARNT στα κύτταρα που υπερεκφράζουν CK1δ, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν διαμολυνθεί με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα (Εικόνα 45). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η CK1δ εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT μέσα στα κύτταρα και επιβεβαιώνει προηγούμενα *in vitro* αποτελέσματα (216).

3.4.2 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT

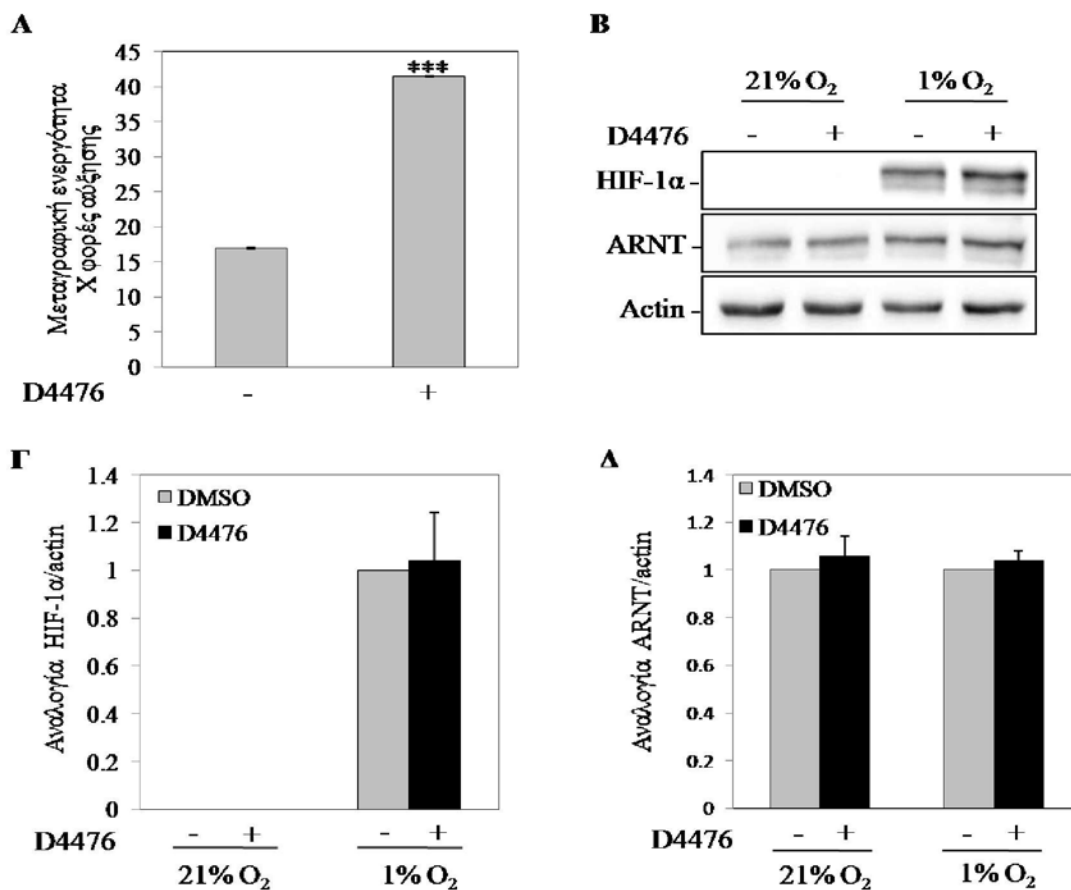
Για την επιβεβαίωση της αρνητικής επίδρασης της CK1δ στην ικανότητα ετεροδιμερισμού του HIF-1α με τον ARNT, κύτταρα HeLa επωάστηκαν με τον ειδικό αναστολέα της CK1δ, D4476, σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και μελετήθηκε η ικανότητα ετεροδιμερισμού του HIF-1α με τον ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 46, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT παρουσία του αναστολέα D4476 σε σύγκριση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 46: Επίδραση της αναστολής της δράσης της CK1δ στο σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *in situ* PLA. *Αριστερά:* Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 4 ώρες στην υποξία (1% O₂) απουσία ή παρουσία 10 μM D4476 και ακολούθησε η μέθοδος *in situ* PLA για την ανίχνευση των συμπλόκων HIF-1α/ARNT. *Δεξιά:* Σχετική ποσοτικοποίηση των σημάτων PLA που αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT που ανιχνεύονται ανά κύτταρο στις συγκεκριμένες συνθήκες (n=50). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

3.4.3 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στη δραστηριότητα του HIF-1 και στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και ARNT

Στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο η αύξηση του αριθμού των συμπλόκων HIF-1 που παρατηρήθηκε παρουσία του αναστολέα D4476 επηρεάζει τη δραστηριότητα του HIF-1, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa, τα οποία επωάστηκαν για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476.



Εικόνα 47: Επίδραση της αναστολής της δράσης της CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και ARNT. Α) Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla και 8 ώρες μετά επωάστηκαν για 16 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10 μM D4476 και μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Β) Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10 μM D4476 και συλλέχθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για τις πρωτεΐνες HIF-1α και ARNT. Γ, Δ) Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων HIF-1α και ARNT χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνη αναφοράς την ακτίνη. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων των τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 47Α, η μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 αυξήθηκε σημαντικά παρουσία του αναστολέα D4476 στην υποξία, ενώ δεν μεταβλήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1α και ARNT στις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 27Β, Γ, Δ). Άρα, η αύξηση της δραστηριότητας του HIF-1 μετά από αναστολή της δράσης της CK1δ οφείλεται στον αυξημένο αριθμό συμπλόκων HIF-1α/ARNT που παρατηρήθηκε στις ίδιες συνθήκες και όχι σε μεταβολή των πρωτεϊνικών τους επιπέδων.

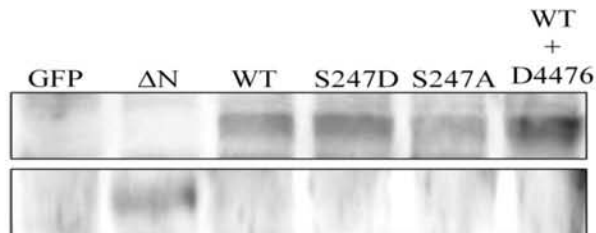
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1δ ΑΠΟ ΤΗΝ CK1δ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη μελέτη της επίδρασης της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ στην κινητικότητα του στον πυρήνα ζωντανών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Με την μέθοδο αυτή εκτιμάται η κινητικότητα των πρωτεϊνών με βάση την ικανότητα ανάκαμψης του φθορισμού τους μετά από φωτολεύκανση. Έτσι, μελετώντας την πυρηνική κινητικότητα διαφόρων μορφών του HIF-1α που έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνονται ή όχι από την CK1δ, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα σχηματισμού ετεροδιμερών HIF-1α/ARNT, τα οποία μπορούν να δεσμευθούν στη χρωματίνη για να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων.

Για τη διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που κωδικοποιούν διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α που φωσφορυλιώνονται ή όχι από τη CK1δ. Συγκεκριμένα, εκτός από τον HIF-1α αγρίου τύπου, χρησιμοποιήθηκαν η μεταλλαγμένη μορφή HIF-1α S247A η οποία δεν φωσφορυλιώνεται από την CK1δ και όπως έχει δειχθεί *in vitro* αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του HIF-1α με τον ARNT και η φωσφομιμητική του μορφή HIF-1α S247D η οποία προκαλεί το αντίθετο αποτέλεσμα (216). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το τμήμα του HIF-1α 348-826 (ΔN), το οποίο δεν μπορεί να ετεροδιμεριστεί με τον ARNT λόγω έλλειψης της PAS περιοχής.

3.5.1 Μελέτη της έκφρασης των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α

Για να διερευνηθεί η έκφραση των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μετέπειτα πειράματα FRAP, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pEGFP-C1-HIF-1α (ΔN), pEGFP-C1- HIF-1α wt απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476, pEGFP-C1-HIF-1αS247D, pEGFP-C1-HIF-1αS247A και pEGFP-C1 ως μάρτυρα. 24 ώρες μετά, ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.



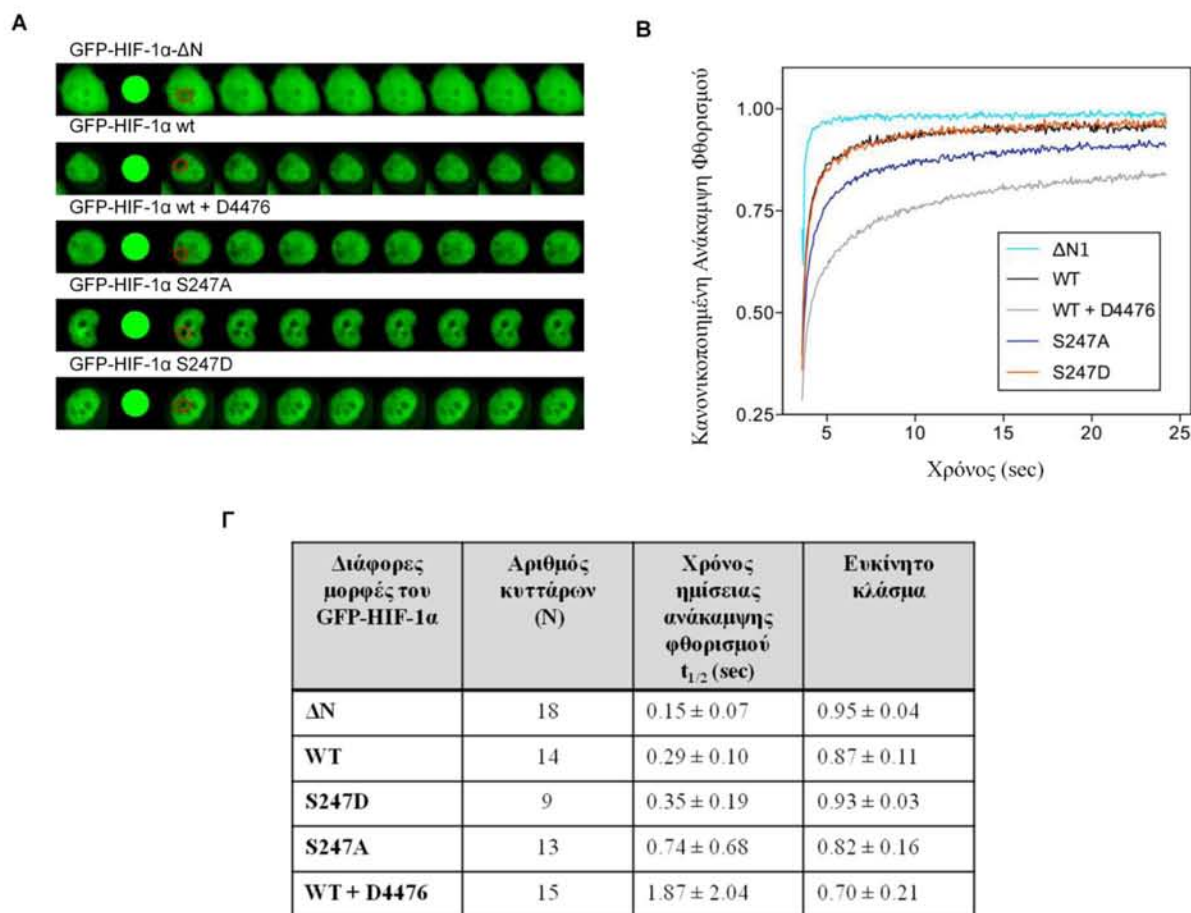
Εικόνα 48: Μελέτη της έκφρασης των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α με ανοσοαποτύπωση. Σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pEGFP-C1-HIF-1α (ΔN), pEGFP-C1- HIF-1α wt απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476, pEGFP-C1-HIF-1αS247D, pEGFP-C1-HIF-1αS247A και pEGFP-C1 ως μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες (21% O₂) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 48, παρατηρήθηκε έκφραση όλων των πρωτεϊνών στο σωστό μοριακό βάρος (GFP HIF-1α WT, S247A, S247D ~ 120 kDa, GFP HIF-1α ΔN ~78 kDa).

3.5.2 Μελέτη της πυρηνικής κινητικότητας των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α που φωσφορυλιώνονται ή όχι από την CK1δ

Για να μελετηθεί η επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ στην πυρηνική κινητικότητά του, σε κύτταρα HeLa έγινε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pEGFP-C1-HIF-1α (ΔN), pEGFP-C1- HIF-1α wt απουσία ή παρουσία του αναστολέα 10 μM D4476 για 4 ώρες, pEGFP-C1-HIF-1αS247D και pEGFP-C1-HIF-1αS247A και 24 ώρες μετά ακολούθησε η μέθοδος FRAP.

Η ποιοτική ανάλυση των καμπυλών FRAP, που δείχνει την ικανότητα ανάκαμψης φθορισμού των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α σε σχέση με το χρόνο, αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην κινητικότητά τους. Στα κύτταρα που εξέφραζαν τη μορφή GFP-HIF-1α (ΔN), που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, παρατηρήθηκε γρήγορη και πλήρης ανάκαμψη φθορισμού υποδεικνύοντας πλήρη διάχυση των μορίων μέσα στον πυρήνα. Η αγρίου τύπου μορφή του GFP-HIF-1α και η φωσφομιμητική του μορφή S247D είχαν παρόμοια συμπεριφορά, ενώ στα κύτταρα που εξέφραζαν τη μορφή GFP-HIF-1α S247A, η οποία δεν φωσφορυλιώνεται από την CK1δ, παρατηρήθηκε μειωμένη ικανότητα ανάκαμψης φθορισμού. Τέλος, η ικανότητα ανάκαμψης φθορισμού μειώθηκε ακόμη περισσότερο στα κύτταρα που εξέφραζαν την αγρίου τύπου μορφή του GFP-HIF-1α παρουσία του αναστολέα της CK1δ, D4476 (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Μελέτη της πυρηνικής κινητικότητας των διαφόρων μορφών GFP-HIF-1α, που φωσφορυλιώνονται ή όχι από την CK1δ, με τη μέθοδο FRAP. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες διαμολυσμένων κυττάρων που εκφράζουν τις συζευγμένες με τη GFP μορφές του HIF-1α. Ο κόκκινος κύκλος υποδηλώνει την περιοχή στην οποία έγινε φωτολευκανση. Β) Καμπύλες ανάκαμψης φθορισμού οι οποίες δείχνουν τη μέση ένταση φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο για τις συζευγμένες με τη GFP πρωτεΐνες HIF-1α ΔN, HIF-1α WT απουσία ή παρουσία 10 μM D4476, HIF-1α S247A, HIF-1α και S247D. Γ) Πίνακας που δείχνει την ανάλυση των παραμέτρων των πειραμάτων FRAP. Με το πρόγραμμα easyFRAP υπολογίστηκαν ο χρόνος ημίσειας ανάκαμψης φθορισμού και το ευκίνητο κλάσμα των πρωτεϊνών στον πυρήνα. Οι αριθμητικές τιμές παρουσιάζουν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση που προέκυψε με βάση τις καμπύλες ανάκαμψης φθορισμού ορισμένου αριθμού κυττάρων. (N= ο αριθμός των κυττάρων που αναλύθηκε για κάθε συνθήκη).

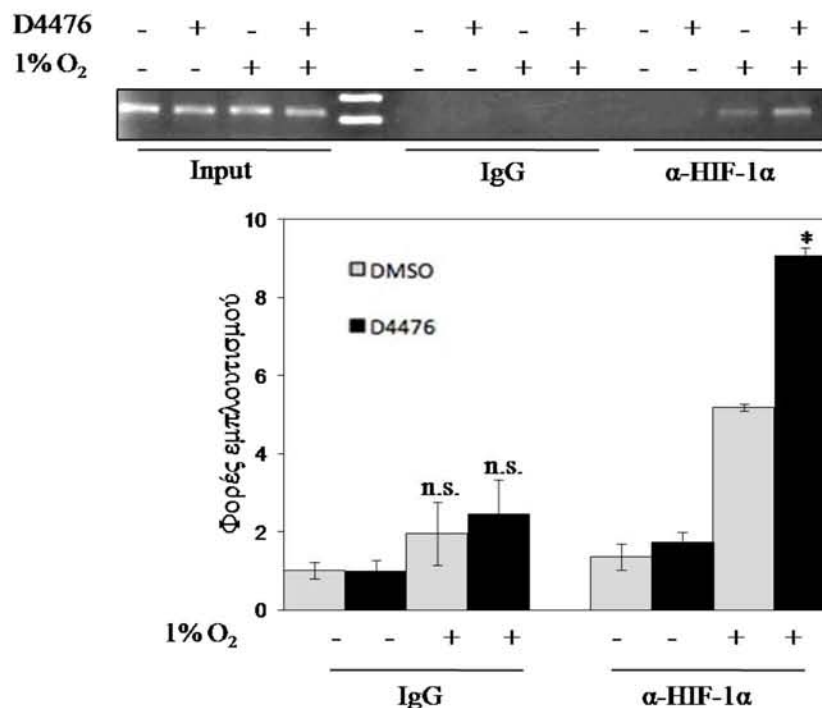
Μετά από ποσοτική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα easyFRAP που επιτρέπει τον υπολογισμό του χρόνου ημίσειας ανάκαμψης φθορισμού ($t_{1/2}$) και το ευκίνητο κλάσμα της πρωτεΐνης, οι τιμές που προέκυψαν επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα μόρια του GFP-HIF-1α (ΔN) ήταν τα πιο ευκίνητα ($0,95 \pm 0,04$) με το μικρότερο $t_{1/2}$ ($0,15 \pm 0,07$), αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι ο GFP-HIF-1α (ΔN) δεν αλληλεπιδρά με τον ARNT και δεν σχηματίζονται λειτουργικά σύμπλοκα για να δεσμευθούν στη χρωματίνη. Ο αγρίου τύπου GFP-HIF-1α και η φωσφομιμητική του μορφή S247D είχαν παρόμοιους χρόνους $t_{1/2}$ ($0,29 \pm 0,10$ και $0,35 \pm 0,19$,

αντίστοιχα) και ευκίνητο κλάσμα ($0,87 \pm 0,11$ και $0,93 \pm 0,03$, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι όλα τα μόρια του GFP-HIF-1α wt φωσφορυλιώνονται από τη κινάση CK1δ στον πυρήνα των ζωντανών κυττάρων. Αντίθετα, η μορφή S247A του GFP-HIF-1α που δεν φωσφορυλιώνεται από την κινάση CK1δ παρουσίασε υψηλότερο $t_{1/2}$ ($0,74 \pm 0,69$) σε σύγκριση με το φωσφομιμητικό μετάλλαγμα S247D υποδεικνύοντας μεγαλύτερη συγγένεια για δέσμευση με τον ARNT και επομένως ισχυρότερη δέσμευση ενεργών συμπλόκων HIF-1 στη χρωματίνη. Στα κύτταρα που εξέφραζαν GFP-HIF-1α wt παρουσία του αναστολέα D4476 ο χρόνος ημίσειας ανάκαμψης φθορισμού ($t_{1/2}$) ήταν ο πιο αργός ($1,87 \pm 2,04$) και το ευκίνητο κλάσμα ($0,70 \pm 0,21$) ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μορφές του GFP-HIF-1α. Οι διαφορές αυτές μεταξύ του GFP-HIF-1α S247A και του GFP-HIF-1α wt παρουσία του αναστολέα D4476 υποδηλώνουν επιπρόσθετο ρόλο για την CK1δ, δηλαδή την ύπαρξη και άλλης ή άλλων θέσεων φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ ή την επίδραση της κινάσης στην πρωτεΐνη ARNT.

3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1δ ΑΠΟ ΤΗΝ CK1δ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ

3.6.1 Διερεύνηση της επίδρασης της αναστολής της CK1δ στην έκφραση της λιπίνης-1

Εφόσον παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 παρουσία του αναστολέα D4476, διερευνήθηκε η επίδραση του αναστολέα στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *LPIN1*, το οποίο όπως έχει δειχθεί σε πρόσφατη μελέτη είναι στόχος του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας (94). Για το λόγο αυτό, κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 8 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476 και ακολούθησε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του HRE του υποκινητή του γονιδίου *LPIN1*, στο οποίο προσδένεται ο HIF-1, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και επακόλουθη real-time RCR.

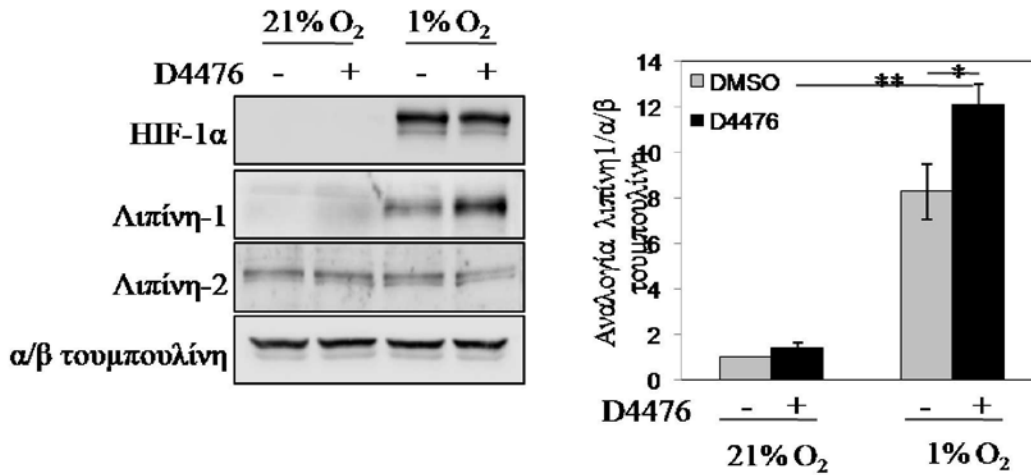


Εικόνα 50: Επίδραση της αναστολής της CK1δ στην ικανότητα δέσμευσης του HIF-1α στον υποκινητή του γονιδίου *LPIN1*. Πάνω: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων real-time PCR που προέκυψαν μετά από ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με το αντι-HIF-1α ή με IgG ως αρνητικό μάρτυρα, από κύτταρα Huh7 τα οποία επώαστηκαν για 8 ώρες σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10μM D4476. Κάτω: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με real-time PCR. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που στο καθένα υπήρχαν τρεις τιμές για το κάθε δείγμα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, n.s. P>0,05).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 50, η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *LPIN1* στην οποία προσδένεται ο HIF-1, ανοσοκατακρημνίστηκε σε συνθήκες υποξίας χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1α, ενώ αντίθετα δεν ανοσοκατακρημνίστηκε σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂) ή μετά από ανοσοκατακρήμιση με IgG. Η απομόνωση του υποκινητή του γονιδίου *LPIN1* ενισχύθηκε σημαντικά παρουσία του αναστολέα της CK1δ, D4476 σε συνθήκες υποξίας. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι μετά από αναστολή της CK1δ ενισχύεται η πρόσδεση του HIF-1α στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου του *LPIN1* σε συνθήκες υποξίας ώστε να επάγει τη μεταγραφή του.

Για να επαληθευθεί το παραπάνω αποτέλεσμα, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του προϊόντος του γονιδίου *LPIN1*, που είναι η λιπίνη-1, στις ίδιες συνθήκες. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476 και ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με

ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση των επιπέδων των πρωτεϊνών HIF-1α, λιπίνη-1 και λιπίνη-2 ως αρνητικό μάρτυρα καθώς δεν αποτελεί στόχο του HIF-1.



Εικόνα 51: Επίδραση της αναστολής της CK1δ στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α, της λιπίνης-1 και της λιπίνης-2. Αριστερά: Ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa, τα οποία επωάστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10μM D4476, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα αντι-HIF-1α, αντι-lipin1 και αντι-lipin2. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η α/β τουμπουλίνη. Δεξιά: Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της λιπίνης-1 μετά από κανονικοποίηση με την πρωτεΐνη αναφοράς α/β τουμπουλίνη. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01).

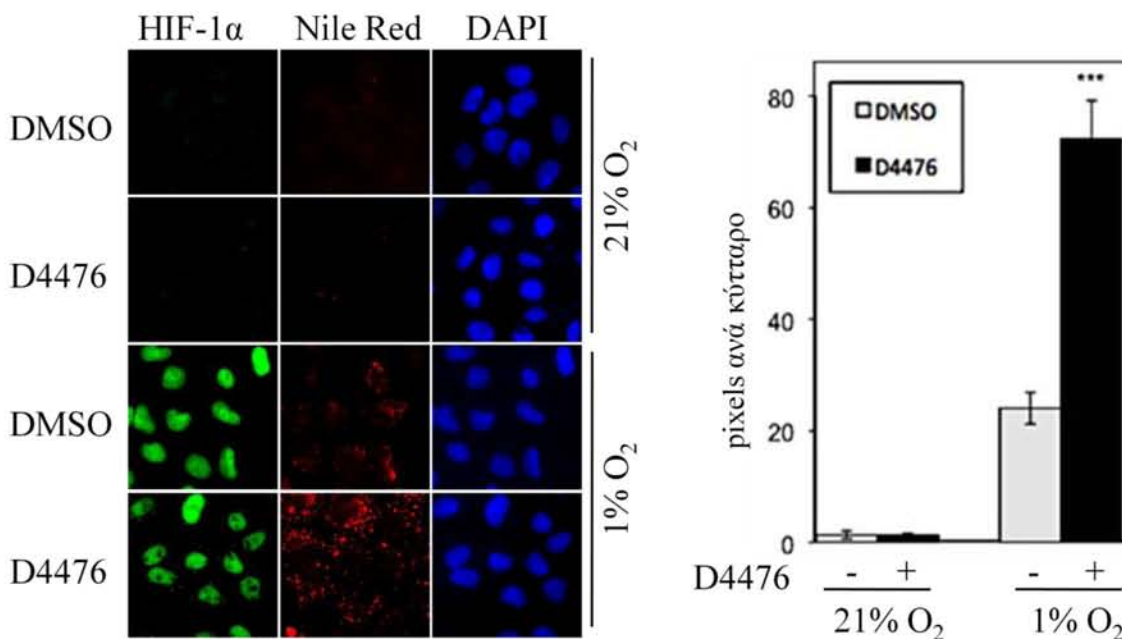
Παρατηρήθηκε έκφραση της λιπίνης-1 μόνο σε συνθήκες υποξίας, η οποία ενισχύθηκε παρουσία του αναστολέα D4476. Αντίθετα, δεν μεταβλήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και της λιπίνης-2 (Εικόνα 51).

Συνδυάζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η αναστολή της CK1δ ενισχύει την πρόσδεση του HIF-1α στον υποκινητή του γονιδίου LPIN1 στην υποξία, γεγονός που οδηγεί σε ενισχυμένη έκφραση της πρωτεΐνης λιπίνης-1.

3.6.2 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της δράσης της CK1δ στον σχηματισμό λιποσταγονιδίων

Όπως έχει αναφερθεί, η λιπίνη-1 είναι το ένζυμο που καταλύει το προτελευταίο στάδιο της σύνθεσης των τριγλυκεριδίων τα οποία αποθηκεύονται στο εσωτερικό των λιποσταγονιδίων, που είναι η κύρια αποθήκη ουδέτερων λιπιδίων σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Έτσι, στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της αναστολής της CK1δ στον σχηματισμό λιποσταγονιδίων σε κύτταρα HeLa, τα οποία επωάστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές

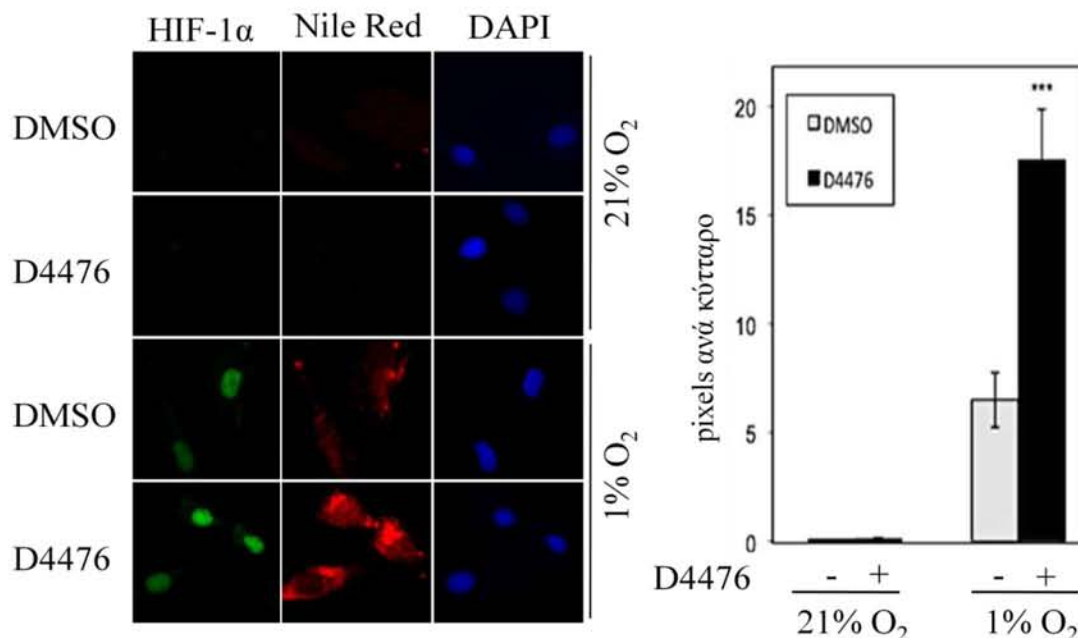
συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για τον ενδογενή HIF-1α και χρώση με Nile Red για την ανίχνευση των λιποσταγονιδίων.



Εικόνα 52: Επίδραση της αναστολής της CK1δ στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων σε καρκινικά κύτταρα.
Αριστερά: Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10μM D4476 και υποβλήθηκαν στη διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ενδογενούς HIF-1α με αντι-HIF-1α και έγινε χρώση με Nile Red για τη παρατήρηση των λιποσταγονιδίων. *Δεξιά:* Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των λιποσταγονιδίων με το πρόγραμμα ImageJ. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο των pixels ανά κύτταρο (συνολικά 50 κύτταρα). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 52, δεν παρατηρήθηκαν λιποσταγονίδια σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476, ενώ σε υποξικές συνθήκες παρατηρήθηκε συσσώρευση λιποσταγονιδίων, η οποία ήταν πολύ μεγαλύτερη παρουσία του αναστολέα D4476.

Η ίδια διαδικασία έγινε και σε μη καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας πρωτογενή ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (hSMB), τα οποία επώαστηκαν για 48 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία του αναστολέα D4476.



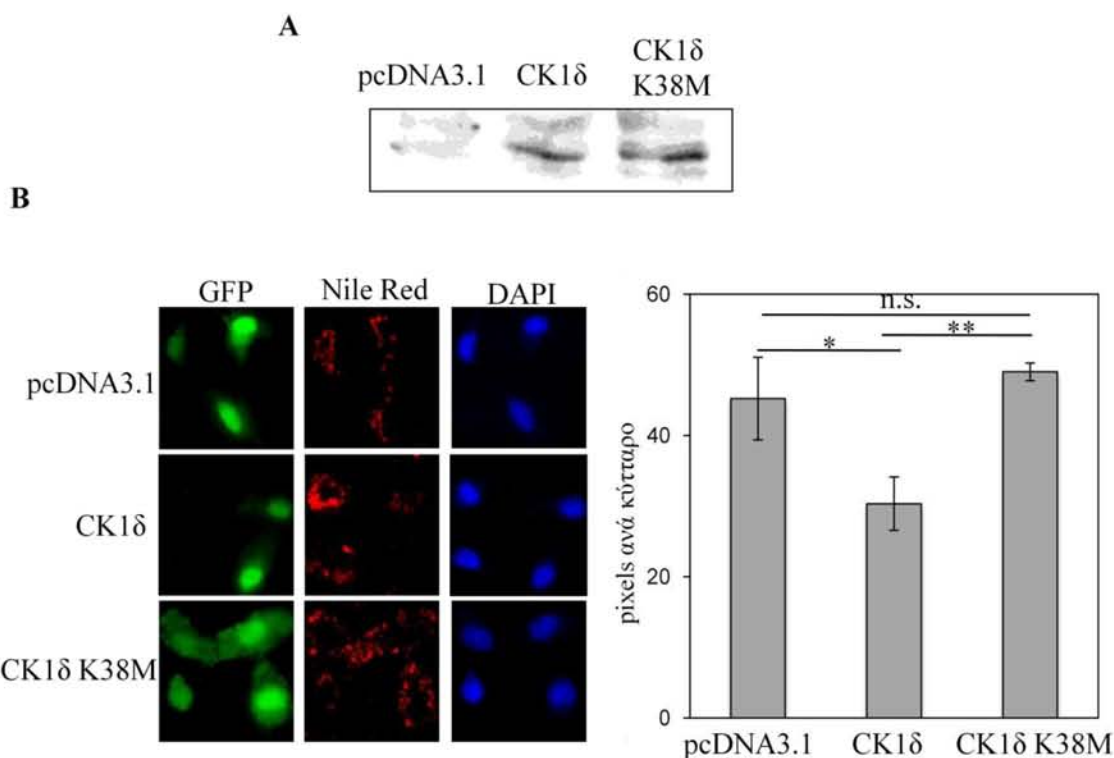
Εικόνα 53: Επίδραση της αναστολής της CK1δ στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων σε μη καρκινικά κύτταρα
Αριστερά: Κύτταρα hSMB επώαστηκαν για 48 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, απουσία ή παρουσία 10μM D4476 και υποβλήθηκαν στη διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ενδογενούς HIF-1α με αντι-HIF-1α και έγινε χρώση με Nile Red για τη παρατήρηση των λιποσταγονιδίων. *Δεξιά:* Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των λιποσταγονιδίων με το πρόγραμμα ImageJ. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο των pixels ανά κύτταρο (συνολικά 50 κύτταρα). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Τα αποτελέσματα ήταν όμοια με αυτά των καρκινικών κυττάρων HeLa, δηλαδή παρατηρήθηκε συσσώρευση λιποσταγονιδίων μόνο σε συνθήκες υποξίας η οποία ενισχύθηκε παρουσία του αναστολέα D4476. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ρυθμιστικός μηχανισμός μέσω του άξονα CK1δ-HIF-1α-λιπίνη-1 είναι γενικός και δεν επηρεάζεται από το βαθμό μετασχηματισμού των κυττάρων.

3.6.3 Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της CK1δ στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε υπερέκφραση της καταλυτικά ενεργής μορφής της CK1δ ή της μεταλλαγμένης αδρανούς μορφής της K38M μαζί με τη πρωτεΐνη GFP, ώστε να είναι δυνατός ο εντοπισμός των διαμολυσμένων κυττάρων HeLa. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση ακολούθησε επώαση για άλλες 24 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1%

O₂). Η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνικών μορφών της CK1δ στα κύτταρα HeLa ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση.

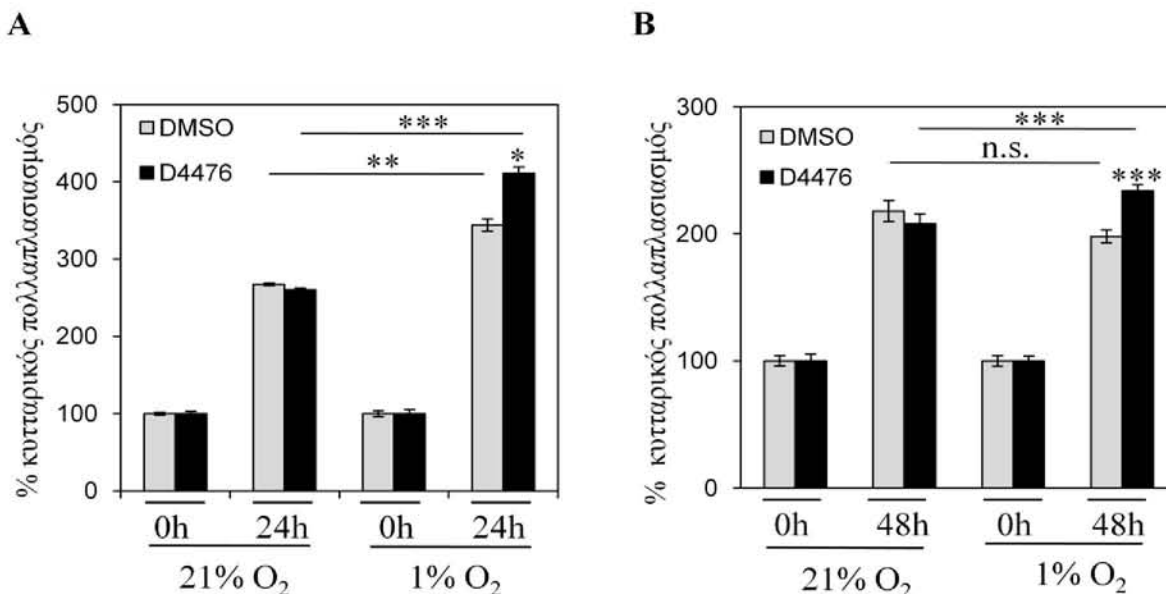


Εικόνα 54: Επίδραση της υπερέκφρασης της CK1δ στο σχηματισμό λιποσταγονιδίων. Α) Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που είχαν διαμολυνθεί με τα πλασμίδια pcDNA3.1-CK1δ, pcDNA3.1-CK1δK38M ή τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 ως μάρτυρα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CK1δ, Β) *Αριστερά:* Κύτταρα HeLa συνδιαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP και pcDNA3.1-CK1δ ή pcDNA3.1-CK1δK38M και 24 ώρες μετά επωάστηκαν για 24 ώρες σε υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων για μικροσκοπία φθορισμού και χρώση με Nile red για τη παρατήρηση των λιποσταγονιδίων. *Δεξιά:* Ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των λιποσταγονιδίων με το πρόγραμμα ImageJ. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο των pixels ανά κύτταρο (συνολικά 50 κύτταρα). Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, ^{ns} P>0,05).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 54, παρατηρήθηκε πρωτεϊνική έκφραση τόσο της αγρίου τύπου μορφής της CK1δ όσο και της μη δραστηκής της μορφής K38M (Εικόνα 54Α). Στα κύτταρα που εκφράζουν τη δραστική μορφή της CK1δ μειώθηκε η συσσώρευση των λιποσταγονιδίων σε αντίθεση με τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την αδρανή μορφή της (Εικόνα 54Β). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα παραπάνω ευρήματα που έδειξαν ότι η αναστολή της CK1δ αύξησε το σχηματισμό λιποσταγονιδίων.

3.6.4 Μελέτη της επίδρασης της αναστολής της δράσης της CK1δ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της αναστολής της CK1δ στην επιβίωση τόσο καρκινικών όσο και μη καρκινικών κυττάρων. Έτσι, κύτταρα HeLa ή hBSM, επώαστηκαν για 24 ή 48 ώρες αντίστοιχα, σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία D4476 και μελετήθηκε η επιβίωσή τους με τη μέθοδο MTS (Εικόνα 55).

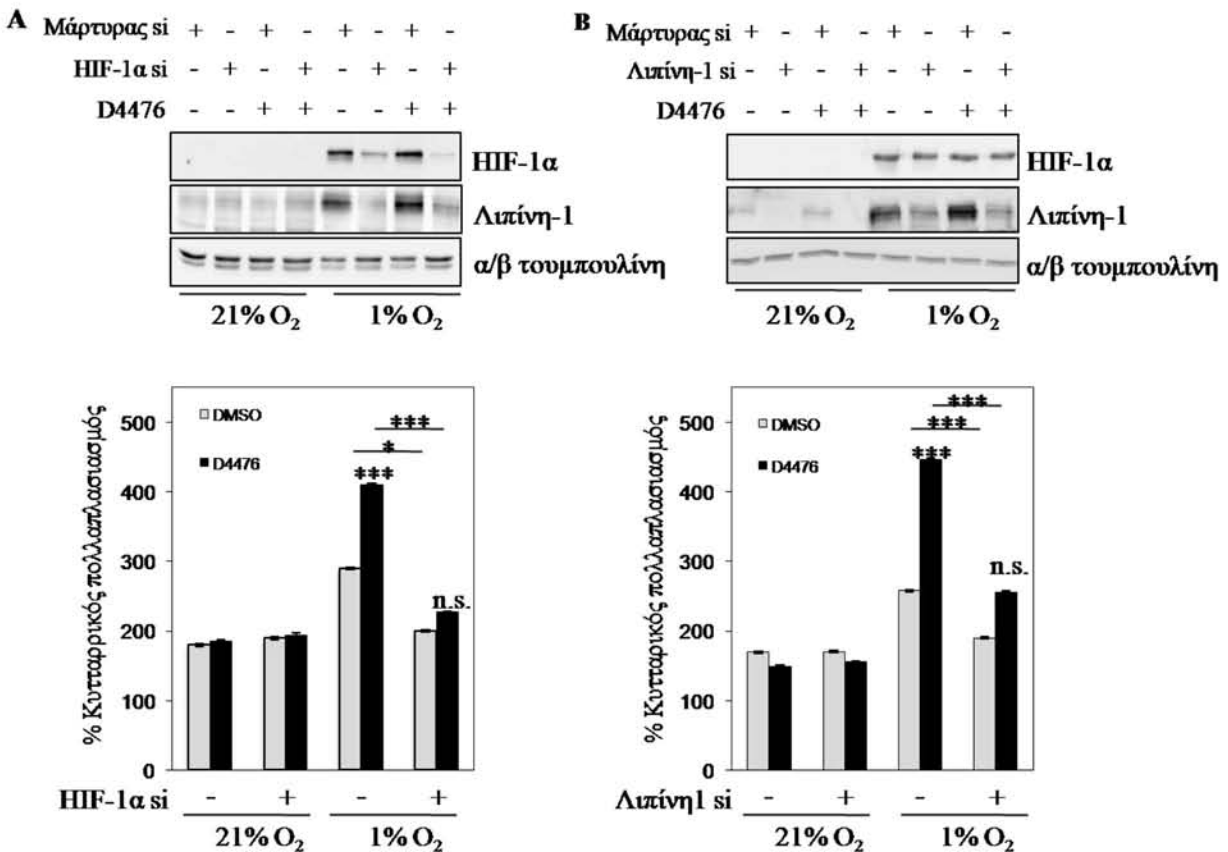


Εικόνα 55: Επίδραση της αναστολής της CK1δ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κύτταρα A) HeLa ή B) hBSM επώαστηκαν για 24 ή 48 ώρες αντίστοιχα, σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία 10 μM D4476, και μελετήθηκε η επιβίωσή τους με τη μέθοδο MTS. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 9 τιμών που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,01, n.s.P>0,05).

Όπως παρατηρήθηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές, η αναστολή της δράσης της CK1δ δεν επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Ωστόσο, ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων ευνοήθηκε από την υποξία, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε για τα πρωτογενή κύτταρα. Η παρουσία του αναστολέα D4476 προκάλεσε στατιστικά σημαντική ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και των καρκινικών (Εικόνα 55A) και των μη καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 55B) σε συνθήκες υποξίας. Έτσι, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει για πρώτη φορά η αρνητική επίδραση της CK1δ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συνθήκες υποξίας μέσω εμπλοκής της στον κυτταρικό μεταβολισμό.

3.6.5 Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω αναστολής της CK1δ εξαρτάται από τον HIF-1α και τη λιπίνη-1

Για να επιβεβαιωθεί ότι η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον αναστολέα D4476 γίνεται μέσω του άξονα CK1δ-HIF-1α-λιπίνη-1 και όχι μέσω μιας άλλης ανεξάρτητης δράσης του αναστολέα ή της CK1δ, έγιναν πειράματα αποσιώπησης του HIF-1α ή της λιπίνης-1 με siRNA σε κύτταρα HeLa σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία D4476. Μελετήθηκαν παράλληλα τόσο η έκφραση των πρωτεϊνών όσο και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετά από 24 ώρες επώασης.



Εικόνα 56: Η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω αναστολής της CK1δ εξαρτάται από τον HIF-1α και τη λιπίνη-1. A) και B) Πάνω: Αποτελέσματα που προέκυψαν με ανάλυση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για τις πρωτεΐνες HIF-1α και λιπίνη-1 μετά από αποσιώπηση της έκφρασής τους με τα αντίστοιχα siRNAs. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το siRNA μάρτυρα ή με το siRNA για τον HIF-1α ή τη λιπίνη-1 και 24 ώρες μετά επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂), απουσία ή παρουσία 10μM D4476. Κάτω: Διαγράμματα που δείχνουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων HeLa στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφηκαν προηγουμένως. Οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο όρο 9 τιμών που προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,01, ^{n.s}P>0,05).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α προκάλεσε μείωση της έκφρασης της λιπίνης-1 στην υποξία (Εικόνα 56A, πάνω), ενώ η αποσιώπηση της λιπίνης-1

δεν επηρέασε την έκφραση του HIF-1α (Εικόνα 56B, πάνω), ευρήματα που συμφωνούν με προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα (94). Όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, φάνηκε ότι η αύξηση πολλαπλασιασμού των συγκεκριμένων κυττάρων στην υποξία αναστέλλεται μετά από αποσιώπηση είτε του HIF-1α ή της λιπίνης-1. Η ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία του αναστολέα D4476 στην υποξία, ανεστάλη μετά από αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α ή της λιπίνης-1 (Εικόνα 56A, B, κάτω). Αυτό αποδεικνύει ότι η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού γίνεται όντως μέσω της επίδρασης της CK1δ στη δράση του HIF-1α και στην έκφραση της λιπίνης-1.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα επίπεδα οξυγόνου και ιδιαίτερα ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, οι ισχαιμικές και οι φλεγμονώδεις ασθένειες. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να διελευκανθούν νέοι μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης του HIF-1 που θα συμβάλλουν στην κατανόηση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία ώστε να αποτελέσουν τη βάση για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί αρκετοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1 υποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα και την προσαρμοστικότητα των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α εκφράζεται συνεχώς, υδροξυλιώνεται από τις PHDs και αποικοδομείται ταχύτατα στο πρωτεόσωμα, ενώ κατά την υποξία η απώλεια οξυγόνου καθιστά τις PHDs ανενεργές σταθεροποιώντας τον HIF-1α και ενεργοποιώντας τη μεταγραφική δράση του. Εκτός από την οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση, ο HIF-1α ρυθμίζεται και από ανεξάρτητους από το οξυγόνο μηχανισμούς σε επίπεδο μεταγραφής μέσω του NF-kB (107, 108, 110) σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης με την εμπλοκή των μονοπατιών PI3K-Akt και Ras-MAPK (3), σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας και δραστηριότητας μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν θετική επίδραση στην μεταγραφική του ενεργότητα όπως είναι η αλληλεπίδρασή του με την HSP90 (121) ή αρνητική επίδραση όπως είναι η αλληλεπίδρασή του με την MgcRacGap (126) και τη σιρτουΐνη-6 (138).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-1α επίσης παίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του, όπως η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α μπορεί να ενισχύσει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, όπως αυτό συμβαίνει μετά από φωσφορυλίωση από τις κινάσες CDK1 (214), ATM (215) και ERK1/2 (9), ενώ η φωσφορυλίωση από τις κινάσες CK1δ (216), GSK3β (217) και PLK3 (218) έχει αντίθετο αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 στις σερίνες 641/643 (10) λειτουργεί ως κάλυμμα ενός σήματος πυρηνικής εξόδου (NES) με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα μέσω της εξπορτίνης CRM1 και να ενισχύεται η μεταγραφική του ενεργότητα (9). Η ελάχιστη επικράτεια του HIF-1α που περιλαμβάνει το NES και τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, που καλείται ETD (ERK1/2 Target Domain), όταν

υπερεκφράζεται ως ανεξάρτητο πολυπεπτιδίο μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος σε αντίθεση με τη μεταλλαγμένη μορφή ETD S→A η οποία δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες (9). Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ στην σερίνη 247 μειώνει την μεταγραφική του ενεργότητα καθώς όπως έχει δειχθεί με *in vitro* πειράματα παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον ARNT (216).

Στην παρούσα εργασία, που αποτελεί συνέχεια των προηγούμενων μελετών της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 και CK1δ, το πρώτο μέρος αφορά την μελέτη της επίδρασης της έκφρασης διαφόρων μορφών της επικράτειας ETD που μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες ERK1/2 ή που μιμούνται τη φωσφορυλίωση αυτή στον υποκυτταρικό εντοπισμό και στη δράση του HIF-1 στην υποξία και στην μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η ρύθμιση του σχηματισμού συμπλόκων HIF-1α/ ARNT στα κύτταρα από τη κινάση CK1δ και ο ρόλος της στον μεταβολισμό και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην υποξία.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιώντας καρκινικά και μη καρκινικά κύτταρα καθώς και διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς συνεχούς ή επαγωγίμης έκφρασης παρατηρήθηκε, ότι τα πεπτιδία του HIF-1α (ETD wt, ETD I→A) τα οποία διαθέτουν τις δύο θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Ser641/643) ή που μιμούνται αυτή τη φωσφορυλίωση (ETD S→E) εντοπίστηκαν στον πυρήνα. Αντίθετα το πεπτιδίο ETD S→A, στο οποίο οι σερίνες 641/643 έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνες, οπότε δεν μπορούν να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες ERK1/2, εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης για τα ίδια πεπτιδία ETD που ήταν σε σύζευξη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (9) και δείχνουν ότι ο κυτταρικός εντοπισμός τους δεν επηρεάζεται από τον βαθμό μετασχηματισμού των κυττάρων και από τον τρόπο έκφρασής τους. Ωστόσο, στη παρούσα μελέτη δεν κατέστη εφικτή η παρατήρηση του διπλά μεταλλαγμένου πεπτιδίου FLAG-ETD I→A/S→A τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποξικές συνθήκες, πιθανόν λόγω τοξικής του δράσης στα κύτταρα. Σε προηγούμενη μελέτη επιτεύχθηκε η παρατήρηση του ίδιου πεπτιδίου που ήταν συζευγμένο με την GFP στον πυρήνα των κυττάρων, πιθανόν γιατί η GFP λόγω του μεγάλου μεγέθους της σε σχέση με τον επίτοπο FLAG (8 αμινοξέα) μπορεί να αποτρέπει την τοξική αυτή δράση του πεπτιδίου ETD I→A/S→A.

Μετά την υπερέκφραση των πεπτιδίων ETD ως ανεξάρτητα πολυπεπτιδία, τα πεπτιδία που είναι δυνατόν να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες ERK1/2, όπως είναι τα ETD wt και I→A,

καθώς και το φωσφομιμητικό πεπτιδίο ETD S→E, αντί να είναι διάχυτα στο κύτταρο λόγω του μικρού τους μεγέθους (42 αμινοξέα), εντοπίζονται στον πυρήνα. Ο πυρηνικός εντοπισμός του ETD wt εξηγείται μέσω της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων Ser641/643 που περιέχει από τις ERK1/2, γεγονός που παρεμποδίζει την εξαγωγή του από τον πυρήνα μέσω της CRM1, αλλά και πιθανόν μπορεί να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με κάποια άλλη πρωτεΐνη του πυρήνα. Το πεπτιδίο ETD I→A είναι το κατεξοχήν πυρηνικό πεπτιδίο λόγω μετάλλαξης στο σήμα πυρηνικής εξόδου (NES) οπότε δεν μπορεί να εξέλθει από τον πυρήνα. Πυρηνικό, επίσης είναι και το πεπτιδίο ETD S→E το οποίο μιμείται τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2 μέσω μετάλλαξης του καταλοίπου Ser641 σε γλουταμινικό οξύ (E). Αντίθετα, το πεπτιδίο ETD S→A, που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες ERK1/2 λόγω μετάλλαξης των δύο καταλοίπων σερίνης Ser641/643 σε αλανίνη, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Η έκφραση των πυρηνικών πεπτιδίων FLAG ETD wt και I→A στα κύτταρα απέκλεισε από τον πυρήνα τόσο τον εξωγενή GFP-HIF-1α όσο και τον ενδογενή HIF-1α, και ιδιαίτερα παρουσία του κατεξοχήν πυρηνικού πεπτιδίου ETD I→A προκλήθηκε πλήρης μετακίνηση του GFP-HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και μειωμένο σήμα για τον ενδογενή HIF-1α. Αντίθετα, το FLAG ETD S→A δεν μετέβαλε τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α. Το κυτταροπλασματικό σήμα του HIF-1α παρουσία των πυρηνικών πεπτιδίων FLAG ETD μπορεί να εξηγηθεί μέσω της ανταγωνιστικής δράσης που ασκούν τα πεπτιδία για φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2, οπότε το κλάσμα του HIF-1α που δεν φωσφορυλιώνεται εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω αλληλεπίδρασης με την εξπορτίνη CRM1. Το γεγονός όμως ότι το FLAG ETD S→E προκάλεσε την εξαγωγή στο κυτταρόπλασμα του ενδογενούς HIF-1α πιθανόν να υποδηλώνει και μια επιπλέον δράση του πεπτιδίου στη ρύθμιση κάποιας πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του HIF-1α στον πυρήνα.

Ο παραπάνω μηχανισμός δράσης των πεπτιδίων εξηγεί και την ανασταλτική δράση της έκφρασης των πυρηνικών πεπτιδίων FLAG ETD στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 σε συνθήκες υποξίας τόσο σε καρκινικά όσο και σε μη καρκινικά κύτταρα, καθώς τα πεπτιδία που προκαλούν τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του HIF-1α ανέστειλαν τη μεταγραφική ενεργότητα, με το ETD I→A να έχει την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση σε κάθε κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε μετά από συνεχή ή επαγωγίμη έκφρασή του. Ωστόσο, μετά από επαγωγίμη έκφραση των πεπτιδίων δεν παρατηρήθηκε τόσο ισχυρή ανασταλτική δράση των πεπτιδίων όπως παρατηρήθηκε μετά από συνεχή έκφρασή τους. Αυτό μπορεί να

οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν στην περίπτωση του συστήματος TET OFF, στις οποίες η έκφραση των πεπτιδίων που επιτυγχάνεται να μην είναι ικανή να αναστείλει τόσο ισχυρά την δραστικότητα του HIF-1. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το σύστημα TET OFF, σε κύτταρα που εξέφρασαν με επαγωγίμο τρόπο το πεπτιδίο FLAG ETD I→A, δεν παρατηρήθηκε κυτταροπλασματικό ή μειωμένο σήμα για τον ενδογενή HIF-1α όπως παρατηρήθηκε μετά από μη επαγωγίμη έκφρασή του. Υπάρχει πιθανότητα στην προκειμένη περίπτωση η ανασταλτική ικανότητα του πεπτιδίου ETD I→A να εκδηλώνεται κυρίως μέσω ρύθμισης κάποιας πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του HIF-1α και όχι τόσο λόγω ανταγωνισμού για φωσφορυλίωση από τις ERK1/2. Ωστόσο, το εύρημα αυτό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και με άλλες μεθόδους εκτός του ανοσοφθορισμού.

Η ρύθμιση της δράσης του HIF-1α μέσω πεπτιδίων που προέρχονται από διάφορες επικράτειες του έχουν αναφερθεί και σε άλλες ερευνητικές μελέτες. Έχειδειχθεί ότι η έκφραση πεπτιδίων του HIF-1α που προέρχονται από την επικράτεια ODD, που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, σταθεροποιούν τον HIF-1α και αυξάνουν τη μεταγραφική του ενεργότητα, επάγοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και στον μεταβολισμό (260). Αντίθετα, η έκφραση του πεπτιδίου C-TAD (786-826) του HIF-1α είχε αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, μέσω παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές του p300 και CREB, γεγονός που προκάλεσε μείωση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων καθώς και των καρκινικών όγκων σε ζενομοσχεύματα ποντικών (261). Στη παρούσα εργασία το αποτέλεσμα της ανασταλτικής δράσης των πεπτιδίων ETD wt και I→A ήταν η μείωση του σχηματισμού λιποσταγονιδίων σε καρκινικά κύτταρα στην υποξία, και μένει να διερευνηθεί το αποτέλεσμα της δράσης αυτής στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για να μελετηθεί αυτό πρέπει να κατασκευαστούν σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που θα εκφράζουν τα πεπτιδία αυτά συνεχώς ή με επαγωγίμο τρόπο, χρησιμοποιώντας για παράδειγμα το σύστημα TET OFF, ώστε να αποφευχθεί τυχόν τοξικότητα από τη συνεχή έκφρασή τους. Στη παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η κατασκευή σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων tTA-HerG2 για τα πεπτιδία FLAG ETD S→A και I→A, ωστόσο δεν ήταν εφικτή η απομόνωση σταθερά διαμολυσμένων κλώνων. Οι παραπάνω μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1α θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλεία στην αντικαρκινική θεραπεία όπου στόχος είναι η αναστολή της δράσης του HIF-1 καθώς συνδέεται με την κακή πρόγνωση και εξέλιξη της νόσου (156).

Η δράση του HIF-1α αναστέλεται, εκτός από τα πεπτιδία, και μέσω χημικών ουσιών που στοχεύουν την μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A*, την μετάφραση του mRNA του HIF-1α, την αποικοδόμησή του, την δέσμευσή του στο DNA και τη μεταγραφική του ενεργότητα (200). Για παράδειγμα, η τοποτεκάνη (topotecan), που είναι αναστολέας της τοποϊσομεράσης I, εμποδίζει την μετάφραση του mRNA του HIF-1α (202) και στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί η διγοξίνη, η οποία όμως εκδηλώνει τοξικότητα (204). Επιπλέον, η αναστολή μονοπατιών όπως των mTOR και ERK1/2 επηρεάζει τη δράση του HIF-1α. Συγκεκριμένα, η αναστολή των κινασών ERK1/2 από τον αναστολέα PD-98059 ή από φυσικές ουσίες που ανήκουν στα φλαβονοειδή όπως η καμπφερόλη αναστέλλει τη δράση του HIF-1, εμποδίζοντας τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και μειώνει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων (205, 206). Μια άλλη προσέγγιση στη θεραπεία ανθρώπινων καρκινικών όγκων είναι η χρήση ανθρωποποιημένων μονοκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στον VEGF-A (bevacizumab), τα οποία όμως απαιτούν τη συνδυαστική δράση με γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (262). Όπως έδειξε πρόσφατη μελέτη η συνδυαστική δράση της μπεβασιζουμάμπης (bevacizumab) με την τοποτεκάνη (topotecan) μείωσε τη δραστηριότητα του HIF-1 και προκάλεσε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, όταν η μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab) χρησιμοποιήθηκε μόνη της είχε αρνητικά αποτελέσματα καθώς αύξησε την δραστηριότητα του HIF-1, και δεν προκάλεσε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, παρά το γεγονός ότι μείωσε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (263). Προκύπτει, λοιπόν, ότι η χρήση χημικών ουσιών για την αναστολή του HIF-1α ή αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα στην αντικαρκινική θεραπεία, είτε γιατί μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή των υγιών κυττάρων και άλλες μη ειδικές παρενέργειες είτε γιατί από μόνα τους δεν μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να επιτευχθεί μόνο μετά από τη συνδυαστική δράση τους.

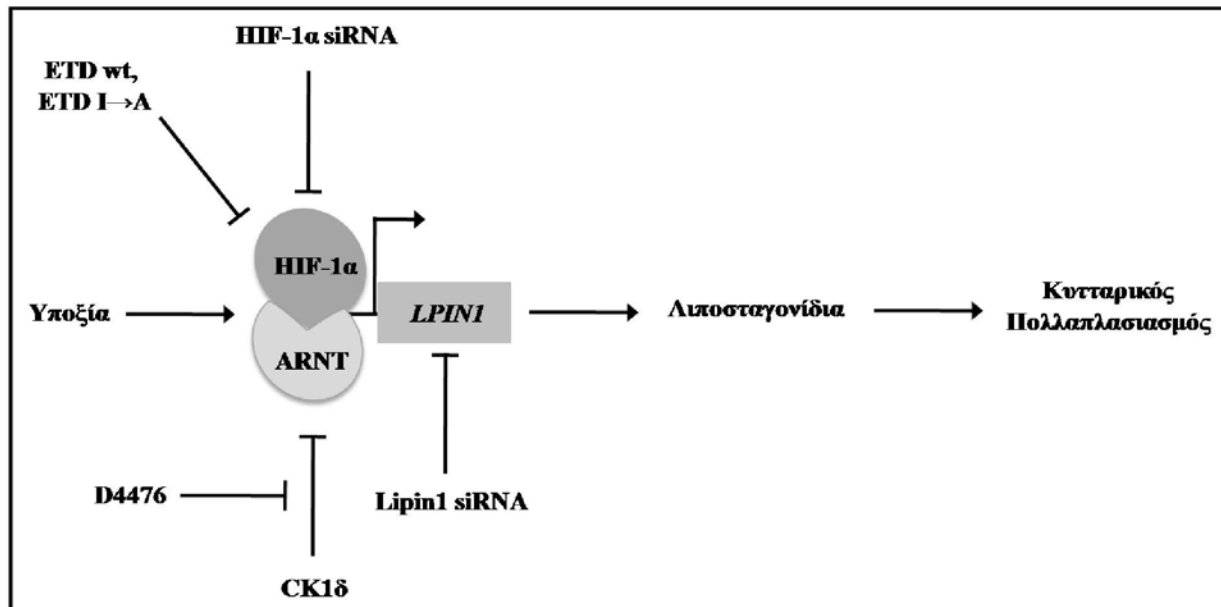
Επομένως, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη πεπτιδίων για πιο ειδική και αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων και κυρίως του καρκίνου, καθώς η χορήγηση των πεπτιδίων στοχεύει συγκεκριμένη πρωτεΐνη από την οποία προέρχονται, σε αντίθεση με τη χορήγηση άλλων χημικών αντικαρκινικών φαρμάκων. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για να διαπεράσουν τέτοια πεπτιδία την κυτταρική μεμβράνη είναι μέσω σύζευξης με την αλληλουχία TAT του ιού HIV (264).

Όσον αφορά τη ρύθμιση του HIF-1α από την κινάση CK1δ, στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η CK1δ παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό HIF-1α και ARNT στα κύτταρα, γεγονός που προκαλεί μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας και δέσμευσης του HIF-1 στο DNA και οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της λιπίνης-1 και του σχηματισμού λιποσταγονιδίων, διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την διατήρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στην υποξία. Όπως αναφέρθηκε, οι περισσότεροι αναστολείς της δράσης του HIF-1 στοχεύουν στη μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A*, στη μετάφραση του mRNA του HIF-1α, στην αποικοδόμησή του, στη δέσμευσή του στο DNA και στη μεταγραφική του ενεργότητα (200). Λίγες, όμως, είναι οι αναφορές που δείχνουν την δυνατότητα αναστολής της δραστηριότητας του HIF-1 μέσω παρεμπόδισης του ετεροδιμερισμού των HIF-1α και ARNT, γεγονός που μπορεί να προσφέρει μεγαλύτερη ειδικότητα.

Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τον ARNT μπορεί να οφείλεται είτε σε άλλες πρωτεΐνες είτε χημικές ουσίες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την PAS περιοχή του HIF-1α ή με τον ARNT. Μια πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή PAS-B του HIF-1α και μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α λόγω παρεμπόδισης του ετεροδιμερισμού του HIF-1α με τον ARNT είναι η MgcRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein) (125, 126). Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και η έκφραση της πρωτεΐνης IPAS, μιας ισομορφής του HIF-3α, η οποία σχηματίζει διμερή με τον HIF-1α και αναστέλλει τη μεταγραφική του ενεργότητα (23) καθώς και η ισομορφή NEPAS (neonatal and embryonic PAS) η οποία διμερίζεται με τον ARNT αναστέλλοντας έτσι τη δράση του HIF-1 (24).

Όσον αφορά την αναστολή της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τον ARNT από χημικές ουσίες, έχει προταθεί ότι η ακρυφλαβίνη δεσμεύεται στην PAS B περιοχή των HIF-1α και HIF-2α με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει τον ετεροδιμερισμό τους με τον ARNT και να μειώνει έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα των HIF-1 και HIF-2, αντίστοιχα (265). Σε πρόσφατη μελέτη, επίσης, έχει προταθεί ένας τρόπος ειδικής στόχευσης της δραστηριότητας του HIF-1 μέσω του κυκλικού πεπτιδίου *cyclo-CLLFVY*, το οποίο δεσμεύεται στην PAS B περιοχή μόνο του HIF-1α και όχι του HIF-2α *in vitro* και στα κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT γεγονός που οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (266). Ένας ακόμη χημικός αναστολέας που παρεμποδίζει τον σχηματισμό συμπλόκων HIF-1α /ARNT είναι ο NSC 50352, μια ρολιτετρακυκλίνη, η οποία δεσμεύεται ειδικά στην περιοχή PAS A του HIF-

1α και εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT, δράση η οποία παρατηρήθηκε όμως μόνο με *in vitro* πειράματα και όχι στα κύτταρα (267).



Εικόνα 57: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω ρύθμισης της δράσης του HIF-1 από τα πεπτίδια ETD και τη CK1δ. Η CK1δ και τα πεπτίδια ETD wt και I→A αναστέλουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση της λιπίνης-1 και σε μειωμένο σχηματισμό λιποσταγονιδίων γεγονός που αναστέλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συνθήκες υποξίας. Το μονοπάτι αυτό αντιστρέφεται μετά από αναστολή της δράσης της CK1δ από τον αναστολέα D4476.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η επίδραση της CK1δ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω εμπλοκής της στη μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, που αποδεικνύεται για πρώτη φορά από τη παρούσα μελέτη. Στη παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η έκφραση της λιπίνης-1 και ο σχηματισμός λιποσταγονιδίων στην υποξία αναστέλλεται από την CK1δ μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού συμπλόκων HIF-1 τόσο σε καρκινικά (HeLa) όσο και σε πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (hBSM), γεγονός που οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού τους σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 57). Από παλαιότερες μελέτες είναι γνωστό ότι ο HIF-1 εμπλέκεται στη μεταβολική προσαρμογή των υποξικών και καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας τη μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας (88). Όμως, ο ρόλος της υποξίας και του HIF-1 στο μεταβολισμό των λιπιδίων έχει πρόσφατα αρχίσει να διερευνάται. Η αυξημένη συσσώρευση λιποσταγονιδίων στην υποξία μπορεί να εξηγηθεί από την αυξημένη *de novo* σύνθεση λιπαρών οξέων, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη ακετυλο-coA το οποίο προέρχεται από την αυξημένη γλυκόλυση και από τη μειωμένη είσοδο του στον κύκλο Krebs στα μιτοχόνδρια (168, 169). Επιπλέον, σε συνθήκες υποξίας παρατηρείται αυξημένη έκφραση του ενζύμου συνθάση των

λιπαρών οξέων (FASN) ενισχύοντας τη *de novo* σύνθεση λιπαρών οξέων. Πρόσφατες μελέτες, επιπλέον, προτείνουν ως σημαντική πηγή λιπιδίων την πρόσληψη λιπαρών οξέων από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (171). Η συσσώρευση λιπαρών οξέων μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω και από την καταστολή της β-οξειδωσης σε συνθήκες υποξίας (165, 268). Έτσι, προκειμένου τα υποξικά κύτταρα να αποφύγουν την λιποτοξικότητα και τον κυτταρικό θάνατο από την συσσώρευση λιπαρών οξέων (269), σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο (Εικόνα 57) αποθηκεύουν τα λιπαρά οξέα ως ουδέτερα τριγλυκερίδια στα λιποσταγονίδια μέσω αύξησης της έκφρασης της λιπίνης-1 από τον HIF-1.

Η απαίτηση της λιπίνης-1 για τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην υποξία μπορεί να μη σχετίζεται μόνο με τον σχηματισμό λιποσταγονιδίων αλλά και με άλλες κυτταρικές διεργασίες. Μια από αυτές είναι η βιογένεση μεμβρανών, καθώς η διακυλογλυκερόλη (DAG), που είναι το προϊόν της ενζυμικής δράσης της λιπίνης-1, δεν αποτελεί μόνο πηγή τριγλυκεριδίων αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοχολίνη (270). Επιπλέον, το φωσφατιδικό οξύ και η διακυλογλυκερόλη, το υπόστρωμα και το προϊόν της δράσης της λιπίνης-1 αντίστοιχα, ρυθμίζουν σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως του mTOR και της φωσφοκινάσης C και αυτή η δράση τους μπορεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην υποξία (271). Η λιπίνη-1, επιπλέον, μπορεί να αλληλεπιδρά ή/και να ρυθμίζει τη δράση μεταγραφικών παραγόντων, όπως του PPAR και του SREBP, που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων (272, 273) και να συμβάλει και με τον τρόπο αυτό στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Πάντως, όπως φάνηκε στη παρούσα εργασία η αναστολή της εξαρτώμενης από τον HIF-1 έκφρασης της λιπίνης-1 από τη CK1δ εμποδίζει την καρκινική ανάπτυξη στην υποξία.

Οι διάφορες ισομορφές της CK1 εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές δράσεις και συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις (234), όμως ο ρόλος τους στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τον σχηματισμό καρκινικών όγκων δεν είναι ξεκάθαρος. Η ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από την CK1, όπως των p53 και Wnt, μπορεί να έχει θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες (274-276). Προηγούμενη μελέτη (216) και η παρούσα εργασία προτείνουν τη μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία ως νέο στόχο της CK1δ, η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω παρεμπόδισης του

σηματισμού συμπλόκων HIF-1α/ARNT, με αποτέλεσμα να εκδηλώνεται έτσι η αντικαρκινική δράση της κινάσης. Η αντικαρκινική δράση της CK1δ έχειδειχθεί και σε άλλες μελέτες που αφορούν την επίδραση διαφόρων ισομορφών της CK1 στη δράση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Σε συνθήκες κυτταρικού στρες οι ισομορφές CK1δ/ε φωσφορυλιώνουν την p53 και μειώνουν την αλληλεπίδραση με την MDM2 με αποτέλεσμα να σταθεροποιούν και να αυξάνουν τη δράση της p53 (277). Επιπλέον, μειωμένη έκφραση των ισομορφών CK1α/δ/ε έχει συνδεθεί με πιο επιθετική μορφή καρκίνου και η CK1α έχει παρατηρηθεί ότι δρα ως ογκοκαταστολέας όταν η p53 απενεργοποιείται (274). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ενδείξεις για ογκογόνο δράση των ισομορφών CK1 σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (234).

Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της δράσης της CK1δ από ειδικούς χημικούς αναστολείς, όπως ο D4476 μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο σε περιπτώσεις που είναι απαραίτητη η ενίσχυση της δράσης του HIF-1, όπως είναι ασθένειες που χαρακτηρίζονται από ισχαιμία και φλεγμονή, όπου ο HIF-1 έχει προστατευτικό ρόλο (178). Μελέτες σε πειραματόζωα και σε δείγματα ασθενών έχουν δείξει ότι σε ισχαιμικούς ιστούς που υπερεκφράζουν HIF-1α, ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με αγγειογένεση και με τον μεταβολισμό επιδρώντας θετικά στην αντιμετώπιση της νόσου (74). Επίσης, η σταθεροποίηση του HIF-1α σε καταστάσεις όπως είναι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η μόλυνση από παθογόνα, η οξεία πνευμονική βλάβη και σε μεταμοσχεύσεις οργάνων, έχει ευεργετική δράση (178). Ο ενισχυμένος πολλαπλασιασμός πρωτογενών κυττάρων βρόγχων στην υποξία μετά από αναστολή της CK1δ, είναι σημαντικό εύρημα για την αντιμετώπιση ισχαιμικών και φλεγμονωδών παθήσεων καθώς μπορεί να συμβάλει στην ανάπλαση του υποξικού/ισχαιμικού ιστού για παράδειγμα σε περιπτώσεις οξείας πνευμονικής βλάβης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν και διελευκάνθηκαν δύο μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης του HIF-1 μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK1/2 και CK1δ, οι οποίοι επιδρούν στη μεταβολική προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία και στην ικανότητά τους να επιβιώνουν στις συνθήκες αυτές. Η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 από τα πεπτιδία ETD wt IA ή από την CK1δ μπορεί να αποτελέσουν νέες μεθόδους στην αντικαρκινική θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, η θετική επίδραση στη δραστηριότητα του HIF-1 και η καλύτερη προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία μέσω αναστολής της CK1δ μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στην αντιμετώπιση ισχαιμικών και φλεγμονωδών παθήσεων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomas SN, Liao Z, Clark D, Chen Y, Samadani R, Mao L, Ann DK, Baulch JE, Shapiro P, Yang AJ. Exosomal Proteome Profiling: A Potential Multi-Marker Cellular Phenotyping Tool to Characterize Hypoxia-Induced Radiation Resistance in Breast Cancer. *Proteomes*. 2013;1(2):87-108.
2. Wang GL, Jiang B, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Genetics*. 1995;92:5510-4.
3. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:97-106.
4. Jiang B, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1 α . *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(31):19253-60.
5. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev*. 2012;92(3):967-1003.
6. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka Ha, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *The EMBO Journal*. 1998;17(22):6573-86.
7. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Kohler M. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin α / β pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(3):394-404.
8. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):235-40.
9. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem*. 2008;283(41):27620-7.
10. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*. 2006;281(44):33095-106.
11. Beischlag TV, Morales JL, Hollingshead BDaGHP. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr Mol Biol*. 2008;18(3):207-50.
12. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):535-40.
13. Nordgren IK, Tavassoli A. Targeting tumour angiogenesis with small molecule inhibitors of hypoxia inducible factor. *Chem Soc Rev*. 2011;40(8):4307-17.
14. Tian H, McKnight SLaDWR. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *GENES & DEVELOPMENT*. 1997;11:72-82.
15. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of Development*. 1997;63:51-60.
16. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Y.Fujii-Kuriyama* a. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the

VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4273-8.

17. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu Y, Pray-Grant M, Perdew GHaCAB. Characterization of a Subset of the Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Superfamily That Interacts with Components of the Dioxin Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(13):8581-93.

18. Keith B, Johnson RSaMCS. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22.

19. M. LJCaS. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1a, 2a and 3a). *Oncogene*. 2001;20:1435-44.

20. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 2003;23(24):9361-74.

21. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15.

22. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3 α 4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*. 2005;19(11):1396-406.

23. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001;414(6863):550-4.

24. Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, Iemitsu M, Makino Y, Tanaka H, Miyauchi T, Goto K, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Poellinger L, Yamamoto M. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol*. 2008;28(4):1285-97.

25. Zhang P, Lu L, Yao Q, Li Y, Zhou J, Liu Y, Duan C. Molecular, functional, and gene expression analysis of zebrafish hypoxia-inducible factor-3. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;303:1165-.

26. Ratcliffe MNaPJ. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *Journal of Cell Science*. 2003;116:3041-9.

27. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*. 2014;2(1):3.

28. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30772-80.

29. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015:549412.

30. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30(4):393-402.

31. Metzzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen1 JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of Cell Science*. 2003;116(7):1319-27.

32. 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.
33. MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3282-9.
34. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, Hunt T, Mitchell M, Olpin S, Moat SJ, Hargreaves IP, Heales SJ, Chung YL, Griffiths JR, Dalglish A, McGrath JA, Gleeson MJ, Hodgson SV, Poulson R, Rustin P, Tomlinson IP. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2231-9.
35. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7(1):77-85.
36. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*. 2005;8(2):143-53.
37. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):635-41.
38. Yuan Y, G. H, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia Inducible Factor- α and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia Inducible Factor- α . *JBC*. 2003.
39. Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(5):544-51.
40. Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res*. 2006;40(8):847-56.
41. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoomik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, Bowtell DD, Ronai Z. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell*. 2004;117(7):941-52.
42. Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42719-25.
43. Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2008;1(1):53-68.
44. Hielscher A, Gerecht S. Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:281-91.
45. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*. 2015;116(5):696-703.

46. Chandel NSaPTS. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol*. 2000;88:1880-9.
47. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*. 2005;1(6):401-8.
48. Chua YL, Dufour E, Dassa EP, Rustin P, Jacobs HT, Taylor CT, Hagen T. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2010;285(41):31277-84.
49. Palmer LA, Gaston B, R.A J. Normoxic Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression and Activity: Redox-Dependent Effect of Nitrogen Oxides. *Mol Pharmacol*. 2000;58:1197-203.
50. Westra J, Brouwer E, Bos R, Posthumus MD, Doornbos-Van Der Meer B, Kallenberg CGM, Limburg PC. Regulation of Cytokine-Induced HIF-1 Expression in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1108(1):340-8.
51. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza aGL. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1a. *GENES & DEVELOPMENT*. 1998;12:149-62.
52. Yoon D, P. P, Prchal JT. Hypoxia. 5. Hypoxia and hematopoiesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300:1215-22.
53. Simon MC. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008.
54. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *GENES & DEVELOPMENT*. 1998;12:33-20-3324.
55. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*. 2002;8(7):702-10.
56. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*. 2003;102(5):1634-40.
57. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Bouxsein ML, Faugere MC, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1616-26.
58. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant*. 2010;19(1):29-42.
59. Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, Hung SC. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*. 2011;117(2):459-69.
60. Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schonbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One*. 2012;7(9):e46483.

61. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Güllly C, Gaßner RaGL. Blackwell Publishing Ltd Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007;6:745-57.
62. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Muller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 2010;11:11.
63. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha-deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2170-4.
64. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;146(5):772-84.
65. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1367-76.
66. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol*. 2008;38(9):2412-8.
67. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, Berenfeld L, Wenger RH, Ohta AaMS. Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 and Its Activation-Inducible Short Isoform I.1 Negatively Regulate Functions of CD4 and CD8+ T Lymphocytes. *The Journal of immunology*. 2007;177:4962-5.
68. Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV. Targeted Deletion of HIF-1a Gene in T Cells Prevents their Inhibition in Hypoxic Inflamed Tissues and Improves Septic Mice Survival. *PLoS One*. 2007;2(9).
69. Neumann AK, Yang J, Biju MP, Joseph SK, Johnson RS, Haase VH, Freedman BD, Turka LA. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(47):17071-6.
70. Larbi A, Zelba H, Goldeck D, Pawelec G. Induction of HIF-1alpha and the glycolytic pathway alters apoptotic and differentiation profiles of activated human T cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(2):265-73.
71. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Napoleone Ferrara NaRSJ. HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell*. 2003;112(5):645-57.
72. Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1806-15.
73. Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1339-46.
74. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1263-8.
75. 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.

76. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10892-903.
77. Gleadle JMaPJR. Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1, Erythropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor, and Glucose Transporter-1 by Hypoxia: Evidence Against a Regulatory Role for Src Kinase. *Blood*. 1997;89(2):503-9.
78. Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: Putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol*. 2005;20:1327-38.
79. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-97.
80. Semenza GL. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(20):32529-37.
81. Semenza GL. Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-inducible Factor I. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(23):23757-63.
82. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem*. 2001;276(46):43407-12.
83. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111-22.
84. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*. 2007;11(5):407-20.
85. Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ*. 2008;15(10):1572-81.
86. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene*. 2010;29(30):4362-8.
87. Guo S, Miyake M, Liu KJ, Shi H. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by in vitro ischemia through deteriorating cellular redox environment. *J Neurochem*. 2009;108(5):1309-21.
88. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3664-71.
89. Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez PV, Lum JJ, Sayed N, Melo JV, Perl AE, Carroll M, Tuttle SW, Thompson CB. Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1 α -induced metabolic reprogramming. *Oncogene*. 2010;29(20):2962-72.
90. Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM. Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Front Oncol*. 2012;2:18.

91. Pescador N. VD, Cifuentes D., Garcia-Rocha M., Ortiz-Barahona A., Vazquez S. OA, Cuevas Y., Saez-Morales D., Garcia-, Bermejo M.L. LM, Guinovart L., del Peso L. Hypoxia Promotes Glycogen Accumulation through Hypoxia Inducible Factor (HIF)-Mediated Induction of Glycogen Synthase 1. *PLoS One*. 2010;5(3).
92. Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C, Steers G, Turley H, Li JL, Gunther UL, Buffa FM, McIntyre A, Harris AL. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab*. 2012;16(6):751-64.
93. Bostrom P, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Boren J, Carlsson LM, Stahlman M, Olofsson SO, Hulten LM. Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1871-6.
94. 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.
95. Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9210-8.
96. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem*. 2007;282(6):3450-7.
97. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC, Jr., Kelly DP. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab*. 2006;4(3):199-210.
98. Csaki LS, Reue K. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annu Rev Nutr*. 2010;30:257-72.
99. Regulation of Lipins and Their Role in Lipid Metabolism <http://lipidlibraryaocsorg/Biochemistry/contentcfm?ItemNumber=39189>.
100. Manmontri B, Sariahmetoglu M, Donkor J, Bou Khalil M, Sundaram M, Yao Z, Reue K, Lehner R, Brindley DN. Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically. *J Lipid Res*. 2008;49(5):1056-67.
101. Lu B. LY, Moser A.H., Shigenaga J.K., Grunfeld C., and Feingold K.R. LPS and proinflammatory cytokines decrease lipin-1 in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:1502-9.
102. Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniossoglou S. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29166-74.
103. Harris TE, Huffman TA, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Kumar A, Lawrence JC, Jr. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem*. 2007;282(1):277-86.
104. Liu GH GL. Sumoylation Regulates Nuclear Localization of Lipin-1a in Neuronal Cells. *PLoS One*. 2009;4(9).
105. Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet*. 2001;27(1):121-4.
106. Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab*. 2005;1(1):73-83.
107. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Gorkach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving

- phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*. 2007;18(12):4691-7.
108. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(4):755-61.
 109. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*. 2008;412(3):477-84.
 110. van Uden P, Kenneth NS, Webster R, Muller HA, Mudie S, Rocha S. Evolutionary conserved regulation of HIF-1beta by NF-kappaB. *PLoS Genet*. 2011;7(1):e1001285.
 111. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon C, Hoffmann A, Johnson aRS. Differential activation and antagonistic function of HIF-a isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *GENES & DEVELOPMENT*. 2010;24:491-501.
 112. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, Kujawski M, Kay H, Cress WD, Jove R, Yu H. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1099-105.
 113. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, Pantopoulos K, Simos G, Koromilas AE. eIF2{alpha} Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{alpha}. *Cancer Res*. 2010;70(20):7820-9.
 114. Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S. SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4123-31.
 115. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(11):526-34.
 116. Yu YP, Landsittel D, Jing L, Nelson J, Ren B, Liu L, McDonald C, Thomas R, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M, Luo JH. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol*. 2004;22(14):2790-9.
 117. van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG. Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biology & Therapy*. 2014;5(7):749-55.
 118. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas aO. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *GENES & DEVELOPMENT*. 2005;19:2199-211.
 119. Jung JE, Kim HS, Lee CS, Shin YJ, Kim YN, Kang GH, Kim TY, Juhn YS, Kim SJ, Park JW, Ye SK, Chung MH. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1 alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med*. 2008;40(5):479-85.
 120. Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*. 2005;24(36):5552-60.
 121. Minet E, Mottel D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Letters*. 1999;450:251-6.
 122. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29936-44.

123. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2007;25(2):207-17.
124. Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, Liu JO, Semenza GL. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem*. 2007;282(51):37064-73.
125. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E. MgcRacGAP Interacts with HIF-1 α and Regulates its Transcriptional Activity. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20:995-1008.
126. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, Liakos P, Simos G, Georgatsou E. MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(6):1378-87.
127. Sanchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR. Binding of natively unfolded HIF-1 α ODD domain to p53. *Mol Cell*. 2005;17(1):11-21.
128. Chen D, Li M, Luo J, Gu aW. Direct Interactions between HIF-1 and Mdm2 Modulate p53 function. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2003;278(April 18):13595-8.
129. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Hayes Sutter C, Dmitri Artemov D, Qinwen Zeng Q, Dillehay LE, AshimaMadan A, Semenza GL, Bedi aA. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1. *GENES & DEVELOPMENT*. 1999;14:34-44.
130. Fels DR, Koumenis C. HIF-1 α and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci*. 2005;30(8):426-9.
131. Huang LE. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):672-7.
132. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Huang BJC aLE. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO Journal*. 2004;23:1949-56.
133. To KW, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, E. HL. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 α from HIF-2 α in NBS1 repression. *The EMBO Journal*. 2006;25:4784-94.
134. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007;12(2):108-13.
135. Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 α , leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol*. 2008;28(23):7081-95.
136. Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*. 2011;71(11):4015-27.
137. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
138. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihaï OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell*. 2010;140(2):280-93.

139. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*. 2009;324(5932):1289-93.
140. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*. 2010;38(6):864-78.
141. Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B, Long HW, Daniels DL, Hahn WC, Dowell RD, Espinosa JM. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell*. 2013;153(6):1327-39.
142. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, Kim KW. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):394-400.
143. Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, Chan DA, Giaccia AJ, Semenza GL. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. 2005;17(4):503-12.
144. Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, Qian DZ. HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2011;286(44):38095-102.
145. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, Dai MS, Qian DZ. HIF1alpha protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *J Biol Chem*. 2012;287(42):35496-505.
146. Jeong JW, Ahn M, Bae M, Lee K, Bae M, Kim S, Yoo M, J. SE, Kim K. Regulation and Destabilization of HIF-1 by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell*. 2002;111:709-20.
147. Arnesen T, Kong X, Evjenth R, Gromyko D, Varhaug JE, Lin Z, Sang N, Caro J, Lillehaug JR. Interaction between HIF-1 alpha (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 alpha. *FEBS Lett*. 2005;579(28):6428-32.
148. Murray-Rust TA, Oldham NJ, Hewitson KS, Schofield CJ. Purified recombinant hARD1 does not catalyse acetylation of Lys532 of HIF-1alpha fragments in vitro. *FEBS Lett*. 2006;580(8):1911-8.
149. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Letters*. 2003;549(1-3):105-9.
150. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett*. 2007;581(8):1542-8.
151. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*. 2007;26(1):63-74.
152. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(3):646-52.
153. Kang X, Li J, Zou Y, Yi J, Zhang H, Cao M, Yeh ET, Cheng J. PIASy stimulates HIF1alpha SUMOylation and negatively regulates HIF1alpha activity in response to hypoxia. *Oncogene*. 2010;29(41):5568-78.
154. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ETH. SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia. *Cell*. 2007;131(3):584-95.
155. Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e26.

156. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207-14.
157. Kroeger N, Seligson DB, Signoretti S, Yu H, Magyar CE, Huang J, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Poor prognosis and advanced clinicopathological features of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) are associated with cytoplasmic subcellular localisation of Hypoxia inducible factor-2alpha. *Eur J Cancer.* 2014;50(8):1531-40.
158. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):139-45.
159. Lee BL, Kim WH, Jung J, Cho SJ, Park JW, Kim J, Chung HY, Chang MS, Nam SY. A hypoxia-independent up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. *Carcinogenesis.* 2008;29(1):44-51.
160. Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer.* 2005;5:84.
161. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays.* 2013;35(11):965-73.
162. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(1):127-39.
163. Swietach P, Patiar S, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD. The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20299-310.
164. Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(5):646-53.
165. Huang D, Li T, Li X, Zhang L, Sun L, He X, Zhong X, Jia D, Song L, Semenza GL, Gao P, Zhang H. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell Rep.* 2014;8(6):1930-42.
166. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3450-4.
167. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Kamada S, Saito K, Iizumi M, Liu W, Ericsson J, Watabe K. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008;68(4):1003-11.
168. Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC, Thompson CB. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(49):19611-6.
169. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 2012;481(7381):380-4.
170. Brose SA, Marquardt AL, Golovko MY. Fatty acid biosynthesis from glutamate and glutamine is specifically induced in neuronal cells under hypoxia. *J Neurochem.* 2014;129(3):400-12.

171. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, Pinnick KE, Wigfield S, Buffa FM, Li JL, Zhang Q, Wakelam MJ, Karpe F, Schulze A, Harris AL. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 2014;9(1):349-65.
172. Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2353-8.
173. Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):686-90.
174. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *European Journal of Neuroscience.* 1999;11:4159-70.
175. H. S. Hypoxia Inducible Factor 1 as a Therapeutic Target in Ischemic Stroke. *Curr Med Chem.* 2009;16(34):4593.
176. Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, Dragatsis I, Johnson RS, Chavez JC. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 α increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2007;27(23):6320-32.
177. Helton R, Cui J, Scheel JR, Ellison JA, Ames C, Gibson C, Blouw B, Ouyang L, Dragatsis I, Zeitlin S, Johnson RS, Lipton SA, Barlow C. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci.* 2005;25(16):4099-107.
178. Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):852-69.
179. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res.* 2008;77(3):463-70.
180. Eckle T, Kohler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation.* 2008;118(2):166-75.
181. Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han J, Borchers CH, Buttrick PM, Kominsky DJ, Colgan SP, Eltzschig HK. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med.* 2012;18(5):774-82.
182. Cai Z, Weibo Luob W, Zhanb H, Semenza aGL. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *PNAS.* 2013;110(43):17462-7.
183. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, Taylor CT. The hydroxylase inhibitor dimethylallylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology.* 2008;134(1):156-65.
184. Hirota SA, Fines K, Ng J, Traboulsi D, Lee J, Ihara E, Li Y, Willmore WG, Chung D, Scully MM, Louie T, Medlicott S, Lejeune M, Chadee K, Armstrong G, Colgan SP, Muruve DA, MacDonald JA, Beck PL. Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in *Clostridium difficile*-induced intestinal injury. *Gastroenterology.* 2010;139(1):259-69 e3.
185. Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwalac MM, Hamsd E, Rodriguez J, Kriegsheim A, Cottera P, Bruningb U, Fallond PG, Cheonga A, Cumminsb EP, Taylora aCT. Regulation of IL-1 β -induced NF- κ B by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *PNAS.* 2013;110(46):18490-5.

186. Peyssonnaux C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting Edge: Essential Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in Development of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *The Journal of Immunology*. 2007;178(12):7516-9.
187. Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK. Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Coordinates Induction of Toll-Like Receptors TLR2 and TLR6 during Hypoxia. *PLoS ONE*. 2007;2(12).
188. Tsapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R, Koukoulis GK, Simos G, Molyvdas PA, Paraskeva E. TNF α induces expression of HIF-1 α mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2013;228(8):1745-53.
189. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18154-9.
190. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*. 2008;453(7196):807-11.
191. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2699-714.
192. Walmsley SR, Cowburn AS, Clatworthy MR, Morrell NW, Roper EC, Singleton V, Maxwell P, Whyte MK, Chilvers ER. Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. *Blood*. 2006;108(9):3176-8.
193. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, Volke M, Gla J, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt K, Steinkasserer A, Hensel M, Willam aC. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. *The Journal of Immunology*. 2008;180:4697-705.
194. Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu YV, Zhang H, Strazza M, Rey S, Savino L, Zhou YF, McDonald KR, Na Y, Vandiver S, Rabi A, Shaked Y, Kerbel R, Lavalley T, Semenza GL. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res*. 2007;101(12):1310-8.
195. Rey S, Lee K, Wang CJ, Gupta K, Chen S, McMillan A, Bhise N, Levchenko A, Semenza GL. Synergistic effect of HIF-1 α gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(48):20399-404.
196. Sarkar K, Fox-Talbot K, Steenberg C, Marta Bosch-Marce M, and G. L. Semenza b. Adenoviral transfer of HIF-1 α enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *PNAS*. 2009;107(1):513-4.
197. Rajagopalan S, Olin J, Deitcher S, Pieczek A, Laird J, Grossman PM, Goldman CK, McEllin K, Kelly R, Chronos N. Use of a constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients: phase I dose-escalation experience. *Circulation*. 2007;115(10):1234-43.

198. Kajiwarra H, Luo Z, Belanger AJ, Urabe A, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Mochizuki S, Gregory RJ, Jiang C. A hypoxic inducible factor-1 alpha hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats. *J Gene Med.* 2009;11(5):390-400.
199. Goverdhana S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther.* 2005;12(2):189-211.
200. Onnis B, Rapisarda A, Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9A):2780-6.
201. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, Albaek C, Schroder H, Orum H. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(11):3598-608.
202. Rapisarda A, Uranchimeg B, Sordet O, Pommier Y, Shoemaker RH, Melillo G. Topoisomerase I-Mediated Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor 1: Mechanism and Therapeutic Implications. *CANCER RESEARCH.* 2004;64:1475-82.
203. Hartwich J, Orr WS, Ng CY, Spence Y, Morton C, Davidoff AM. HIF-1alpha activation mediates resistance to anti-angiogenic therapy in neuroblastoma xenografts. *J Pediatr Surg.* 2013;48(1):39-46.
204. Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO, Semenza GL. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(50):19579-86.
205. Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(4):657-70.
206. Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(1):74-8.
207. Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett.* 2009;280(2):145-53.
208. Shin DH, Chun Y, Lee DS, Huang LE, Park aJ. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 2008;111(6):3131-8.
209. Befani CD, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Patrikidou A, Bonanou S, Simos G, Papandreou CN, Liakos P. Bortezomib represses HIF-1alpha protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(1):45-54.
210. Braliou GG, Venieris E, Kalousi A, Simos G. Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1alpha effectors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(4):1289-96.
211. Boohaker RJ, Lee MW, Vishnubhotla P, Perez JM, Khaled aAR. The Use of Therapeutic Peptides to Target and to Kill Cancer Cells. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3794-804.
212. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Schofield RPJaCJ. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J.* 2004;383:429-37.

213. Toffoli S, Feron O, Raes M, Michiels C. Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(10):1558-71.
214. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1alpha via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. 2013;12(23):3689-701.
215. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. 2010;40(4):509-20.
216. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva Ea, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell science*. 2010;123:2976-86.
217. Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3253-65.
218. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2010;285(50):38944-50.
219. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012;66(2):105-43.
220. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*. 2010;277(1):2-21.
221. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):559-70.
222. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007;26(22):3203-13.
223. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1227-37.
224. Tomaselli B, Podhraski V, Heftberger V, Bock G, Baier-Bitterlich G. Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. *Neurochem Int*. 2005;46(7):513-21.
225. Tomaselli B, Nedden SZ, Podhraski V, Baier-Bitterlich G. p42/44 MAPK is an essential effector for purine nucleoside-mediated neuroprotection of hypoxic PC12 cells and primary cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2008;38(4):559-68.
226. Bickler PEaPHD. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. 2002;205:3579-86.
227. Wang X, Zhu C, Qiu L, Hagberg H, Sandberg M, Blomgren K. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 2004;86(2):351-62.
228. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle*. 2009;8(8):1168-75.
229. Thauerer B, Zur Nedden S, Baier-Bitterlich G. Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. *J Neurochem*. 2012;121(3):329-42.
230. Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*. 2006;16(12):1171-82.
231. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007;26(22):3227-39.

232. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75(1):50-83.
233. Fremin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2010;3:8.
234. Knippschild U, Kruger M, Richter J, Xu P, Garcia-Reyes B, Peifer C, Halekotte J, Bakulev V, Bischof J. The CK1 Family: Contribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis. *Front Oncol.* 2014;4:96.
235. Schittek B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2014;13:231.
236. Greer YE, Westlake CJ, Gao B, Bharti K, Shiba Y, Xavier CP, Pazour GJ, Yang Y, Rubin JS. Casein kinase 1delta functions at the centrosome and Golgi to promote ciliogenesis. *Mol Biol Cell.* 2014;25(10):1629-40.
237. Etchegaray JP, Yu EA, Indic P, Dallmann R, Weaver DR. Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One.* 2010;5(4):e10303.
238. Lee H, Chen R, Lee Y, Yoo S, Lee C. Essential roles of CK1delta and CK1epsilon in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(50):21359-64.
239. Cheong JK, Virshup DM. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(4):465-9.
240. Inuzuka H, Tseng A, Gao D, Zhai B, Zhang Q, Shaik S, Wan L, Ang XL, Mock C, Yin H, Stommel JM, Gygi S, Lahav G, Asara J, Xiao ZX, Kaelin WG, Jr., Harper JW, Wei W. Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell.* 2010;18(2):147-59.
241. Kim SY, Dunn IF, Firestein R, Gupta P, Wardwell L, Repich K, Schinzel AC, Wittner B, Silver SJ, Root DE, Boehm JS, Ramaswamy S, Lander ES, Hahn WC. CK1e Is Required for Breast Cancers Dependent on b-Catenin activity. *PLoS One.* 2010;5(2).
242. Rena G, Bain J, Elliott M, Cohen P. D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep.* 2004;5(1):60-5.
243. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007;408(3):297-315.
244. Zemp I, Wandrey F, Rao S, Ashiono C, Wyler E, Montellese C, Kutay U. CK1delta and CK1epsilon are components of human 40S subunit precursors required for cytoplasmic 40S maturation. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 6):1242-53.
245. Hausmann A, Lee J, Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory protein 2 stability. *FEBS Letters.* 2011;585(4):687-92.
246. Meulmeester E, Kunze M, Hsiao H, Urlaub H, F. M. Mechanism and Consequences for Paralog-Specific Sumoylation of Ubiquitin-Specific Protease 25. *Molecular Cell.* 2008;30:610-9.
247. Hutten S, Chachami G, Winter U, Melchior FaAIL. A role for the Cajal-body-associated SUMO isopeptidase USPL1 in snRNA transcription mediated by RNA polymerase II. *Journal of Cell Science.* 2014;127:1065-78.
248. Shibata T, Akiyama N, Noda M, Sasai K, Hiraoka aM. Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 1998;42(4):913-6.

249. Verga Falzacappa MV, Spasic MV, Kessler R, Stolte J, Hentze MaMUM. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*. 2007;109(1):353-9.
250. Kanasty RL, Whitehead KA, Vegas AJ, Anderson DG. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol Ther*. 2012;20(3):513-24.
251. Kohan DE. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int*. 2008;74(4):427-37.
252. <https://www.google.gr/search?q=duolink+in+situ+proximity+ligation+assay&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjRiT>.
253. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006;3(12):995-1000.
254. Byun J, Verardo MR, Sumengen B, Lewis GP, Manjunath BS, Fisher SK. Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: Application to retinal images. *Molecular Vision*. 2006;12:949-60.
255. Riss TL, Maoravec RA, Niles AL, Benik HA, Warzella TJ, Minor L, Reid Y. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*. 2013.
256. Day CA, Kraft LJ, Kang M, Kenworthy AK. Analysis of protein and lipid dynamics using confocal fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Curr Protoc Cytom*. 2012;Chapter 2:Unit2 19.
257. Rapsomaniki MA, Kotsantis P, Symeonidou IE, Giakoumakis NN, Taraviras S, Lygerou Z. easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics*. 2012;28(13):1800-1.
258. Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, Tissenbaum HA. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to detection by quantitative real-time PCR to study transcription factor binding to DNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc*. 2008;3(4):698-709.
259. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
260. Willam C, Masson N, Tian YM, Mahmood SA, Wilson MI, Bicknell R, Eckardt KU, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Peptide blockade of HIF α degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10423-8.
261. Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Linvingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nature Medicine*. 2000;6(12):1335-41.
262. Hurwitz H. Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2004;4 Suppl 2:S62-8.
263. Rapisarda A, Hollingshead M, Uranchimeg B, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Gehrs B, Raffeld M, Kinders RJ, Parchment R, Anver MR, Shoemaker RH, Melillo G. Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(7):1867-77.
264. Cattelan P, Dolcetta D, Hladnik U, Fortunati E. HIV-1 TAT-mediated protein transduction of human HPRT into deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(1):114-9.
265. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17910-5.

266. Miranda E, Nordgren IK, Male AL, Lawrence CE, Hoakwie F, Cuda F, Court W, Fox KR, Townsend PA, Packham GK, Eccles SA, Tavassoli A. A cyclic peptide inhibitor of HIF-1 heterodimerization that inhibits hypoxia signaling in cancer cells. *J Am Chem Soc.* 2013;135(28):10418-25.
267. Park J-E, Kong D, Fisher R, Cardellina J, Shoemaker RH, Melillo G. Targeting the PAS-A Domain of HIF-1 α ; for Development of Small Molecule Inhibitors of HIF-1. *Cell Cycle.* 2014;5(16):1847-53.
268. Liu Y, Ma Z, Zhao C, Wang Y, Wu G, Xiao J, McClain CJ, Li X, Feng W. HIF-1 α and HIF-2 α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 α -mediated fatty acid beta-oxidation. *Toxicol Lett.* 2014;226(2):117-23.
269. Yoo W, Noh KH, Ahn JH, Yu JH, Seo JA, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kim TW, Kim HJ, Kim NH. HIF-1 α expression as a protective strategy of HepG2 cells against fatty acid-induced toxicity. *J Cell Biochem.* 2014;115(6):1147-58.
270. Siniouoglou S. Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(3):575-81.
271. Foster DA. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(9):949-55.
272. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell.* 2011;146(3):408-20.
273. Koh YK, Lee MY, Kim JW, Kim M, Moon JS, Lee YJ, Ahn YH, Kim KS. Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem.* 2008;283(50):34896-906.
274. Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocaru G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S, Wiener Z, Alitalo K, Oren M, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature.* 2011;470(7334):409-13.
275. Foldynova-Trantirkova S, Sekyrova P, Tmejova K, Brumovska E, Bernatik O, Blankenfeldt W, Krejci P, Kozubik A, Dolezal T, Trantirek L, Bryja V. Breast cancer-specific mutations in CK1 ϵ inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):R30.
276. Tsai IC, Woolf M, Neklason DW, Branford WW, Yost HJ, Burt RW, Virshup DM. Disease-associated casein kinase I delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism. *Int J Cancer.* 2007;120(5):1005-12.
277. Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9278-83.