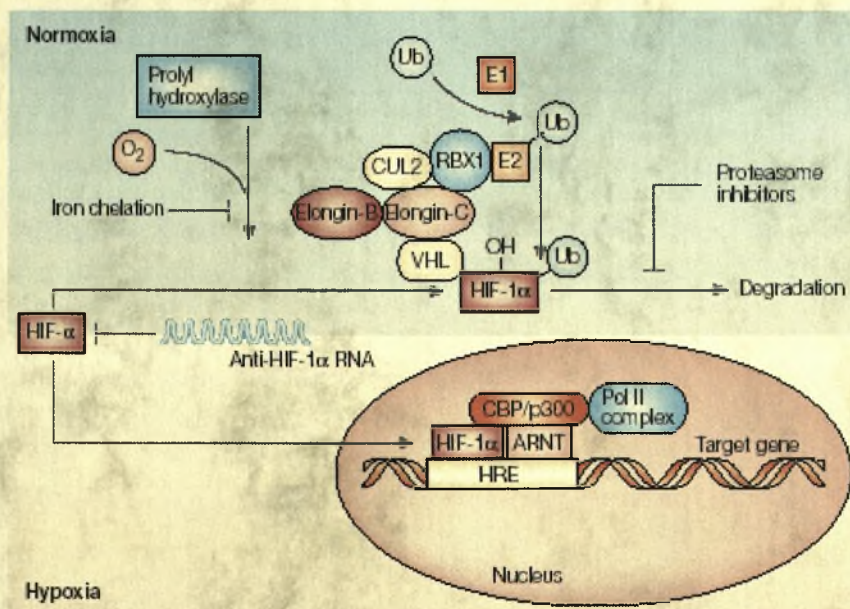


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ «ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
1 - HIF-1» ΣΕ ΛΕΙΑ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ
ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ *in vitro* ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ



ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ Β. ΓΕΩΡΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ «ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
1 - HIF-1» ΣΕ ΛΕΙΑ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΡΑΧΕΙΑΣ
ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ *in vitro* ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Διπλωματική Εργασία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Παρασκευά Ευφροσύνη

Λέκτορας Κυτταρικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Παρασκευά Ευφροσύνη, Λέκτορας Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

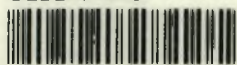
Γουργουλιάνης Κων/νος, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4435/1
Ημερ. Εισ.: 16-03-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΟΙΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087829

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διευθυντή του εργαστηρίου, Καθηγητή κ. Μολυβδά τόσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας όσο και για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της. Η επιστημονική κατάρτιση, το ακούραστο ενδιαφέρον και η άψογη συνεργασία εκ μέρους της υπεύθυνης καθηγήτριας Παρασκευά Ευφροσύνης συνιστούν τους κυριότερους, ίσως, λόγους της ευχάριστης και αποτελεσματικής διεκπεραίωσης της εργασίας μου. Με ιδιαίτερη χαρά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χαχάμη Γεωργία για την πολύτιμη βοήθειά της καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και του εργαστηρίου Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής για τη σύνθεση ενός ευχάριστου και δημιουργικού περιβάλλοντος εργασίας. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γ. Σίμο, που εμπιστεύθηκε τις δυνατότητές μου.

*Σε όσους βοήθησαν να γίνει το όνειρό μου
πραγματικότητα και κυρίως στους γονείς μου*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
Η υποξία και ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (hypoxia-inducible factor 1 – HIF-1).....	4
Ρύθμιση του HIF-1.....	6
Το αναπνευστικό σύστημα και η απόκρισή του στην υποξία.....	11
Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών	12
Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	15
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
Απομόνωση λείων μυϊκών κυττάρων από τραχεία κουνελιού και δημιουργία πρωτογενούς καλλιέργειας.....	16
Πάγωμα κυττάρων	17
Ξεπάγωμα κυττάρων.....	17
Καλλιέργεια των κυττάρων.....	17
Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια.....	17
Ταυτοποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων	17
Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	18
Κατεργασία κυττάρων	19
Παρασκευή εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης λείων μυϊκών κυττάρων.....	20
Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων (μέθοδος Bradford)..	20
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού μέσου (SDS-PAGE).....	21
Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting).....	23
Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε υγρό περιβάλλον.....	23
Χρώση με Ponceau S	24
Επώαση με αντίσωμα.....	24
Χημειοφωταύγεια	24

Χρωματική αντίδραση	25
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
Δημιουργία πρωτογενούς καλλιέργειας λείων μυικών κυττάρων τραχείας κουνελιού	26
Επαγωγή έκφρασης του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας	27
Κινητική μελέτη της επαγωγής του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας	29
Επίδραση του χρόνου διαφοροποίησης των λείων μυικών κυττάρων τραχείας στην επαγωγή του HIF-1α	30
Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του ορού παρουσία CoCl_2 στην επαγωγή του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας	31
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών, όταν βρίσκονται σε πρωτογενείς καλλιέργειες παρουσία ορού εμβρύου βοός, εμφανίζουν έναν μη διαφοροποιημένο «συνθετικό» φαινότυπο. Έχειδειχθεί ότι αν αφαιρεθεί ο ορός από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, τα λεία μυϊκά κύτταρα ανακτούν τον διαφοροποιημένο «συσταλτό» φαινότυπο. Στην εργασία αυτή, μελετήθηκαν οι μηχανισμοί επαγωγής της υπομονάδας α του «επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1» - HIF-1α σε λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας κουνελιού υπό συνθήκες *in vitro* διαφοροποίησης.

Ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (HIF-1) είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής υποξίας. Αποτελείται από δύο υπομονάδες: την α και τη β. Η υπομονάδα β εκφράζεται συνεχώς ενώ η υπομονάδα α υπόκειται σε ρύθμιση. Έχειδειχθεί, πρόσφατα, ότι το κοβάλτιο επάγει την έκφραση του HIF-1α σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων παρουσία ορού, μέσω της αύξησης της σύνθεσης της πρωτεΐνης που μεσολαβείται από το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης και της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου.

Κατά τη διεξαγωγή της εργασίας αυτής, λεία μυϊκά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία διαφοροποίησής τους. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, ο ορός επάγει την έκφραση του HIF-1α. Ο σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση του χρόνου καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού, και συνεπώς της διαφοροποίησης, σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας στην επαγωγή του HIF-1α καθώς και την κινητική της επαγωγής αυτής. Επιπλέον, ελέγξαμε την επίδραση της προσθήκης ορού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μέσο καλλιέργειας στην επαγωγή του HIF-1α. Ως επαγωγείς του HIF-1α χρησιμοποιήσαμε CoCl_2 , ορό ή συνδυασμό τους. Για το λόγο αυτό, δημιουργήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων από τραχεία κουνελιού, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό και χρήση μονοκλωνικού αντισώματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του HIF-1α επάγεται από την πρώτη ημέρα αφαίρεσης του ορού από το θρεπτικό μέσο. Σε διάστημα τριών ημερών αφαίρεσης του ορού, ο HIF-1α επάγεται 2 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων και βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα για διάστημα 6 ωρών. Τέλος, ο ορός σε συγκέντρωση 1% ή υψηλότερη στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας επάγει την έκφραση

του HIF-1α, φαίνεται όμως ότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις, πιθανόν, να δρουν ανασταλτικά στην επαγωγή αυτή.

ABSTRACT

Airway smooth muscle cells cultured in the presence of serum acquire an undifferentiated “synthetic” phenotype. It has been shown that upon serum deprivation, they regain their contractile form (in vitro differentiation). We studied the mechanisms mediating the induction of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in airway smooth muscle cells that have undergone serum deprivation and in vitro differentiation.

HIF-1 is the key mediator of the cellular hypoxia. It consists of two subunits: HIF-1 α and HIF-1 β . HIF-1 α expression is regulated. It has been previously shown that cobalt induces HIF-1 α expression in primary cultures of Airway Smooth Muscles Cells (ASM cells) in the presence of serum by a mechanism dependent on ROS (reactive oxygen species), PI3K (phosphatidyl inositol-3 kinase) and protein synthesis.

During this project, airway smooth muscle cells in primary cultures are submitted in serum starvation. Under these conditions, addition of serum causes the induction of HIF- 1 α expression. Our aim was to investigate the effect of the duration of serum deprivation on HIF- 1 α induction, as well as the kinetics of HIF- 1 α induction. We also tested how the addition of different concentrations of serum in the culture medium affect the accumulation of HIF-1 α protein. CoCl₂, serum or their combination were used as HIF-1 α inducers.

We established primary cultures of rabbit tracheal smooth muscle cells. The cells were identified through immunofluorescence with anti-SM- α -actin antibody. Our results showed that the expression of HIF-1 α was induced after the first day of serum deprivation. After 3 days of serum deprivation, HIF-1 α is induced 2 hours after the addition of the inducers (cobalt, serum or both) and its levels remain high for a period of 6 hours. Serum concentrations as low as 1% induce HIF-1 α but it seems that high concentrations have an inhibitive role on the induction.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υποξία και ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (hypoxia-inducible factor 1 – HIF-1)

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, υπάρχουν ειδικά όργανα για την πρόσληψη, την μεταφορά και την διανομή του οξυγόνου στους ιστούς. Τον κύριο λειτουργικό ρυθμιστή της ομοιόστασης του οξυγόνου συνιστά η μερική πίεση του οξυγόνου σε τοπικό επίπεδο. Η αυτόνομη ρύθμιση του οξυγόνου έχει πλεονεκτήματα, επειδή παρέχει ένα υψηλό επίπεδο πλαστικότητας στη λειτουργία αυτών των οργάνων σε αλλαγές της μερικής πίεσης οξυγόνου (Wegner, 2002).

Η υποξία είναι η μείωση των φυσιολογικών επιπέδων οξυγόνου στους ιστούς. Εμφανίζεται κατά τη διάρκεια παραμονής σε υψηλό υψόμετρο ή κατά τη διάρκεια επούλωσης τραυμάτων, χρόνιων ή οξείων αγγειακών παθήσεων, πνευμονικών νόσων και στον καρκίνο. Προκαλεί κυτταρικό θάνατο, αν συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό ή είναι παρατεταμένη. Είναι τοξική τόσο για τα φυσιολογικά όσο και για τα καρκινικά κύτταρα, αλλά τα τελευταία υπόκεινται σε γενετικές και προσαρμοστικές αλλαγές (εγγενείς μηχανισμοί) που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν ακόμη και να πολλαπλασιάζονται σε υποξικό περιβάλλον.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η υποξία διαμορφώνει την έκφραση πάνω από 60 γονιδίων (Semenza, 2003) που μεσολαβούν στη φυσιολογική και κυτταρική προσαρμοστική απόκριση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν τη μεταφορά οξυγόνου, τον μεταβολισμό του σιδήρου, την αγγειογένεση, τον τόνο των λείων μυών, τον αερισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Harris, 2002, Wegner, 2002). Ο κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου είναι ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (hypoxia-inducible transcription factor 1 – HIF-1) (Iyer et al., 1998; Semenza, 1999; Semenza, 2000), ο οποίος ρυθμίζει μεταγραφικά την έκφραση μερικών δεκάδων γονιδίων-στόχων (Harris, 2002).

Στα μέχρι τώρα δεδομένα για τα γονίδια-στόχους του HIF-1 (πίνακας 1) περιλαμβάνονται γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου όσο και στην προσαρμογή στις αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου (Zagórska and Dulak, 2004). Τα γονίδια αυτά είναι δυνατόν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος, τα

οποία είτε προωθούν την αγγειογένεση (όπως ο VEGF και ο υποδοχέας του flt-1) είτε διαμορφώνουν τον αγγειακό τόνο (όπως η επαγόμενη συνθάση του NO, η οξυγενάση 1 της αίμης, η ενδοθηλίνη 1 κλπ). Η δεύτερη ομάδα αντιπροσωπεύεται από γονίδια των οποίων τα προϊόντα επάγουν την ερυθροποίηση. Εκτός από την ερυθροποιητίνη, ο HIF-1 προκαλεί θετική ρύθμιση του γονιδίου της σερούλοπλασμίνης, της

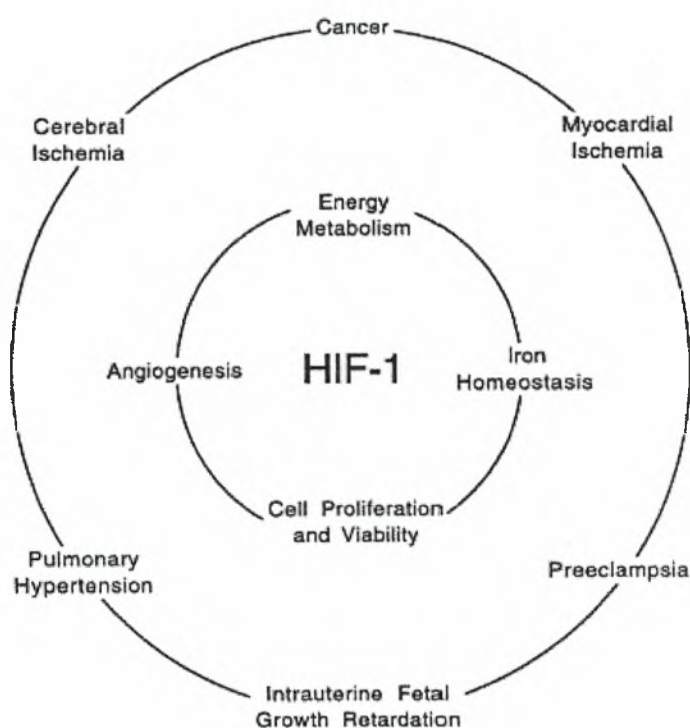
Process		Gene product	References	
Control of vascular system	Angiogenesis	Vascular endothelial growth factor	Forsythe <i>et al.</i> , 1996	
		VEGF receptor 1	Gerber <i>et al.</i> , 1997	
		Plasminogen activator inhibitor 1	Kietzmann <i>et al.</i> , 1999	
		Transforming growth factor β 3	Caniggia <i>et al.</i> , 2000	
		Nitric oxide synthase 2 (inducible nitric oxide synthase)	Melillo <i>et al.</i> , 1995	
	Vasomotor control	Endothelin-1	Palmer <i>et al.</i> , 1998	
		α 1 β -adrenergic receptor	Hu <i>et al.</i> , 1998	
		Adrenomedullin	Eckhart <i>et al.</i> , 1997	
		Heme oxygenase 1	Cormier-Regard <i>et al.</i> , 1998	
			Lee <i>et al.</i> , 1997	
Maturation of red blood cells	Erythropoiesis	Erythropoietin	Jiang <i>et al.</i> , 1996	
		Transferrin	Rolf's <i>et al.</i> , 1997	
	Iron transport	Transferrin receptor	Lok & Ponka, 1999	
			Tacchini <i>et al.</i> , 1999	
			Mukhopadhyav <i>et al.</i> , 2000	
Energy metabolism	Glycolysis	Ceruloplasmin		
		Lactate dehydrogenase A	Firth <i>et al.</i> , 1994	
		Phosphoglycerate kinase 1	Semenza <i>et al.</i> , 1994, 1996	
		Aldolase A and C	Iyer <i>et al.</i> , 1998	
		Phosphofructokinase L		
		Pyruvate kinase M		
		Enofase 1		
		Hexokinase 1 and 2		
		Glucose transport	Glucose transporter 1	Gleadle & Ratcliffe, 1997
			Glucose transporter 3	O'Rourke <i>et al.</i> , 1996
			Iyer <i>et al.</i> , 1998	
	Multifunctional enzyme	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Lu <i>et al.</i> , 2002 Iyer <i>et al.</i> , 1998	
	Cell proliferation and viability	Arrest of cell cycle	p21	Carmeliet <i>et al.</i> , 1998
		Apoptosis	Bcl2/E1B 19kDa-interacting protein 3 (BNIP3)	Bruick, 2000
			Nip3-like protein X	Sowter <i>et al.</i> , 2001
Insulin-like growth factor 2			Feldser <i>et al.</i> , 1999	
Growth factors		Insulin-like growth factor binding protein 1, 2 and 3		
Other	pH regulation	Carbonic anhydrase 9	Wykoff <i>et al.</i> , 2000	
	Nucleotide metabolism	Adenylyate kinase 3	O'Rourke <i>et al.</i> , 1996	
	Matrix metabolism	Collagen prolyl-4-hydroxylase α 1	Takahashi <i>et al.</i> , 2000	
	Catecholamine synthesis	Tyrosine hydroxylase	Norris & Millhorn, 1995	
	Feedback regulation	p35srj	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1999	

Πίνακας 1: Γονίδια-στόχοι του HIF-1 (Zagórska, A. and Dulak, J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Bioch. Pol.* 51(3):563-585, 2004)

τρανσφερρίνης και του υποδοχέα της, που διευκολύνουν την πρόσληψη σιδήρου από τους ερυθροποιητικούς ιστούς. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας από το μεταβολισμό. Η συνεργασία τους οδηγεί σε αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και ενεργοποίηση της γλυκόλυσης ως κύριας πηγής ενέργειας. Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει γονίδια των οποίων τα

προϊόντα είναι υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Επιπλέον αυτών των τεσσάρων ομάδων γονιδίων, υπάρχουν και άλλα γονίδια που επάγονται από τον HIF-1, με σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου σε διάφορα ακραία ερεθίσματα (stresses).

Λόγω του μεγάλου εύρους των γονιδίων-στόχων του HIF-1, η εμπλοκή του είναι αναπόφευκτη εκτός από τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και σε παθολογικές καταστάσεις. Παθοφυσιολογικά, εμπλέκεται στην ανάπτυξη ισχαιμικών καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών, πνευμονικής υπέρτασης, ανωμαλιών κατά την κύηση (προεκλαμψία, καθυστέρηση στην ανάπτυξη του εμβρύου) και καρκίνου (εικ. 1) (Semenza, 2000).

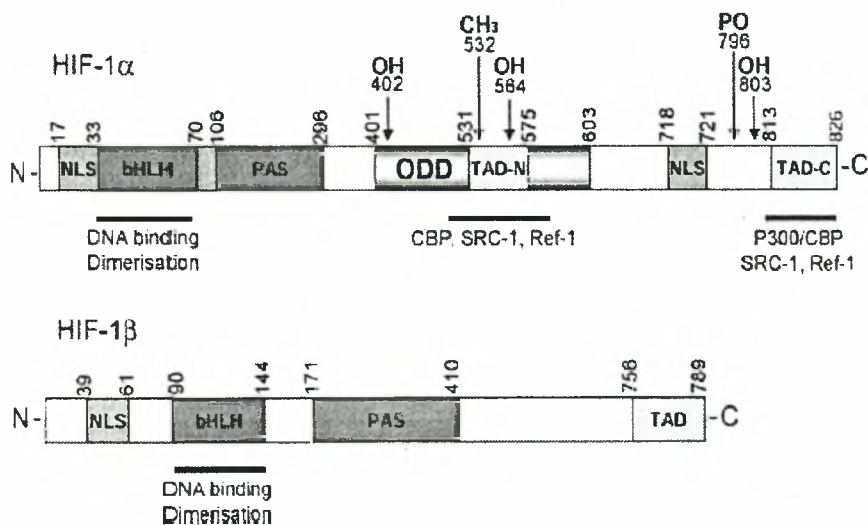


Εικ. 1: Εμπλοκή του HIF-1 σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Ο HIF-1 συμμετέχει σε φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες (εσωτερικός κύκλος) με την trans-ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων, που συμβάλλει σε προστατευτικές ή παθολογικές αποκρίσεις σε καταστάσεις νόσου (εξωτερικός κύκλος) (Semenza, G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14:1983-1991, 2000).

Ρύθμιση του HIF-1

Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες: τον HIF-1α και τον HIF-1β (Déry et al, 2005) (εικ. 2).

Ο HIF-1β εκφράζεται συνεχώς και είναι επίσης γνωστός ως πυρηνικός μεταφορέας του υποδοχέα των αρυλ-υδρογονανθράκων (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator – ARNT). Στην αλληλουχία του έχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal – NLS) και μια βασική περιοχή με δομή έλικα-θηλιά-έλικα (helix-loop-helix – bHLH). Η δομή bHLH είναι απαραίτητη τόσο για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA όσο και για τον διμερισμό με τον HIF-1α. Φέρει, επίσης, την περιοχή PAS, που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Η αλληλουχία αυτή ταυτοποιεί μια υπερικογένεια πρωτεϊνών που το όνομά της προκύπτει από τα ονόματα των τριών πρώτων μελών της (Per-ARNT-Sim) (Wang et al, 1995).

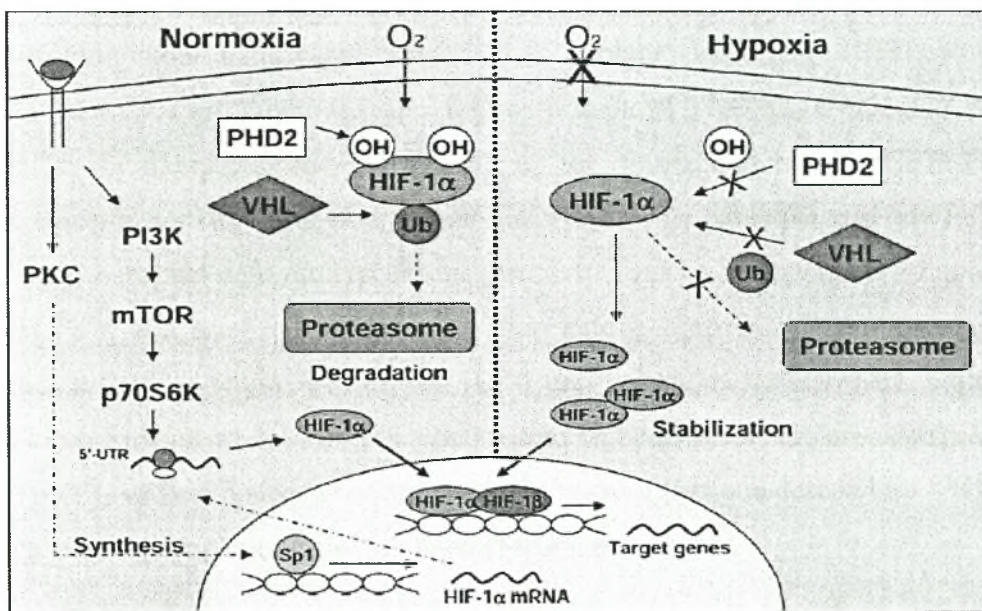


Εικ. 2: Σχηματική παράσταση της πρωτεϊνικής δομής των δύο υπομονάδων του HIF-1. Φαίνονται οι λειτουργικές περιοχές και οι περιοχές πρόσδεσης με τους συμπαραγόντες (Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., Richard, D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 37:535-540, 2005)

Ο HIF-1α, όπως και ο HIF-1β, έχει τις περιοχές NLS, bHLH και PAS αλλά και κάποιες μοναδικές χαρακτηριστικές περιοχές. Αυτές είναι η περιοχή αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο (oxygen-dependent degradation domain – ODD), που είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α και της οποίας ο ρόλος περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω. Επίσης περιέχει δύο περιοχές trans ενεργοποίησης (transactivation domains – TAD), που είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του HIF-1 καθώς και για την πρόσδεση

των συνενεργοποιητών όπως ο p300/CBP που είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1.

Αντίθετα με τον HIF-1β, η έκφραση του HIF-1α υπόκειται σε ρύθμιση. Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, η υπομονάδα α του HIF-1 υδροξυλιώνεται στην περιοχή ODD, ουβικουτινιώνεται και αποικοδομείται μέσω του πρωτεώσματος (Huang et al, 1998, Salceda and Caro, 1997, Pugh et al, 1997, Srinivas et al, 1999, Kallio et al, 1999, Sutter et al, 2000) (εικ. 3). Στην αποικοδόμηση του HIF-1α μεσολαβεί και ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας von Hippel-Lindau (pVHL) (Maxwell et al, 1999), ο οποίος ενώνεται με τον υδροξυλιωμένο στην περιοχή ODD

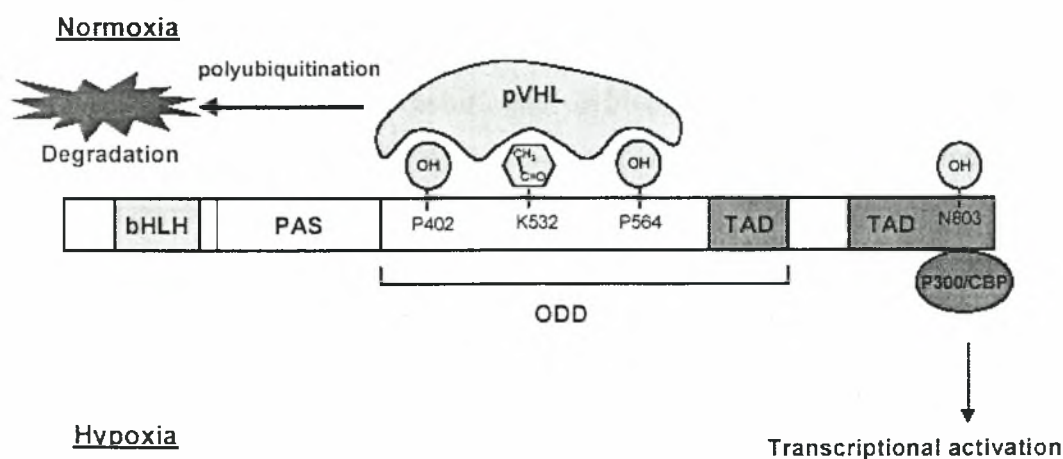


Εικ. 3: Ρύθμιση του HIF-1 εξαρτώμενη και μη από το οξυγόνο. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564 από την PHD2, ουβικουτινιώνεται από τον pVHL και γρήγορα οδηγείται στο πρωτεώσωμα για αποικοδόμηση. Αντίθετα, η σταθεροποίηση του HIF-1α συμβαίνει όταν η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι περιορισμένη. Αυτό επιτρέπει την μεταγραφή των γονιδίων απαραίτητων για την προσαρμοστική απόκριση στην υποξία. Μη υποξικά ερεθίσματα αυξάνουν τη μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α (Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., Richard, D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 37:535-540, 2005)

HIF-1α αλλά όχι με τη μη υδροξυλιωμένη πρωτεΐνη (Jaakola et al, 2000, Ivan et al, 2001). Ο pVHL είναι τμήμα μιας λιγάσης ουβικουτινίνης που ενώνει τον HIF-1α με ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών του μηχανισμού της ουβικουτινίνωσης και τον οδηγεί με τον τρόπο αυτό στο πρωτεώσωμα. Η υδροξυλίωση πραγματοποιείται από μια οικογένεια οξυγονο-εξαρτώμενων προλυλ-υδροξυλασών (prolyl-hydroxylases – PHD 1-3). Οι προλυλ-υδροξυλάσες είναι διοξυγενάσες, που περιέχουν αίμη και έχουν υποστρώματα το οξυγόνο και το 2-οξογλουταρικό οξύ. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν

ένα άτομο οξυγόνου στο κατάλοιπο προλίνης που υδροξυλιώνουν και το δεύτερο άτομο αντιδρά με το 2-οξογλουταρικό οξύ παράγοντας ηλεκτρικό οξύ (Semenza, 2001). Η παρουσία σιδήρου, οξυγόνου και 2-οξογλουταρικού οξέος είναι απαραίτητα για την ενζυματική υδροξυλίωση του HIF-1α από τις προλυλ-υδροξυλάσες (Schofield and Ratcliffe, 2004).

Προκειμένου ο HIF-1α να οδηγηθεί, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, στο προτεόσωμα για αποικοδόμηση, απαραίτητη είναι η ακετυλίωση σε κατάλοιπο λυσίνης στην ODD από την ARD1 ακετυλτρασφεράση, που μεταφέρει μια ακετυλομάδα από το ακετυλο-συνένζυμο Α. Η υδροξυλίωση παίζει επίσης ρόλο στην ενεργοποίηση του HIF-1, αλλά αυτή τη φορά σε κατάλοιπο ασπαραγίνης. Ο «παράγοντας που αναστέλλει τον HIF-1» (factor inhibiting HIF-1 – FIH) υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην περιοχή TAD στο C-τελικό άκρο και εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συμπαράγοντα p300/CBP. Ο FIH είναι, όπως οι προλυλ-υδροξυλάσες, μια διοξυγενάση με υποστρώματα τον Fe^{+2} και το 2-οξογλουταρικό οξύ. Απαιτεί επίσης βιταμίνη C για να διατηρείται ο σίδηρος στη μορφή Fe^{+2} . Και αυτή η υδροξυλίωση είναι επίσης εξαρτώμενη από το οξυγόνο, δηλώνοντας την αυστηρή ρύθμιση του HIF-1 από την παρουσία οξυγόνου. Επιπλέον, ο FIH ενώνεται με τον pVHL ανεξάρτητα από τη δράση των προλυλ-υδροξυλασών και ο pVHL αποκτά δράση απακετυλάσης της ιστόνης (histone deacetylase – HDAC) και σχετίζεται με τη λειτουργία της TAD (Mahon et al, 2001).

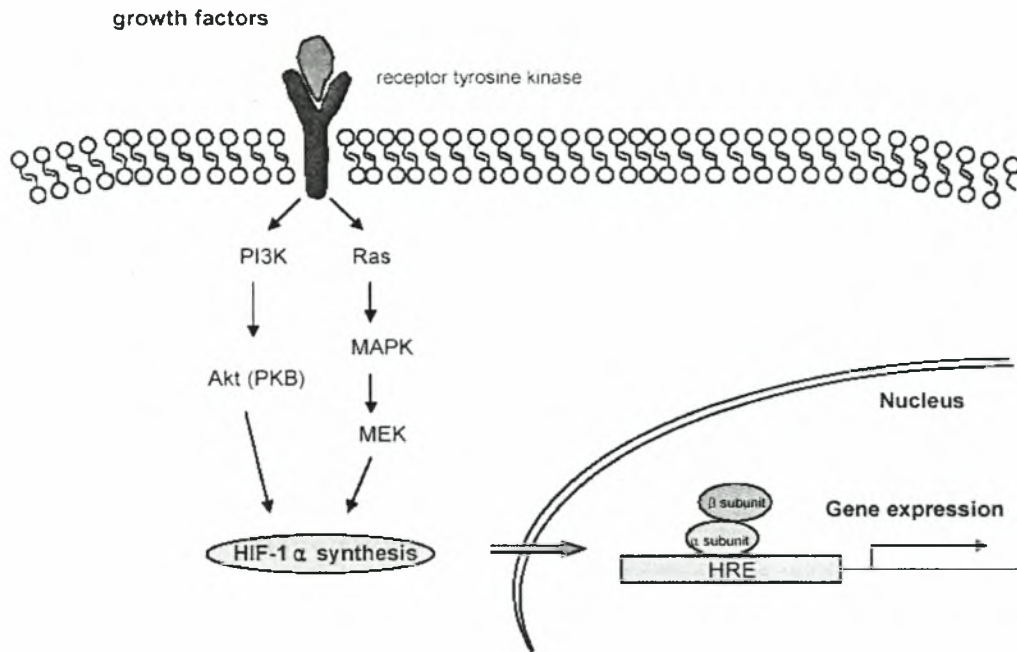


Εικ. 4: Μοριακός μηχανισμός σταθεροποίησης του HIF-1α. Τα επίπεδα οξυγόνου ρυθμίζουν την αποικοδόμηση μέσω υδροξυλίωσης ή ακετυλίωσης της ODD περιοχής και σύνδεσης του pVHL καθώς και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. (Ji-Won Lee, Seong-Hui Bae, Joo-Won Jeong, Se-Hee Kim and Kyu-Won Kim. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 36(1), 1-12, 2004)

Σε συνθήκες υποξίας, εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, η προλυλ-υδροξυλίωση του HIF-1α εμποδίζεται και η ακετυλίωση στο κατάλοιπο της λυσίνης υπόκειται σε κατιούσα ρύθμιση. Ο παράγοντας pVHL δεν μπορεί να ενωθεί στον HIF-1α, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να σταθεροποιείται. Ο HIF-1α συνδέεται με τον HIF-1β και σχηματίζουν το μεταγραφικό σύμπλοκο του HIF-1 στον πυρήνα. Επιπλέον, ο παράγοντας FIH δεν μπορεί να δράσει, με αποτέλεσμα να προσδένεται ο συμπαράγοντας p300/CBP στην TAD περιοχή και ο HIF-1 να ενεργοποιείται μεταγραφικά. Το ετεροδιμερές προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements –HREs) και αυξάνει την έκφραση των γονιδίων-στόχων του (Wegner, 2000).

Η επαγωγή του HIF-1α επιτυγχάνεται, σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου και από παράγοντες που μιμούνται την υποξία όπως η δεσφερριόξαμίνη και το κοβάλτιο (Co^{2+}) (Salnikow et al, 2000, Chachami et al, 2004). Η δεσφερριόξαμίνη είναι ένας χηλικός παράγοντας που δεσμεύει το σίδηρο που εμποδίζοντας τη δράση των προλυλ-υδροξυλασών (Wang and Semenza, 1993). Το κοβάλτιο πιθανόν εμποδίζει την δράση των προλυλ-υδροξυλασών, αντικαθιστώντας τον σίδηρο.

Επιπλέον, ο HIF-1α, σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, επάγεται από κυτοκίνινες όπως η ιντερλευκίνη 1β και αυξητικούς παράγοντες όπως η θρομβίνη, η αγγειοτενσίνη II, η ινσουλίνη, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF2) (Zelzer et al, 1998, Hellwig-Burgel et al, 1999, Richard et al, 2000, Görlach et al, 2001, Stiehl et al, 2002, Ji-Won Lee et al, 2004). Σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου, οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν την σύνθεση του HIF-1α, η οποία υπερισχύει της αποικοδόμησής του. Πιθανόν, οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση του HIF-1α ενεργοποιώντας το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K) και/ή της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (mitogen activated protein kinase –MAPK) (Zhong et al, 2000; Zundel et al, 2000; Laughner et al, 2001; Fukuda et al, 2002; Hellwig-Burgel et al, 1999). (εικ. 5). Επιπρόσθετα στο ρόλο του στη σύνθεση του HIF-1α, το μονοπάτι των MAPK ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, εξαιτίας της φωσφορυλίωσης της p300, η οποία είναι μεταγραφικός συμπαράγοντας του HIF-1α.



Εικ. 5: Αυξητικοί παράγοντες επάγουν τη σύνθεση του HIF-1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών (Ji-Won Lee, Seong-Hui Bae, Joo-Won Jeong, Se-Hee Kim and Kyu-Won Kim. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 36(1), 1-12, 2004)

Το αναπνευστικό σύστημα και η απόκριση του στην υποξία

Η αναπνευστική οδός, προκειμένου να ανταποκριθεί σε συνθήκες υποξίας, έχει αναπτύξει εξελικτικές ομοιοστατικές αποκρίσεις για την επαναφορά της ισορροπίας μεταξύ αερισμού και διάχυσης του οξυγόνου και με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζει την παροχή οξυγόνου στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, η οξεία υποξία οδηγεί στη συστολή των πνευμονικών αρτηριών, σε αυξημένη αρτηριακή πίεση και σε μια ανακατανομή της αιματικής ροής από το κατώτερο στο ανώτερο μέρος του πνεύμονα (Thyberg et al, 1996). Η χρόνια υποξία, που παρατηρείται σε άτομα που πάσχουν από προχωρημένες ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος ή ζουν σε μεγάλο υψόμετρο, μπορεί να οδηγήσει σε αγγειακή αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αρτηριών και τελικά, σε πνευμονική υπέρταση (Leach and Treacher, 1995, Leach et al, 2002). Τα αποτελέσματα της έκθεσης σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου είναι, επίσης, εμφανή και στην ανώτερη αναπνευστική οδό. *In vivo*, η χρόνια υποξία οδηγεί σε υπερπλασία των βρογχικών λείων μυών (Hulsmann et al, 1997) και αύξηση των συσπάσεων σε απομονωμένη τραχεία ποντικού (Clayton et al, 1999). *In vitro*, τα επίπεδα του οξυγόνου πιστεύεται ότι διαμορφώνουν την ανάπτυξη των λείων μυικών

κυττάρων της αναπνευστική οδού: η μέτρια υποξία (3% O₂) επάγει ενώ η έντονη υποξία (1% O₂) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους (Cogo et al, 2003).

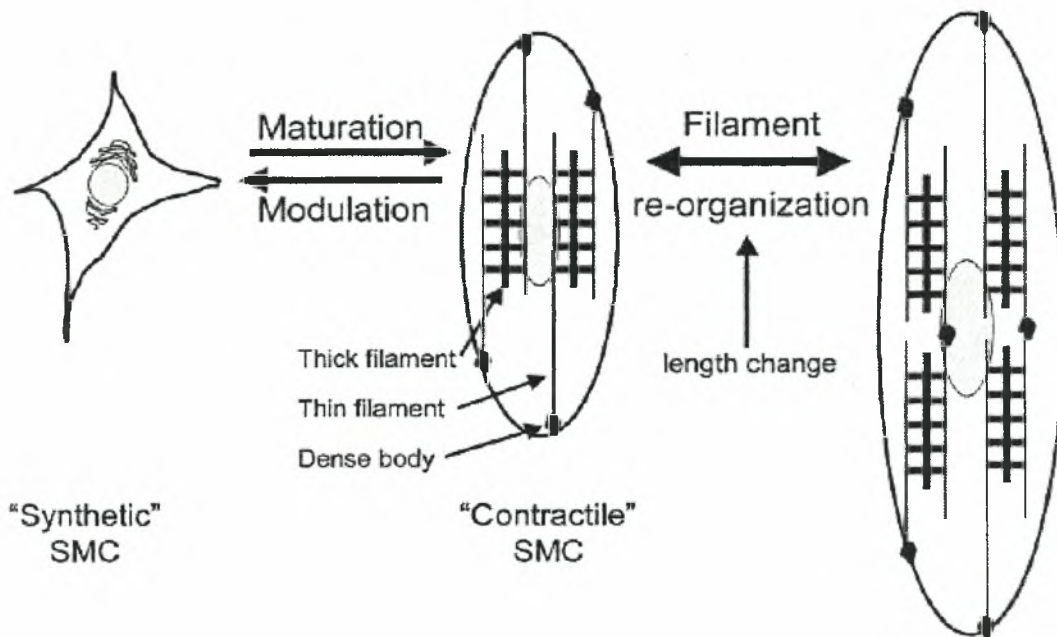
Τα επίπεδα του οξυγόνου in vivo είναι στενά συνδεδεμένα με την έκφραση του HIF-1α σε πολλά από τα είδη των κυττάρων που συμμετέχουν στο αναπνευστικό σύστημα και ενισχύεται, έτσι, η εμπλοκή του HIF-1 στις φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές αποκρίσεις του στην υποξία (Yu et al, 1998). Ειδικά, στα λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας κουνελιού, τόσο οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξυγόνου όσο και η παρουσία κοβαλτίου επηρεάζουν την έκφραση του HIF-1 (Chachami, et al, 2004).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών

Στην αναπνευστική οδό, τα λεία μυϊκά κύτταρα καλύπτουν το εσωτερικό των αεραγωγών και συστέλλονται προκειμένου να ρυθμίζουν τη διάμετρο τους. Τα λεία μυϊκά κύτταρα εκδηλώνουν έναν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και δεν υφίστανται τελική διαφοροποίηση (Owens, 1995, Thyberg, 1996). Η πρωταρχική τους λειτουργία είναι η σύσπαση, η οποία εξαρτάται από την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών συσταλών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι παρούσες στα κύτταρα σε αυστηρά ελεγχόμενες συγκεντρώσεις (Horowitz et al, 1996).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα υπάρχουν, εν δυνάμει, σε δύο διακριτούς φαινότυπους, τον συσταλώ και τον συνθετικό. Η φαινοτυπική διαφορά αντιστοιχεί και σε λειτουργική διαφοροποίηση. Ο συσταλώ φαινότυπος συνιστά αποτέλεσμα διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών (εικ. 6). Μέσα στο ίδιο το όργανο αλλά και μεταξύ διαφορετικών οργάνων, τα λεία μυϊκά κύτταρα οργανώνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί που προκαλούν αυτή την ετερογένεια περιλαμβάνουν τη διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών-υποδοχέων και των πρωτεϊνών-καναλιών και/ή των συσταλών πρωτεϊνών καθώς και εκείνων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της σύσπασης.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα συμμετέχουν σε παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού και εμπλέκονται στη δημιουργία ίνωσης, στη συσσώρευση μυϊκής μάζας και τη φλεγμονή (Hirst, 1996, Ross, 1993). Τα λεία μυϊκά κύτταρα με συνθετικό φαινότυπο εκφράζουν λίγες συσταλτές πρωτεΐνες και συνθέτουν μεμβρανικές πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκινίνες.

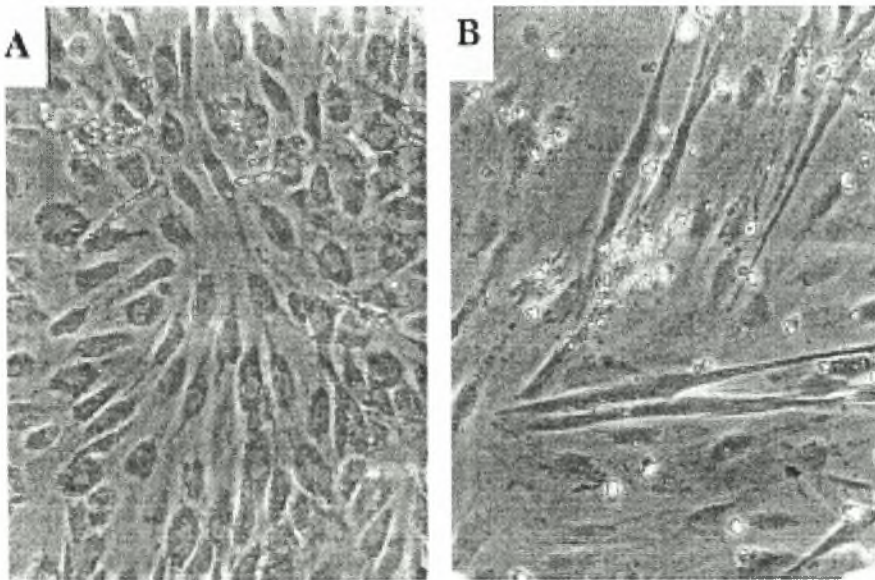


Εικ. 6: Σχηματική αναπαράσταση της συσχέτισης φαινοτυπικής και μηχανικής πλαστικότητας των λείων μυών. Η φαινοτυπική πλαστικότητα προέρχεται από την αντιστρέψιμη διαμόρφωση και ωρίμανση των λείων μυικών κυττάρων ανάμεσα στην συνθετική και συσταλή κατάσταση. Η μηχανική πλαστικότητα εμφανίζεται στα συσταλά μυοκύτταρα ως το αποτέλεσμα της χρονοεξαρτώμενης υποκυτταρικής αναδιοργάνωσης της συσκευής συστολής ως απόκριση στις αλλαγές του μήκους των μυών (Halayko, A. J., B. Camoretti-Mercado, S. M. Forsythe, J. E. Vieira, R. W. Mitchell, M. E. Wylam, M. B. Hershenson, and J. Solway. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am. J. Physiol.* 276 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 20): L197–L206, 1999).

Τα λεία μυικά κύτταρα υφίστανται γρήγορη φαινοτυπική διαμόρφωση σε πρωτογενείς καλλιέργειες, που εκδηλώνεται με χαρακτηριστική μείωση στη σύσταση των ειδικών για τα λεία μυικά κύτταρα συσταλών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών και αύξηση των μη μυικών πρωτεϊνών (Halayko et al, 1996, Shanahan et al, 1993). Η υφιστάμενη αποδιαφοροποίηση αντιστρέφεται μερικώς, όταν η επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου καλλιέργειας καλυφθεί πλήρως από κύτταρα. Λειτουργικά, παραμένουν ελάχιστα συσταλά. Ο συσταλτός φαινότυπος των πρόσφατα απομονωμένων λείων μυικών κυττάρων μπορεί να διατηρηθεί σε συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο, το οποίο δεν επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά από τη στιγμή που τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε μέσο που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους, η συσταλτικότητά τους χάνεται γρήγορα (Bowers et al, 1993). Σχετικά λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των λείων μυικών κυττάρων, εξαιτίας της μεγάλης πλαστικότητας των κυττάρων αυτών καθώς και των περιορισμών που αφορούν στην επαγωγή και/ή

τη διατήρηση του διαφοροποιημένου φαινότυπου στις καλλιέργειες. Φαίνεται, ωστόσο, ότι είναι υψηλά εξαρτώμενη από τις συνθήκες καλλιέργειας (Owens et al, 1996).

Η παρατεταμένη αφαίρεση του ορού (fetal serum) από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε επανεμφάνιση του συσταλτού φαινότυπου στα λεία μυϊκά κύτταρα της τραχείας (Halayko et al, 1999). Μορφολογικά, εμφανίζονται δύο ξεχωριστές ομάδες κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες κατά τη διάρκεια αφαίρεσης του ορού από το θρεπτικό μέσο για μεγάλο χρονικό διάστημα (εικ. 7). Η μία ομάδα αποτελείται από κύτταρα που φαίνονται επίπεδα και λαμπερά στο μικροσκόπιο αναστροφής φάσης και μοιάζει με τα κύτταρα που υπήρχαν πριν την αφαίρεση του ορού από το θρεπτικό μέσο. Η δεύτερη ομάδα αντιπροσωπεύει τη φυσιολογική επιμηκυσμένη μορφή και τα κύτταρα είναι ευθυγραμμισμένα και σε πολλές περιπτώσεις, διαταγμένα σε δεσμίδες. Στο μικροσκόπιο φαίνονται σκοτεινά αλλά με φωτεινό σαρκώλειμμα. Η ομάδα αυτή των κυττάρων αρχίζει να εμφανίζεται μετά από 2 μέρες αφαίρεσης του ορού από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και αυξάνει όσο το διάστημα καλλιέργειας χωρίς ορό παρατείνεται (Ma et al, 1998).



Εικ. 7: Επαγωγή δύο διακριτών φαινότυπων λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια μετά από παρατεταμένη αφαίρεση ορού από το θρεπτικό μέσο.

A: Φωτογραφία κυττάρων σε καλλιέργεια από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, που δείχνει έναν σχετικά ομοιογενή πληθυσμό και πρότυπο «λόφου – κοιλάδας»

B: Φωτογραφία μετά 10 ημέρες καλλιέργειας, όπου φαίνονται 2 διακριτές ομάδες κυττάρων: επίπεδα κυκλικά κύτταρα, που φαίνονται φωτεινά και επιμηκυσμένα κύτταρα με φωτεινό σαρκώλειμμα ευθυγραμμισμένα (Ma, X. F., Y. Wang, and N. L. Stephens. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 274 (*Cell Physiol.* 43): C1206– C1214, 1998)

Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Όπως έχει δειχθεί, η επίδραση CoCl_2 επάγει την έκφραση της υπομονάδας α του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυικών κυττάρων τραχείας κουνελιού, παρουσία ορού (Chachami et al, 2004). Η επαγωγή αυτή εξαρτάται από το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3K) και την παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Επιπλέον, μετά από αφαίρεση του ορού από το θρεπτικό μέσο σε πρωτογενή καλλιέργεια λείων μυικών κυττάρων εμφανίζεται ο συσταλτός φαινότυπος και η επίδραση CoCl_2 , ορού ή ορού και CoCl_2 οδηγούν στην επαγωγή του HIF-1 α . Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των παραμέτρων της επαγωγής του HIF-1 α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας υπό συνθήκες *in vitro* διαφοροποίησης από τους παράγοντες αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, διερευνάται η επίδραση στην επαγωγή του HIF-1 α του χρόνου διαφοροποίησης των λείων μυικών κυττάρων, αφαιρώντας τον ορό από το θρεπτικό μέσο και επιδρώντας με CoCl_2 , ορό ή ορό και CoCl_2 . Επιπλέον, μελετάται η κινητική της επαγωγής του HIF-1 α μετά την επίδραση των επαγωγέων καθώς και η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων ορού παρουσία CoCl_2 στην επαγωγή του HIF-1 α στα εν λόγω κύτταρα.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

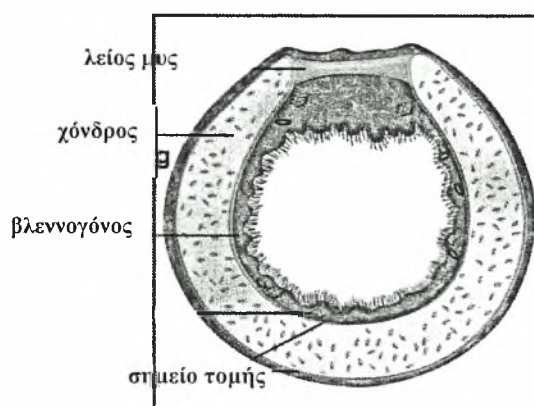
Απομόνωση λείων μυικών κυττάρων από τραχεία κουνελιού και δημιουργία πρωτογενούς καλλιέργειας

Θυσιάζουμε το κουνέλι με ενδοφλέβια χορήγηση πεντοβαρβιτάλης. Αφαιρούμε την τραχεία κάτω από – κατά το δυνατόν – ασηπτικές συνθήκες χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα εργαλεία, γάζες και αντισηπτικό διάλυμα (betadine). Τοποθετούμε την τραχεία σε παγωμένο και αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλής συγκέντρωσης Ca και ξεπλένουμε ώστε να απομακρυνθεί το αίμα. Στη συνέχεια αφαιρούμε το λίπος και κόβουμε τον χόνδρο κατά μήκος

στο τμήμα της τραχείας που βρίσκεται αντιδιαμετρικά από τις λείες μυικές ίνες (εικ. 8).

Απομακρύνουμε το επιθήλιο με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό, απομονώνουμε από την τραχεία τον λείο μυ και ξεπλένουμε με διάλυμα Krebs χαμηλού Ca. Επωάζουμε τον ιστό παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, ώστε τα

μυικά κύτταρα να αποκολληθούν ενζυμικά. Αρχικά, μεταφέρουμε σε 2ml διαλύματος Krebs χαμηλού Ca που περιέχει 0.25% αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin - BSA), 2mg/ml κολλαγόναση (collagenase I) και 10U/ml ελαστάση (elastase IV) και επωάζουμε 30min στους 37°C αναδεύοντας. Ξεπλένουμε και φυγοκεντρούμε 2 φορές (για 10min σε 1000g στους 4°C σε διάλυμα Krebs χαμηλού Ca). Στη συνέχεια, μεταφέρουμε σε 2ml διαλύματος Krebs χαμηλού Ca που περιέχει 0.25% αλβουμίνη ορού βοός, 1mg/ml κολλαγόναση και 20U/ml ελαστάση. Επωάζουμε για 45-60min στους 37°C αναδεύοντας. Ξεπλένουμε τις λείες μυικές ίνες και φυγοκεντρούμε 2 φορές (για 10min σε 1000g στους 4°C) σε DMEM:F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium:Ham's F12) που περιέχει 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum - FBS) και 100U/ml πενικιλίνη και 0,1mg/ml στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin - pen/str). Επαναίωρούμε το ίζημα με απαλό πιπετάρισμα προκειμένου να



Εικ.8: Σχηματική αναπαράσταση τραχείας όπου φαίνεται και το σημείο τομής αντιδιαμετρικά του λείου μυ

αποκολληθούν τα χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα των λείων μυικών ινών. Μεταφέρουμε το εναιώρημα των κυττάρων σε τρυβλίο Petri με DMEM:F12 που περιέχει 10% ορό και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και επωάζουμε σε υγραινόμενο επωαστικό κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO₂ αλλάζοντας το θρεπτικό μέσο κάθε 48-72 ώρες.

ΔΙΑΛΥΜΑ KREBS ΧΑΜΗΛΟΥ Ca

139mM NaCl

5.4mM KCl

1.47mM MgSO₄

11mM γλυκόζη

1.47mM KH₂PO₄

2.8mM Na₂HPO₄

1.4mM NaHCO₃

0.2mM CaCl₂

Πάγωμα κυττάρων

Πλένουμε τα κύτταρα με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline – PBS) και προσθέτουμε 0,25% τρυψίνη σε PBS και 0,05% EDTA (2ml σε κάθε φλάσκα επιφάνειας 75cm²). Επωάζουμε για 5min στους 37°C και προσθέτουμε 2ml θρεπτικού μέσου που περιέχει 10% διμεθυλ-σουλφοξείδιο (dimethyl-sulfoxide - DMSO). Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα μεταφέρουμε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης, τα οποία τοποθετούμε στους -80°C ή σε υγρό άζωτο. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε υγρό άζωτο προκειμένου να διατηρηθούν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Ξεπάγωμα κυττάρων

Ξεπαγώνουμε τα κύτταρα γρήγορα κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης. Προσθέτουμε σταγόνα σταγόνα 10ml DMEM:F12 που περιέχει 10% ορό και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και επαναιωρούμε. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 3min στις 800rpm και αποχύνουμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε τα

κύτταρα σε 10ml DMEM:F12 που περιέχει 10% ορό και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και τα μεταφέρουμε σε φλάσκα για επώαση στους 37°C παρουσία 5% CO₂.

Καλλιέργεια των κυττάρων

Αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιασθούν, ως ότου η φλάσκα γεμίσει (confluence). Η πληρότητα της φλάσκας πραγματοποιείται περίπου σε 3-5 ημέρες ανάλογα την ποσότητα των κυττάρων που έχουμε μεταφέρει σε αυτή. Κάθε 48 ώρες αλλάζουμε το θρεπτικό μέσο. Όταν η φλάσκα γεμίσει, ξεπλένουμε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Προσθέτουμε 2ml 0,25% τρυψίνη σε PBS και 0,05% EDTA και επωάζουμε για 5min στους 37°C. Αποκολλούμε τα κύτταρα, προσθέτουμε DMEM:F12 που περιέχει 10% ορό και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και τα μεταφέρουμε σε τρυβλία Petri, όπου θα πραγματοποιηθούν οι πειραματικές διαδικασίες.

Διαφοροποίηση των λείων μυικών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια

Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί και έχουν καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου κατά 85%, αλλάζουμε το θρεπτικό μέσο και προσθέτουμε καινούριο, το οποίο δεν περιέχει ορό αλλά 100U/ml πενικιλίνη και 0,1mg/ml στρεπτομυκίνη και 5μg/ml ινσουλίνη, 5μg/ml τρανσφερίνη και 5ng/ml σελήνιο (insulin – transferrin – selenium - ITS), απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων.

Ταυτοποίηση των λείων μυικών κυττάρων

Η ταυτοποίηση των λείων μυικών κυττάρων που απομονώθηκαν από την τραχεία του κουνελιού γίνεται με τη χρήση αντισώματος κατά της α-ακτίνης των λείων μυών του ανθρώπου (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού A104 – Sigma) με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και την α-ακτίνη των λείων μυών του κουνελιού.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Αρχικά, τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία Petri, τα οποία περιέχουν γυάλινες καλυπτρίδες (διαμέτρου 12mm), όπου προσκολλώνται και οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα βήματα.

Μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε πιάτο 24 θέσεων και ξεπλένουμε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Μονιμοποιούμε τα κύτταρα σε διάλυμα 3% φορμαλδεΐδης σε PBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε με διάλυμα PBS 2 φορές για 5min κάθε φορά, ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΐδη. Επώαζουμε με διάλυμα PBS-1% Triton X-100 για 15min στους 4°C, ώστε η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή. Ξεπλένουμε με διάλυμα PBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Μπλοκάρουμε με διάλυμα 3% αλβουμίνης ορού βοός (BSA) – PBS - 0.1% Tween 20 για 1 ώρα στους 4°C. Σε υγρό περιβάλλον, επώαζουμε με το πρώτο αντίσωμα anti-SM- α -actin (αραίωση 1:400) ή anti-HIF-1 (αραίωση 1:200) αραιωμένο σε διάλυμα 1% BSA – PBS - 0.1% Tween 20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε 3 φορές με διάλυμα 1% BSA – PBS - 0.1% Tween 20 για 10min κάθε φορά. Επώαζουμε με το δεύτερο αντίσωμα (goat anti-mouse) κατά της IgG του ποντικού συζευγμένο με FITC (Amersham) αραιωμένο 1:50 σε διάλυμα 1% BSA - PBS - 0.1% Tween 20 για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε 3 φορές με 1% BSA - PBS - 0.1% Tween 20 για 5min κάθε φορά. Στη συνέχεια, πλένουμε τις καλυπτρίδες με απεσταγμένο νερό, τις στεγνώνουμε και τις τοποθετούμε ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε μια σταγόνα Vectashield, το οποίο περιέχει 4,6 διαμιδο-2-φαινυλ-ινδόλη (4,6 diamido-2-phenylindole - DAPI (20μg/ml)) για χρώση του DNA. Παρατηρούμε σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με το σύστημα κάμερας UFX-DX (Nikon).

Κατεργασία κυττάρων

Αλλάζουμε το θρεπτικό μέσο στα τρυβλία που η επιφάνειά τους είναι καλυμμένη με λεία μυϊκά κύτταρα και επώαζουμε για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προσθέτουμε τους επαγωγείς του HIF-1: 100μM CoCl₂ και ορό (FBS) σε συγκεντρώσεις 1%, 2%, 5% και 10% και συνεχίζουμε την επώαση για τον χρόνο που απαιτείται σε κάθε πείραμα.

Παρασκευή εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης λείων μυικών κυττάρων

Μετά το τέλος του χρόνου επώασης με τους επαγωγείς αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο και ξεπλένουμε με 1x PBS που περιέχει 100μg/ml φθορο-φαινυλ-μεθυλ-σουλφίδιο (phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF). Απομακρύνουμε (scrape) τα κύτταρα από το πιάτο με 50μl διαλύματος λύσης (lysis buffer) και τοποθετούμε για 10min στον πάγο. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε στις 10000rpm για 30min στους 4°C. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (lysis buffer)

20mM Tris-HCl pH 8.0

150mM NaCl

1% Triton X-100

100μg/ml φθορο-φαινυλ-μεθυλ-σουλφίδιο(PMSF)

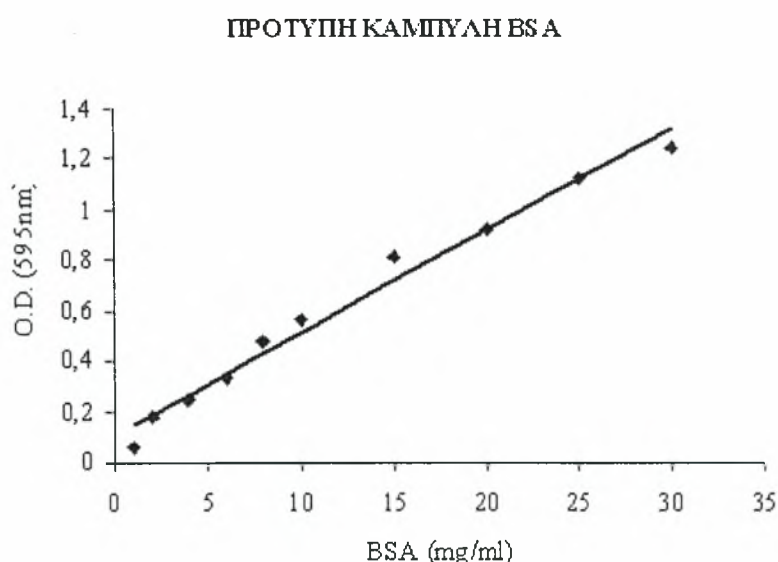
1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

1mM Na₃VO₄

10mM β-glycerolphosphate

Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων (μέθοδος Bradford)

BSA (mg/ml)	O.D. (595nm)
1	0,063
2	0,181
4	0,246
6	0,330
8	0,481
10	0,561
15	0,814
20	0,920
25	1,131
30	1,249



Εικ. 9: Πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατά Bradford

Χρησιμοποιούμε 5μl από το υπερκείμενο για τη μέτρηση των πρωτεϊνών του δείγματος με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford και προσθέτουμε 795μl H₂O και 200μl διαλύματος της εταιρείας BioRad, επωάζουμε 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για σταθεροποίηση του χρώματος και φωτομετούμε στα 595nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται από πρότυπη καμπύλη, η οποία προκύπτει από φωτομέτρηση πρότυπων διαλυμάτων (γνωστών συγκεντρώσεων) αλβουμίνης ορού βοός (BSA) (εικ.9).

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού μέσου (SDS PAGE)

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιούμε 100μl (ή 3 όγκους) από το υπερκείμενο και προσθέτουμε 33μl (ή 1 όγκο) 4x διάλυμα φόρτωσης του δείγματος (4x sample loading buffer). Θερμαίνουμε στους 95°C για 3min και τα δείγματα είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση.

4x ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΟΡΤΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (sample loading buffer)

250mM Tris-HCl pH 6.8

9.2% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

40% γλυκερόλη

0.2% (w/v) κυανό της βρωμοφαινόλης

100mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (BUFFERS)

Πηκτή διαχωρισμού (separating gel)

0.375M Tris – HCl pH 8.8

2mM EDTA

0.1% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

4x ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (separating gel buffer)

1.5M Tris

8mM EDTA

0.4% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

Πηκτή συσσώρευσης (stacking gel)

0.125M Tris – HCl pH 6.8

2mM EDTA

0.1% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

4x ΔΙΑΛΥΜΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ (stacking gel buffer)

0.5M Tris

8mM EDTA

0.4% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΝ

Προετοιμασία 10ml διαλύματος για 2 πηκτές διαχωρισμού διαστάσεων 10cm x 5cm ως εξής:

πηκτή περιεκτικότητας 8% σε ακρυλαμίδιο: 2.7ml 30% ακρυλαμίδιο/bis ακρυλαμίδιο, 2.5ml 4x ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού, 4.85ml H₂O, 40μl 10% υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulphate – APS) και 20μl N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλ-διαμίνη (N,N,N',N'-tetramethylethylen diamine – TEMED)

Αναμιγνύουμε καλά το ακρυλαμίδιο, το ρυθμιστικό διάλυμα και το νερό και στη συνέχεια προσθέτουμε πρώτα το APS και έπειτα το TEMED και αναμιγνύουμε. Στη συνέχεια, ρίχνουμε την πηκτή ανάμεσα σε γυάλινες πλάκες κατάλληλα τοποθετημένες. Δεν γεμίζουμε τελείως αλλά αφήνουμε περίπου 2cm χώρο από την κορυφή. Γεμίζουμε τον επιπλέον χώρο με νερό χωρίς να αναταράξουμε την επιφάνεια της πηκτής.

Περιμένουμε μέχρι να πολυμεριστεί η πηκτή (μπορούμε να διακρίνουμε την διεπιφάνεια ανάμεσα στην πολυμερισμένη πηκτή και το νερό). Αποχύνουμε το νερό και απομακρύνουμε το υπόλοιπο με διηθητικό χαρτί χωρίς να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια της πηκτής.

Προετοιμασία 8ml διαλύματος για 2 πηκτές συσσώρευσης διαστάσεων 10cm x 2cm ως εξής:

1.2ml 30% ακρυλαμίδιο/bis ακρυλαμίδιο, 2.0ml 4x ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης, 4.7ml H₂O, 50μl 10% υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulphate – APS) και 50μl N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλ-διαμίνη (N,N,N',N'-tetramethylethylen diamine – TEMED).

Ρίχνουμε την πηκτή συσσώρευσης πάνω από την πηκτή διαχωρισμού γεμίζοντας το χώρο ανάμεσα από τις δύο γυάλινες πλάκες και τοποθετούμε τα «χτενάκια». Περιμένουμε μέχρι η πηκτή να πολυμεριστεί. Όταν πολυμεριστεί, απομακρύνουμε προσεκτικά τα χτενάκια και ξεπλένουμε τα πηγαδάκια με νερό. Τοποθετούμε τις πηκτές στην συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN® 3 Cell της εταιρείας BioRad.

Γεμίζουμε το εσωτερικό διαμέρισμα της συσκευής μέχρι την κορυφή με 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running (electrode) buffer).

Φορτώνουμε τα δείγματα (μέγιστη χωρητικότητα στα πηγαδάκια 35μl) και τρέχουμε τις πηκτές σε σταθερή τάση 150V για περίπου 1 ώρα. Σταματάμε όταν η χρωστική φτάσει το τέλος της πηκτής.

5x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ (running (electrode) buffer)

0.25M Tris

1.92M γλυκίνη

10mM EDTA

0.5% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)

Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε υγρό περιβάλλον

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται για εξισορρόπηση σε διάλυμα μεταφοράς. Στη συνέχεια, σε ειδική θήκη τοποθετούμε διαδοχικά ένα σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί, την πηκτή, την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα διηθητικό χαρτί και ένα σφουγγαράκι, τα οποία έχουμε εμβαπτίσει στο διάλυμα μεταφοράς. Η παραπάνω διάταξη τοποθετείται σε συσκευή μεταφοράς, έτσι ώστε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να γειτνιάζει με τον θετικό πόλο και η πηκτή με τον αρνητικό πόλο της συσκευής. Με τον τρόπο αυτό, οι πρωτεΐνες (αρνητικά φορτισμένες) μεταφέρονται από την πηκτή στην μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται σε τάση 100V, ένταση 350mA για 1 ώρα.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ (transfer buffer)

48mM Tris

39mM γλυκίνη

20% μεθανόλη

1.3mM δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

Χρώση με Ponceau S

Ξεπλένουμε την μεμβράνη με απεσταγμένο νερό και προσθέτουμε χρωστική Ponceau S 0,2% σε 0,5% τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid – TCA) (Serva) για 1min. Στην συνέχεια, ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό. Οι ζώνες των πρωτεϊνών φαίνονται κόκκινες. Ξεπλένουμε με διάλυμα PBS - 0,1% Tween 20 για να απομακρυνθεί η χρωστική.

Επώαση με αντίσωμα

Επώαζουμε τη μεμβράνη με διάλυμα κορεσμού (blocking buffer – 5% άπαχο γάλα σε PBS – 0,1% Tween 20) για 30min. Ξεπλένουμε με διάλυμα PBS – 0,1% Tween 20 και βάζουμε το πρώτο αντίσωμα anti-HIF (σε αραιώση 1:500) ή anti-SM- α -actin (σε αραιώση 1:1000) αραιωμένο σε PBS – 0,1% Tween 20 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη 3 φορές με διάλυμα PBS – 0,1% Tween 20 για 10min κάθε φορά. Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (σε αραιώση 1:3000) αραιωμένο σε PBS – 0,1% Tween 20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP (horse-raddish peroxidase) και έχει παραχθεί κατά του πρώτου αντισώματος. Στην περίπτωση των anti-HIF-1 και anti-SM- α -actin χρησιμοποιούμε ως δεύτερο αντίσωμα ανοσοσφαιρίνη αίγας κατά της ανοσοσφαιρίνης G του ποντικού (goat anti mouse). Ξεπλένουμε 3 φορές για 10min κάθε φορά με διάλυμα PBS – 0,1% Tween 20.

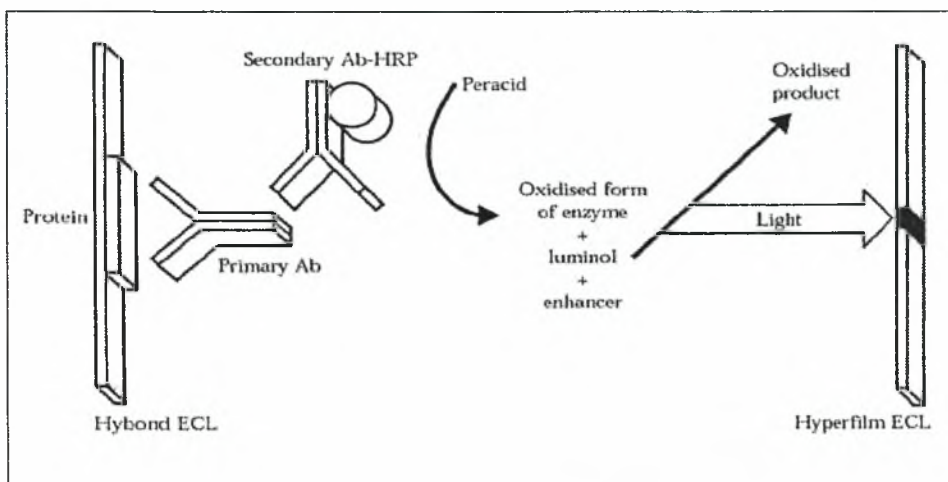
Χημειοφωταύγεια (chemiluminescence – ECL)

Επώαζουμε τη μεμβράνη με διάλυμα, το οποίο αποτελείται από 10ml λουμινόλης 1.25mM σε 0,1M Tris pH 8.5, 100μl κουμαρικού οξέος 6.8mM σε διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO) και 30μl H₂O₂ 3%. Στη συνέχεια, εκθέτουμε μεμβράνη σε φιλμ φωταύγειας (εικ.10). Μεταφέρουμε το φιλμ σε υγρό εμφάνισης

(developer) για 3min και υγρό σταθεροποίησης (fixer) της AGFA. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο.

Χρωματική αντίδραση

Επιάζουμε τη μεμβράνη με διάλυμα, το οποίο περιέχει 1ml μεθανόλης με 10μl χλωροναφθόλης 0,5g/ml και 9ml διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) με 10μl H₂O₂ 30% μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες της ακτίνης. Διακόπτουμε την αντίδραση ξεπλένοντας με νερό και στεγνώνουμε τη μεμβράνη σε διηθητικό χαρτί.



Εικ. 10: Σχηματική περιγραφή της αρχής μεθόδου της χημειοφωταύγειας. Το πρώτο αντίσωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη και το δεύτερο αντίσωμα που φέρει το ένζυμο HRP με το πρώτο. Το H₂O₂ προκαλεί οξείδωση του ενζύμου, το οποίο παρουσία λουμινόλης και ενισχυτή (κουμαρικό οξύ) δίνει ένα οξειδωμένο προϊόν που εκπέμπει φως. Η ένταση του φωτός αποτυπώνεται στο φιλμ.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

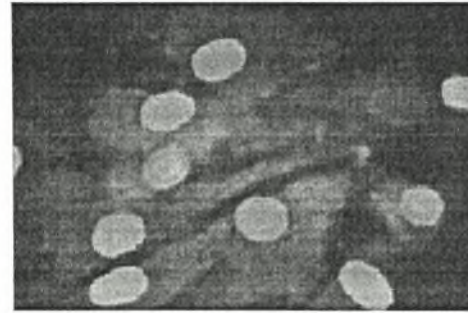
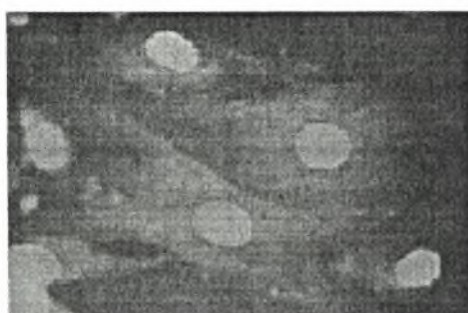
Δημιουργία πρωτογενούς καλλιέργειας λείων μυικών κυττάρων από τραχεία κουνελιού

Απομονώσαμε λεία μυικά κύτταρα από τραχεία κουνελιού, μετά από επώαση του ιστού με πρωτεολυτικά ένζυμα (ελαστάση και κολλαγονάση), με σκοπό τη δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει μελέτη της επαγωγής του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα αεραγωγών. Η εκ νέου δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών είναι απαραίτητη, καθώς τα κύτταρα σε αυτές έχουν πεπερασμένο χρόνο επιβίωσης. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα κύτταρα στην καλλιέργεια ήταν λεία μυικά έγινε ταυτοποίηση τους με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού και τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού κατά της ισομορφής της ανθρώπινης α-ακτίνης που συναντάται στους λείους μυς. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο DMEM:F12 που περιέχει 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (pen/str).

anti-SM- α -actin



DAPI

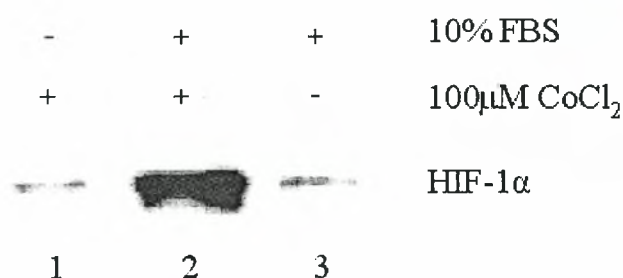


Εικ. 11: Ανοσοφθορισμός λείων μυικών κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ανθρώπινης SM- α -actin A104. Πάνω από το 95% των κυττάρων χρωματίστηκαν θετικά για την ειδική πρωτεΐνη των λείων μυικών κυττάρων (α -ακτίνη). Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται εμφανής με χρώση με 4,6 διαμιδο-2-φαινυλινδόλη (DAPI).

Μονιμοποιήσαμε τα κύτταρα πάνω στις καλυπτρίδες που είχαν προσκολληθεί και τα επώασαμε με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της α-ακτίνη των λείων μυικών κυττάρων. Στη συνέχεια, επώασαμε με ένα δεύτερο αντίσωμα κατά της IgG του ποντικού που φέρει συνδεδεμένη ομοιοπολικά φθορίζουσα ομάδα (φλουορεσκεΐνη). Μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού διαπιστώσαμε ότι πάνω από το 95% των κυττάρων είχε αντιδράσει με τα αντισώματα και συνεπώς, εκφράζει τη συσταλή πρωτεΐνη των λείων μυικών κυττάρων (εικ.11). Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται εμφανής μετά από χρώση με 4,6 διαμιδο-2-φαινυλινδόλη (DAPI).

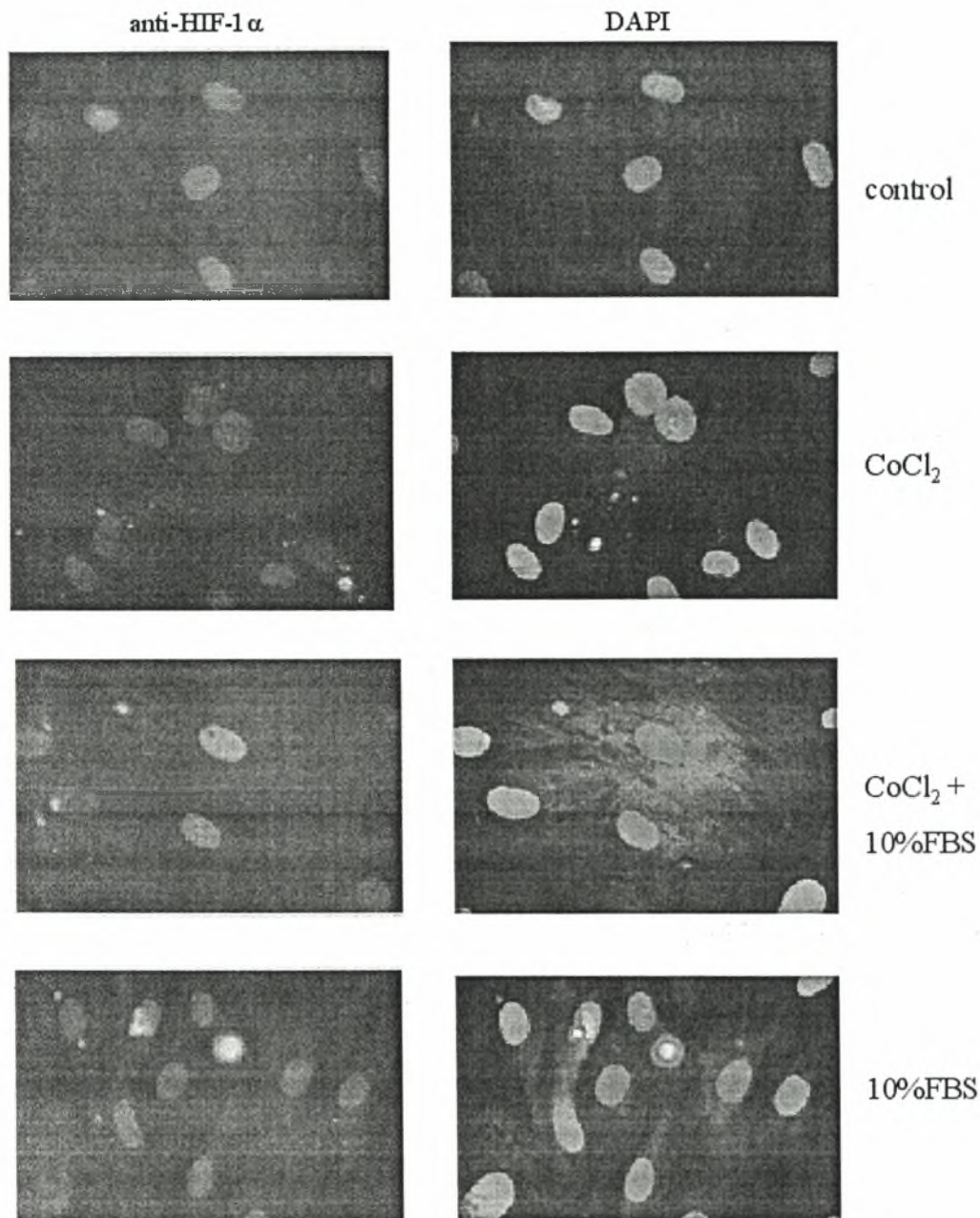
Επαγωγή έκφρασης του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας

Στη συνέχεια, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε το πρότυπο επαγωγής του HIF-1α στα λεία μυικά κύτταρα τραχείας. Αρχικά, τα λεία μυικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (pen/str). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, αφαιρέσαμε τον ορό από το θρεπτικό μέσο, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της διαφοροποίησης και επώασαμε στο μέσο αυτό για 3 ημέρες. Την τέταρτη ημέρα προσθέσαμε στα κύτταρα 100μM CoCl₂, 100μM CoCl₂+10%FBS ή 10%FBS για 4 ώρες. Προκαλέσαμε λύση των κυττάρων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε κατά Bradford για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Στη συνέχεια 40μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Τα επίπεδα του HIF-1α προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-HIF-1α.



Εικ. 12: Λεία μυικά κύτταρα τραχείας εκφράζουν τον HIF-1α, όταν εκτίθενται σε CoCl₂ (διαδρομή 1) και FBS (διαδρομή 2). Η επαγωγή αυξάνει όταν οι δύο αυτοί παράγοντες συνυπάρχουν στο μέσο καλλιέργειας (διαδρομή 3).

Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν τόσο μετά από την προσθήκη CoCl_2 όσο και μετά από την προσθήκη ορού στο μέσο καλλιέργειας. Η επαγωγή όμως ήταν πολύ μεγαλύτερη, όταν στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν ταυτόχρονα $100\mu\text{M}$ CoCl_2 και $10\%\text{FBS}$ (εικ. 12).



Εικ. 13: Ανοσοφθορισμός λείων μυϊκών κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά του HIF-1α. Απουσία ορού και CoCl_2 , ο HIF-1α δεν εκφράζεται και τα κύτταρα δεν φθορίζουν. Παρουσία CoCl_2 ή ορού, ο HIF-1α επάγεται και τα κύτταρα φθορίζουν. Ο φθορισμός γίνεται πιο έντονος, όταν οι δύο παράγοντες συνυπάρχουν στο μέσο καλλιέργειας των κυττάρων. Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται εμφανής με χρώση με 4,6 διαμιδο-2-φαινυλινδόλη (DAPI).

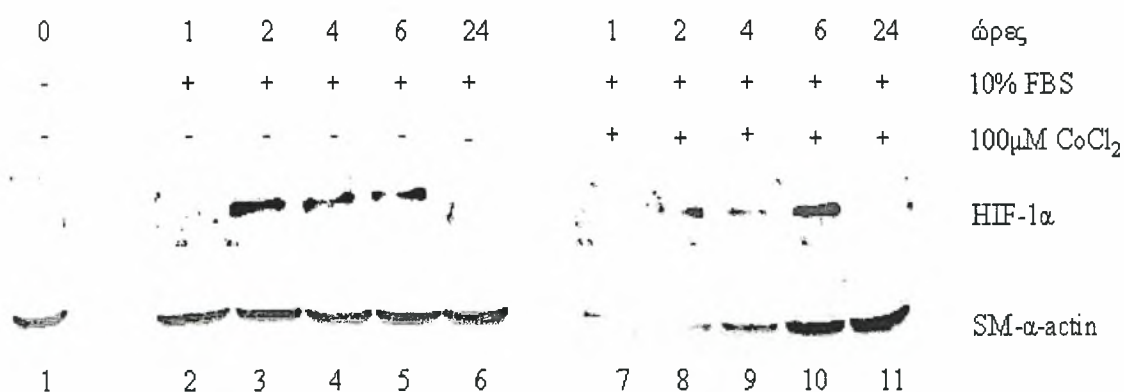
Ταυτόχρονα, μελετήσαμε την επαγωγή και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του HIF-1α στα ίδια κύτταρα, με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Μέσα στα

τρυβλία καλλιέργειας υπήρχαν καλυπτρίδες, στις οποίες είχαν προσκολληθεί κύτταρα, εκτεθειμένα αντίστοιχα σε CoCl_2 , FBS ή CoCl_2 +FBS. Έγινε επεξεργασία με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIF-1α και δεύτερο αντίσωμα που φέρει φθορίζουσα ομάδα, προκειμένου να διαπιστωθεί η έκφραση του HIF-1α.

Παρατηρήσαμε ότι σε κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε CoCl_2 ή ορό, ο HIF-1α δεν ήταν ανιχνεύσιμος. Όταν στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων προστέθηκε $100\mu\text{M CoCl}_2$ ή $10\%\text{FBS}$, τα επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν. Η επαγωγή έγινε πιο έντονη, όταν στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων προστέθηκαν ταυτόχρονα $100\mu\text{M CoCl}_2$ και $10\%\text{FBS}$ (εικ. 13).

Κινητική μελέτη της επαγωγής του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας

Σε πρωτογενή καλλιέργεια λείων μυικών κυττάρων και εφόσον τα κύτταρα είχαν καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, αφαιρέσαμε τον ορό από το θρεπτικό μέσο, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της διαφοροποίησης και επώασαμε στο μέσο αυτό για 3 ημέρες. Την τέταρτη ημέρα προσθέσαμε στα κύτταρα $100\mu\text{M CoCl}_2$ + $10\%\text{FBS}$ ή $10\%\text{FBS}$ για 4 ώρες. Προκαλέσαμε λύση των κυττάρων 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε κατά Bradford για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Στη συνέχεια $40\mu\text{g}$ πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Τα επίπεδα του HIF-1α προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό



Εικ. 14: Κινητική μελέτη της επαγωγής του HIF-1α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας, που αφαιρέθηκε ο ορός από το θρεπτικό τους μέσο και προστέθηκαν ως επαγωγείς $10\%\text{FBS}$ (διαδρομές 2-6) ή $10\%\text{FBS}$ και $100\mu\text{M CoCl}_2$ (διαδρομές 7-11). Η επαγωγή ανιχνεύεται αρχικά στις 2 ώρες (διαδρομές 3 και 8) και μέχρι διάστημα 6 ωρών (διαδρομές 5 και 10) μετά την προσθήκη των επαγωγέων

αντίσωμα ποντικού anti-HIF-1α. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, αντίσωμα κατά της α-ακτίνης των λείων μυών (anti-SM-α-actin) ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων που φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή.

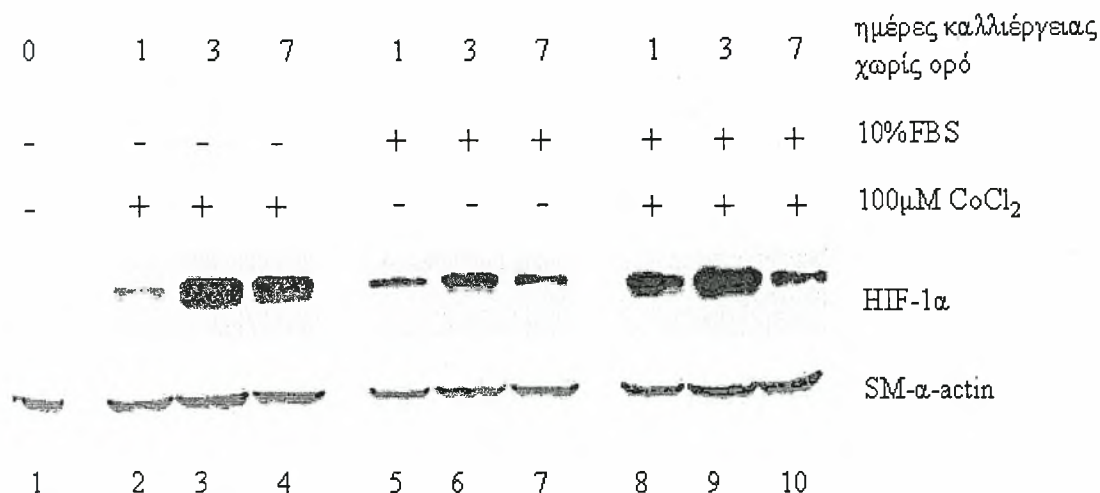
Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο περιπτώσεις, ο HIF-1α ανιχνεύθηκε αρχικά 2 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων. Τα επίπεδα του HIF-1α παραμείναν υψηλά για διάστημα 6 ωρών (εικ. 14).

Επίδραση του χρόνου διαφοροποίησης των λείων μυικών κυττάρων τραχείας στην επαγωγή του HIF-1α

Η αφαίρεση του ορού από το θρεπτικό μέσο των πρωτογενών καλλιιεργειών οδηγεί σε διαφοροποίηση των λείων μυικών κυττάρων και εμφάνιση του συσταλτού φαινότυπου.

Σε πρωτογενή καλλιέργεια λείων μυικών κυττάρων και εφόσον τα κύτταρα είχαν καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, αφαιρέσαμε τον ορό από το θρεπτικό μέσο, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της διαφοροποίησης και επώασαμε στο μέσο αυτό για 1, 3 και 7 ημέρες. Την δεύτερη, τέταρτη και όγδοη ημέρα προσθέσαμε στα κύτταρα 100μM CoCl₂, 100μM CoCl₂+10%FBS ή 10%FBS για 4 ώρες. Προκαλέσαμε λύση των κυττάρων 4 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε κατά Bradford για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Στη συνέχεια 40μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Τα επίπεδα του HIF-1α προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-HIF-1α. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, αντίσωμα κατά της α-ακτίνης των λείων μυών (anti-SM-α-actin) ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων που φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή.

Παρατηρήσαμε ότι η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α ήταν ανιχνεύσιμη σε όλες τις διαβαθμίσεις διαφοροποίησης (1, 3 και 7 ημέρες) των λείων μυικών κυττάρων παρουσία 100μM CoCl₂, 100μM CoCl₂+10%FBS και 10%FBS. Παρατηρήθηκε μέγιστη επαγωγή της έκφρασης την τρίτη ημέρα και για τις τρεις περιπτώσεις (διαδρομές 3, 6, 9), ενώ η επαγωγή από 10%FBS (διαδρομή 7) και 100μM CoCl₂+10%FBS (διαδρομή 10) μειώνεται όσο προχωρά η διαφοροποίηση (έβδομη ημέρα) (εικ. 15)



Εικ. 15: Μελέτη της επίδρασης του χρόνου διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας στην επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α από 100μM CoCl₂, 100μM CoCl₂+10%FBS και 10%FBS. Μέγιστη επαγωγή παρατηρείται την τρίτη ημέρα διαφοροποίησης (διαδρομές 3, 6, 9). Στην έβδομη ημέρα, όταν προστεθεί 100μM CoCl₂ (διαδρομή 4) στο θρεπτικό μέσο, το μέγιστο της επαγωγής διατηρείται, ενώ, όταν προστεθεί 10%FBS (διαδρομή 7) ή 100μM CoCl₂+10%FBS (διαδρομή 10), η επαγωγή μειώνεται.

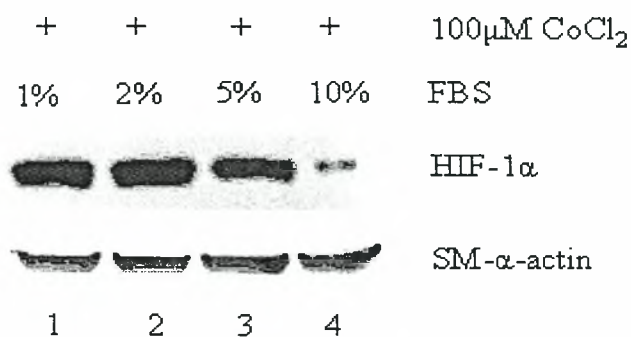
Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του ορού παρουσία CoCl₂ στην επαγωγή του HIF-1α σε λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας

Ο ορός από έμβρυο βοός (fetal bovine serum – FBS) είναι πλούσιος σε αυξητικούς παράγοντες. Έχει δειχθεί ότι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως η θρομβίνη, ο VEGF, ο TGF-β και άλλοι επάγουν την έκφραση του HIF-1α. Βάσει αυτού, αναζητήσαμε την επίδραση στην επαγωγή του HIF-1α των διαφορετικών συγκεντρώσεων του ορού σε λεία μυϊκά κύτταρα, παρουσία CoCl₂.

Σε πρωτογενή καλλιέργεια λείων μυϊκών κυττάρων και εφόσον τα κύτταρα είχαν καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, αφαιρέσαμε τον ορό από το θρεπτικό μέσο, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της διαφοροποίησης και επώασαμε στο μέσο αυτό για 3 ημέρες. Την τέταρτη ημέρα προσθέσαμε στα κύτταρα 100μM CoCl₂ και 1%, 2%, 5% ή 10%FBS για 4 ώρες. Προκαλέσαμε λύση των κυττάρων 4 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε κατά Bradford για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Στη συνέχεια 40μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Τα επίπεδα του HIF-1α προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-HIF-1α. Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, αντίσωμα κατά της α-

ακτίνης των λείων μυών (anti-SM- α -actin) ως μάρτυρας για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων που φορτώθηκαν σε κάθε διαδρομή.

Παρατηρήσαμε ότι η επαγωγή του HIF-1 α ήταν εμφανής από τη μικρότερη (1%) μέχρι και τη μεγαλύτερη (10%) συγκέντρωση του ορού (εικ. 16).



Εικ. 16: Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του ορού παρουσία CoCl₂ στην επαγωγή του HIF-1 α σε λεία μυικά κύτταρα τραχείας, που αφαιρέθηκε ο ορός από το μέσο καλλιέργειάς τους.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανώτερη αναπνευστική οδός εξυπηρετεί τη πρόσληψη του οξυγόνου στον οργανισμό και συνιστά ένα σημαντικό σημείο ρύθμισης της ποσότητας του οξυγόνου που φτάνει στους πνεύμονες και στη συνέχεια, διανέμεται στους ιστούς. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, η ανώτερη αναπνευστική οδός έχει αναπτύξει έναν αριθμό φυσιολογικών μηχανισμών ως απόκριση στην υποξία. Ένας σημαντικός μεσολαβητής για τις αποκρίσεις των κυττάρων στην υποξία είναι ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1 – HIF-1», ο οποίος επάγεται, και σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου, από αυξητικούς παράγοντες και το κοβάλτιο (Harris, 2002).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας σε πρωτογενείς καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο παρουσία ορού εμβρύου βοός, εμφανίζουν το συνθετικό φαινότυπο (Halayko et al, 2001). Στις καλλιέργειες αυτές, η προσθήκη κοβαλτίου αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α επάγοντας τη σύνθεσή της μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) και την παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου (Chachami et al., 2004).

Η αφαίρεση του ορού εμβρύου βοός (FBS) από το θρεπτικό μέσο των πρωτογενών καλλιεργείων λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας, επάγει την εμφάνιση του συσταλτού φαινότυπου σε έναν πληθυσμό των κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή τόσο η προσθήκη κοβαλτίου αλλά και η προσθήκη 10% ορού και ο συνδυασμός κοβαλτίου και ορού έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του HIF-1α στην καλλιέργεια (Χαχάμη και συν., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη των συνθηκών επαγωγής του HIF-1α από τους παραπάνω επαγωγείς (κοβάλτιο, όρο και τον συνδυασμό τους) σε αυτές τις πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας κουνελιού τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες διαφοροποίησης.

Από την κινητική μελέτη της επαγωγής του HIF-1α υπό την επίδραση 10%FBS και 10%FBS+CoCl₂ σε λεία μυϊκά κύτταρα από το θρεπτικό μέσο των οποίων έχει αφαιρεθεί ο ορός 3 ημέρες πριν, προκύπτει ότι ο HIF-1α επάγεται 2 ώρες μετά την προσθήκη των επαγωγέων και τα επίπεδα του παραμένουν υψηλά 6 ώρες μετά. Η κινητική μελέτη της επαγωγής του HIF-1α από CoCl₂ σε λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας που καλλιεργούνται συνεχώς παρουσία ορού έχει δείξει ότι η επαγωγή είναι ορατή

30min μετά την προσθήκη 100μM CoCl₂ στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, με μέγιστο σήμα 4 ώρες μετά την προσθήκη που διατηρείται σε υψηλό επίπεδο και 24 ώρες μετά (Chachami et al, 2004).

Η μελέτη της επίδρασης του χρόνου διαφοροποίησης (1, 3, και 7 ημέρες) στην επαγωγή του HIF-1α έδειξε ότι η επαγωγή είναι εμφανής από την πρώτη μέρα αφαίρεσης του ορού από το θρεπτικό μέσο και γίνεται πολύ έντονη την τρίτη ημέρα. Την έβδομη ημέρα καλλιέργειας χωρίς ορό, η επαγωγή του HIF-1α παραμένει το ίδιο έντονη όταν ως επαγωγέας έχει προστεθεί CoCl₂, ενώ μειώνεται όταν έχει προστεθεί ορός ή ορός και CoCl₂. Στην πρόοδο της διαφοροποίησης, φαίνεται ότι ο ορός δεν συνεργεί με το CoCl₂ στην επαγωγή του HIF-1α (τρίτη ημέρα) ή δρα ανασταλτικά στην επαγωγή του (έβδομη ημέρα).

Παρουσία CoCl₂, ο ορός επάγει τον HIF-1α σε συγκεντρώσεις 1%, 2% και 5%. Παραδόξως, η επαγωγή φαίνεται να μειώνεται όταν η συγκέντρωση του ορού είναι 10%. Η επανάληψη του πειράματος και η προσθήκη περισσότερων σημείων με συγκεντρώσεις ορού ενδιάμεσες του 5% και του 10% θα διαλευκάνουν την επίδραση της συγκέντρωσης του ορού στην επαγωγή του HIF-1α στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Η διαφοροποίηση και η εμφάνιση του συσταλτού φαινότυπου των λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας *in vitro* μπορεί να αντιστοιχίσει σε καταστάσεις υπερτροφίας των λείων μυών *in vivo*. Αντίθετα τα κύτταρα σε πρωτογενείς καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο παρουσία ορού μοιάζουν με τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται και βρίσκονται σε ιστό που είναι σε κατάσταση υπερπλασίας. Η παρούσα μελέτη συμβάλλει στον καθορισμό των χαρακτηριστικών της επαγωγής του HIF-1α σε πρωτογενείς καλλιέργειες που αναπτύσσονται απουσία ορού και παρέχει πληροφορίες για την επαγωγή του HIF-1α σε κύτταρα αεραγωγών σε συνθήκες υπερτροφίας.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bowers, C. W., and L. M. Dahm. Maintenance of contractility in dissociated smooth muscle: low-density cultures in a defined medium. *Am. J. Physiol.* 264 (*Cell Physiol.* 33): C229–C236, 1993

Chachami, G., Simos, G., Hatziefthimiou, A., Bonanou, S., Molyvdas, P.-A., Paraskeva, E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor – 1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species – and PI3K-dependent mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:544-551, 2004

Clayton, R.A., Nally, J.E., MacLean, M.R., Thomson, N.C. and McGrath J.C. Chronic exposure to hypoxia attenuates contractile responses in rat airways *in vitro*: a possible role for nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 385:29-37, 1999

Cogo, A., Napolitano, G., Michoud, M.C., Barbon, D.R., Ward, M. and Martin, J.G. Effects of hypoxia on rat airway smooth muscle cell proliferation. *J. Appl. Physiol.* 94:1403-1403, 2003

Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., Richard, D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 37:535-540, 2005

Fukuda R. Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 277:38205-11, 2002

Görlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner- Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T., and Busse, R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. Role of the p22phox-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.* 89, 47–54, 2001

Gunther, S., R. W. Alexander, W. J. Atkinson, and M. A. Gimbrone, Jr. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 92: 289–298, 1982

Halayko, A. J., B. Camoretti-Mercado, S. M. Forsythe, J. E. Vieira, R. W. Mitchell, M. E. Wylam, M. B. Hershenson, and J. Solway. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am. J. Physiol.* 276 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 20): L197–L206, 1999

- Halayko, A. J., H. Salari, X. Ma, and N. L. Stephens.** Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am. J. Physiol.* 270 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 14): L1040–L1051, 1996
- Harris, A.L.** Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2:38-47, 2002
- Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W.** Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- β stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94:1561–1567, 1999
- Hirst, S. J.** Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodeling and phenotype plasticity in asthma. *Eur. Respir. J.* 9: 808–820, 1996
- Horowitz, A., C. B. Menice, R. Laporte, and K. G. Morgan.** Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76: 967–1003, 1996
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F.** Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7987–7992, 1998
- Hulsmann, A.R. and van den Anker, J.N.** Evolution and natural history of chronic lung disease of prematurity. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 52:272-277, 1997
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr.** HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464–468, 2001
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL.** Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-62, 1998
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J.** Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468–472, 2001
- Ji-Won Lee, Seong-Hui Bae, Joo-Won Jeong, Se-Hee Kim and Kyu-Won Kim.** Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 36(1), 1-12, 2004

- Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L.** Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274:6519–6525, 1999
- Laughner E.** HRE2 signaling increases the rate of HIF- 1α synthesis: novel mechanism for HIF-1 mediated VEGF expression. *Mol Cell Biol* 21:3995-4004, 2001
- Leach, R.M., and Treacher, D.F.** Clinical aspects of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Exp. Physiol.* 80:865-875, 1995
- Leach, R.M., Hill, H.S., Snetkov, V.A. and Ward, P.T.** Hypoxia, energy state, and pulmonary vasomotor tone. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132:55-67, 2002
- Ma, X. F., Y. Wang, and N. L. Stephens.** Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 274 (*Cell Physiol.* 43): C1206– C1214, 1998
- Mahon PC, Hirota K, Semeza GL.** FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*:15:2675-86, 2001
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., and Ratcliffe, P. J.** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature (London)* 399:271–275, 1999
- Owens, G. K.** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75: 487–517, 1995
- Owens, G. K., M. S. Vernon, and C. S. Madsen.** Molecular regulation of smooth muscle differentiation. *J. Hypertens.* 4, *Suppl.* 5: S55–S64, 1996
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J.** Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J. Biol. Chem.* 272:11205–11214, 1997
- Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J.** Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275:26765–26771, 2000
- Ross, R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801–809, 1993
- Salceda, S., and Caro, J.** Hypoxia-inducible factor 1α (HIF- 1α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its

stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272:22642–22647, 1997

Salnikow, K., Su, W., Blagosklonny, M.V., and Costa M. Carcinogenic Metals Induce Hypoxia-inducible Factor-stimulated Transcription by Reactive Oxygen Species-independent Mechanism. *Cancer Research* 60:3375–3378, 2000

Schofield, G.L., Ratcliffe, P.J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5:343-354, 2004

Semenza, G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14:1983-1991, 2000

Semenza, G.L. HIF-1, O₂ and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, 107:1-3, 2001

Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88:1474-80, 2000

Semenza, G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-78, 1999

Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Review. Cancer*, 3:721-732, 2003

Shanahan, C. M., P. L. Weissberg, and J. C. Metcalfe. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 73: 193–204, 1993

Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., and Caro, J. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor α (HIF- α) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:557–561, 1999

Stiehl, D. P., Jelkmann, W., Wenger, R. H., and Hellwig-Bürgel, T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor- 1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 512:157–162, 2002

Sutter, C. H., Laughner, E., and Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4748–4753, 2000

Thyberg, J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int. Rev. Cytol.* 169: 183–265, 1996

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

- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-loop-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:5510-4, 1995
- Wegner, R.H.** Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16:1151-1162, 2002
- Wegner, R.H.** Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203:1253-1263, 2000
- Yu, A.Y., Frid, M.G., Snimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K. and Semenza, G.L.** Temporal, spatial and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 275:818-826, 1998
- Zagórska, A. and Dulak, J.** HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Bioch. Pol.* 51(3):563-585, 2004
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., and Cohen, B.** Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J.* 17:5085-5094, 1998
- Zhong H.** Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60:1541-5, 2000
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ.** Loss of PTEN facilitates HIF-1 α mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391-6, 2000

