



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος



Διπλωματική Εργασία

**"Μελέτη της επίδρασης της υποξίας και της έκφρασης των
επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIFs
στη διαφοροποίηση των K562 ανθρώπινων
ερυθρολευχαιμικών κυττάρων "**

ΓΚΟΤΙΝΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ- ΜΑΡΙΑ

Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος

**Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος
Λάρισα, 2014**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Λιάκο Παναγιώτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου Επίκουρο Καθηγητή κ. Λιάκο Παναγιώτη, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να μνηθώ στα μονοπάτια της μοριακής βιολογίας και βιοχημείας από το προπτυχιακό μου ακόμη επίπεδο, όπως και για τη συνεχή υποστήριξη και ορθή καθοδήγησή του, τόσο στην παρούσα εργασία, όσο και καθ’ όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σίμο Γεώργιο, για τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας καθώς και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Γερμενή που δέχτηκε να γίνει μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια και φίλη μου Μπεφάνη Χριστίνα για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά της. Καθ’ όλη τη διάρκεια της μέχρι τώρα ερευνητικής μου δραστηριότητας υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τη χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά της. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Δρακούλη Σωτηρία, Κούρτη Μαρία και Πάγγου Ευανθία για την βοήθεια και τη στήριξή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία στα πρώτα αυτά

στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

Τέλος, θα ήθελα πάνω απ' όλα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για τη συνεχή οικονομική υποστήριξη και βοήθεια που μου παρείχε, όπως και τους πραγματικούς μου φίλους Ραφαέλα, Χάρη, και Μάριον οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε εύκολη και δύσκολη στιγμή αυτής της πορείας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Η διαφοροποίηση των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων	8
1.2 Πρότυπα κυτταρικά συστήματα μελέτης της διαφοροποίησης των ερυθροποιητικών κυττάρων.....	12
1.2.1 MEL (Murine ErythroLeukemia) ή Friend leukemia κύτταρα.....	13
1.2.2 HL-60 ανθρώπινα κύτταρα της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας.....	14
1.2.3 K562 ανθρώπινα πρόδρομα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα.....	15
1.3 Χημικοί επαγωγείς της διαφοροποίησης λευχαιμικών κυττάρων	16
1.4 Η επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των ανθρώπινων K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.....	20
2 Υποξία	21
2.1 Υποξία και μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία HIFs	22
2.1.1 HIF- 1α.....	22
2.1.3 HIF- 3α.....	25
2.1.4 HIF-1β ή ARNT.....	25
2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ	25
2.2.1 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	26
2.2.2 ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	28
2.3 Κοινά και ειδικά γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIFs	31
3 ΣΤΟΧΟΣ.....	34
4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
4.1 Υλικά.....	35
4.1.1 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια	35
4.1.2 Υλικά μοριακής βιολογίας.....	35
4.1.3 Αντισώματα.....	35
4.1.4 Βιολογικά υλικά – Κυτταρικές σειρές.....	35
4.1.5 Θρεπτικά υγρά – Οροί – Αντιβιοτικά	36
4.2 Μέθοδοι	36
4.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	36
4.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών.....	37
4.2.3 Προσδιορισμός του ρυθμού της κυτταρικής ανάπτυξης.....	37
4.2.4 Προσδιορισμός των διαφοροποιημένων κυττάρων με χρώση βενζιδίνης – H ₂ O ₂	37
4.2.5 Έλεγχος ζωτικότητας των κυττάρων με χρώση trypan blue.....	38
4.2.6 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα	39
4.2.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	39
4.2.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	40
4.2.9 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	41
5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
5.1 Μελέτη της συμπεριφοράς των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562	43
5.2 Επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.....	44
5.3 Επίδραση της αιμίνης στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.....	47

5.4 Επίδραση της υποξίας παρουσία αιμίνης στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων	48
5.5 Μελέτη της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία HIFs.....	51
5.5.1 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας και της αιμίνης στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα K562.	51
6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562, αποτελούν ένα ενδιαφέρον σύστημα για τη μελέτη της διαφοροποίησης ανθρωπίνων κυττάρων προς κύτταρα της ερυθράς σειράς, καθώς και των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδοχική έκφραση των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης.

Η διαδικασία της ερυθροποίησης είναι στενά συνδεδεμένη με τη υποξία καθώς η παραγωγή των ερυθροκυττάρων αποτελεί βασικό μηχανισμό προσαρμογής του οργανισμού στις μεταβολές του οξυγόνου. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρωπίνων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562. Τα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562, υποβλήθηκαν στη διαδικασία της διαφοροποίησης προς ερυθροκύτταρα παρουσία αιμίνης αλλά και παρουσία υποξίας προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή της υποξίας και προσδιορίστηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και HIF-2α στις παραπάνω συνθήκες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υποξία αναστέλλει την ανάπτυξή τους, και αυξάνει το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου. Η παραπάνω μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων και η αύξηση του ποσοστού των νεκρών K562 κυττάρων σε μακροχρόνια υποξία δεν διαφαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα έκφρασης των HIFs.

Επίσης φαίνεται ότι η υποξία διευκολύνει την επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των K562 κυττάρων προς ερυθροκύτταρα. Ωστόσο, από τα πρώτα αυτά αποτελέσματα παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των HIFs, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της διαφοροποίησης των K562. Βέβαια, από την προηγούμενη βιβλιογραφία του εργαστηρίου μας γνωρίζουμε ότι η έκφραση των HIF δεν συνδέεται άμεσα με τη μεταγραφική τους ενεργότητα. Συνεπώς, για την πληρέστερη εκτίμηση της επίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων HIFs στη διαφοροποίηση των K562 προς ερυθροκύτταρα, θα πρέπει να μελετήσουμε τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs και να αναζητηθούν οι πιθανοί συνενεργοποιητές που συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές.

ABSTRACT

Human erythroleukemia K562 cells , constitute an interesting system for studying the differentiation of human stem cells to cells of the erythroid lineage , and the mechanisms involved in hemoglobin gene expression .

Erythropoiesis is closely related to hypoxia as the production of red blood cells is a key mechanism of adaptation to changes in oxygen concentration. The present study focused on investigating the effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human erythroleukemia cells K562. The differentiation of K562 erythroleukemia cells, was invoked with hemin and we investigated the contribution of hypoxia and the expression of hypoxia induced transcription factors HIF- 1a and HIF- 2a in the above conditions.

The results showed that hypoxia inhibits their growth, and increases the rate of cell death . The above reduction in the rate of cell growth and the increase in the percentage of dead K562 cells in long-term hypoxia does not appear to be directly related to the expression of HIFs.

It is also shown that hypoxia facilitates hemin induced differentiation of K562 cells to erythrocytes. However, we observed that the expression of HIFs, does not seem to be essential for differentiation of K562 . Of course , previous literature published by our laboratory shows that the expression of HIFs is not directly linked to their transcriptional activity . Therefore , in order to fully assess the impact of transcription factors HIFs to differentiation of K562 to erythrocytes , we need to study the transcriptional activity of HIFs and explore potential coactivators involved in these processes .

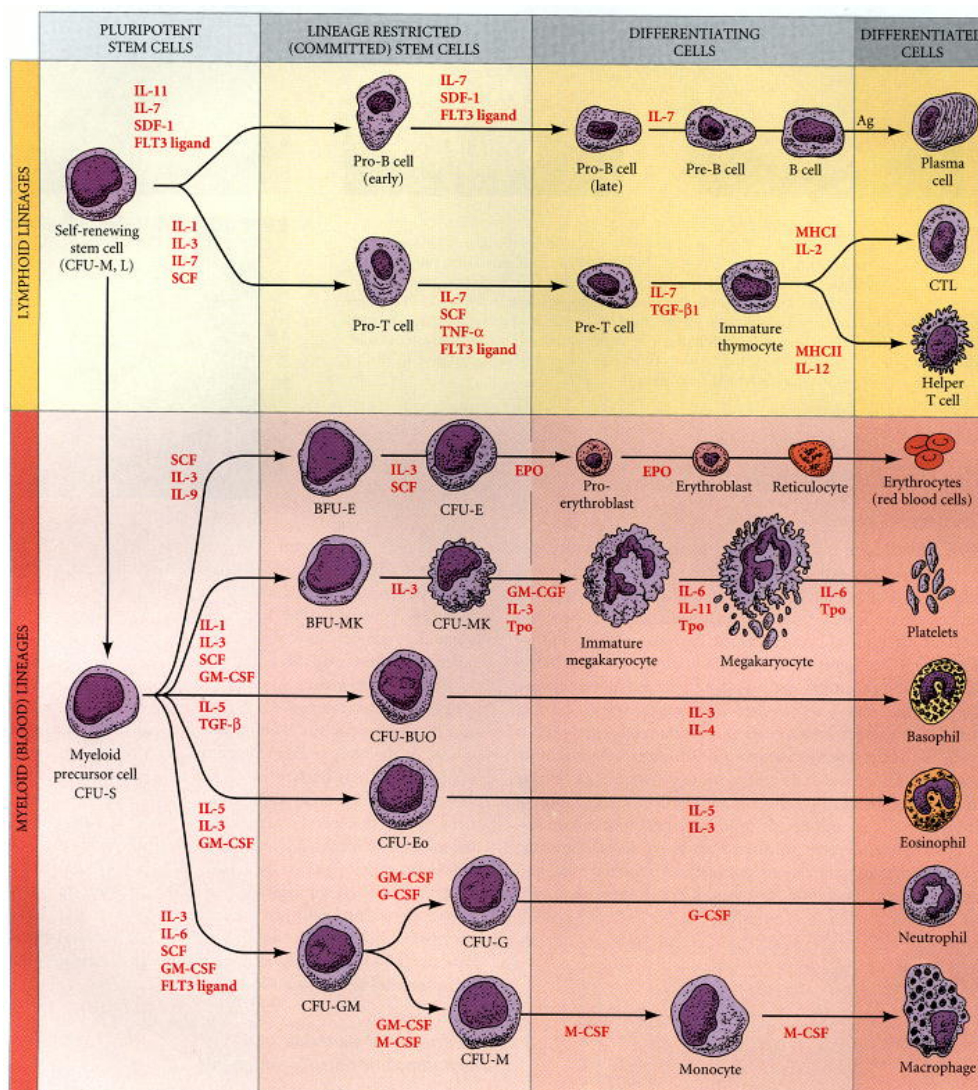
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η διαφοροποίηση των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων

Η ερυθροποίηση είναι μια σύνθετη δυναμική διαδικασία πολλών σταδίων που ξεκινά από τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα HSCs (Hematopoietic Stem Cells) στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (HSCs niche), και τελειώνει με την παραγωγή ώριμων απύρηνων ερυθροκυττάρων (RBCs) (*Weissman, I. L., 2000, Orkin, S. H. Et al., 2008*) τα οποία αποτελούν το 0,5-1% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του μυελού των οστών. Τα κύτταρα HSCs, επίσης γνωστά ως CFU-M,L (Colony Forming Unit of Myeloid and Lymphoid cells ή CD34 cells), προέρχονται από τα αρχέγονα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) και μέσω της διαδικασίας της διαφοροποίησης παράγουν όλα τα έμμορφα συστατικά του περιφερικού αίματος (RBCs, πολυμορφοπύρηννα ή ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, αιμοπετάλια, T- και B- λεμφοκύτταρα). Φυσιολογικά, τα HSCs είναι προγραμματισμένα να διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, μετά την επαγωγή τους από εξειδικευμένους αναπτυξιακούς παράγοντες, οι οποίοι διατηρούν την ισορροπία μεταξύ κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) στο μυελό των οστών (*Cantor and Orkin, 2001; Fisher, 2002; Socolovsky et al., 1998*), (**Εικόνα 1**). Η δέσμευση των HSCs για διαφοροποίηση συνοδεύεται από τη μη αντιστρεπτή ωρίμανσή τους, την προοδευτική μείωση του δυναμικού της κυτταρικής αναπαραγωγής ή ακόμα και την απόπτωση τους (*Enver and Greaves, 1998*).

Τα αιμοποιητικά κύτταρα που αναπτύσσονται είτε στο μυελό των οστών (*in vivo*) είτε σε κυτταροκαλλιέργειες (*in vitro*), απαιτούν την παρουσία πολυδύναμων αναπτυξιακών παραγόντων, οι οποίοι συμβάλλουν στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους (*Chang et al., 1989; Charbord et al., 1986*). Οι αναπτυξιακοί αυτοί παράγοντες διαχωρίζονται σε επαγωγείς της αύξησης και σε επαγωγείς της διαφοροποίησης. Οι μεν πρώτοι (με κυριότερους εκπροσώπους τις ιντερλευκίνες και τις κυτοκίνες), προάγουν την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ οι δεύτεροι (EPO, GM-CSF, CSF, κ.ά.) συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά μήκος ενός συγκεκριμένου

φαινοτύπου (Metcalf, 1989; Stamatoyannopoulos, 2005)



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής αιμοποίησης και απεικόνιση του μονοπατιού ανάπτυξης των ερυθροκυττάρων. Από τα αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα παράγονται τα μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα της μυελικής και της λεμφικής σειράς. Από τα μητρικά κύτταρα της λεμφικής σειράς σχηματίζονται τα T- και B λεμφοκύτταρα, ενώ από τα μυελικά μητρικά κύτταρα σχηματίζονται τα RBCs, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα. Το μονοπάτι της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων ξεκινά από πολυδύναμα προγονικά μεγακαρυωτικά / ερυθροειδή κύτταρα από τα οποία προκύπτουν τα BFU - E , CFU - E , ενδιάμεσες μορφές προερυθροβλαστών (ProEB) , και στη συνέχεια οι ορθοχρωματικοί νορμοβλάστες (ON) . Η εμπύρηνωση των ON οδηγεί στη δημιουργία των δικτυοερυθροκυττάρων (RETs) από τα οποία τελικά προκύπτουν τα ώριμα απύρηντα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) . EPO: Erythropoietin, G-CSF: Granulocyte- Colony Stimulating Factor, GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, IL: Interleukin, LIF: Leukemia Inhibiting Factor, M- CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor, MHCII: Major Histocampatability Complex type I protein, MHCII: Major Histocampatability Complex type

Il protein, SCF: Stem Cell Factor, SDF-1: Stromal Derived Factor-1, TNF: Tumor Necrosis Factor, Tpo: Thrombopoietin (*Gilbert and Singer, 2000*).

Στο φυσιολογικό ενήλικο, ο αιμοποιητικός ιστός υπάρχει στις μυελικές κοιλότητες των οστών και αναπτύσσεται σε ορισμένες θέσεις που αποτελούνται από κύτταρα λείων μυϊκών ινών, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα και οστεοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν το μυελικό στρώμα και είναι το κατάλληλο μικροπεριβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται τόσο τα αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, όσο και τα ώριμα κύτταρα των μυελικών σειρών (*Beutler and Williams, 1995*). Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών υποστηρίζεται ότι είναι υποξικό. Στο περιβάλλον αυτό η υποξία προωθεί την ερυθροποίηση α) ρυθμίζοντας την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (*Adelman DM et al., 1999, Yamashita T et al., 2008*), β) διεγείροντας την έκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης EPOR γ) ρυθμίζοντας την έκφραση των διάφορων συστατικών της οδού σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης (*Yoon D et al., 2006, Liu YL et al., 2004, Hofer T et al., 2003*) και δ) διαμορφώνοντας την αλληλεπίδραση των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων με άλλους κυτταρικούς τύπους και κατά συνέπεια την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων.

Τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα, παρ' όλο που σε φυσιολογικές συνθήκες σπανίως εισέρχονται στη μιτωτική φάση, αναπαράγονται πολύ εύκολα μόλις αυτό απαιτηθεί. Ο ρόλος τους είναι κρίσιμος, διότι είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση της αιμοποίησης σε καταστάσεις επείγουσας ανάγκης παραγωγής ερυθροκυττάρων, όπως για παράδειγμα σε μεγάλο υψόμετρο, σε καταστάσεις χαμηλής συγκέντρωσης O₂ ή σε περιπτώσεις σοβαρής βλάβης του μυελού των οστών, η οποία είναι δυνατόν να προέλθει είτε από χημειοθεραπεία με αντινεοπλασματικά φάρμακα είτε από ακτινοβολία. Σε περίπτωση που τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν αναπαράγονται φυσιολογικά, είναι δυνατόν να οδηγηθούμε σε αναιμίες, σε απλασία του μυελού των οστών, σε αιματολογικά νεοπλάσματα και σε λεμφο- ή μυελο-δυσπλαστικά σύνδρομα.

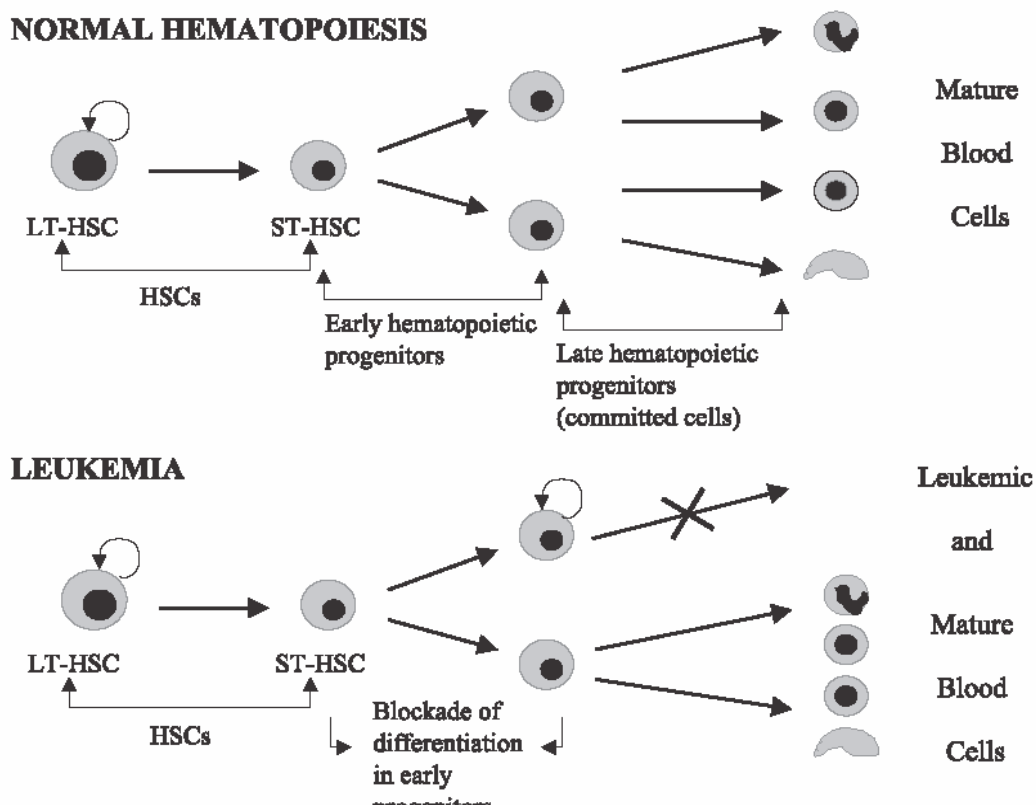
Σε περιπτώσεις λευχαιμίας, τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα αποτυγχάνουν να ανταποκριθούν στα εξωτερικά ερεθίσματα του μικρο-περιβάλλοντος του μυελού των οστών, με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται προς μη φυσιολογικές μορφές αιμοποιητικών κυττάρων (*Fialkow et al., 1981*). Οι λευχαιμίες καλύπτουν ένα μεγάλο

ποσοστό των αιματολογικών διαταραχών και απαντώνται ως οξείες ή χρόνιες καταστάσεις, με σχετικά χαμηλή συχνότητα (5-8 περιπτώσεις ανά 105 άτομα) (Tsiftoglou et al., 2003). Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι προέρχονται από δυσλειτουργία του μηχανισμού διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων (Bonnet and Dick, 1997; Enver and Greaves, 1998; Tenen, 2003). Ο μηχανισμός της απόπτωσης των λευχαιμικών κυττάρων είναι συνήθως αδρανοποιημένος, έτσι ώστε τα κύτταρα να αθανатоποιούνται, να πολλαπλασιάζονται συνεχώς εις βάρος των υπολοίπων κυττάρων του μυελού των οστών και τελικά να εισβάλουν στο περιφερικό αίμα (**Εικόνα 2**). Για το λόγο αυτό, υποστηρίζεται ότι οι λευχαιμίες αποτελούν διαταραχή του μηχανισμού της διαφοροποίησης αλλά και του μηχανισμού της απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων (Domen, 2001).

Επιπλέον, τα λευχαιμικά κύτταρα εμφανίζουν συνήθως χαρακτηριστικές ανωμαλίες στον καρυότυπό (όπως π.χ. η αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση t(9;22) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία) και εκφράζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην κυτταρική τους μεμβράνη (Champlin and Gale, 1987).

Ο επιγενετικός έλεγχος της νεοπλασματικής ανάπτυξης και η αναστροφή του κακοήθους φαινοτύπου στηρίχθηκαν σε μελέτες, κατά τις οποίες ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα και ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού διαφοροποιήθηκαν προς RBCs, προς μετα-μυελοκύτταρα και προς μακροφάγα (Andersson et al., 1979, Collins et al., 1978, Friend et al., 1971, Hoffman et al., 1980, Marks and Rifkind, 1978, Rovera et al., 1979, Sachs, 1978). Τα πειράματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων είναι λιγότερο σταθερός από εκείνο των κυττάρων που διαφοροποιούνται φυσιολογικά, καθώς η διαφοροποίηση στο αιμοποιητικό σύστημα είναι μη αναστρέψιμη. Συνεπώς, η σε βάθος μελέτη της συσχέτισης της νεοπλασίας με την ενεργοποίηση των μηχανισμών διαφοροποίησης είναι καθοριστικής σημασίας.

Τέλος, ο βαθμός της διαφοροποίησής των λευχαιμικών κυττάρων εκτιμάται ότι είναι αντιστρόφως ανάλογος της κακοήθειάς τους. Ακόμη, η επαγωγή της διαφοροποίησης είναι δυνατόν να μειώσει ή ακόμη να καταργήσει το δυναμικό της κακοήθειας στα λευχαιμικά κύτταρα (Tsiftoglou et al., 2003).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της φυσιολογικής αιμοποίησης και της ανάπτυξης λευχαιμίας. Φυσιολογικά τα (αρχέγονα) long-term HSCs μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να δώσουν τα (δεσμευμένα) short-term HSCs, τα οποία με τη σειρά τους θα οδηγήσουν στα δεσμευμένα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και στα ώριμα κύτταρα του αίματος. Στις λευχαιμίες, τα short-term HSCs αναπαράγουν προγονικά κύτταρα τα οποία αδυνατούν να ανταποκριθούν στην επαγωγή της διαφοροποίησης και να δώσουν ώριμα κύτταρα. Η παρεμπόδιση της διαφοροποίησης δημιουργεί πληθυσμό βλαστικών λευχαιμικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα (*Tsiftoglou et al., 2003*).

1.2 Πρότυπα κυτταρικά συστήματα μελέτης της διαφοροποίησης των ερυθροποιητικών κυττάρων.

Παρά το γεγονός ότι πρόδρομα φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα BFU-Es (Burst Forming Unit-Erythroid) ή CFU-Es (Colony Forming Unit-Erythroid) ή ακόμα και ολόκληρος ο μυελός των οστών, ήταν δυνατό να καλλιεργηθούν σε ειδικά ημιστερεά θρεπτικά υποστρώματα, παρέμενε πάντοτε το πρόβλημα της διατήρησης και αναπαραγωγής των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων. Από τις αρχές τις δεκαετίας του '70, ξεκίνησαν να απομονώνονται διάφοροι κλώνοι λευχαιμικών κυττάρων με ικανότητα συνεχούς αναπαραγωγής όπως οι HL-60, K-562, KG-1, MEL

και U937. Οι λευχαιμικές αυτές κυτταρικές σειρές διατηρούν το νεοπλασματικό τους φαινότυπο, έχουν σταθερή κινητική κυτταρικής αναπαραγωγής, που δε μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου, και σχηματίζουν ομοιογενείς πληθυσμούς. Μάλιστα, έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται εκτενώς (>90%) σε κύτταρα παρόμοια με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, διαφόρων φαινοτύπων (ορθοχρωματικοί νορμοβλάστες, πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα, ηωσινόφιλα), πράγμα που τις καθιστά πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη της διαφοροποίησης μονοδύναμων ή πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων (Tsiftoglou *et al.*, 2003).

Είδος νεοπλάσματος (κυτταρική σειρά)	Διαφοροποιείται προς
MEL	Ορθοβλάστες
K-562	Ερυθροκύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα
HL-60	Μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα ή ηωσινόφιλα

Πίνακας 1: Μοντέλα διαφοροποίησης νεοπλασματικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Μερικές από τις πιο διαδεδομένες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές είναι τα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού MEL, τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K-562 και τα ανθρώπινα κύτταρα της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 (Πίνακας 1).

1.2.1 MEL (Murine ErythroLeukemia) ή Friend leukemia κύτταρα

Τα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού MEL απομονώθηκαν αρχικά από τη Charlotte Friend το 1966, από κυτταρικές αποικίες που εμφανίστηκαν σε διογκωμένο σπλήνα πειραματόζωων (ποντίκια του είδους DAB/2J), τα οποία είχαν εμβολιασθεί προηγούμενα με ιό τύπου FLV, (Friend Leukemia Virus) (Harrison, 1976). Τα κύτταρα αυτά, έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά προερυθροβλαστών, των πρόδρομων δηλαδή ερυθροκυττάρων, με τη διαφορά ότι παραμένουν σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, χωρίς να έχουν τη δυνατότητα περαιτέρω διαφοροποίησης.

Η ανακάλυψη ότι τα MEL κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα

που προσομοιάζουν με ορθοχρωματικούς νορμοβλάστες (*Friend et al., 1971*) ήταν η απαρχή εκτεταμένης έρευνας παγκοσμίως που οδήγησε στην επονομαζόμενη «Θεραπεία του καρκίνου με διαφοροποίηση» (Differentiation Therapy of Cancer) (*Lotan et al., 1990*), δηλαδή τη θεραπεία καρκινοπαθών με χημικές ουσίες που επάγουν την τελική διαφοροποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα διαφοροποιημένα MEL κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης και υπόκεινται σε μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών, που προσομοιάζουν τις αντίστοιχες που παρατηρούνται κατά τη φυσιολογική διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς (*Tsiftoglou and Robinson, 1985*). Αυτές περιλαμβάνουν ελάττωση του μεγέθους του κυττάρου, πύκνωση του πυρήνα, διαδοχικές αλλαγές της αρχιτεκτονικής της κυτταρικής μεμβράνης και μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή πολλών γονιδίων (*Sartorelli, 1981*).

Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (CFU-E), τα MEL κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στη μιτογόνο δράση της ερυθροποιητίνης και δε διαφοροποιούνται προς ερυθροκύτταρα. Κύτταρα MEL, δεσμευμένα προς την τελική διαφοροποίηση, εμφανίζουν προγραμματισμένο περιορισμό της ανάπτυξής τους σε 4-5 κυτταρικές διαιρέσεις και στη συνέχεια εισέρχονται σε φάση στασιμότητας G1/G0 (*Tsiftoglou et al., 2003*).

Μεταξύ των ουσιών, που επάγουν τη δέσμευση των MEL προς την τελική τους ωρίμανση, περιλαμβάνονται χημικά ανάλογα πουρινών και πυριμιδινών, παράγωγα του υδροξυαμικού οξέος, υποκατάστατα αμιδίων, κυκλικές ουρίες και θειουρίες, ουρείδοπαράγωγα πυριδίνης (UDPs), βενζοδιαπεζίνες, ιντερφερόνες κ.α. (*Marks et al., 2001, Tsiftoglou and Robinson, 1985*). Η μεγάλη ποικιλία των επαγωγέων καθώς και οι ευρείες κλίμακας πληροφορίες που έχουν αποκτηθεί από την πολύχρονη έρευνα στα MEL κύτταρα, τα καθιστούν ένα από τα πιο γνωστά και εδραιωμένα πρότυπα συστήματα μελέτης βασικών βιολογικών φαινομένων, όπως είναι η διαφοροποίηση, αλλά και έλεγχου της φαρμακολογικής δράσης νέων ουσιών.

1.2.2 HL-60 ανθρώπινα κύτταρα της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας

Τα HL-60 κύτταρα απομονώθηκαν το 1978 από περιφερικό αίμα ασθενούς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL) (*Collins et al., 1978*). Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται προς ώριμα και λειτουργικά ουδετερόφιλα, με τη χρήση χημικών επαγωγέων όπως το διμέθυλο-σουλφοξείδιο

(DMSO), ρετινοϊκό οξύ (RA), 6-θειογουανίνη (6-TG), 5-αζακυτιδίνη (*Breitman et al., 1980, Christman et al., 1983, Collins et al., 1978, Papac et al., 1980*), κ.α. Ακόμα, με τη χρήση άλλων χημικών επαγωγέων όπως το TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13- acetate), η 1α,25 διϋδροξυ-βιταμίνη D₃ και η αραβινοφουρανοσυλ-κυτοσίνη (Ara- C), μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα παρόμοια με τα μακροφάγα- μονοκύτταρα (*Griffin et al., 1982*). Τα HL 60, σε καλλιέργεια κάτω από ελαφριές αλκαλικές συνθήκες, αναπτύσσουν τα χαρακτηριστικά κοκκία των ηωσινόφιλων (*Tsiftoglou and Robinson, 1985*). Η δέσμευση των κυττάρων αυτών, κατά την κοκκιοκυτταρική ωρίμανση, προκαλεί μη αντιστρεπτή διαφοροποίησή τους και αναστολή της ανάπτυξής τους, όπως αντίστοιχα παρατηρείται και στα MEL κύτταρα (*Tsiftoglou et al., 1985*). Επιπλέον, τα διαφοροποιημένα HL-60 κύτταρα αποτυγχάνουν να σχηματίσουν αποικίες σε μαλακό άγαρ (*Tsiftoglou and Robinson, 1985*).

Το γένωμα των HL-60 κυττάρων περιέχει μια ενισχυμένη μορφή του c-myc πρωτο-ογκογονιδίου. Τα επίπεδα του mRNA του c-myc είναι συγκριτικά υψηλά στα μη διαφοροποιημένα HL-60, αλλά υπάρχει ταχύτατη πτώση τους κατά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Το χαρακτηριστικό αυτό έχει κάνει τα HL 60 κύτταρα ένα αρκετά ελκυστικό μοντέλο μελέτης της διαφοροποίησης ανθρώπινων μυελικών κυττάρων (*Birnie, 1988*).

1.2.3 K562 ανθρώπινα πρόδρομα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα

Η ανθρώπινη ερυθρολευχαιμική σειρά K562 απομονώθηκε από τους Lozzio και Lozzio το 1975, από πλευρικό έγχυμα ασθενούς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία σε βλαστική κρίση (*Lozzio and Lozzio, 1975*). Τα K562 κύτταρα θεωρήθηκαν αντιπρόσωπος πρώιμων κοκκιοκυττάρων, αρχικά βάσει μορφολογικών παρατηρήσεων και στη συνέχεια λόγω του ότι φέρουν το χρωμόσωμα Ph (χρωμόσωμα της Φιλαδέλφεια, t(9;22) αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση), που αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι τα K562 κύτταρα συνθέτουν τη γλυκοφορίνη A, ένα εξειδικευμένο συστατικό της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και ότι το βουτυρικό νάτριο επάγει στα κύτταρα αυτά την παραγωγή ερυθροκυτταρικών στοιχείων και αιμοσφαιρίνης (*Andersson et al., 1979, Jokinen et al., 1979*). Παράλληλα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα K562 κύτταρα εμφανίζουν τουλάχιστον δύο δυναμικά διαφοροποίησης, προς

ερυθροκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα, αναλόγως των επαγωγέων που χρησιμοποιούνται (*Vainchenker et al., 1981*).

Η διαφοροποίηση των K562 κυττάρων προς κύτταρα που παράγουν αιμοσφαιρίνη έχει επιτευχθεί με πολλούς επαγωγείς όπως η αιμίνη, η υδροξυουρία, οι ανθρακυκλίνες, η 5-αζακυτιδίνη, αλλά και φάρμακα που δεσμεύονται σε G + C πλούσιες περιοχές του DNA, όπως η μιθραμυκίνη και η χρωμομυκίνη. Κατά τη διαφοροποίησή τους, τα K562 κύτταρα παράγουν πρώιμες και ώριμες εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες (*Bianchi et al., 1999, Hoffman et al., 1980, Rutherford et al., 1979*). Για το λόγο αυτό, το βουτυρικό οξύ και η 5-αζακυτιδίνη έχουν χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* πειράματα με σκοπό τη θεραπεία ασθενών με β-θαλασσαιμία (*DeSimone et al., 1982, Lowrey and Nienhuis, 1993*). Συγκεκριμένα, η δράση της αιμίνης στα K562 εντοπίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο, όπου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των mRNA των ζ-, ε-, γ- και α- γονιδίων της αιμοσφαιρίνης (*Charnay and Maniatis, 1983, Dean et al., 1983*), ενώ στην περίπτωση της υδροξυουρίας έχουμε αύξηση της μεταγραφής των ζ- και ε- γονιδίων. Επιπρόσθετα, έχειδειχτεί ότι τα αποτελέσματα της επαγωγής της σύνθεσης των αιμοσφαιρινών, από την αιμίνη και την υδροξυουρία, είναι αντιστρεπτά στα K562 κύτταρα και δε σχετίζονται με επαγωγή προς τελική διαφοροποίηση (*Dean et al., 1981, Erard et al., 1981*). Βέβαια, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα K562 κύτταρα μπορούν να δεσμευτούν προς τελική διαφοροποίηση από την αραβινο φουρανοσυλ-κυτοσίνη (Ara-C), αφού εκτός από τον διαφοροποιημένο φαινότυπό τους, αυτή σχετίζεται και με την απώλεια της κλωνογενετικής τους ικανότητας (*Luisi-DeLuca et al., 1984*).

Συνεπώς, τα K562 κύτταρα αποτελούν ένα ενδιαφέρον σύστημα για τη μελέτη της διαφοροποίησης ανθρώπινων κυττάρων προς κύτταρα της ερυθράς σειράς, καθώς και των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδοχική έκφραση των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης (*Charnay and Maniatis, 1983*).

1.3 Χημικοί επαγωγείς της διαφοροποίησης λευχαιμικών κυττάρων

Από την ανακάλυψη του DMSO ως επαγωγέα της διαφοροποίησης των MEL κυττάρων (*Friend et al., 1971*) μέχρι σήμερα, μία πληθώρα ουσιών έχει χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Οι ουσίες αυτές διαφέρουν στη χημική δομή, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την εξειδίκευσή όσον αφορά τη δράση τους σε

συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, ακόμη και τη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται το βέλτιστο ποσοστό διαφοροποίησης. Ποσοτικές μελέτες της σχέσης δομής – δραστηριότητας έδειξαν ότι ορισμένες κατηγορίες χημικών επαγωγέων μπορεί να διαθέτουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, κάτι που τους δίνει τη δυνατότητα να δρουν με κοινό μηχανισμό είτε μέσω κάποιων υποδοχέων, είτε μέσω της ρύθμισης κάποιων σηματοδοτικών μονοπατιών (Tsiftoglou *et al.*, 2003).

Σε σχέση με το μηχανισμό δράσης τους, οι επαγωγείς της διαφοροποίησης μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

1.3.1 Ρετινοειδή. Η πιο γνωστή ουσία της κατηγορίας αυτής είναι το ATRA (All-trans-RA), που αποτελεί επαγωγέα της διαφοροποίησης των HL-60 κυττάρων προς κοκκιοκύτταρα (Breitman *et al.*, 1980), ενώ ακόμη παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση αρκετών ιστών, μεταξύ άλλων και του μυελού των οστών. Το ATRA δρα μέσω του RAR-alpha υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (Collins *et al.*, 1990).

1.3.2 Επαγωγείς που δρουν μέσω της αλλαγής δομής του DNA. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι επαγωγείς που δρουν μέσω της υπομεθυλίωσης του DNA, όπως π.χ. η 5-αζακυτιδίνη (Christman *et al.*, 1983), αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών, όπως π.χ. το βουτυρικό οξύ (Andersson *et al.*, 1979) και αναστολείς των τοποισομερασών του DNA, όπως π.χ. η novobiocin (Constantinou *et al.*, 1989).

1.3.3 Παράγωγα των πουρινών και πυριμιδινών. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πουρινών και πυριμιδινών, κατά τη βιοσύνθεση του DNA και του RNA, αποτέλεσαν από τους πρώτους στόχους για τη δημιουργία αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Ως αναστολείς αυτών των ενζύμων χρησιμοποιούνται διάφοροι αντιμεταβολίτες των πουρινών ή πυριμιδινών (Hatse *et al.*, 1999). Το πιο γνωστό φάρμακο της κατηγορίας αυτής είναι η 5-FU (5- φθορο-ουρακίλη), η οποία μεταξύ άλλων επάγει και τη διαφοροποίηση των K562 κυττάρων (Yang and Chang, 1995).

1.3.4 Ενεργοποιητές και καταστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Αναστολείς κινασών, όπως των PKA και PKB κινασών, των MAPK, των JNK/SAPK (c-jun N-terminal

kinase/stress-activated protein kinases) ή των p38 κινασών έχουν χρησιμοποιηθεί ως επαγωγείς της διαφοροποίησης λευχαιμικών κυττάρων (Kyriakis and Avruch, 2001).

1.3.5 Πολικές ενώσεις και ουρείδο-παράγωγα της πυριδίνης. Η πιο γνωστή ένωση της κατηγορίας αυτής είναι το διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO), που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην επαγωγή της διαφοροποίησης των MEL και HL- 60 κυττάρων (Collins *et al.*, 1978, Friend *et al.*, 1971). Ο μηχανισμός δράσης του DMSO δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, αλλά έχει δείχτεί ότι συμμετέχει στη διαταραχή της δράσης της PKC κινάσης, στην αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης και την αύξηση της δέσμευσης ασβεστίου, καθώς και στην αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων c-myc και p53 (Tsiftoglou and Robinson, 1985). Άλλες γνωστές πολικές ενώσεις είναι τα δις-ακεταμίδια (π.χ. HMBA) (Reuben *et al.*, 1976), οι βενζοδιαζεπίνες (Wang *et al.*, 1984), οι κυκλικές ουρίες και θειουρίες (Li *et al.*, 1981), υποκατεστημένα αμίδια, λακτάμες και 2-πυριδόνες (Li *et al.*, 1981) και τα ουρείδο-παράγωγα της πυριδίνης (Pappas *et al.*, 1992).

1.3.6 Αιμίνη. Αποτελεί φυσικό επαγωγέα της ερυθροποίησης των K562 κυττάρων και δεν έχει ούτε δομικές, ούτε μηχανιστικές ομοιότητες με της ουσίες που προαναφέρθηκαν (Rutherford *et al.*, 1979).

1.3.7 Κυτταροκίνες. Επιπλέον των χημικών επαγωγέων, έχει δείχτεί ότι αρκετές κυτταροκίνες, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, επάγουν τη διαφοροποίηση αρκετών λευχαιμικών κυτταρικών σειρών. Παραδείγματα αποτελούν η ερυθροποιητίνη (Busfield and Klinken, 1992) και ο παράγοντας GM-CSF (Komatsu *et al.*, 1997).

Στον **Πίνακα 2** δίνονται οι πιο γνωστοί από τους χημικούς επαγωγείς της διαφοροποίησης των **K562** ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων, καθώς και ο τελικός φαινότυπος των διαφοροποιημένων κυττάρων σε κάθε περίπτωση.

Επαγωγικές ουσίες	Τελικός φαινότυπος (μετά τη διαφοροποίηση)	Αναφορές
Anthracyclins	ερυθροκύτταρα	(Steinheider et al., 1986; Tsiftoglou et al., 1991)
Apicidin	ερυθροκύτταρα	(Witt et al., 2003)
5-Azacytidine	ερυθροκύτταρα	(Gambari et al., 1984)
Butyric acid	ερυθροκύτταρα	(Cioe et al., 1981)
Chromomycin	ερυθροκύτταρα	(Bianchi et al., 1999)
cis-platin	ερυθροκύτταρα	(Bianchi et al., 2000)
Ara-C	ερυθροκύτταρα	(Bianchi Scarra et al., 1986)
5-FU	ερυθροκύτταρα	(Yang and Chang, 1995)
Hemin	ερυθροκύτταρα	(Rutherford et al., 1979)
Herbimycin	ερυθροκύτταρα	(Honma et al., 1989)
HMBA	ερυθροκύτταρα – μεγακαρυοκύτταρα	(Green et al., 1993)
Hydroxyurea	ερυθροκύτταρα	(Erard et al., 1981)
Mithramycin	ερυθροκύτταρα	(Bianchi et al., 1999)
PMEA	ερυθροκύτταρα	(Hatse et al., 1996)
Phorbol esters (PMA, TPA)	μεγακαρυοκύτταρα	(Whalen et al., 1997)
PA	ερυθροκύτταρα	(Samid et al., 1992)
Resveratrol	ερυθροκύτταρα	(Rodrigue et al., 2001)
Sodium butyrate	ερυθροκύτταρα – μεγακαρυοκύτταρα	(Lozzio et al., 1979; Sutherland et al., 1986)
Tiazofurin	ερυθροκύτταρα	(Hatse et al., 1996; Olah et al., 1988)
Tallimustine	ερυθροκύτταρα	(Bianchi et al., 2001)
Vitamin B12	ερυθροκύτταρα	(Rowley et al., 1981)

Πίνακας 2. Χημικοί επαγωγείς της διαφοροποίησης των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562 (Tsiftoglou et al., 2003).

1.4 Η επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των ανθρώπινων K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.

Από τα μέσα της δεκαετίας '70 παρατηρήθηκε ότι η αιμίνη επάγει την ωρίμανση τόσο των ανθρώπινων K-562 όσο και των MEL ερυθρολευχαιμικών κυττάρων από ποντίκι, (*Ross and Sautner, 1976, Rutherford et al., 1979, Sassa, 1976*). Επιπλέον, η παρατήρηση ότι λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης τους με αιμίνη, χάνουν την ικανότητά τους να καταστέλλουν την ανάπτυξη των CFU-Es και BFU-Es στο μυελό των οστών, έδωσε στην αιμίνη μεταξύ άλλων και κλινική αξία όσον αφορά τη θεραπεία της λευχαιμίας (*Steinberg et al., 1985*). Η αιμίνη μεταφέρεται στα K562 κύτταρα είτε μέσω της HPX (hemopexin), μιας πρωτεΐνης υπεύθυνης για τη μεταφορά της αιμίνης από το πλάσμα στο εσωτερικό των κυττάρων, είτε μέσω πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεμβρανικοί υποδοχείς της ή ακόμα και με απλή παθητική διάχυση, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της και της ιδιότητάς της να αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (*Taketani, 2005, Tsiftoglou et al., 2006*). Στη συνέχεια δεσμεύεται από ενδοκυττάριας και πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται HeBPs (hemin binding proteins), (*Majuri, 1989*).

Στα K-562 κύτταρα, η αιμίνη αυξάνει επίσης το ρυθμό της μεταγραφής των γονιδίων των σφαιρινών, με αντιστρεπτό τρόπο (*Charnay and Maniatis, 1983, Dean et al., 1981*). Πιο συγκεκριμένα, επάγει εκλεκτικά την έκφραση των εμβρυϊκών (Portland, Gower) και των ώριμων εμβρυϊκών (HbF, Barts) γονιδίων (*Benz et al., 1980; Fibach et al., 1995, Rutherford et al., 1979*). Η επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών από την αιμίνη δεν γίνεται μέχρι τα τελικά στάδια ωρίμανσής τους και δεν τους στερεί την ικανότητα πολλαπλασιασμού (*Gusella et al., 1980*). Συνδυασμός αιμίνης και διάφορων αντινεοπλασματικών φαρμάκων οδηγεί τα K562 κύτταρα στο τελικό στάδιο ωρίμανσής τους και στην έλλειψη ικανότητας πολλαπλασιασμού, πράγμα που μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμο στη θεραπεία του καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός αιμίνης και ανθρακυκλινών, όπως π.χ. aclacinomycin και musetamycin (*Tsiftoglou et al., 1991*).

Υποστηρίζεται ότι ο μηχανισμός δράσης της αιμίνης έγκειται στη δυνατότητα αλληλεπίδρασής της με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι NF-E2, Oct-1

και GATA-1, οι οποίοι δρουν επιλεκτικά στον υποκινητή του γονιδίου της Gγ σφαιρίνης (Aries *et al.*, 1996; Palma *et al.*, 1994). Πρόσφατα έχειδειχτεί ότι η αιμίνη ενεργοποιεί ταυτόχρονα τα γονίδια των α- και β-σφαιρινών και της οξυγονάσης της αίμης-1 (HO-1), μέσω της απομάκρυνσης του μεταγραφικού καταστολέα Bach1 (Sun *et al.*, 2002, Tahara *et al.*, 2004). Ακόμα, μέσω της ενεργοποίησης των ERK κινασών, η αιμίνη επάγει την παραγωγή ώριμων εμβρυικών αιμοσφαιρινών στα K562 κύτταρα (Woessmann and Mivechi, 2001).

2 Υποξία

Κατά την εξέλιξη, οι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου σε επίπεδο κυττάρων και συστημάτων. Οι μηχανισμοί αυτοί δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται στις μεταβολές της συγκέντρωσης οξυγόνου, όπως στην αύξηση των επιπέδων του (υπεροξία) ή στη μείωση (υποξία). Η υπεροξία μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου και οξειδωτικές βλάβες. Η υποξία σε φυσιολογικές καταστάσεις αποτελεί το απαραίτητο εξωκυττάριο ερέθισμα για την ομαλή εμβρυογένεση, την διατήρηση της πολυδυναμίας των στελεχιαίων κυττάρων και τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Η ενεργοποίηση της παραγωγής των ερυθροκυττάρων είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες συστηματικές προσαρμογές στην υποξία. Η παραγωγή της ερυθροποιητίνης ως απάντηση στην υποξία διεγείρεται κυρίως από τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες HIFs.

Τα κύτταρα αποκρίνονται στις μεταβολές του οξυγόνου με αλλαγές της έκφρασης γονιδίων τα προϊόντα των οποίων βοηθούν στην προσαρμογή των κυττάρων, προάγοντας μεταξύ άλλων τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την ερυθροποίηση. Η επαγωγή από την υποξία των διαφορετικών αυτών γονιδίων, ορισμένα από τα οποία εκφράζονται γενικά και ορισμένα ιστοειδικά, φαίνεται ότι εξαρτάται από ένα κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor HIFs).

2.1 Υποξία και μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία HIFs

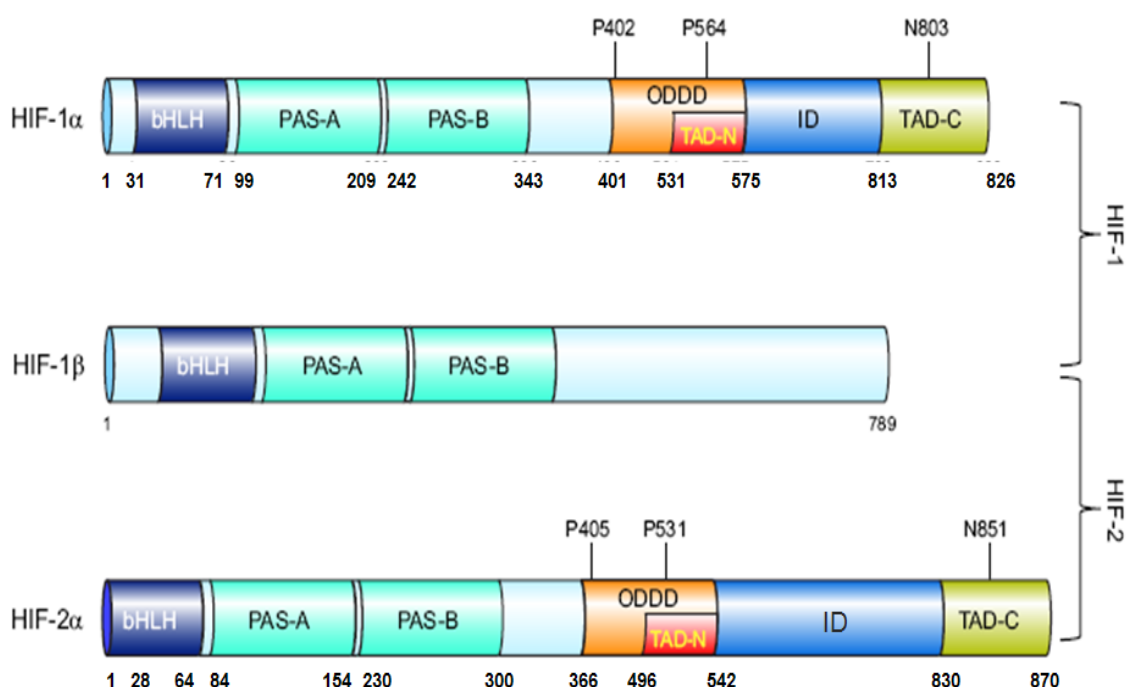
Οι επαγόμενοι από την υποξία HIFs ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM, bHLH/PAS). Οι bHLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό και την σύνδεση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Η περιοχή PAS περιέχει δύο εσωτερικές ομόλογες υποπεριοχές τις A και B που έχουν βασικά αμινοξέα και οι οποίες εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών (*Wang, GL et al., 2012*).

Οι πρωτεΐνες HIFs είναι ετεροδιμερείς, αποτελούμενες από δυο υπομονάδες, την α-υπομονάδα, η οποία είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο και τη β-υπομονάδα (ARNT) η οποία έχει σταθερή έκφραση και είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση οξυγόνου. Υπάρχουν περισσότερες από μια α υπομονάδες, η HIF-1α, HIF-2α και η HIF-3α. Παρουσία οξυγόνου, οι HIF-α υπομονάδες υδροξυλιώνονται, ουβικουιτινυλιώνονται και αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα. Κατά τη διάρκεια της υποξίας, οι υπομονάδες του HIF οδηγούνται στον πυρήνα, μέσω των ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη, τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) και σχηματίζουν ένα ενεργό σύμπλοκο με τις β υπομονάδες (HIF-α/ARNT). Οι HIF-α υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τον ARNT σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia responsive elements HRE) των γονιδίων στόχων και επάγουν τη μεταγραφή τους. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία όπως για παράδειγμα με την αύξηση της ερυθροποίησης ή της αγγειογένεσης και τη μεταφορά της γλυκόζης. (*Semenza, GL 2007, 2009*).

2.1.1 HIF- 1α

Ο HIF-1 ανακαλύφθηκε το 1992 μέσω της ανάλυσης των μοριακών μηχανισμών επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) (*Semenza GL and Wang GL 1992, Semenza GL 2007, Weidemann A and Johnson RS 2008*). Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη καθώς εμφανίζει περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α είναι διαρκής αλλά η σταθεροποίησή της εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου. Επίσης

ο HIF-1α φαίνεται να εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει μια περιοχή βασικών αμινοξέων (17-30), την περιοχή HLH (αμινοξέα 31-71) και την περιοχή PAS (αμινοξέα 99-343) με τις A (99-209) και B (242-343) υποπεριοχές. Τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που βρίσκονται στην αμινο-τελική περιοχή του HIF-1α απαιτούνται για το διμερισμό με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs με αλληλουχία 5'RCGTG3'. Ο HIF-1α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), οι οποίες εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α, μια αμινοτελική, την N-TAD (αμινοξέα 531-575) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 813-826). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (Oxygen Dependent Degradation) (αμινοξέα 401-603) που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (*Dery, MA et al., 2005*) (**Εικόνα 3**). Επιπλέον, ο HIF-1α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear localization signals) τα N-NLS (αμινοξέα 17-74) και CNLS (αμινοξέα 718-721) (*Kallio, PJ et al., 1998*).



Εικόνα 3: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α, HIF-2α και ARNT. Οι πρωτεΐνες περιέχουν μια περιοχή bHLH που ευθύνεται για την πρόσδεσή τους στο DNA και δύο PAS περιοχές (A & B) που βοηθούν στον ετεροδιμερισμό τους (με τον ARNT). Στο καρβοξυτελικό του 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 του.

2.1.2 HIF-2α

Ο HIF-2α, επίσης γνωστός ως endothelial PAS domain protein 1 EPAS-1, member of PAS family 2 MOP2, HIF-like factor HLF και HIF-related factor HRF, αποτελείται από 870 αμινοξέα και ανιχνεύτηκε αρχικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.

Στη συνέχεια, με λεπτομερείς μελέτες σε όλους τους ιστούς σε συνθήκες υποξίας βρέθηκε ότι ο HIF-2α εκφράζεται στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, όπου η δράση του φαίνεται να υπερέχει έναντι του HIF-1α (*Tian, H et al., 1997, Wiesener, MS et al., 2003*). Επίσης, με πειράματα ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύθηκε η έκφραση του HIF-2α σε ηπατοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου, νεφρικά κύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και αστροκύτταρα όταν αυτά υποβάλλονται σε συστηματική υποξία (*Wiesener, MS et al., 2003*). Ενδιαφέρον είναι ότι τα επίπεδα του mRNA του HIF-2α είναι υψηλά σε ιστούς που είναι κυρίως υπεύθυνοι για τη μεταφορά οξυγόνου, όπως στον πνεύμονα, την καρδιά και το ενδοθήλιο (*Tian, H et al., 1997*), (*Wiesener, MS et al., 2003*), (*Patel, SA and Simon, MC 2008*).

Ο HIF-2α παρουσιάζει περίπου 48% ομολογία με τον HIF-1α με τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας να εντοπίζεται στις περιοχές bHLH με ποσοστό 85%, και στις περιοχές PAS-A και PAS-B με 68% και 73% αντίστοιχα (*Tian, H et al., 1997, Hu, CJ et al., 2003*). Στην αμινοτελική περιοχή του HIF-2α όπως και του HIF-1α βρίσκονται τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για το διμερισμό τους με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs. Ο HIF-2α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό τμήμα του συνόλου του HIF-2α, μια αμινοτελική, την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 830-870). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (αμινοξέα 366-619), η οποία παίζει ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη σταθερότητα της πρωτεΐνης και έχει μικρή ομολογία με εκείνη του HIF-1α (40%). Υποστηρίζεται ότι απονέμει την εξειδίκευση για τα γονίδια στόχους, διότι αντικατάσταση της N-TAD περιοχής του HIF-2α από την αντίστοιχη του HIF-1α έχει δείξει ότι μεταβάλλει την εξειδίκευση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων (*Hu et al 2003*). Η C-TAD περιοχή και των δύο ισομορφών έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι μεταξύ άλλων ο CBP (CREB Binding Protein) ,ο p300 και πιο πρόσφατα φαίνεται από τη βιβλιογραφία ότι υπάρχουν και άλλοι συνενεργοποιητές του HIF-2α όπως ο USF2 και ο ELK1 (*Pawlus et al., 2013*).

2.1.3 HIF- 3α

Ο HIF-3α ανακαλύφθηκε μεταγενέστερα των HIF-1α και HIF-2α. Παρουσιάζει ομοιότητες με αυτούς ως προς τις περιοχές bHLH (75% και 76% ομολογία αντίστοιχα) και PAS (34% και 36% ομολογία στην PAS-A, 40% και 36% στην PAS-B). Ο HIF-3α δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD, αλλά μόνο την περιοχή N-TAD. Ο HIF-3α, ο οποίος εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-3, αλλά η μεταγραφική του ενεργότητα διαφέρει από εκείνη των HIF-1 και HIF-2.

2.1.4 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, -2α, η Single-minded protein 1 και 2 (SIM 1 & 2) και ο παράγοντας Cardiovascular helix-loop-helix factor 1 (CHF1) (Beischlag, *TV et al.*, 2008). Ο ARNT αποτελείται από 798 αμινοξέα και στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει ένα NLS που ευθύνεται για τον πυρηνικό του εντοπισμό, μια περιοχή bHLH υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA και την PAS περιοχή για τον ετεροδιμερισμό του (Εικόνα 1). Στο καρβοξυτελικό του άκρο υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής η οποία δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στη μεταγραφική ενεργότητα των ετεροδιμερών HIF-1/2α/ARNT ή AhR/ARNT (Dery, *MA et al.*, 2005).

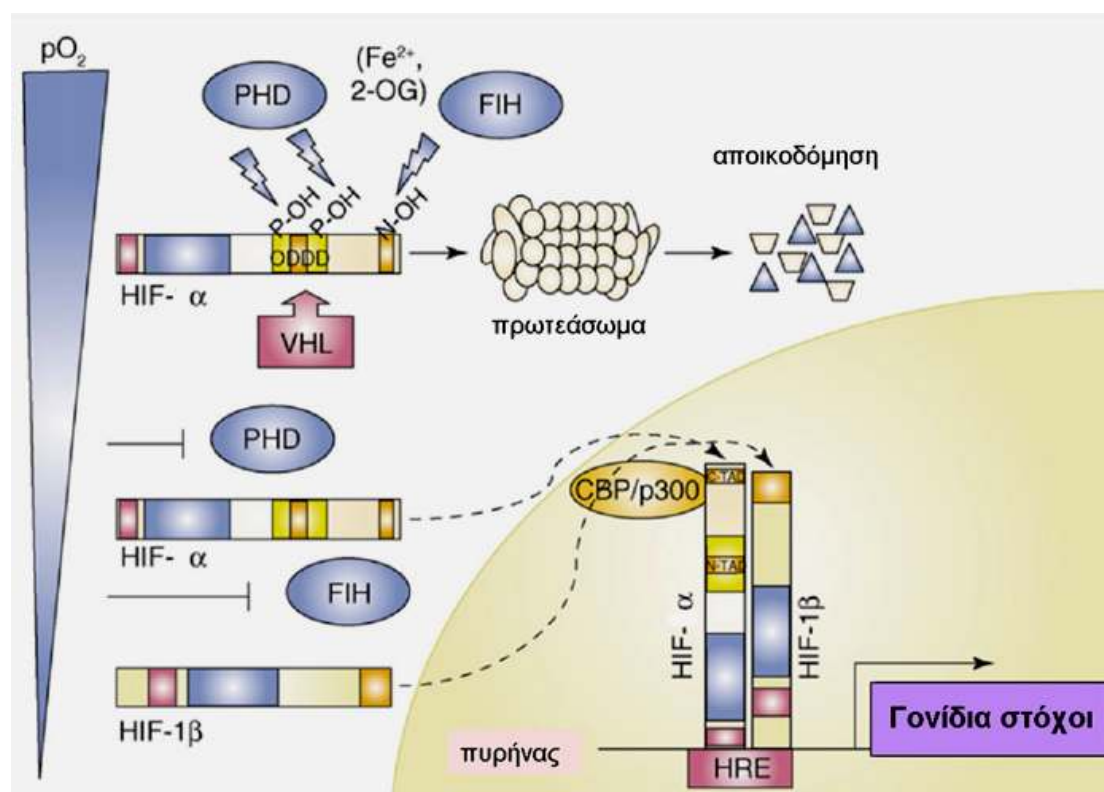
2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

Για να είναι μεταγραφικά ενεργές οι α υπομονάδες των HIF, υπόκεινται σε μια πληθώρα ρυθμίσεων σε διάφορα στάδια, όπως η μεταγραφή των γονιδίων των HIF-1α και HIF-2α, η σύνθεση και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης τους καθώς και η είσοδός τους στον πυρήνα, ο διμερισμός τους με τον ARNT, η πρόσδεση στο DNA και η αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της μεταγραφής ρυθμίζονται τόσο από οξυγόνο-εξαρτώμενες όσο και από οξυγόνο-ανεξάρτητες διαδικασίες.

2.2.1 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

2.2.1.1 Υδροξυλίωση των HIFs

Οι HIF-1α και HIF-2α, λόγω της μεγάλης ομολογίας τους, παρουσιάζουν κοινή ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης τους με οξυγόνο-εξαρτώμενο τρόπο και της μεταγραφικής ενεργότητας της C-TAD περιοχής τους μέσω υδροξυλίωσης μίας συντηρημένης ασπαραγίνης από τον «παράγοντα αναστολής του HIF» (Factor Inhibiting HIF, FIH-1) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Η εξαρτώμενη από το οξυγόνο υδροξυλίωση ρυθμίζει την ουβικιτινλίωση και την συνενεργοποίηση των HIF μεταγραφικών παραγόντων. Οι πολυλουδροξυλάσες PHD(1-3) δεσμεύονται στην οξυγονοεξαρτώμενη περιοχή αποικοδόμησης των HIFs (ODD) και παρουσία οξυγόνου υδροξυλιώνουν κατάλοιπα προλίνης, για να προσδεθεί η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL, η οποία με τη σειρά της στρατολογεί το σύμπλοκο E3 λιγάσης ουβικιτίνης. Η υδροξυλίωση από τον FIH-1 σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της περιοχής συνενεργοποίησης των HIFs εμποδίζει την πρόσδεση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή (p300 ή CBP) και τη μεταγραφική ενεργότητά τους (Brahimi-Horn, MC et al., 2007).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι HIFs παράγονται συνεχώς αλλά αποικοδομούνται αμέσως στο 26S πρωτεάσωμα. Αρχικά, οι HIFs υδροξυλιώνονται σε δύο κατάλοιπα προλίνης, P402/P564 του HIF-1α και P405/P531 του HIF-2α, που βρίσκονται στην περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD) από τις υδροξυλάσες προλίνης ή προλυλο-υδροξυλάσες (Proline Hydroxylase Domain, PHD). Οι PHDs συναντώνται σε τρεις ισομορφές τις PHD1, PHD2 και PHD3 και υδροξυλιώνουν προλίνες που περιέχονται στο συντηρημένο μοτίβο LeuXxxXxxLeuAlaPro στην ODD περιοχή των HIFs. Τα ένζυμα αυτά είναι μέλη της υπεροικογένειας των διοξυγονασών, περιέχουν Fe^{+2} στο καταλυτικό τους κέντρο και χρειάζονται οξυγόνο (O_2), α-κετογλουταρικό και ασκορβικό για τη δράση τους.

Η υδροξυλίωση των HIFs από τις προλυλοϋδροξυλάσες επιτρέπει την πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau, pVHL), στην περιοχή ODD των HIFs και της ουβικουϊτινυλίωσής τους. Ο pVHL είναι συστατικό του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικουϊτίνης. Μετά από την πρόσδεσή του στους HIFs, ακολουθεί η πρόσδεση των πρωτεϊνών ελογκίνη B και C (elongins B and C), της κουλίνης 2 (cullin 2) και της Ring-box1. Οι HIFs ουβικιτινυλιώνονται και κατευθύνονται στο πρωτεάσωμα όπου και αποικοδομούνται (*Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008*) (**Εικόνα 4**).

Οι HIFs, εκτός από τις PHDs, υπόκεινται σε περαιτέρω οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση της μεταγραφικής τους ενεργότητας. Η HIF-α υπομονάδα υδροξυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στη C-TAD περιοχή (Asn803 για τον HIF-1α και Asn851 για τον HIF-2α) από την οξυγονο-εξαρτώμενη υδροξυλάση που ονομάζεται παράγοντας αναστολής του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH). Ο FIH είναι και αυτός μέλος της υπεροικογένειας των διοξυγενασών και απαιτεί μοριακό οξυγόνο, Fe^{+2} και κετογλουταρικό για τη δράση του (**Εικόνα 4**). Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης αυτής στο καρβοξυτελικό άκρο εμποδίζει την σύνδεση του HIF C-TAD, αλλά όχι του N-TAD, με την πλούσια σε ιστιδίνες περιοχή των μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών CBP και P300 (*Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008*). Είναι γνωστό ότι οι περιοχές N-TAD και C-TAD των HIFs είναι υπεύθυνες για την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων στόχων. Συνεπώς, ο FIH αναστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής C-TAD, αλλά αφήνοντας ανεπηρέαστη την N-TAD, οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης μόνο μιας ομάδας γονιδίων στόχων (*Webb, JD et al., 2009*). Κατά αυτόν τον τρόπο η C-TAD περιοχή

είναι ανενεργή και αναστέλλεται η μεταγραφή των εξαρτώμενων γονιδίων από την περιοχή C-TAD.

Η υδροξυλίωση των HIFs είναι ένας διπλός ελεγκτικός μηχανισμός. Στη νορμοξία, οι HIFs αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα και αν μια ποσότητα της πρωτεΐνης διαφύγει από αυτό το μηχανισμό ρύθμισης, αυτή θα είναι μεταγραφικά ανενεργή λόγω της δράσης του FIH. Οι PHDs και ο FIH έχουν πολύ διαφορετικές σταθερές συγγένειας για το O₂. Πιο συγκεκριμένα, η Km του FIH για το οξυγόνο είναι 3 φορές χαμηλότερη από αυτήν των PHDs (Koivunen, P et al., 2004). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια μικρή πτώση στη συγκέντρωση οξυγόνου πρώτα θα απενεργοποιήσει τις PHDs και μια μεγαλύτερη μείωση απαιτείται για να επηρεάσει την ενεργότητα του FIH. Συνεπώς, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-s θα αυξηθούν, αλλά η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας μέσω του C-TAD θα διατηρείται. Ωστόσο, οι HIF-s θα επάγουν την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων μόνο μέσω του N-TAD (Dayan, F et al., 2006).

2.2.2 ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

2.2.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Σχετικά λίγα είναι γνωστά για την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων *HIF1A* και *EPAS1*. Υπάρχουν μόνο μερικές αναφορές που δείχνουν ότι σε καταστάσεις φλεγμονής το σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB επηρεάζει τα επίπεδα mRNA του HIF-1α (Frede, S et al., 2006, Rius, J et al., 2008, van Uden, P et al., 2008). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB (Inhibitory κB) και η επακόλουθη ενεργοποίηση των υπομονάδων του NF-κB (υπομονάδες p50 και p65 (RelA) επηρεάζει τα βασικά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του HIF-1α έπειτα από απόκριση στη θρομβίνη, το H₂O₂ και την βραχείας διάρκειας υποξία (Belaiba, RS et al., 2007, Bonello, S et al., 2007, van Uden, P et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι υπομονάδες p50 και p65 του NF-κB αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α.

Η έκφραση του *HIF1A*, σε αντίθεση με εκείνη του *EPAS1*, ρυθμίζεται επίσης από το SWI/SNF σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης μέσω της πρωτεΐνης BAF57 η οποία είναι γνωστή και ως SMARCE1 (Kenneth, NS et al., 2009).

2.2.2.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η υποξία αυξάνει τα επίπεδα των HIFs σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Αντίθετα, η διέγερση από αυξητικούς παράγοντες επάγει την έκφρασή τους με ιστοειδικό τρόπο. Επιπλέον, η υποξία σχετίζεται με μειωμένη αποικοδόμηση των HIFs, ενώ οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και άλλα μόρια διεγείρουν τη σύνθεση των HIFs μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) (Hansen, AE et al., 2011).

Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την PI3K και τις MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και 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 ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p70 S6 κινάση (S6K), η οποία κατόπιν φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την προσδεδεμένη στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E) πρωτεΐνη (4E-BP1). Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF-4E εμποδίζεται από τη φωσφορυλίωσή του από την mTOR και την ERK έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' κάλυμμα. Επίσης η MNK φωσφορυλιώνει τον eIF-4E και διεγείρει τη δράση του απευθείας. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η αυξημένη μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και οι HIFs.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν έναν ακόμη μηχανισμό ρύθμισης του HIF-2α σε μεταφραστικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, ο HIF-2α, περιέχει ένα συντηρημένο και λειτουργικό στοιχείο απόκρισης στο σίδηρο (iron-responsive element, IRE) στη 5' μη μεταφρασμένη περιοχή (5'UTR) του mRNA του, και μέσω αυτού του IRE, η σιδηρορυθμιζόμενη πρωτεΐνη που συνδέεται στο IRE (IRE binding protein1 (IREBP1, γνωστή επίσης και ως ακονιτάση) ρυθμίζει την μετάφραση του mRNA του *EPAS1* ανάλογα με την διαθεσιμότητα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Σε συνθήκες υποξίας, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι ανεπαρκή, η IREBP1 συνδέεται στα IRE στο 5'UTR του mRNA του *EPAS1* και αναστέλλει την μετάφραση του HIF-2α (Sanchez, M et al., 2007). Αυτή η ρύθμιση είναι ειδική για τον HIF-2α επειδή η IREBP1 δεν μπορεί να συνδεθεί στο mRNA του *HIF1A* ή να ρυθμίσει την μετάφρασή του (Zimmer, M et al., 2008)

2.2.2.3 Ρύθμιση από μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις

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

- **Φωσφορυλίωση**

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

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

- **Ακετυλίωση**

Η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση των HIFs ρυθμίζει την μεταγραφική τους ενεργότητα. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν οι σιρτουΐνες (sirtuins, Sirt1-7), μία οικογένεια αποακετυλασών ευαίσθητες στο οξειδοαναγωγικό στρες και εξαρτώμενες από το NAD⁺. Η Sirt1 σχηματίζει σύμπλοκο με τον HIF-2α και αποακετυλιώνει κατάλοιπα λυσίνης στο καρβοξυτελικό του άκρο. Η αποακετυλίωση του HIF-2α από την Sirt1 ενισχύει την μεταγραφική του ενεργότητα HIF-2α.

Η Sirt1 αποακετυλιώνει και τον HIF-1α, με αποτέλεσμα όμως να καταστέλλεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (*Lim, JH et al., 2010*). Επίσης, η λυσίνη 532 (K532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD του HIF-1α βρέθηκε να

ακετυλιώνεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης, της arrest-defective-1 (ARD1). Η ακετυλίωση της λυσίνης K532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του (Jeong, JW et al., 2002).

- **Σουμοϋλίωση**

Ο HIF-1α περιέχει τρεις αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων (Brahimi-Horn, C et al., 2005). Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν έχει διευκρινιστεί.

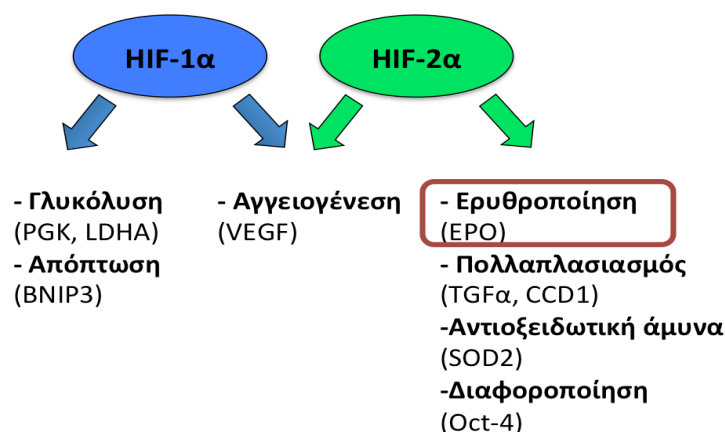
Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο HIF-2α είναι πρωτεΐνη στόχος για σουμοϋλίωση και ότι περιέχει δύο αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στη λυσίνη 394 του HIF-2α προκαλώντας τη μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Ο σουμοϋλιωμένος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

2.3 Κοινά και ειδικά γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIFs

Ο HIF-1 και ο HIF-2, εφόσον προσδεθούν στα HRE των γονιδίων στόχων τους, κρίνεται απαραίτητο να αλληλεπιδράσουν με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300 μέσω της C-TAD περιοχής των HIF-1/2α, για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αυτή η αλληλεπίδραση «στρατολογεί» και άλλους βοηθητικούς συνενεργοποιητές, όπως ο SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), ο TIF-2 (Transcription Intermediary Factor-2) και ο Ref-1 (Redox factor-1). Οι συνενεργοποιητές παίζουν δύο κύριους ρόλους, σταθεροποιούν το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής το οποίο περιέχει την RNA πολυμεράση II και επίσης έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών η οποία απαιτείται ώστε η πολυμεράση να έχει πρόσβαση στο DNA της χρωματίνης και να το μεταγράψει σε RNA (Ruas, JL et al., 2005).

Παρόλο που οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στη δομή, στο οξυγονοεξαρτώμενο μηχανισμό ενεργοποίησης και συνδέονται στην ίδια αλληλουχία στο DNA, μελέτες όσον αφορά την έκφραση και τη λειτουργικότητα τους αποκάλυψαν ότι οι HIF-α υπομονάδες ρυθμίζουν και κοινά και ειδικά γονίδια στόχους. Για παράδειγμα, ο HIF-1 είναι ο μόνος που ενεργοποιεί γονίδια που

κωδικοποιούν τα γλυκολυτικά ένζυμα, όπως κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος (PGK) και γαλακτική αφυδρογονάση A (LDHA) κ.α., αυτά που προωθούν την απόπτωση όπως το προαποπτωτικό γονίδιο *BNIP-3* (Εικόνα 5). Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α ρυθμίζει αποκλειστικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή παράγοντες που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση, όπως η ερυθροποιητίνη (*EPO*), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως η κυκλίνη D1 και ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-α (*TGF-α*) και στην διαφοροποίηση, όπως ο εμβρυϊκός μεταγραφικός παράγοντας *Oct-4* (*Pou5f1*, *Oct-3/4*) ο οποίος διατηρεί την πολυδυναμικότητα των στελεχιαίων κυττάρων (Εικόνα 5). Μια τρίτη ομάδα γονιδίων, που συμπεριλαμβάνει τον αγγειακό αυξητικό παράγοντα A (*VEGFA*) και τον μεταφορέα της γλυκόζης 1 (*GLUT-1*) ρυθμίζονται και από τους δυο (Keith, B et al., 2012). Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η N-TAD περιοχή της HIF-α υπομονάδας απονέμει την εξειδίκευση για τα ειδικά γονίδια στόχους του HIF-1α και του HIF-2α ενώ η C-TAD περιοχή επάγει τα κοινά γονίδια στόχους (Εικόνα 5) (Hu, CJ et al., 2007).



Εικόνα 5: Μερικά κοινά και ειδικά γονίδια-στόχοι των HIF-1α και HIF-2α.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες απαιτείται για τη βέλτιστη και κυτταροειδική ρύθμιση των HIF γονιδίων στόχων. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη, έδειξε για πρώτη φορά ότι ο USF2 (upstream stimulatory factor-2), ο οποίος ανήκει στους μεταγραφικούς παράγοντες με δομή helix-loop-helix-leucine-zip, είναι απαραίτητος για την μεταγραφή των HIF-2 γονιδίων στόχων, όπως της *EPO*, του *PAI-1* και του *CITED-2* στην υποξία σε Hep3B, RCC4 και mES. Συγκεκριμένα, η αναστολή της δράσης του USF2 μείωσε σημαντικά την επαγωγή των HIF-2 γονιδίων στόχων σε συνθήκες

υποξίας, ενώ η επαγωγή της δράσης του USF2, σε κύτταρα που δεν ήταν ενεργός, ενεργοποίησε την μεταγραφή των HIF-2 γονιδίων στόχων σε συνθήκες υποξίας. Μηχανιστικά, ο USF2 ενεργοποιεί τα HIF-2 γονίδια στόχους, και όχι τα HIF-1 γονίδια στόχους, μέσω δέσμευσης στους υποκινητές των γονιδίων, αλληλεπίδρασης με το HIF-2α και «στρατολογώντας» τους συνεργοποιητές CBP/P300 με σκοπό τον σχηματισμό ενός ενισχυμένου μεταγραφικού συμπλόκου (Pawlus, MR et al., 2012).

3 ΣΤΟΧΟΣ

Πρώτος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562 και πιο συγκεκριμένα α) η καλλιέργεια και ο πολλαπλασιασμός των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562 σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε συνθήκες υποξίας, β) η διαφοροποίησή τους προς ερυθροκύτταρα παρουσία αιμίνης και η μελέτη της προόδου της διαφοροποίησής τους και γ) η μελέτη της προόδου της διαφοροποίησης των K562 παρουσία αιμίνη κάτω από συνθήκες υποξίας.

Δεύτερος στόχος ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων HIF- 1α και HIF- 2α υπό την επίδραση της υποξίας κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των K562 προς κύτταρα της ερυθράς σειράς παρουσία αιμίνης.

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

4.1.1 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια

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

4.1.2 Υλικά μοριακής βιολογίας

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

4.1.3 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα (Lyberopoulou et al., 2007) από ορό κουνελιού σε αραίωση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρίας Abcam σε αραίωση 1:500.
- Μονοκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρίας Novus σε αραίωση 1:1000.

4.1.4 Βιολογικά υλικά – Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά K- 562 κύτταρα (ATCC, CCL-243) χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML).

Τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά K-562 κύτταρα απομονώθηκαν αρχικά το 1975 από τον μυελό των οστών ασθενούς 53 ετών που έπασχε από CML, από τους Lozzio B. B. και Lozzio C. B. (Lozzio, C.B., 1975) και αποτελούν ένα από τα πρότυπα συστήματα μελέτης της διαφοροποίησης ερυθρολευχαιμικών κυττάρων. Περιέχουν το χαρακτηριστικό γονίδιο *BCR-ABL*, προϊόν αμοιβαίας μετατόπισης t(9;22), γνωστό και ως χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας (Philadelphia chromosome – Ph) και εκφράζουν τη BCR-ABL κινάση της τυροσίνης. Επιπλέον, εκφράζουν τα αντιγόνα CD7 σε ποσοστό 25% και CD38 (μόνο τα διαφοροποιημένα κύτταρα). Επίσης, συνθέτουν την γλυκοφορίνη A, ένα εξειδικευμένο για την ερυθρά σειρά συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Με προσθήκη του επαγωγέα αιμίνη

στην καλλιέργεια, τα κύτταρα K-562 διαφοροποιούνται και παράγουν αιμοσφαιρίνη F (HbF). Η επαγωγή των κυττάρων από την αιμίνη εντοπίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο, με παράλληλη αύξηση του ποσοστού της μεταγραφής και του επιπέδου της συσσώρευσης των ζ-, ε-, γ- και α- mRNAs των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης. Παράλληλα, άλλες υποκυτταρικές μελέτες έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν δύο τουλάχιστον δυναμικά διαφοροποίησης, προς ερυθροκύτταρα και προς μεγακαρυοκύτταρα, ανάλογα με τους επαγωγείς που χρησιμοποιούνται. Αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες, χωρίς να προσκολλώνται στο στερεό υπόστρωμα του υποδοχέα, αιωρούμενα δηλαδή στο θρεπτικό υγρό (suspension culture). Οι πλαστικές φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν (tissue culture flasks) ήταν διαφόρων μεγεθών της εταιρείας Corning. Για τη διατήρηση των κυττάρων σε εκθετική φάση ανάπτυξης, οι υγρές καλλιέργειες αραιώνονταν κάθε 72h με καινούριο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υγρό RPMI-1640, το οποίο περιείχε 10% v/v FBS και 1% v/v PS, σε ειδικό επωαστήριο στους 37°C, με συνεχή παροχή 5% CO₂.

4.1.5 Θρεπτικά υγρά – Οροί – Αντιβιοτικά

Τα θρεπτικά υγρά, οι οροί και τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του οίκου Gibco-Invitrogen (Life Technologies Inc., U.S.A.). Η προσθήκη ορού FBS και μίγματος αντιβιοτικών PS γινόταν λίγο πριν από την χρήση τους.

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα K-562 αναπτύχθηκαν σε εν αιωρήσει κυτταροκαλλιέργειες (suspension cultures) σε θρεπτικό υγρό (RPMI-1640) που περιείχε 10% ορό εμβρύου μοσχαριού (fetal calf serum, FCS) καθώς και μίγμα αντιβιοτικών που αναστέλλει την ανάπτυξη μυκήτων και μικροβίων. Η ανάπτυξη έγινε σε επωαστήριο στους 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO₂ και κορεσμένη σε υγρασία (95%). Τα κύτταρα διατηρούνται σε συγκεντρώσεις 5×10^4 - 1×10^7 κύτταρα/ml και προκειμένου να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης, αραιώνονται κάθε 72 ώρες με φρέσκο θρεπτικό υλικό. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με τη μέθοδο του αιματοκυτταρόμετρου (Neübauer) κάτω από μικροσκόπιο και έτσι προσδιορίζεται η συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml.

Η επαγωγή της διαφοροποίησης των K562 κυττάρων έγινε με την προσθήκη διαλύματος αιμίνης 60 μM και DMSO 1.5% για 96 h, σε καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/ml.

4.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κύτταρα τα οποία βρίσκονταν σε μορφή αιωρήματος φυγοκεντρήθηκαν 200xg για 3. Μετά από απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστέθηκαν 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640 ψύξης που περιείχε 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) στους -80°C .

Η επανέναρξη καλλιιεργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανση τους στους 37°C και στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα (για την αποφυγή πρόκλησης ωσμωτικού σοκ) 10 ml θρεπτικού υλικού RPMI-1640 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των κυττάρων στα 200xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO_2 .

4.2.3 Προσδιορισμός του ρυθμού της κυτταρικής ανάπτυξης

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού της κυτταρικής ανάπτυξης στις καλλιέργειες, έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου (cells/ml) θρεπτικού υγρού σε διάφορες χρονικές στιγμές (0, 24, 48, 72, 96 ώρες). Η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον εις διπλούν και λήφθηκε ο μέσος όρος. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του αιμακυταρόμετρου (πλάκα Neubauer), με τη βοήθεια κοινού μικροσκοπίου φωτός.

4.2.4 Προσδιορισμός των διαφοροποιημένων κυττάρων με χρώση βενζιδίνης – H_2O_2

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην εκλεκτική ιστοχημική αντίδραση και χρώση των διαφοροποιημένων κυττάρων που εκφράζουν αιμοσφαιρίνη με διάλυμα βενζιδίνης και H_2O_2 . Έτσι, τα αδιαφοροποίητα δεν χρωματίζονται, ενώ τα κύτταρα που περιέχουν αιμοσφαιρίνη (διαφοροποιημένα) χρωματίζονται κυανά (Bz^+).

Για τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα Α: Υδροχλωρική βενζιδίνη 0,1g, Παγόμορφο CH_3COOH 1,5ml, ddH₂O μέχρι 50ml

Το διάλυμα Α φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C και μπορεί να διατηρηθεί 2-3 μήνες.

Διάλυμα Β: H₂O₂ (30% v/v) 25-30ml, ddH₂O 500ml

Το διάλυμα Β παρασκευάζεται πριν από κάθε προσδιορισμό σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.

Η χρώση των κυττάρων γίνεται σε 50μl κυττάρων στα οποία προστίθενται 50μl από το διάλυμα Α και 50μl από το διάλυμα Β. Ακολουθεί ανακίνηση και το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου 5-6min για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, μετράται στο μικροσκόπιο ο συνολικός αριθμός των κυττάρων (τουλάχιστον 250- 300 κύτταρα) και ο αριθμός των κυττάρων που έχουν χρωματιστεί κυανά. Θεωρώντας ότι τα κυανά κύτταρα αντιστοιχούν σε εκείνα που περιέχουν αιμοσφαιρίνη (διαφοροποιημένα), υπολογίζεται το % ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων στην καλλιέργεια (% Bz⁺).

4.2.5 Έλεγχος ζωτικότητας των κυττάρων με χρώση trypan blue

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση και χρώση των κυττάρων με το διάλυμα trypan blue (0,4%). Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει τη χημική ένωση $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{NaO}_{14}\text{S}_4$, η οποία είναι ικανή να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη όταν αυτή χάσει την ακεραιότητά της, λόγω της εκτεταμένης διάνοιξης των κυτταρικών πόρων (μορφολογικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού θανάτου). Έτσι, η ένωση αυτή χρωματίζει κυανά τα νεκρά κύτταρα, ενώ δεν επηρεάζει καθόλου τα ζωντανά.

Η χρώση των κυττάρων γίνεται με προσθήκη 20μl αιωρήματος της εκάστοτε καλλιέργειας σε 20μl έτοιμου διαλύματος trypan blue (0,4%) και ακολουθεί ανακίνηση. Κατόπιν, το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η χρωματική αντίδραση. Στο μικροσκόπιο προσδιορίζεται τόσο ο συνολικός αριθμός των κυττάρων (τουλάχιστον 250-300 κύτταρα), όσο και ο

αριθμός των κυττάρων που χρωματίζονται μπλέ. Θεωρώντας ότι τα μπλέ κύτταρα είναι τα νεκρά, αφού παρουσιάζουν διαπερατότητα στο trypan blue, υπολογίζεται το % ποσοστό των νεκρών κυττάρων στην καλλιέργεια.

4.2.6 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Τα K562 κύτταρα συλλέχθηκαν αφαιρώντας αρχικά το υγρό μέσο ανάπτυξης, μετά από φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές/λεπτό. Έπειτα, ακολούθησε ένα πλύσιμο με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,4 (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4). Στο ίζημα των κυττάρων που λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση, προστέθηκε μία ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης Lysis Buffer (50mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton, 1mM PMSF).

Συγκεκριμένα, για τη διατήρηση της αναλογίας του αριθμού των κυττάρων σε κάθε εκχύλισμα, όσον αφορά τα K562 κύτταρα έγινε χρήση 100 μl διαλύματος λύσης για 10⁶ κύτταρα. Τα αιωρημένα κύτταρα παρέμειναν για 10 λεπτά στον πάγο, στο διάλυμα λύσης και κατόπιν διαβιβάστηκαν μέσα από σύριγγα ινσουλίνης (1 ml), ώστε να σπάσει κατά το δυνατόν το μακρομοριακό DNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000 x g, για 15 λεπτά στους 4 °C και συλλογή του υπερκείμενου. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυλάσσεται στους -70 °C.

Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και ακολούθησε sonication 60Hz και θέρμανση τους στους 96°C για 5 λεπτά.

4.2.7 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

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

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το

πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετريέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

4.2.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

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

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffeur και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8-10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel): 8-10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O. Πάνω από την πηκτή επιστοίβαξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπληξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 min, με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

4.2.9 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

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

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

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μ l 3% H₂O₂ και 100 μ l 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, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε ειδικό φωτογραφικό θάλαμο (Cambridge).

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα μεταφοράς: 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, pH 9,2

Ponceau S 0,2%: 2% Ponceau, 30% τριγλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10

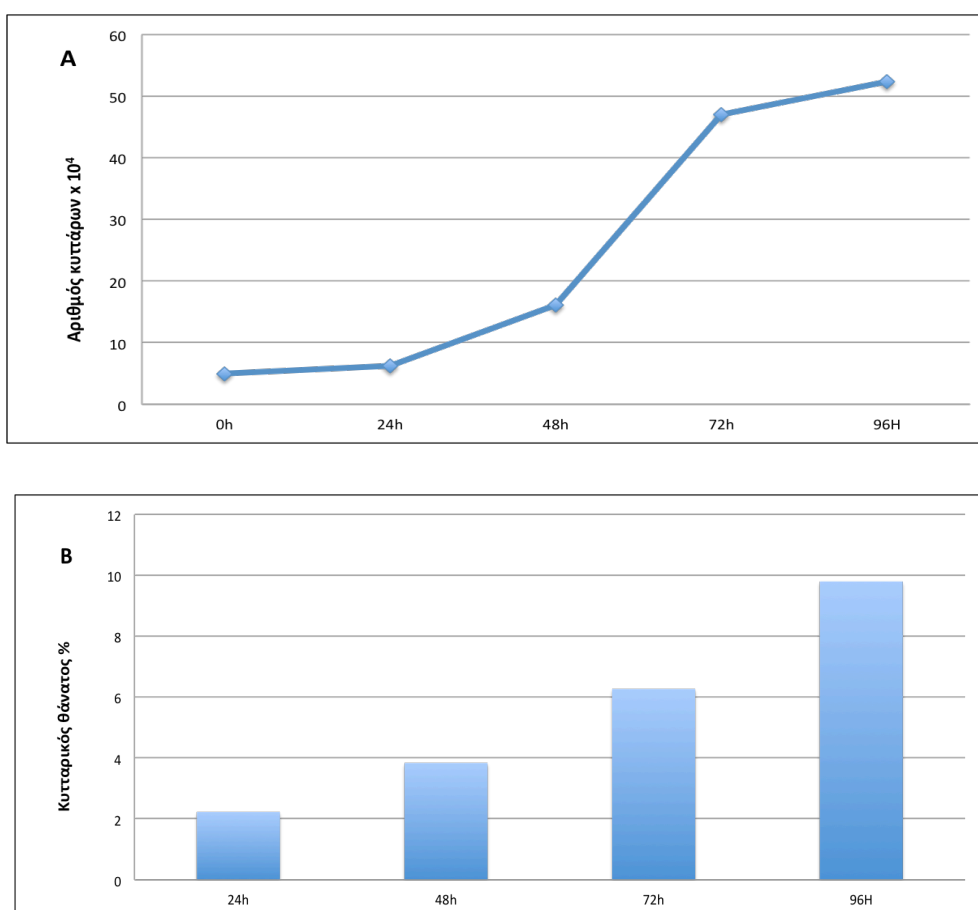
PBS Phosphate Buffer Saline: 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4

PBS-Tween 20: 0,1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Μελέτη της συμπεριφοράς των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562

Αρχικά μελετήθηκε η κινητική της ανάπτυξης και η βιωσιμότητα των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562 καλλιεργούμενα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (πείραμα μάρτυρας – control). Για την πραγματοποίηση του πειράματος καλλιεργήθηκαν κύτταρα K562 σε φλάσκες με αρχική συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα/ml για 96 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (21% O₂, 5% CO₂). Κάθε 24 ώρες, μετά από χρώση των κυττάρων με trypan blue, υπολογίστηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων και το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου κάθε 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου.



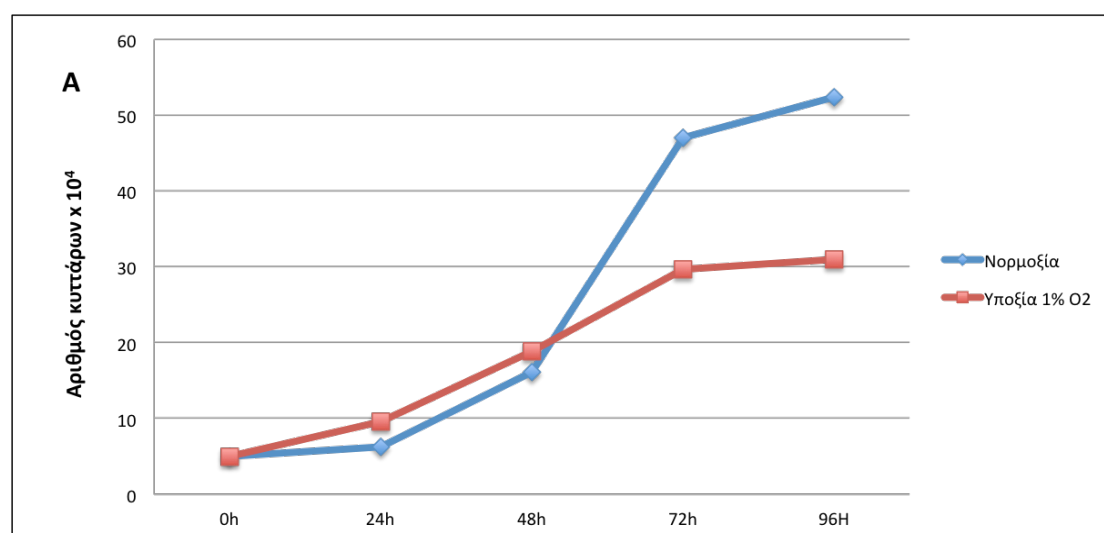
Σχήμα 1: Κινητική ανάπτυξης και ποσοστά κυτταρικού θανάτου των κυττάρων K562 Μέτρηση κάθε 24 ώρες του αριθμού των ζωντανών κυττάρων K562 που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (1A). Υπολογισμός του ποσοστού των νεκρών κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ανά 24 ώρες (1B)

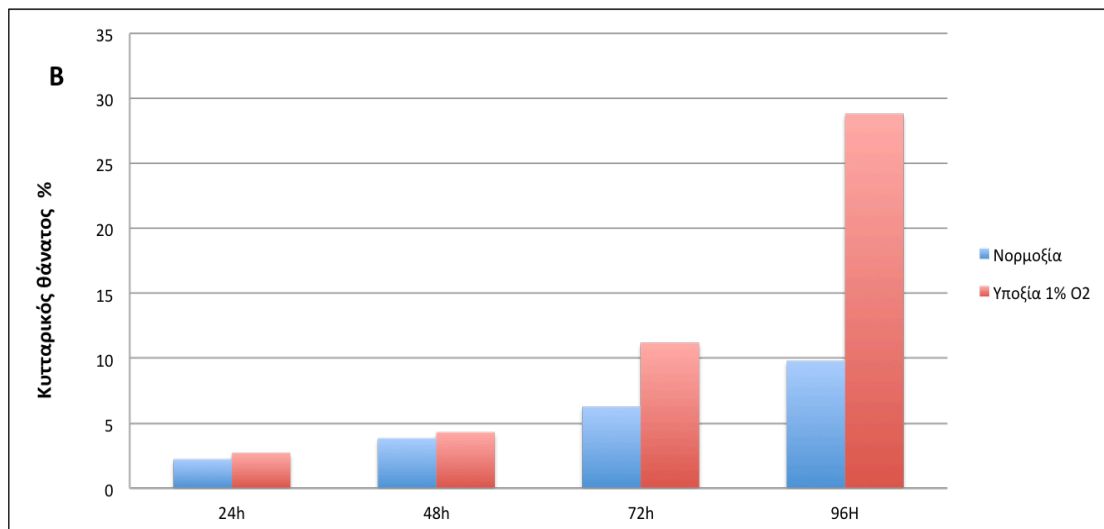
Από την κινητική της ανάπτυξης του σχήματος 1Α, φαίνεται ότι τα K562 κύτταρα πολλαπλασιάζονται αργά τις πρώτες 24 ώρες, διπλασιάζονται στις 48 ώρες και αναπτύσσονται εκθετικά μέχρι τις 72 ώρες. Μετά τις 72 ώρες σταματά η εκθετική ανάπτυξη των κυττάρων και τελικά στις 96 ώρες έχουμε 50×10^4 κύτταρα/ ml. Η μέτρηση του κυτταρικού θανάτου (1B) δείχνει ότι στις 24, 48 και 72 ώρες υπάρχει ένας σταθερός αριθμός κυττάρων που πεθαίνουν κάθε 24ωρο (2% των κυττάρων), ενώ στις 96 ώρες ο αριθμός αυτός αυξάνεται στο 4%. Αυτό φαίνεται να συνδέεται με την κινητική ανάπτυξης (1Α), όπου μετά τις 72 ώρες σταματά η εκθετική ανάπτυξη των κυττάρων.

5.2 Επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας στην ανάπτυξη και στον κυτταρικό θάνατο των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.

Γι' αυτό το πείραμα, τα κύτταρα K562 καλλιεργήθηκαν με αρχική συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα/ml εκτέθηκαν σε συγκέντρωση O_2 1% και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων κάθε 24 ώρες.

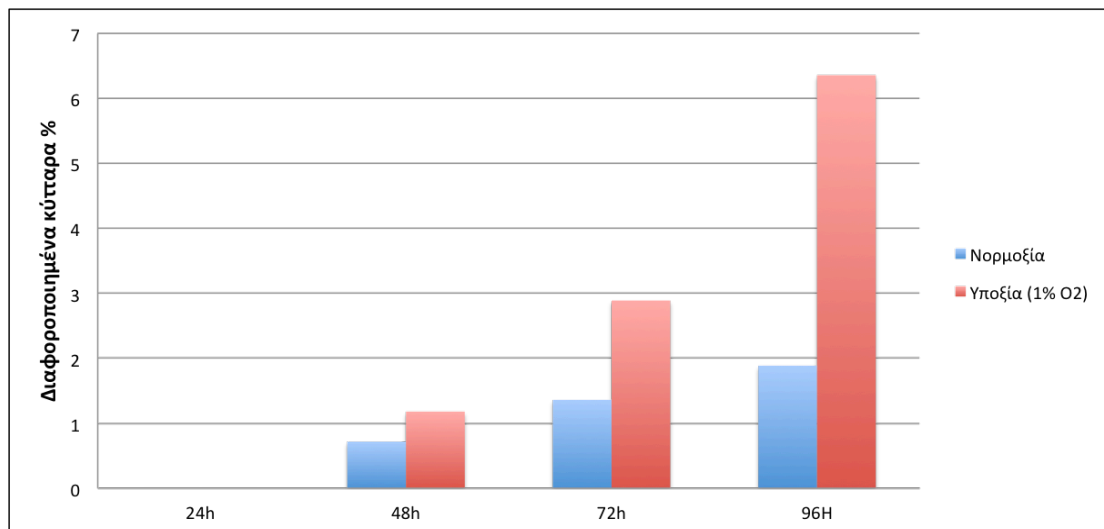




Σχήμα 2: Κινητική ανάπτυξης και ποσοστά κυτταρικού θανάτου των κυττάρων K562 σε συνθήκες υποξίας Μέτρηση κάθε 24 ώρες του αριθμού των ζωντανών κυττάρων K562 που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας 1% [O₂] (2A). Υπολογισμός του ποσοστού των νεκρών κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας 1% [O₂] ανά 24 ώρες (2B)

Στις καλλιέργειες κυττάρων K562 που εκτέθηκαν σε 1% [O₂], παρατηρήθηκε ότι στο χρονικό διάστημα από 0 έως 48 ώρες, τα κύτταρα K562 αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό που αναπτύσσονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου 21% [O₂]. Από τις 48 ώρες και μετά, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων μειώνεται σε σχέση με εκείνο στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε 21% [O₂] και μετά τις 72 ώρες σταματά με μέγιστο αριθμό κυττάρων 30×10^4 κύτταρα/ml (2A). Από το διάγραμμα του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι μετά τις 72 ώρες το ποσοστό των κυττάρων που πεθαίνουν αυξάνεται σημαντικά και φτάνει το 28% στις 96 ώρες (2B).

Στις ίδιες συνθήκες, μελετήθηκε και η επίδραση της υποξίας στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.



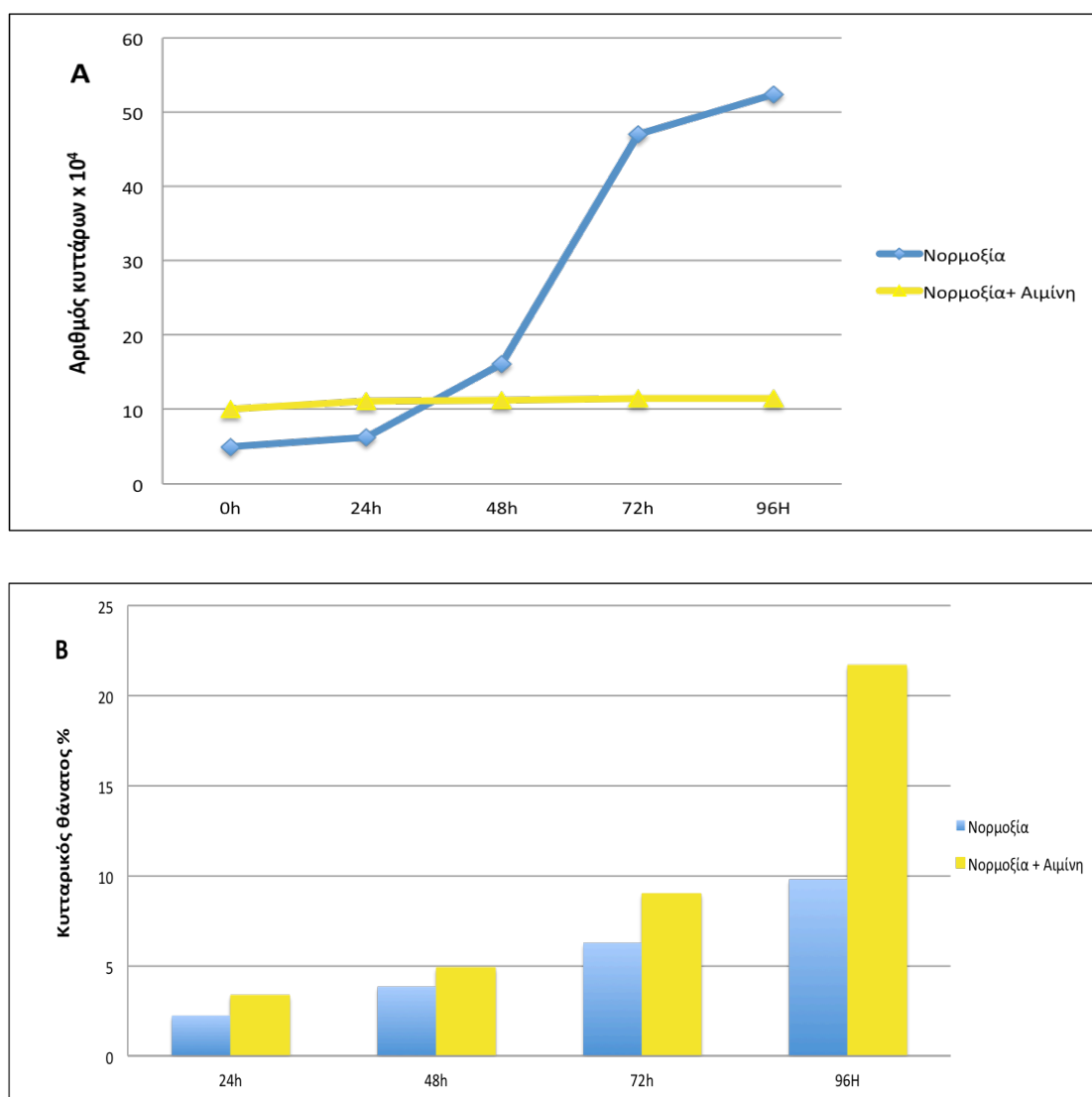
Σχήμα 3: Διαφοροποίηση των K562 κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Υπολογισμός του ποσοστού των διαφοροποιημένων κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας 1% [O₂] ανά 24 ώρες

Παρατηρήθηκε ότι στις καλλιέργειες κυττάρων K562 που εκτέθηκαν σε υποξία 1% [O₂] το ποσοστό των κυττάρων που διαφοροποιούνται είναι μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου 21% [O₂]. Πιο ειδικά, παρατηρήθηκε ότι σε νορμοξία βρέθηκε ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων να διαφοροποιείται, 0.5, 1.2 και 1.8% στις 48, 72 και 96 ώρες αντίστοιχα. Το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας είναι 2 φορές μεγαλύτερο στις 48 και 72 ώρες και 3 φορές μεγαλύτερο στις 96 ώρες σε σχέση με το ποσοστό διαφοροποιημένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε νορμοξία.

Η υποξία μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των K562 κυττάρων μετά από 48 ώρες και αυξάνει το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου μετά τις 72 ώρες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η υποξία ευνοεί τη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.

5.3 Επίδραση της αιμίνης στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων

Γι' αυτό το πείραμα, τα κύτταρα K562 καλλιεργήθηκαν με αρχική συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/ml παρουσία αιμίνης 60μM και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων κάθε 24 ώρες.

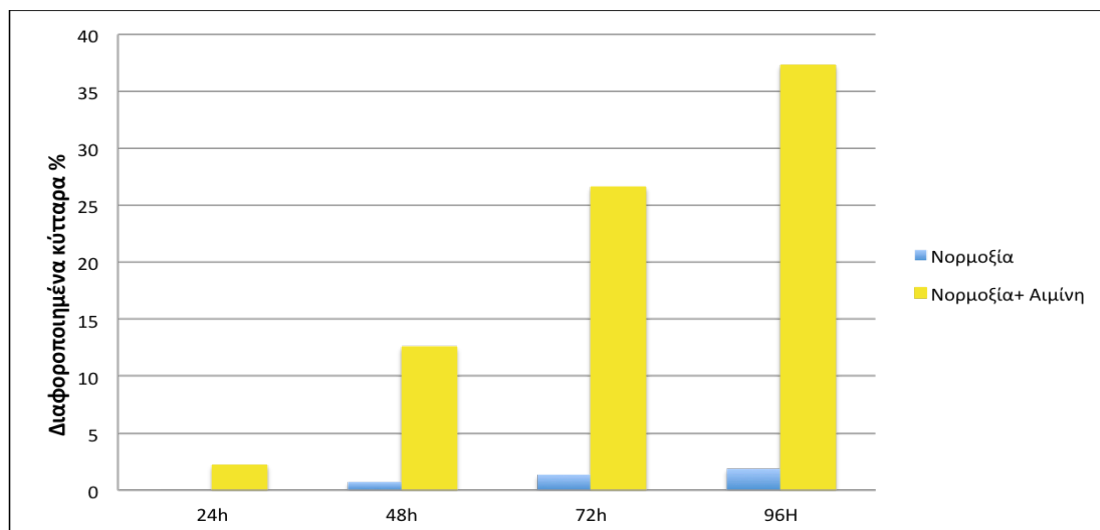


Σχήμα 4: Κινητική ανάπτυξης και ποσοστά κυτταρικού θανάτου των κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης. Μέτρηση κάθε 24 ώρες του αριθμού των ζωντανών κυττάρων K562 που καλλιεργήθηκαν παρουσία αιμίνης 60μM (4A). Υπολογισμός του ποσοστού των νεκρών κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης 60 μM ανά 24 ώρες (4B)

Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης 60μM δεν πολλαπλασιάζονται. Στο διάγραμμα του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι το ποσοστό

των κυττάρων που πεθαίνουν αυξάνεται σημαντικά στις 96 ώρες και φτάνει το 22%.

Στις ίδιες συνθήκες, μελετήθηκε και η επίδραση της αιμίνης στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.



Σχήμα 5: Διαφοροποίηση των K562 κυττάρων παρουσία αιμίνης σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Υπολογισμός του ποσοστού των διαφοροποιημένων κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης 60μM σε νορμοξία 21% [O₂] ανά 24 ώρες

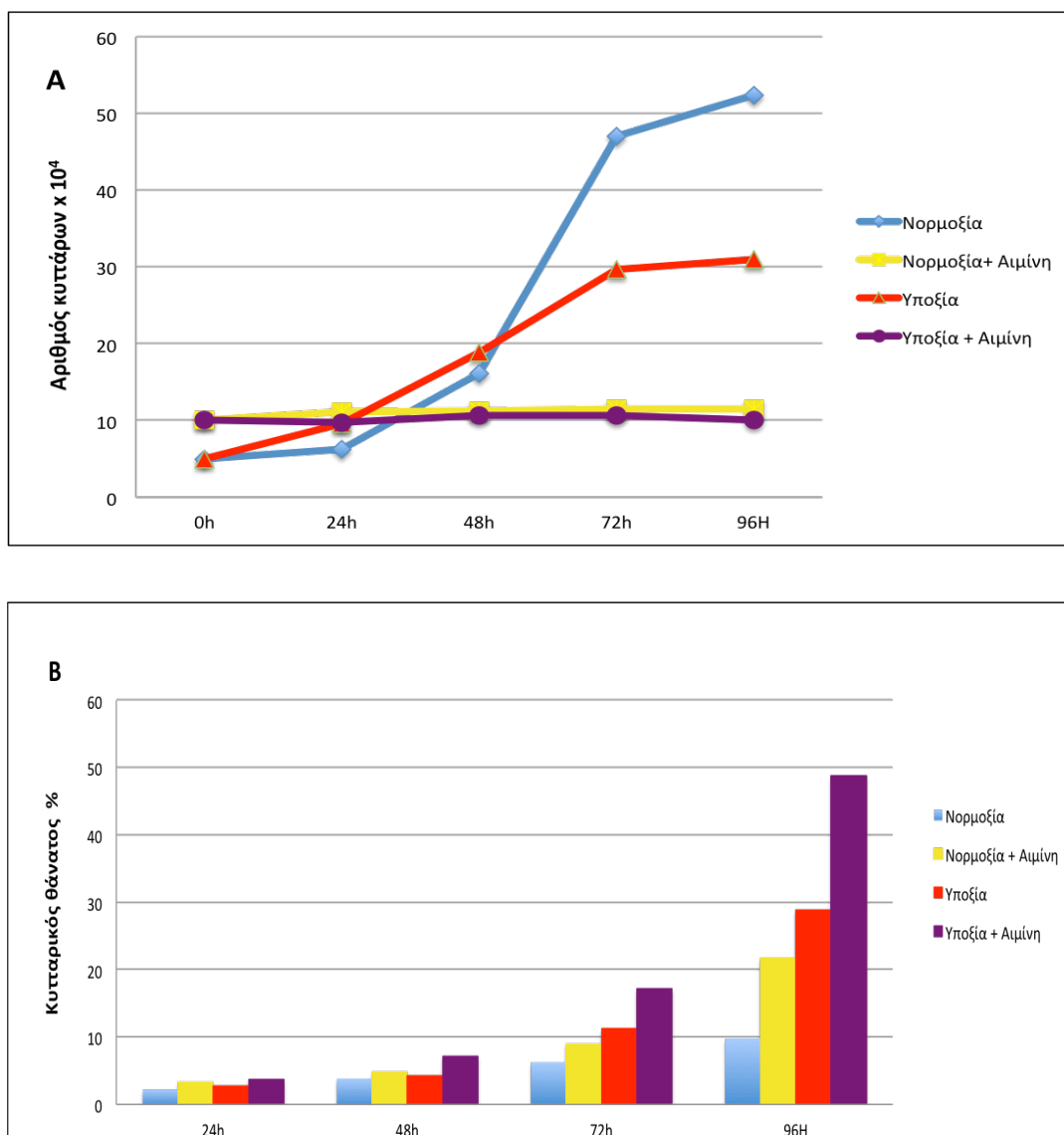
Στις καλλιέργειες κυττάρων K562 στις οποίες προστέθηκε αιμίνη, παρατηρήθηκε ένα αυξημένο ποσοστό των κυττάρων που διαφοροποιούνται σε σχέση με αυτό στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν απουσία αιμίνης. Πιο ειδικά, το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης είναι 2, 13, 26 και 38% στις 24, 48, 72 και 96 ώρες ενώ το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων που αναπτύχθηκαν απουσία αιμίνης φτάνει μόλις το 2% στις 96 ώρες.

5.4 Επίδραση της υποξίας παρουσία αιμίνης στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων

Ακολούθως, μελετήθηκε η συνδυαστική επίδραση της υποξίας και της αιμίνης στην ανάπτυξη, στον κυτταρικό θάνατο και στη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων.

Γι' αυτό το πείραμα, σε καλλιέργειες κυττάρων K562 με αρχική συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml προστέθηκε αιμίνη 60μM και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας

1% [O₂]. Ο αριθμός των ζωντανών κυτάρων και το ποσοστό των νεκρών κυττάρων μετρήθηκε κάθε 24 ώρες.

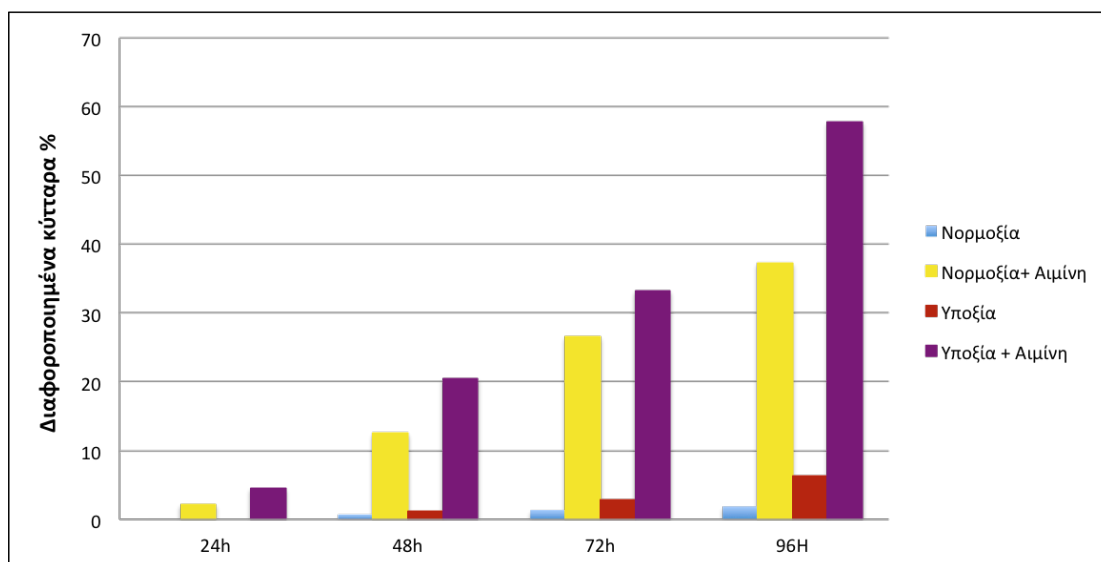


Σχήμα 6: Κινητική ανάπτυξης και ποσοστά κυτταρικού θανάτου των κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας, παρουσία αιμίνης. Μέτρηση κάθε 24 ώρες του αριθμού των ζωντανών κυττάρων K562 που καλλιεργήθηκαν παρουσία υποξίας 1% [O₂] και αιμίνης 60 μM (6A). Υπολογισμός του ποσοστού των νεκρών κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν παρουσία υποξίας 1% [O₂] και αιμίνης 60 μM ανά 24 ώρες (6B)

Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα K562 που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υποξίας, παρουσία αιμίνης δεν πολλαπλασιάζονται σε όλους τους χρόνους. Στο διάγραμμα του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι μετά στις 72 ώρες το ποσοστό των κυττάρων που πεθαίνουν αυξάνεται σημαντικά και φτάνει το 50% στις 96 ώρες. Πιο ειδικά, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων στις 96 ώρες είναι διπλάσιο (50%) στις καλλιέργειες

που αναπτύχθηκαν σε ταυτόχρονη παρουσία υποξίας και αιμίνης σε σχέση με αυτό στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση είτε της υποξίας (28%), είτε της αιμίνης (22%).

Η παρουσία της υποξίας ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την αιμίνη.



Σχήμα 7: Διαφοροποίηση των K562 κυττάρων παρουσία αιμίνης σε συνθήκες υποξίας

Υπολογισμός του ποσοστού των διαφοροποιημένων κυττάρων K562 που αναπτύχθηκαν παρουσία αιμίνης 60μM σε υποξία 1% [O₂] ανά 24 ώρες

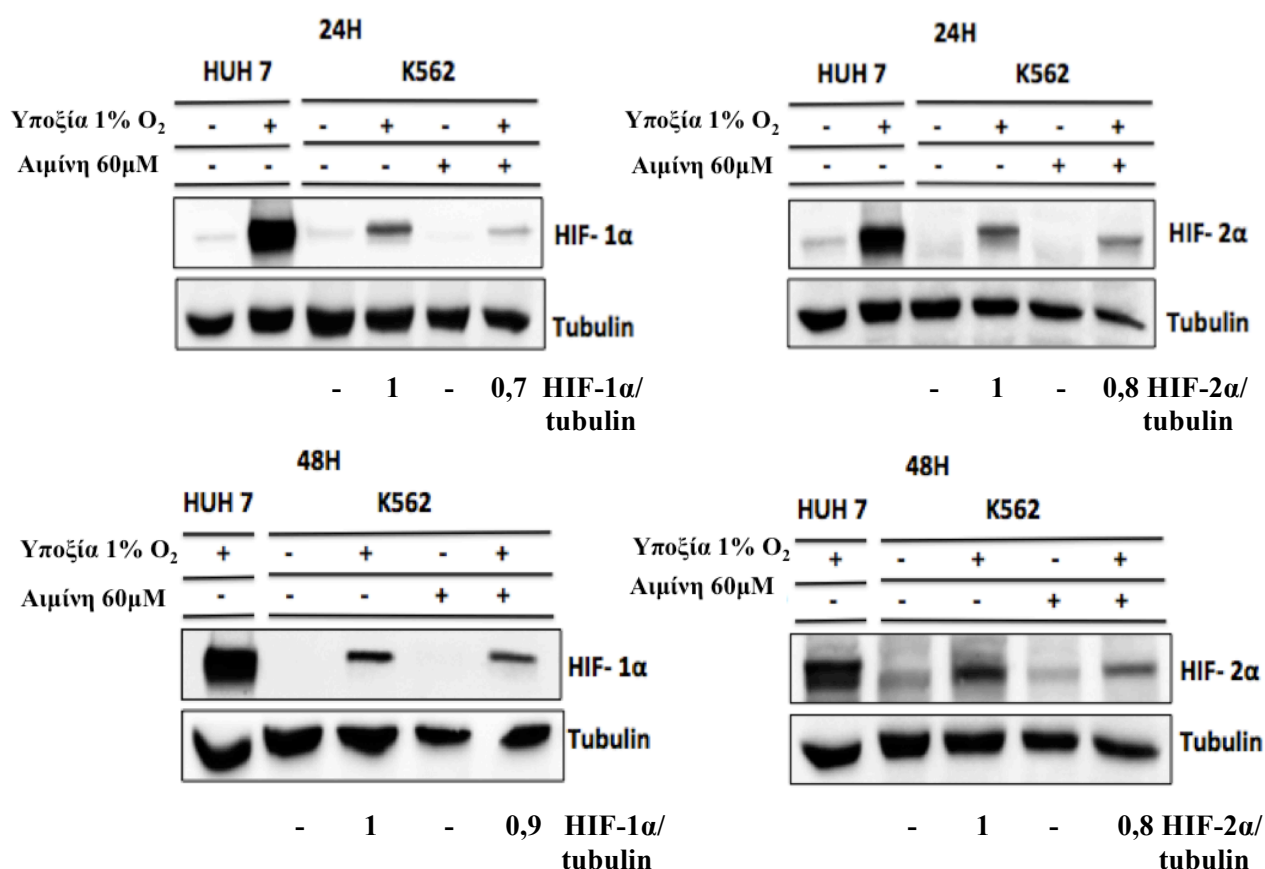
Στις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε ταυτόχρονη παρουσία υποξίας και αιμίνης το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων φτάνει το 58% στις 96 ώρες. Παρατηρούμε ότι η υποξία διευκολύνει την επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων. Η αιμίνη και η υποξία φαίνεται να δρουν αθροιστικά στη διαφοροποίηση.

5.5 Μελέτη της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία HIFs

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία, HIFs, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.

Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία HIF-1α και HIF-2α στα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 κάτω από συνθήκες υποξίας και επαγωγής της διαφοροποίησής τους με αιμίνη.

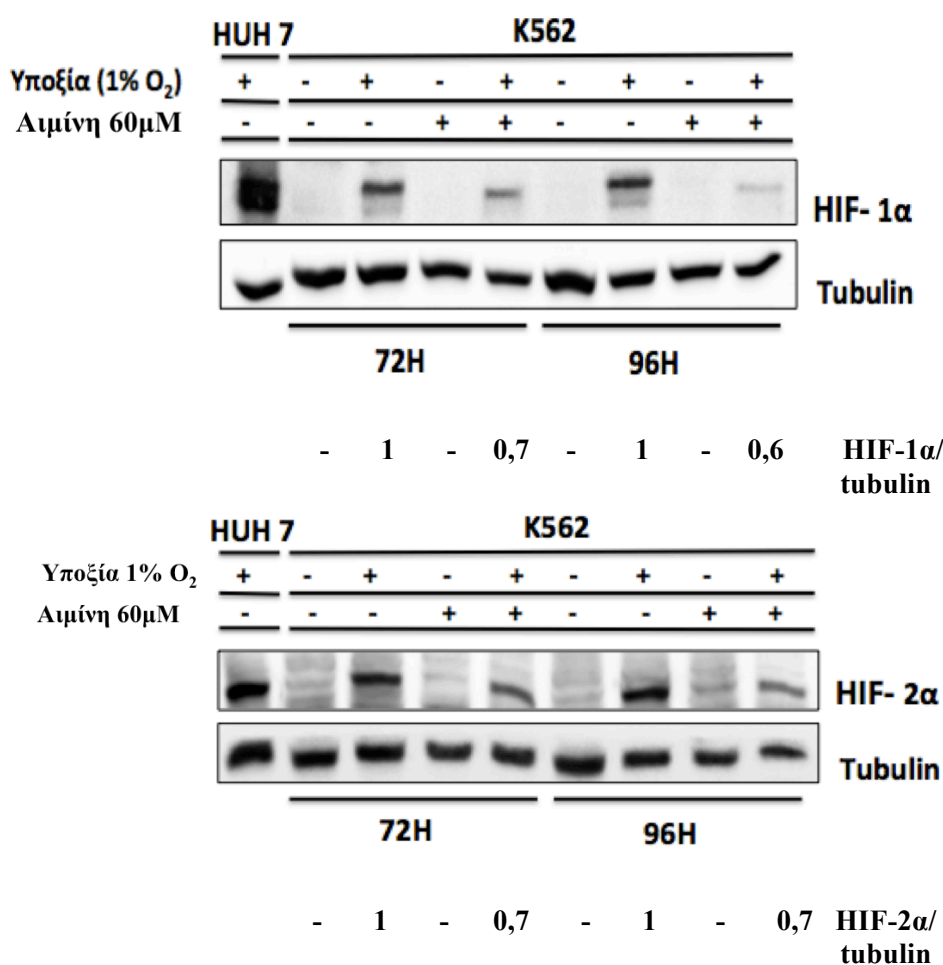
5.5.1 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας και της αιμίνης στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα K562.



Σχήμα 8: Κινητική της επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης των HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και παρουσία αιμίνης σε κύτταρα K562 στις 24 και 48 ώρες. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, τον HIF-2α και την τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων K562 που επώαστηκαν σε υποξία 1% O₂ και διάλυμα αιμίνης 60μM/ DMSO 1,5% για 24 και 48 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικός μάρτυρας ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HUH7 που επώαστηκαν για 4H

σε υποξία 1% O₂. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Μελετήθηκε η επαγωγή της έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α και παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας, τα κύτταρα K562 εκφράζουν και τις δυο ισομορφές του HIF μετά από 24 και 48 ώρες υποξίας, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου δεν επάγεται καμία από τις δυο ισομορφές. Η παρουσία αιμίνης σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου δεν προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων με αιμίνη σε συνθήκες υποξίας παρουσιάζει τον HIF-1α και τον HIF-2α να εκφράζονται στις 24 και 48 ώρες. Ωστόσο σημειώνουμε μια μικρή μείωση της έκφρασής τους στις 24 ώρες σε σχέση με εκείνες της υποξίας απουσία αιμίνης ενώ στις 48 ώρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση για καμία από τις ισομορφές (Σχήμα 8)



Σχήμα 9: Κινητική της επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης των HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και παρουσία αιμίνης σε κύτταρα K562 στις 72H και 96H. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, τον HIF-2α και την

τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων K562 που επωάστηκαν σε υποξία 1% O₂ και διάλυμα αιμίνης 60μM/ DMSO 1,5% για 72 και 96 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικός μάρτυρας ολικά εκχυλίσματα κυττάρων HUH7 που επωάστηκαν για 4H σε υποξία 1% O₂. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Παρατηρούμε ότι στις 72 και τις 96 ώρες σε συνθήκες υποξίας επάγεται η έκφραση των πρωτεϊνών του HIF-1α και του HIF-2α. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου δεν επάγεται καμία από τις δυο ισομορφές των HIF μεταγραφικών παραγόντων. Παρουσία αιμίνης, παρατηρούμε ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου δεν εκφράζεται ούτε ο HIF-1α ούτε ο HIF-2α. Μετά από ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε υποξία και αιμίνη εκφράζεται και η HIF-1α και η HIF-2α υπομονάδα. Ωστόσο σημειώνουμε μια μικρή μεταβολή στα επίπεδα της έκφρασής και των δυο υπομονάδων σε σχέση με την υποξία στις 72 και στις 96 ώρες (Σχήμα 9).

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθρώπινη ερυθρολευχαιμική σειρά K562 κύτταρα αποτελεί ένα ενδιαφέρον κυτταρικό σύστημα για τη μελέτη της διαφοροποίησης ανθρωπίνων κυττάρων προς κύτταρα της ερυθράς σειράς, καθώς και των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδοχική έκφραση των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αιμίνη αποτελεί έναν από τους φυσικούς επαγωγείς που προκαλούν την ερυθροποίηση των K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων επάγοντας εκλεκτικά την έκφραση των εμβρυϊκών και των ώριμων εμβρυϊκών (HbF, Barts) γονιδίων (*Benz et al., 1980; Fibach et al., 1995, Rutherford et al., 1979*). Επίσης πρόσφατα έχειδειχθεί ότι η αιμίνη προκαλεί την ερυθροποίηση των K562 λόγω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι NF-E2, GATA-1 και Oct-1, οι οποίοι δρουν επιλεκτικά στο υποκινητή του γονιδίου της Gγ σφαιρίνης (*Aries et al., 1996; Palma et al., 1994*).

Η διαδικασία της ερυθροποίησης είναι στενά συνδεδεμένη με τη υποξία καθώς η παραγωγή ερυθροκυττάρων αποτελεί βασικό μηχανισμό προσαρμογής του οργανισμού στις μεταβολές του οξυγόνου. Ωστόσο η διαφοροποίηση των ανθρωπίνων κυττάρων K562 προς κύτταρα της ερυθράς σειράς **σε συνθήκες υποξίας** δεν έχει μελετηθεί.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρωπίνων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562. Πιο συγκεκριμένα καλλιεργήθηκαν τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 και μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός τους σε συνθήκες υποξίας. Επίσης, τα κύτταρα K562 υποβλήθηκαν στη διαδικασία της διαφοροποίησης προς ερυθροκύτταρα παρουσία αιμίνης αλλά και παρουσία υποξίας προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή της υποξίας. Τέλος, προσδιορίστηκε η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και HIF-2α στις παραπάνω συνθήκες.

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η υποξία στα δυο πρώτα εικοσιτετράωρα φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των K562 κυττάρων, ενώ από τις 48 ώρες και πιο έντονα στις 72 και 96 ώρες αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Μια πρόσφατη δημοσίευση (*Yan Cui X. et al., 2013*), περιγράφει σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα ότι η υποξία μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά τις 72 ώρες. Οι συγγραφείς δεν μελέτησαν την επίδραση της υποξίας στον κυτταρικό θάνατο και

έτσι για πρώτη φορά δείχνουμε πως ένα μέρος των κυττάρων των οποίων αναστέλλεται η ανάπτυξη οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο στις 72 και πιο έντονα στις 96 ώρες. Στην προσπάθεια αναζήτησης μιας πιθανής συσχέτισης των μεταγραφικών παραγόντων HIFs που επάγονται στην υποξία με τις παραπάνω καταστάσεις μελετήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α και παρατηρήσαμε ότι εκφράζονται στην υποξία από τις 24 έως τις 96 ώρες και η έκφρασή τους δε φαίνεται να μεταβάλλεται με το χρόνο παρόλες τις μεταβολές της ανάπτυξης και του κυτταρικού θανάτου. Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων και η αύξηση του ποσοστού των νεκρών K562 κυττάρων σε μακροχρόνια υποξία δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα έκφρασης των HIFs.

Στη συνέχεια, μελετώντας τη διαδικασία της διαφοροποίησης των K562 κυττάρων προς ερυθροκύτταρα, διαπιστώσαμε ότι τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται παρουσία αιμίνης και η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε υποξία δεν επηρεάζει την προκαλούμενη από την αιμίνη αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενισχύει τον προκαλούμενο από την αιμίνη κυτταρικό θάνατο και αυξάνει αθροιστικά τη διαφοροποίησή τους. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν για πρώτη φορά, ότι η υποξία διευκολύνει την επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των K562 κυττάρων προς ερυθροκύτταρα. Αναζητώντας και πάλι μια πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των HIFs με τη διαφοροποίηση των κυττάρων K562 σε συνθήκες υποξίας, παρατηρούμε ότι η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α μειώνεται στις 96 ώρες. Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα δεν μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε για τη σχέση της έκφρασης των HIFs με τη διαφοροποίηση των K562 παρουσία αιμίνης.

Ωστόσο πρέπει να σημειώσουμε ότι η αιμίνη από μόνη της προκαλεί τη διαφοροποίηση των κυττάρων απουσία της έκφρασης των HIFs. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα διαφοροποιούνται υπό την επίδραση της υποξίας και πιο συγκεκριμένα στις 96 ώρες όπου έχουμε και το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων παρατηρούμε μια μείωση της έκφρασης των HIF-1α και HIF-2α. Συνεπώς, η έκφραση των HIFs, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη διαδικασία της διαφοροποίησης των K562. Βέβαια, από την προηγούμενη βιβλιογραφία του εργαστηρίου μας γνωρίζουμε ότι η έκφραση των HIF δεν συνδέεται άμεσα με τη μεταγραφική τους ενεργότητα (*Befani et al., 2013*).

Συνεπώς, για την πληρέστερη εκτίμηση της επίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων HIFs στη διαφοροποίηση των K562 προς ερυθροκύτταρα, θα πρέπει να μελετήσουμε τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs και να αναζητηθούν οι πιθανοί συνενεργοποιητές που συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές.

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adelman DM, Maltepe E, Simon MC. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev* 1999;13:2478–83.
- Andersson, L.C., K. Nilsson, and C.G. Gahmberg. 1979b. K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*. 23:143-7.
- Andersson, L.C., M. Jokinen, and C.G. Gahmberg. 1979a. Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*. 278:364-5.
- Aries, A., C. Trentesaux, S. Ottolenghi, J.C. Jardillier, P. Jeannesson, and A. Doubeikovski. 1996. Activation of erythroid-specific promoters during anthracycline-induced differentiation of K562 cells. *Blood*. 87:2885-90.
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008 18: 207-250
- Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Gorlach 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: 4691-4697
- Benz, E.J., Jr., M.J. Murnane, B.L. Tonkonow, B.W. Berman, E.M. Mazur, C. Cavallesco, T. Jenko, E.L. Snyder, B.G. Forget, and R. Hoffman. 1980. Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:3509-13.
- Beutler, E., and W.J. Williams. 1995. Williams hematology. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York. xxxv, 1668, 124, 89 p., [32] p. of plates pp.
- Bianchi, N., F. Osti, C. Rutigliano, F.G. Corradini, E. Borsetti, M. Tomassetti, C. Mischiati, G. Feriotto, and R. Gambari. 1999. The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells. *Br J Haematol*. 104:258-65.
- Birnie, G.D. 1988. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl*. 9:41-5.
- 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: 755-761
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 3:730- 7.

- Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 2005 17: 1-9
- Breitman, T.R., S.E. Selonick, and S.J. Collins. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:2936-40.
- Busfield, S.J., and S.P. Klinken. 1992. Erythropoietin-induced stimulation of differentiation and proliferation in J2E cells is not mimicked by chemical induction. *Blood.* 80:412-9.
- Cantor, A.B., and S.H. Orkin. 2001. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev.* 11:513-9.
- Champlin, R., and R.P. Gale. 1987. Acute myelogenous leukemia: recent advances in therapy. *Blood.* 69:1551-62.
- Chang, J., T.D. Allen, and T.M. Dexter. 1989. Long-term bone marrow cultures: their use in autologous marrow transplantation. *Cancer Cells.* 1:17-24.
- Charbord, P., M. Fujiwara, and J.W. Singer. 1986. Long-term cultures of human marrow cells. *Nouv Rev Fr Hematol.* 28:65-74.
- Charnay, P., and T. Maniatis. 1983. Transcriptional regulation of globin gene expression in the human erythroid cell line K562. *Science.* 220:1281-3.
- 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: 1542-1548
- Christman, J.K., N. Mendelsohn, D. Herzog, and N. Schneiderman. 1983. Effect of 5- azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* 43:763-9.
- Collins, S.J., F.W. Ruscetti, R.E. Gallagher, and R.C. Gallo. 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:2458-62.
- Collins, S.J., K.A. Robertson, and L. Mueller. 1990. Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha). *Mol Cell Biol.* 10:2154-63.
- Constantinou, A., C. Henning-Chubb, and E. Huberman. 1989. Novobiocin- and phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation of human leukemia cells associated with a reduction in topoisomerase II activity. *Cancer Res.* 49:1110-7.
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 2006 66: 3688-3698

- Dean, A., F. Erard, A.P. Schneider, and A.N. Schechter. 1981. Induction of hemoglobin accumulation in human K562 cells by hemin is reversible. *Science*. 212:459-61.
- Dean, A., T.J. Ley, R.K. Humphries, M. Fordis, and A.N. Schechter. 1983. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:5515-9.
- Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 37: 535-540
- DeSimone, J., P. Heller, L. Hall, and D. Zwiers. 1982. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:4428-31.
- Domen, J. 2001. The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis*. 6:239-52.
- Enver, T., and M. Greaves. 1998. Loops, lineage, and leukemia. *Cell*. 94:9-12.
- Enver, T., and M. Greaves. 1998. Loops, lineage, and leukemia. *Cell*. 94:9-12.
- Erard, F., A. Dean, and A.N. Schechter. 1981. Inhibitors of cell division reversibly modify hemoglobin concentration in human erythroleukemia K562 cells. *Blood*. 58:1236-9.
- Fialkow, P.J., J.W. Singer, J.W. Adamson, K. Vaidya, L.W. Dow, J. Ochs, and J.W. Moohr. 1981. Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*. 57:1068-73.
- Fibach, E., P. Kolli, A.N. Schechter, C.T. Noguchi, and G.P. Rodgers. 1995. Hemin- induced acceleration of hemoglobin production in immature cultured erythroid cells: preferential enhancement of fetal hemoglobin. *Blood*. 85:2967-74.
- Fisher, A.G. 2002. Cellular identity and lineage choice. *Nat Rev Immunol*. 2:977-82.
- 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: 3253-3265
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006 396: 517-527
- Friend, C., W. Scher, J.G. Holland, and T. Sato. 1971. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68:378-82.
- Gilbert, S.F., and S.R. Singer. 2000. Developmental biology. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. xviii, 749 p. pp.

- Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem* 2002 277: 23508-23514
- Griffin, J., D. Munroe, P. Major, and D. Kufe. 1982. Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. *Exp Hematol.* 10:774-81.
- Gusella, J.F., S.C. Weil, A.S. Tsiftoglou, V. Volloch, J.R. Neumann, C. Keys, and D.E. Housman. 1980. Hemin does not cause commitment of murine erythroleukemia (MEL) cells to terminal differentiation. *Blood.* 56:481-7.
- Hansen AE, Kristensen AT, Law I, Jorgensen JT, Engelholm SA. Hypoxia-inducible factors--regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis. *Vet Comp Oncol* 2011 9: 16-37
- Harrison, P.R. 1976. Analysis of erythropoiesis at the molecular level. *Nature.* 262:353-6.
- Hatse, S., E. De Clercq, and J. Balzarini. 1999. Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem Pharmacol.* 58:539-55.
- Hofer T, Wenger RH, Kramer MF, Ferreira GC, Gassmann M. Hypoxic up-regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase. *Blood* 2003;101: 348–50.
- Hoffman, R., N. Ibrahim, M.J. Murnane, A. Diamond, B.G. Forget, and R.D. Levere. 1980. Hemin control of heme biosynthesis and catabolism in a human leukemia cell line. *Blood.* 56:567-70.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003 23: 9361-9374
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002 111: 709-720
- Jokinen, M., C.G. Gahmberg, and L.C. Andersson. 1979. Biosynthesis of the major human red cell sialoglycoprotein, glycophorin A, in a continuous cell line. *Nature.* 279:604-7.
- Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008 30: 393-402
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J* 1998 17: 6573-6586
- Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human HIF-1. *J Cell Sci* 2010 123: 2976-2986

- Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S. SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem* 2009 284: 4123-4131
- 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: 9899-9904
- Koivunen P, Tiainen P, Hyvarinen J, Williams KE, Sormunen R, Klaus SJ, Kivirikko KI, Myllyharju J. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem* 2007 282: 30544-30552
- Komatsu, N., K. Kirito, R. Shimizu, M. Kunitama, M. Yamada, M. Uchida, M. Takatoku, M. Eguchi, and Y. Miura. 1997. In vitro development of erythroid and megakaryocytic cells from a UT-7 subline, UT-7/GM. *Blood*. 89:4021-33.
- Kyriakis, J.M., and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 81:807-69.
- Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* 2004 383: 429-437
- Li, C., E.L. Schwartz, S.L. Mella, L.S. Rittmann, and A.C. Sartorelli. 1981b. Induction of differentiation of leukemia cells in vitro by N-substituted amides, lactams, and 2-pyridones. *J Med Chem*. 24:1092-4.
- 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: 864-878
- Liu, Y., D.A. Peterson, H. Kimura, and D. Schubert. 1997. Mechanism of cellular 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 69:581-93.
- Lotan, R., G.E. Francis, C.S. Freeman, and S. Waxman. 1990. Differentiation therapy. *Cancer Res*. 50:3453-64.
- Lowrey, C.H., and A.W. Nienhuis. 1993. Brief report: treatment with azacitidine of patients with end-stage beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 329:845-8.
- Lozzio, C.B., and B.B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45:321-34.
- Lozzio, C.B., B.B. Lozzio, E.A. Machado, J.E. Fuhr, S.V. Lair, and E.G. Bamberger. 1979. Effects of sodium butyrate on human chronic myelogenous leukaemia cell line K562. *Nature*. 281:709-10.
- Luisi-DeLuca, C., T. Mitchell, D. Spriggs, and D.W. Kufe. 1984. Induction of

- terminal differentiation in human K562 erythroleukemia cells by arabinofuranosylcytosine. *J Clin Invest.* 74:821-7.
- Majuri, R. 1989. Heme-binding plasma membrane proteins of K562 erythroleukemia cells: adsorption to heme-microbeads, isolation with affinity chromatography. *Eur J Haematol.* 43:220-5.
 - Marks, P.A., and M. Dokmanovic. 2005. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 14:1497- 511.
 - Marks, P.A., V.M. Richon, R. Breslow, and R.A. Rifkind. 2001. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol.* 13:477-83.
 - Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem* 2008 283: 27620-27627
 - Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2006 281: 33095-33106
 - Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–464.
 - Palma, J.F., X. Gao, C.H. Lin, S. Wu, and W.B. Solomon. 1994. Iron protoporphyrin IX (hemin) but not tin or zinc protoporphyrin IX can stimulate gene expression in K562 cells from enhancer elements containing binding sites for NF-E2. *Blood.* 84:1288-97.
 - Papac, R.J., A.E. Brown, E.L. Schwartz, and A.C. Sartorelli. 1980. Differentiation of human promyelocytic leukemia cells in vitro by 6-thioguanine. *Cancer Lett.* 10:33-8.
 - Pappas, I.S., I. Niopas, and A.S. Tsiftoglou. 1992. Ureido derivatives of pyridine: a new class of inducers of murine erythroleukemia cell differentiation. *Anticancer Drug Des.* 7:153-61.
 - Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ* 2008 15: 628-634
 - Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hu CJ. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF2alpha) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2012 32: 4595-4610
 - Pawlus MR., Hu CJ. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cellular Signaling* 2013 25: 1895–1903
 - Reuben, R.C., R.L. Wife, R. Breslow, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 1976. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:862-6.

- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008 453: 807-811
- Ross, J., and D. Sautner. 1976. Induction of globin mRNA accumulation by hemin in cultured erythroleukemic cells. *Cell*. 8:513-20.
- Rovera, G., D. Santoli, and C. Damsky. 1979. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:2779-83.
- Rutherford, T.R., J.B. Clegg, and D.J. Weatherall. 1979. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. 280:164-5.
- Sachs, L. 1978. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature*. 274:535-9.
- Sachs, L. 1980. Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia: a model for the origin and progression of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:6152-6.
- Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 2007 14: 420-426
- Sartorelli, A.C. 1981. Changes in surface architecture during murine erythroleukemia cell differentiation as detected by lectin binding and agglutination. *Biochim Biophys Acta*. 649:105-12.
- Sassa, S. 1976. Sequential induction of heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse Friend leukemia virus-infected cells. *J Exp Med*. 143:305-15.
- Schodel J, Klanke B, Weidemann A, Buchholz B, Bernhardt W, Bertog M, et al. HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney: physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. *Am J Pathol* 2009;174:1663-74.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 338: 617-626
- Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992 12: 5447-5454
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007 2007: cm8
- Semenza GL. Involvement of oxygen- sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood* 2009 114: 2015- 2019

- Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* (Bethesda) 2009 24: 97-106
- Socolovsky, M., H.F. Lodish, and G.Q. Daley. 1998. Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6573-5.
- Stamatoyannopoulos, G. 2005. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 33:259-71.
- Steinberg, H.N., A.S. Tsiftoglou, and S.H. Robinson. 1985. Loss of suppression of normal bone marrow colony formation by leukemic cell lines after differentiation is induced by chemical agents. *Blood*. 65:100-6.
- Sun, J., H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M.M. Taketo, M. Yamamoto, and K. Igarashi. 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *Embo J*. 21:5216-24.
- Tahara, T., J. Sun, K. Nakanishi, M. Yamamoto, H. Mori, T. Saito, H. Fujita, K. Igarashi, and S. Taketani. 2004b. Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J Biol Chem*. 279:5480-7.
- Taketani, S. 2005. Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med*. 205:297-318.
- Tenen, D.G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 3:89-101.
- Tenen, D.G., R. Hromas, J.D. Licht, and D.E. Zhang. 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 90:489-519.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997 11: 72-82
- Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou, and L.C. Papadopoulou. 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 111:327-45.
- Tsiftoglou, A.S., and S.H. Robinson. 1985. Differentiation of leukemic cell lines: a review focusing on murine erythroleukemia and human HL-60 cells. *Int J Cell Cloning*. 3:349-66.
- Tsiftoglou, A.S., I.S. Pappas, and I.S. Vizirianakis. 2003a. The developmental program of murine erythroleukemia cells. *Oncol Res*. 13:339-46.
- Tsiftoglou, A.S., I.S. Pappas, and I.S. Vizirianakis. 2003b. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther*. 100:257-90.
- Vainchenker, W., U. Testa, J. Guichard, M. Titeux, and J. Breton-Gorius. 1981. Heterogeneity in the cellular commitment of a human leukemic cell

line: K 562. *Blood Cells*. 7:357-75.

- van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res* 2010 38: 1922-1931
- van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 2008 412: 477-484
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. HIF 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92: 5510-5514
- Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 2009 66: 3539-3554
- Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008 15: 621-627
- Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, Rafie CA, Boutin AT, Stockmann C, et al. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3373-83
- Weissman, I. L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb J* 2003 17: 271-273
- Woessmann, W., and N.F. Mivechi. 2001. Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res*. 264:193-200.
- Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y. The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood* 2008;112:1482-92.
- Yang, Y.W., and Y.H. Chang. 1995. Induction of erythroid differentiation by 5- fluorouracil in K562 leukemia cells. *Jpn J Cancer Res*. 86:948-55.
- Yoon D, Pastore YD, Divoky V, Liu E, Mlodnicka AE, Rainey K, et al. HIF-1alpha deficiency results in dysregulated EPO signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem* 2006;281:25703-11.
- Zimmer M, Ebert BL, Neil C, Brenner K, Papaioannou I, Melas A, et al. Small molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell* 2008;32:838-48.
- Zimmer M, Ebert BL, Neil C, Brenner K, Papaioannou I, Melas A, Tolliday N, Lamb J, Pantopoulos K, Golub T, Iliopoulos O. Small-molecule inhibitors

of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. Mol Cell 2008 32: 838-848