

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓ.
ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΛΑΚΗ ΣΟΦΙΑ**

**Μελέτη της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία:
Ο ρόλος του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α και
στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό κάτω
από συνθήκες υποξικού στρες**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2006

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓ.
ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΛΑΚΗ ΣΟΦΙΑ**

**Μελέτη της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία:
Ο ρόλος του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α και
στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό κάτω
από συνθήκες υποξικού στρες**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2006

*Στον Κωνσταντίνο
που με βοηθάει να γίνομαι καλύτερη*

*Στην οικογένειά μου
που πάντα με στηρίζει*

*Στην κ. Μπονάνου Σοφία
για όσα μου πρόσφερε*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ., Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας.

Μέλη:

- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Σακελλαρίδης Νικόλαος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ., Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας.
- Γεωργιάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Λιάκος Παναγιώτης, Λέκτορας Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIF-1	11
1.1.1 Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)	11
1.1.2 Hypoxia inducible factor 1 β (HIF-1 β)	12
1.1.3 Ισομορφές των HIF α και HIF β	12
1.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ HIF-1	14
1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1	16
1.3.1 Ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1 α από το οξυγόνο	16
1.3.1.1 Ιδιότητες των PHDs	18
1.3.2 Ενεργοποίηση του HIF-1 α	19
1.3.3 Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1 α	20
1.3.3.1 Ακετυλίωση του HIF-1 α	21
1.3.3.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1 α	21
1.3.3.3 Σουμοϋλίωση του HIF-1 α	23
1.3.3.4 S-νιτροζυλίωση του HIF-1 α	24
1.3.4 Πυρηνικός εντοπισμός του HIF-1 α και πρόσδεση στο DNA	25
1.3.5 Ρύθμιση του HIF-1 α από τα ROS	26
1.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ HIF-1 α ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΝΟΡΜΟΞΙΑΣ	28
1.4.1 Επαγωγή του HIF-1 α από «μυμητές της υποξίας»	28
1.4.2 Επαγωγή του HIF-1 α από βιολογικά σημαντικά μόρια	29
1.4.3 Επαγωγή του HIF-1 α από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO)	31
1.4.4 Επαγωγή του HIF-1 α από φλαβονοειδή	32
1.5 ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ HIF-1 α ΜΕ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	32
1.5.1 Σχέση του HIF-1 α με την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων	33
1.5.2 Σχέση του HIF-1 α με την απόπτωση	33
1.6 HIF-1 α ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	36
1.6.1 HIF-1 α και καρκίνος	36
1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο	37
1.6.3 HIF-1 α και αγγειοπάθειες	39
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	41
2.1.1 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών	41
2.1.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων	42
2.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	42
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN	44
2.3.1 Λύση κυττάρων	44
2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	45
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	45
2.3.4 Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue	47
2.3.5 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη	47

2.3.6	Ανοσοαποτύπωση και εμφάνιση με ECL	49
2.4	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	51
2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	52
2.6	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	52
2.6.1	Πλασμιδιακές κατασκευές	52
2.6.2	Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών σε πλασμιδιακό DNA (Competent T10 E.coli)	54
2.6.3	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	54
2.6.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Qiagen kit)	55
2.6.5	Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA	55
2.6.6	Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς	56
2.6.7	Προσδιορισμός μεταγραφικής ενεργότητας με μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης	56
2.7	ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	58
2.7.1	Μέτρηση αριθμού κυττάρων	58
2.7.2	Ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης	59
2.8	ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	59
2.8.1	Απομόνωση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο	59
2.8.2	Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA	60
2.8.3	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	60
2.9	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	61
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
3.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa	62
3.1.1	Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης επαγωγέων υποξικού στρες για έκφραση του HIF-1α	62
3.1.2	Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α	63
3.1.3	Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στη μεταγραφή του HIF-1α	64
3.1.4	Ρόλος της πρωτεϊνσύνθεσης στην έκφραση του HIF-1α	66
3.1.5	Ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) στην έκφραση του HIF-1α	68
3.1.6	Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK 1/2 στην έκφραση του HIF-1α	70
3.2	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1α	71
3.2.1	Επίδραση της περίσσειας σιδήρου παρουσία διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa	71
3.2.2	Επίδραση της περίσσειας σιδήρου παρουσία διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HepG2	81
3.2.3	Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa	82
3.2.4	Επίδραση της αίμης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa	83
3.2.5	Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου σε κύτταρα HeLa	85

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΠΑΓΩΓΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa	91
3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ HIF-1	93
3.4.1 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa	93
3.4.2 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HepG2	98
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ HIF-1α	100
3.5.1 Χαρακτηριστικά της δομής των φλαβονοειδών	100
3.5.2 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης φλαβονοειδών για έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa	103
3.5.3 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των φλαβονοειδών στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa	105
3.5.4 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από διάφορα φλαβονοειδή σε κύτταρα HeLa	106
3.5.5 Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου παρουσία διαφόρων φλαβονοειδών σε κύτταρα HeLa	106
3.5.6 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 που επάγεται από τα φλαβονοειδή σε κύτταρα HeLa	108
3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΩΓΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΞΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	110
3.6.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων HeLa παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες	111
3.6.2 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες	112
3.6.3 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες	118
3.7 ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΥΠΟΞΙΑ	122
3.7.1 Επαγωγή απόπτωσης από διάφορους επαγωγείς υποξικού στρες σε κύτταρα HeLa	122
3.7.2 Επαγωγή απόπτωσης από διάφορους επαγωγείς υποξικού στρες σε κύτταρα HepG2	123
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	140
SUMMARY	141
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	142
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	166

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 (κωδικός ΟΙΕΔ121), με τίτλο: «Μοριακοί μηχανισμοί απόκρισης στην υποξία: Ενεργοποίηση και δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1», με επιστημονική υπεύθυνη την κ. Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπεύθυνη καθηγήτρια μου, την κ. Μπονάνου Σοφία για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη και υποστήριξη που μου παρείχε σε οποιαδήποτε καλή ή κακή στιγμή. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ουσιαστική της παρουσία σε κάθε μου απορία, τη μοναδική παροχή γνώσεων και την υπομονή της. Τέλος, γιατί ήταν πραγματικά δίπλα μου όχι μόνο ως καθηγήτρια αλλά και ως άνθρωπος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Σίμο Γιώργο, για τη βοήθειά του τους πρώτους μήνες στο εργαστήριο, τις γνώσεις που μου προσέφερε και τις σωστές κατευθύνσεις που μου έδινε στην πορεία της δουλειάς. Επίσης, την επίκουρο καθηγήτρια κ. Γεωργιάτσου Έλενα για το ενδιαφέρον της και τη βοήθεια που μου προσέφερε, όπου αυτή χρειάστηκε και τις πάντα σωστές παρατηρήσεις της. Τέλος, τους λέκτορες κ. Λιάκο Παναγιώτη και κ. Τσακάλωφ Ανδρέα για τη διαφορετική πνοή και νέες ιδέες που έδωσαν στην εργασία καθώς και στην τεχνική τους υποστήριξη. Τους ευχαριστώ όλους για τις εύστοχες υποδείξεις τους κατά τη διόρθωση της εργασίας. Ευχαριστίες, επίσης, οφείλω στη λέκτορα Κυτταρικής Φυσιολογίας κ. Παρασκευά Ευφροσύνη για τη βοήθειά της με τα πρωτόκολλα κυτταροκαλλιιεργειών, ανάλυσης πρωτεϊνών και ανοσοφθορισμού και τη διάθεση που είχε πάντα να βοηθήσει.

Ευχαριστώ, επίσης, τους καθηγητές κ. Θ. Φώτση, τον κ. Ν. Σακελλαρίδη και τον κ. Π.Α. Μολυβδά, μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση της εργασίας μου και τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ την κ. Κρετσόβαλη Νίκη για τη ευκαιρία που μου έδωσε να επισκεφτώ το εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Θηλαστικών του Ινστιτούτου

Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης με σκοπό την εκμάθηση των τεχνικών διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδιο αναφοράς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στο Βενιέρη Μάνο και τη Μηνά Βίκη για τη βοήθειά τους το πρώτο διάστημα στο εργαστήριο και καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου για τη βοήθεια που προσέφερε ο καθένας τους, το ευχάριστο κλίμα και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υλική και ηθική συμπαράσταση που μου παρέχει όλα τα χρόνια, τον αδερφό μου Θοδωρή για την υπομονή του και τη βοήθειά του με τη διαμόρφωση του κειμένου και τον Κωνσταντίνο Βελησσαρίου για την υποστήριξη, ενθάρρυνση και υπομονή σε όλες τις κρίσεις μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ActD = ακτινομυκίνη D

BSA = Αλβουμίνη ορού βοδιού

Chx = κυκλοεξιμίδιο

Cpm = Κρούσεις ανά λεπτό

DAPI = 4', 6-διαμιδινό-2-φαινυλινδόλιο

DMSO = διμεθυλοσουλφοξείδιο

DTT = Διθειοθρεϊτόλη

EDTA = Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

FBS = εμβρυϊκός ορός βοδιού

FITC = ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη

HRP = Ραφανιδική υπεροξειδάση

LB = Luria Broth

MAPK = Κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα

NAC = N-ακετυλο-L-κυστεΐνη

ONPG = ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης

PBS = Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PHD = προλυλο-υδροξυλάση

PI3K = κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης

PMSF = φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

ROS = ενεργές μορφές οξυγόνου

SDS = Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο

TAE = Tris-οξικό οξύ-EDTA

TEMED = N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οξυγόνο εμφανίστηκε στη βιόσφαιρα της γης πριν από 2.2 δισεκατομμύρια χρόνια και σήμερα βρίσκεται στην ατμόσφαιρα, στα επίπεδα της θάλασσας, σε συγκέντρωση περίπου 21% (20.9%) και μειώνεται όσο αυξάνεται το υψόμετρο. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στην οποία εκτίθενται τα περισσότερα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού είναι 6-8%. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ως απαραίτητο στοιχείο για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Όλοι οι οργανισμοί, από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο, διαθέτουν μηχανισμούς διατήρησης της ομοιοστασίας του οξυγόνου, που είναι ουσιώδεις για την επιβίωσή τους. Ενώ η αύξηση στα επίπεδα του οξυγόνου (υπεροξία) μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου και οξειδωτικές βλάβες, η μείωση στα επίπεδα του οξυγόνου (υποξία) μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολικές διαταραχές και νέκρωση των ιστών, μια κατάσταση που παρατηρείται κατά την οξεία και χρόνια αγγειοπάθεια, την πνευμονοπάθεια και τον καρκίνο [1, 2].

Σε συνθήκες υποξίας, οι οργανισμοί έχουν ποικίλες αντιδράσεις για να επιβιώσουν. Στην οξεία φάση του υποξικού στρες, οι αντιδράσεις που καταναλώνουν ενέργεια μειώνονται, τα κύτταρα αλλάζουν το μεταβολισμό από αερόβιο σε αναερόβιο και οι οργανισμοί αυξάνουν το ρυθμό αναπνοής για να παραλάβουν μεγαλύτερη ποσότητα οξυγόνου από το περιβάλλον και να παραγάγουν ενέργεια. Οι χρόνιες αντιδράσεις περιλαμβάνουν αλλαγές στην έκφραση διαφόρων γονιδίων με στόχο, εκτός από την αυξημένη πρόσληψη και αναερόβια χρήση γλυκόζης, την αυξημένη ερυθροποίηση, την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση ώστε να μεταφερθεί αποτελεσματικότερα το οξυγόνο στους περιφερικούς ιστούς [3, 4]. Η εξαρτώμενη από την υποξία ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω του κύριου ρυθμιστή της απόκρισης στην υποξία, που είναι ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). Αν και έχουν αναφερθεί και άλλοι παράγοντες που ενέχονται στην απόκριση στην ιστική υποξία, στην παρούσα εργασία μελετήσαμε αποκλειστικά την κυτταρική απόκριση στο υποξικό στρες που διαμεσολαβείται από τον HIF-1.

1.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIF-1

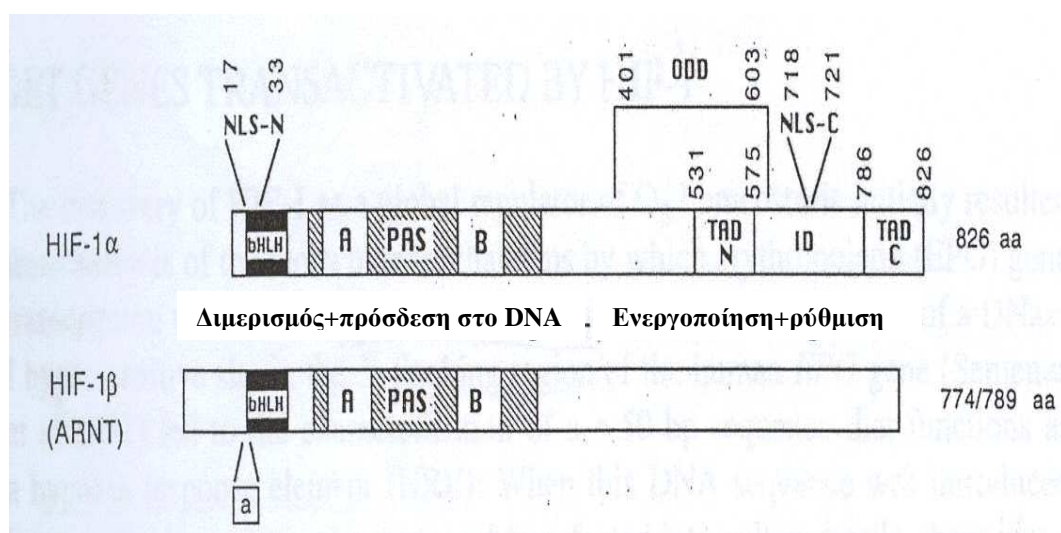
Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμφανίζεται μόνο στα μετάζωα. Οργανισμοί, των οποίων τα κύτταρα παραλαμβάνουν το οξυγόνο με απλή διάχυση από το περιβάλλον δεν εκφράζουν τον HIF-1. Ο παράγοντας αυτός είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από μια α υπομονάδα και μια β υπομονάδα, που ανήκουν στην οικογένεια basic helix-loop-helix (bHLH)/ PER-ARNT-SIM (PAS) των μεταγραφικών παραγόντων. Και οι δυο υπομονάδες του HIF-1 περιέχουν δυο PAS περιοχές, τις PAS-A και PAS-B, οι οποίες έχουν βρεθεί σε πολλά είδη, ακόμη και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και οι οποίες συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών [5]. Οι περιοχές bHLH, που βρίσκονται σε μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων είναι υπεύθυνες για το διμερισμό των υπομονάδων α και β και την πρόσδεσή τους στο DNA. Η υποξία επάγει την υπομονάδα α , ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση της υπομονάδας β .

1.1.1 Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)

Ο HIF-1 α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων (μοριακό βάρος κατά την ηλεκτροφόρηση περίπου 120kDa). Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει την περιοχή bHLH (αμινοξέα 31-71) και τις περιοχές PAS (αμινοξέα 85-298) [5]. Στο καρβοξυλικό του άκρο περιέχει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (transactivation domains, TADs), την N-TAD προς το αμινοτελικό άκρο, η οποία αντιστοιχεί στα αμινοξέα 531-575 και την C-TAD προς το καρβοξυλικό άκρο, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 786-826 [6, 7, 8]. Η υποξία επάγει την έκφραση του HIF-1 α , επειδή εμποδίζει την αποικοδόμησή του. Σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), ο χρόνος ημιζωής του HIF-1 α είναι περίπου 5 λεπτά, ενώ σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας (\leq 6% O₂). Η αποικοδόμηση του HIF-1 α σε συνθήκες νορμοξίας συμβαίνει μέσω μιας περιοχής αποικοδόμησης εξαρτώμενης από το οξυγόνο ODDD (oxygen dependent degradation domain) (αμινοξέα 401-603). Η περιοχή αυτή περιέχει 2 μοτίβα PEST, δηλαδή αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T), χαρακτηριστικές για πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ημιζωής [9]. Τέλος, ο HIF-1 α διαθέτει 2 σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLS), το N-NLS (αμινοξέα 17-33) και το C-NLS (αμινοξέα 718-721), από τα οποία σημαντικότερο για την είσοδο του HIF-1 α στον πυρήνα φαίνεται να είναι το C-NLS [10, 11].

1.1.2 Hypoxia inducible factor 1β (HIF-1β)

Σε αντίθεση με τον HIF-1α που απαντάται αποκλειστικά στον HIF-1, ο HIF-1β, που είναι γνωστός ως ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), αναγνωρίστηκε πρωταρχικά ως παρτενέρ άλλων bHLH/PAS πρωτεϊνών, όπως ο aryl hydrocarbon receptor (AhR) ή οι πρωτεΐνες SIM-1 and SIM-2 (single minded proteins) [12]. Ο ARNT περιέχει περιοχές bHLH και PAS, αλλά σε αντίθεση με τον HIF-1α δεν έχει περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής εκτός από μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη (Q-rich) στο καρβοξυλικό άκρο του, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφική ενεργότητα των ομοδιμερών του ARNT [13]. Ο ARNT εκφράζεται συνεχώς στον πυρήνα και τα επίπεδά του, σε αντίθεση με τον HIF-1α, δεν επηρεάζονται από την υποξία.



Σχήμα 1: Απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών του HIF-1α και του HIF-1β. Και οι δυο περιέχουν μια περιοχή bHLH και 2 περιοχές PAS απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό και την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Ο HIF-1α έχει 2 περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, την N-TAD και τη C-TAD και μια περιοχή αποικοδόμησης εξαρτώμενη από το οξυγόνο (ODD). Ο HIF-1β απαντάται σε δυο ισομορφές, οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα στη θέση α [1].

1.1.3 Ισομορφές των HIFα και HIFβ

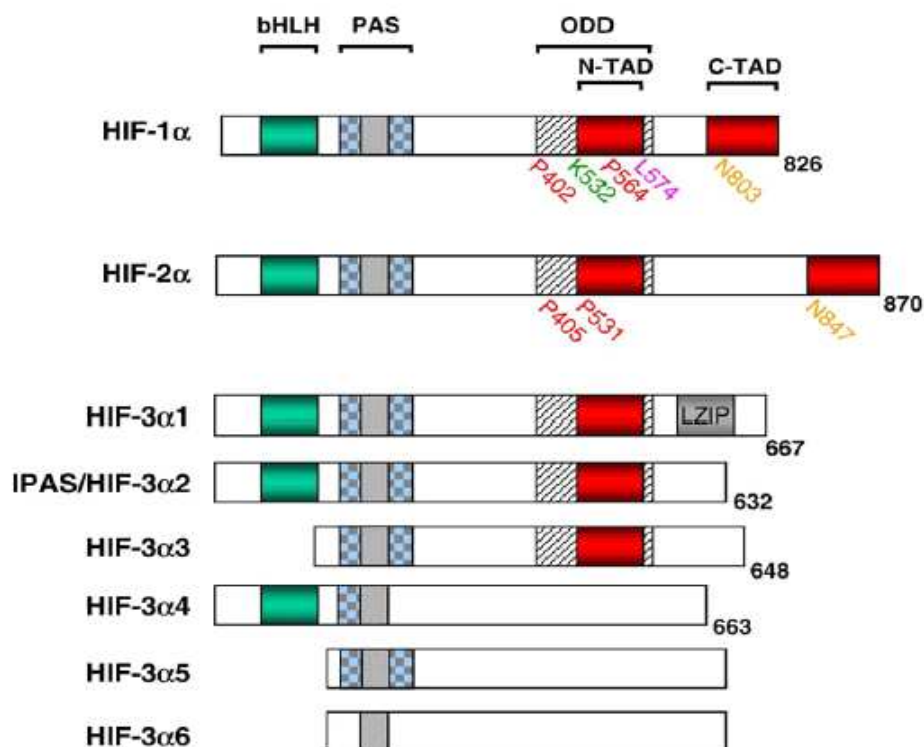
Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 3 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες HIFα και ανήκουν στην οικογένεια των bHLH/PAS πρωτεϊνών. Ο HIF-2α αναγνωρίστηκε από 4 διαφορετικά εργαστήρια ως endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) [14] ή HIF-related factor (HRF) [15] ή HIF-like factor (HLF) [16] ή

MOP2 (member of PAS family 2) [17]. Ο HIF-2α έχει περίπου 50% ομολογία με τον HIF-1α, επάγεται από την υποξία και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-2, το οποίο ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω πρόσδεσής του σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία [14, 16]. Ο HIF-2α εκφράζεται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, όπως και ο HIF-1α. Ωστόσο, ο HIF-1α εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και ο HIF-2α κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες [14, 16].

Ο HIF-3α αναγνωρίστηκε από τους Gu et al [18] και ενώ έχει ομοιότητες με τον HIF-1α και τον HIF-2α 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), δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD, αλλά μόνο την περιοχή N-TAD. Ο HIF-3α ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-3, αλλά η μεταγραφική ενεργότητά του διαφέρει από αυτή των HIF-1 και HIF-2. Ο HIF-3α φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων στόχων που ενεργοποιούνται από την υποξία σε ανθρώπινους νεφρούς, οπότε θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής [19]. Το 2001 οι Makino et al ανακάλυψαν ένα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α, τον IPAS (Inhibitory PAS domain protein), ο οποίος εκφράζεται κυρίως στον οφθαλμό και την παρεγκεφαλίδα και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α και -2α [20, 21]. Έως σήμερα έχουν αναφερθεί συνολικά 6 διαφορετικές μορφές του HIF-3α και μερικές δε διαθέτουν ούτε την N-TAD ή bHLH περιοχή [2] (Σχήμα 2).

Η παρουσία πολλών υπομονάδων του HIFα πιθανόν διασφαλίζει την ενεργοποίηση του HIF ακόμη και αν ο HIF-1α απουσιάζει ή είναι ανενεργός. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας HIF-α να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, πιθανόν σημαντικές στην ιστοειδική απόκριση στην υποξία.

Και στην περίπτωση του ARNT έχουν αναγνωριστεί δυο άλλες πρωτεΐνες που μοιάζουν δομικά και λειτουργικά, ο ARNT2 και ο ARNT3 [1], αλλά δεν είναι γνωστό αν ετεροδιμερίζονται με τους HIF-1α, HIF-2α ή HIF-3α.

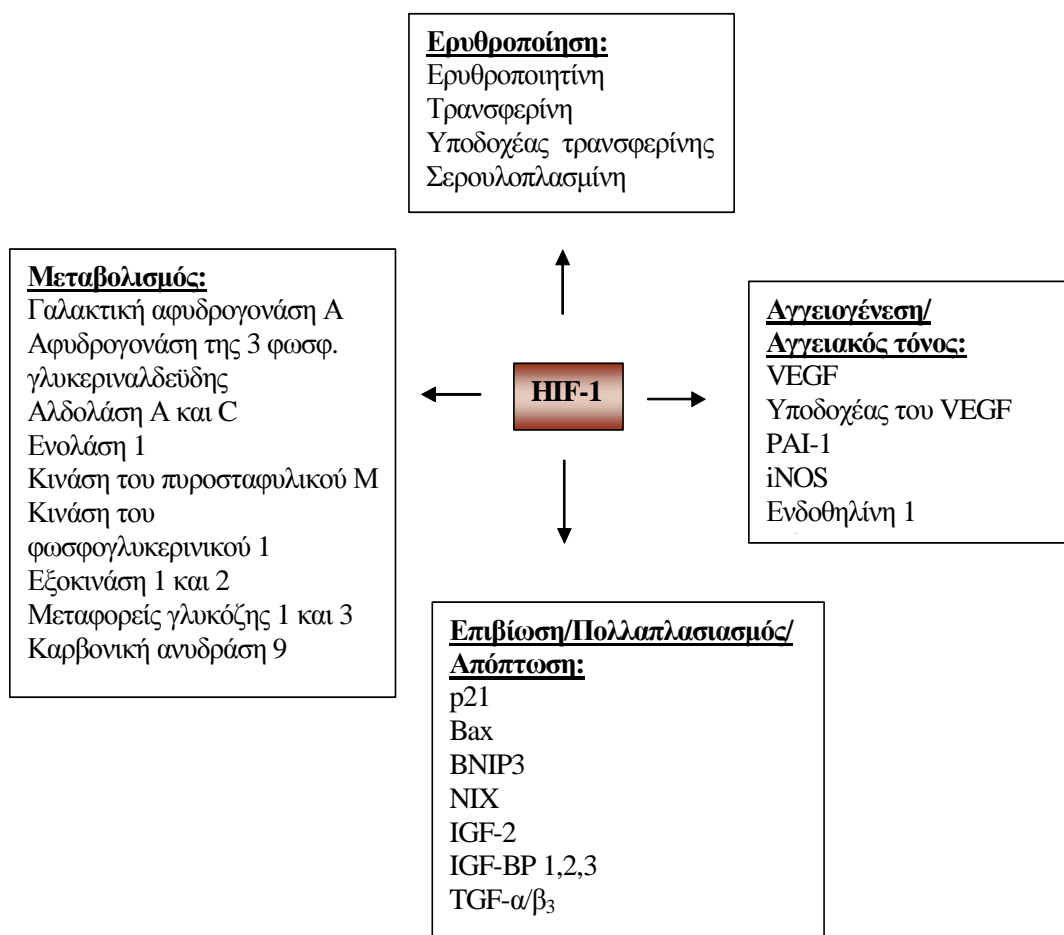


Σχήμα 2: Απεικόνιση των πρωτεϊνών **HIF-α**. Οι διαφορετικές ισομορφές του HIF-α φαίνονται με τις χαρακτηριστικές περιοχές τους [2].

1.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ HIF-1

Η ανακάλυψη του HIF-1 ως κύριου ρυθμιστή της ομοιοστασίας του οξυγόνου στους πολυκύτταρους οργανισμούς ήρθε από την ανάλυση του μηχανισμού ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης στην υποξία. Το 1991, οι Semenza et al ανακάλυψαν μια αλληλουχία 50 βάσεων στον ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, που λειτουργεί ως στοιχείο απόκρισης στην υποξία (HRE, Hypoxia Response Element) [22], στην οποία προσδένεται ο HIF-1. Τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία έχουν την αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' και μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 70 γονίδια που ενεργοποιούνται από τον HIF-1 και παίζουν ρόλο στην ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, τη μεταφορά γλυκόζης, τη γλυκόλυση, την πρόσληψη του σιδήρου, την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την απόπτωση. Οι αποκρίσεις αυτές είναι απαραίτητες για την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου.

Ο HIF-1 επάγει την ερυθροποίηση μέσω της επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) και των γονιδίων της τρανσφερίνης και του υποδοχέα της τρανσφερίνης, πιθανόν με σκοπό την αύξηση της μεταφοράς του σιδήρου στα κέντρα ερυθροποίησης, με αποτέλεσμα την αύξηση των ερυθροκυττάρων και της αιμοσφαιρίνης. Ο HIF-1 επάγει την αγγειογένεση κυρίως μέσω της επαγωγής του γονιδίου του VEGF (vascular endothelial growth factor) με σκοπό την αύξηση των αγγείων (νεοαγγειογένεση) και την αποτελεσματικότερη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Ο HIF-1 επάγει την πρόσληψη της γλυκόζης και τη γλυκόλυση μέσω της επαγωγής πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή, με σκοπό την αναερόβια παραγωγή ενέργειας [23, 24]. Τέλος, ο HIF-1 επάγει διάφορες άλλες διεργασίες, που επηρεάζουν την κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό, αλλά και τον κυτταροσκελετό και τον εξωκυττάριο χώρο [25, 11], όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Γονίδια στόχοι του HIF-1 [11].

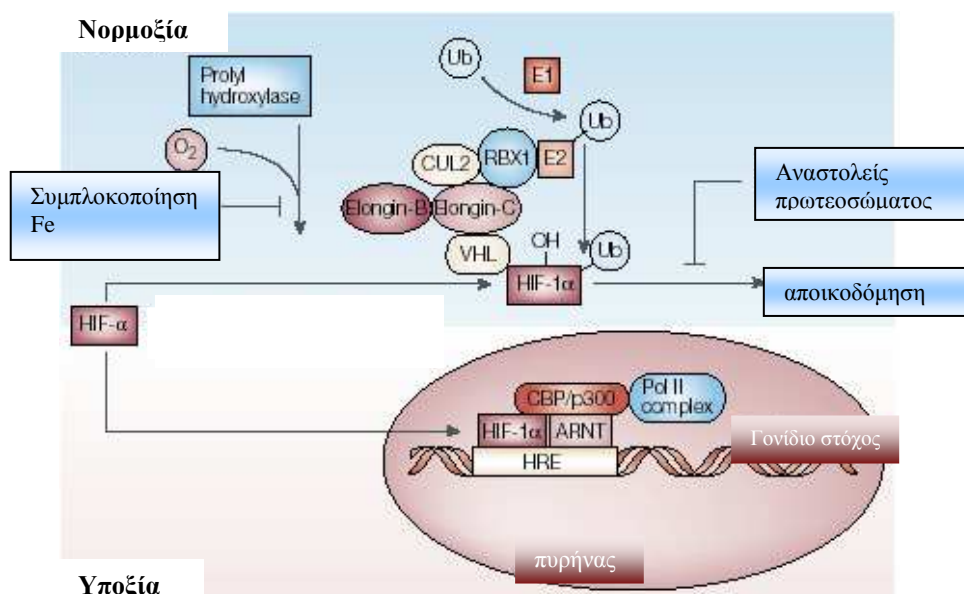
1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1

1.3.1 Ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α από το οξυγόνο

Αρχικές μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων είχαν δείξει ότι σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ο HIF-1α παράγεται, αλλά αποικοδομείται, ενώ η υποξία αναστέλλει την αποικοδόμησή του οδηγώντας σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης [26, 27]. Με τη χρήση αναστολέων του πρωτεασώματος αποδείχθηκε ότι ο HIF-1α ουβικιτινώνεται και αποικοδομείται στο 26S πρωτεόσωμα [28]. Σε επόμενες μελέτες, χαρτογραφήθηκε μια περιοχή περίπου 200 αμινοξέων που ονομάστηκε περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD), η οποία σχετίζεται με αστάθεια του HIF-1α παρουσία οξυγόνου [29]. Ο Maxwell και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι σε καρκινικά κύτταρα από ασθενείς με το σύνδρομο Von Hippel-Lindau, τα οποία δεν παράγουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL και χαρακτηρίζονται από έντονη αγγειογένεση, ο HIF-1α δεν αποικοδομείται και σταθεροποιείται ακόμη και σε συνθήκες νορμοξίας [30]. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι ο pVHL συνδέεται άμεσα, μέσω της β περιοχής του, με την περιοχή ODD του HIF-1α και τον ουβικιτινώνει [30, 31]. Ο pVHL αποτελεί συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και έπειτα από την πρόσδεσή του στον HIF-1α προσδένονται οι πρωτεΐνες ελογκίνη B και C (elongins B and C), η κουλίνη 2 (cullin 2) και η Rbx1 [32] και ο ουβικιτινωμένος HIF-1α κατευθύνεται στο πρωτεόσωμα (Σχήμα 4).

Η αλληλεπίδραση του pVHL με τον HIF-1α εξαρτάται από μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-1α, που είναι υδροξυλίωση δύο προλινών, στις θέσεις 402 και 564 [33, 34]. Σε συνθήκες υποξίας, η υδροξυλίωση και η σύνδεση του VHL στον HIF-1α δε γίνονται, οδηγώντας συνεπώς σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη ότι η τροποποίηση του HIF-1α εξαρτάται από το σίδηρο και το οξογλουταρικό, όπως και στην περίπτωση των υδροξυλασών του προκολλαγόνου, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι προλυλο-υδροξυλάσες του HIF-1α θα ανήκουν στην ίδια οικογένεια ενζύμων. Έπειτα από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων, οι επιστήμονες κατέληξαν σε ένα γονίδιο του σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, το *egl-9*, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη άγνωστης μέχρι πρότινος λειτουργίας [35] [36]. Οι σκώληκες με μεταλλαγμένο το *egl-9*, όπως συμβαίνει και με το μεταλλαγμένο VHL, εκφράζουν συνεχώς HIF-1α. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του *egl-9*, αναγνωρίστηκαν 3 ομόλογα γονίδια στα

θηλαστικά, που ονομάστηκαν PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain-containing proteins) 1,2 και 3 ή HPHs (HIF-1 prolyl hydroxylases) 3, 2, and 1 αντίστοιχα.

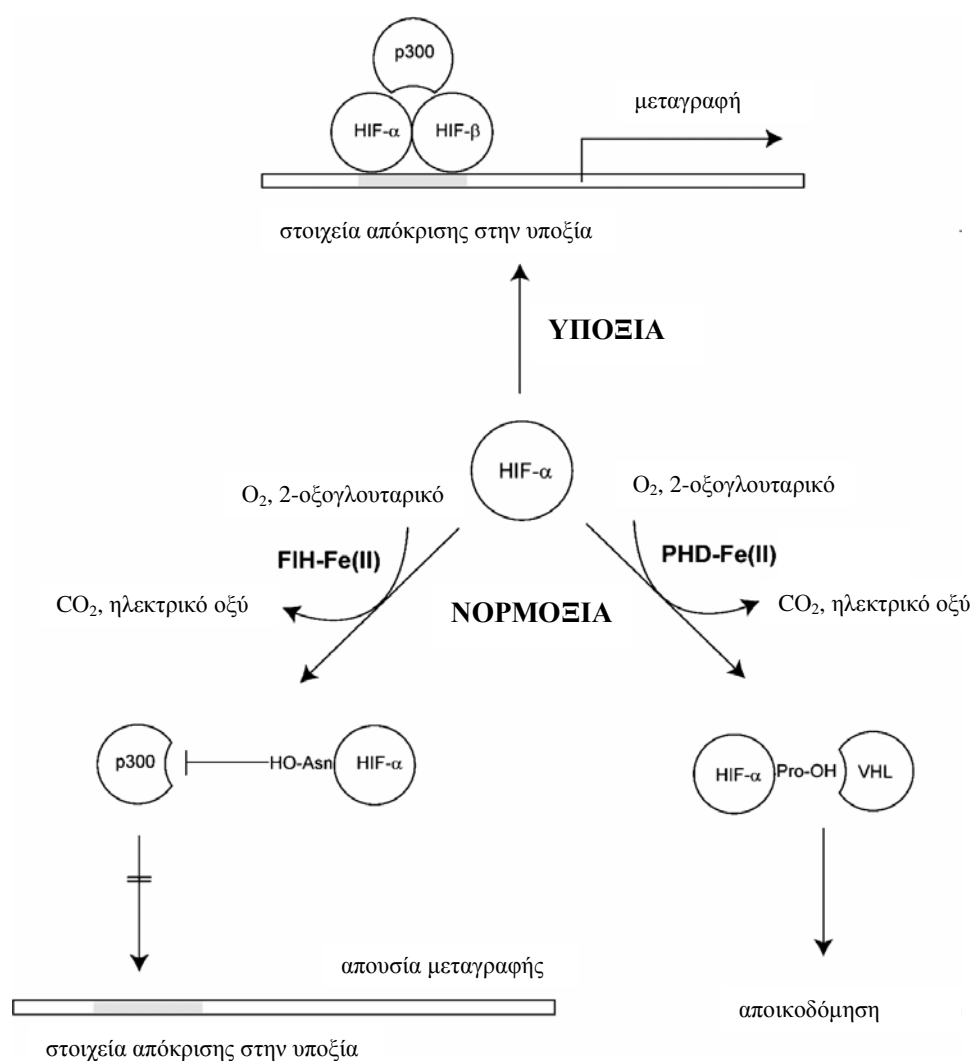


Σχήμα 4: Ρύθμιση του HIF-1α. Παρουσία οξυγόνου, οι προλυλο-υδροξυλάσες (PHDs) τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τον HIF-1α. Η δράση των PHDs απαιτεί μοριακό οξυγόνο και δισθενή σίδηρο, οπότε ενώσεις που συμπλοκοποιούν το σίδηρο αναστέλλουν τη δράση τους. Η υδροξυλίωση του HIF-1α επιτρέπει το σχηματισμό του συμπλόκου ουβικιτινίωσης, που περιλαμβάνει τον VHL και οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Αναστολείς του πρωτεοσώματος σταθεροποιούν τον HIF-1α. Απουσία οξυγόνου, οι PHDs δεν μπορούν να υδροξυλιώσουν τον HIF-1α και η πρωτεΐνη σταθεροποιείται, μετακινείται στον πυρήνα, δημιουργεί σύμπλοκο με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων με τη συνεργασία των CBP /p300 και της RNA πολυμεράσης. Ο HIF-1 προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες των γονιδίων στόχων, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) [37].

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τελευταία έχουν ανακαλυφθεί μονοπάτια αποικοδόμησης του HIF-1α ανεξάρτητα του VHL. Η αλληλεπίδραση της μοριακής συνοδού πρωτεΐνης Hsp90 με τον HIF-1α αποτελεί ένα διαφορετικό επίπεδο ρύθμισης του HIF-1α, μια και έχει βρεθεί ότι αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α σε κύτταρα όπου λείπει ο VHL [38]. Επιπλέον, αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη λιγάση της ουβικιτίνης του p53, την mdm2, οδηγεί σε αποικοδόμησης του ανεξάρτητα του VHL [39].

1.3.1.1 Ιδιότητες των PHDs

Οι τρεις προλυλο-υδροξυλάσες υδροξυλιώνουν προλίνες που περιέχονται στο συντηρημένο μοτίβο LXXLAP στην ODD περιοχή του HIF-1α, στις θέσεις 402 και 564. Η ενζυμική αντίδραση απαιτεί οξυγόνο (O_2), σίδηρο (Fe^{2+}) και 2-οξογλουταρικό. Η αντίδραση εξαρτάται απόλυτα από το οξυγόνο, αφού το άτομο του οξυγόνου για το σχηματισμό της υδροξυλομάδας στην προλίνη προέρχεται από το μοριακό οξυγόνο. Το 2-οξογλουταρικό είναι απαραίτητο καθώς χρησιμοποιεί το άλλο άτομο οξυγόνου και αποκαρβοξυλιώνεται σχηματίζοντας CO_2 και ηλεκτρικό οξύ [32] (Σχήμα 5). Επίσης, είναι απαραίτητο το ασκορβικό οξύ για τη διατήρηση του σιδήρου στη Fe^{2+} μορφή του [40].



Σχήμα 5: Τροποποίηση του HIF-1α από τις υδροξυλάσες. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις PHDs με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή του και από την FIH με αποτέλεσμα την απουσία μεταγραφικής ενεργότητας. Η αντίδραση των υδροξυλασών απαιτεί

οξυγόνο, 2-οξογλουταρικό και Fe^{2+} . Το 2-οξογλουταρικό αποκαρβοξυλιώνεται παράγοντας CO_2 και ηλεκτρικό οξύ. Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1α σταθεροποιείται και επάγει αφού συμπλοκοποιηθεί με τον ARNT τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων [41].

Μελέτες με ανασυνδυασμένες PHDs έδειξαν ότι έχουν K_m για το O_2 ίση με 230-250 μM , για το οξογλουταρικό 55-60 μM , για το ασκορβικό οξύ 140-170 μM και για το Fe^{2+} <0.1 μM [42]. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου στους ιστούς είναι μικρότερη από 10-30 μM , είναι προφανές ότι οι PHDs μπορούν να παίζουν το ρόλο του «αισθητήρα του οξυγόνου», διότι η δραστηότητά τους μειώνεται γραμμικά με την ελάττωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των τριών προλυλο-υδροξυλασών διαφέρει. Η PHD1 εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD2 στο κυτταρόπλασμα, ενώ η PHD3 και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα [43]. Και οι τρεις υδροξυλιώνουν την προλίνη στη θέση 564, αλλά μόνο η PHD1 και η PHD2 υδροξυλιώνουν την προλίνη στη θέση 402. In vitro πειράματα έδειξαν ότι οι τρεις υδροξυλάσες έχουν διαφορετική ικανότητα υδροξυλίωσης του HIF-1α. Η PHD2 έχει μεγαλύτερη ικανότητα υδροξυλίωσης από την PHD1 [44]. Πειράματα με τη χρήση siRNA έδειξαν ότι μόνο η PHD2 είναι υπεύθυνη για την υδροξυλίωση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας [45]. Τέλος, βρέθηκε ότι η PHD2 και η PHD3 επάγονται από την υποξία γεγονός που υποδεικνύει ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης του HIF-1α έπειτα από παρατεταμένη υποξία [46]. Πιθανόν, η επαγωγή των PHDs από την υποξία να έχει σχέση με διαφορετική ρύθμιση του HIF-1α σε σύντομη και παρατεταμένη υποξία. Μέχρι στιγμής, δεν έχει βρεθεί άλλο υπόστρωμα για τις προλυλο-υδροξυλάσες, εκτός από τον HIF-1α [47].

1.3.2 Ενεργοποίηση του HIF-1α

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία των γονιδίων στόχων και ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους. Ο ρόλος των δυο περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής, της N-TAD και της C-TAD είναι η πρόσδεση των συνενεργοποιητών της μεταγραφής στον προαγωγέα των γονιδίων στόχων. Οι συνενεργοποιητές αυτοί είναι ο p300/CBP, ο οποίος συνδέεται στις περιοχές ενεργοποίησης του HIF-1α και στη συνέχεια προσδένονται ο SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), ο TIF-2 (Transcription Intermediary Factor-2) και ο Ref-1 (Redox factor-1).

Ο μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης των TADs ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1 δεν είναι μεταγραφικά ενεργός, εξαιτίας της υδροξυλίωσης μιας ασπαραγίνης (Asn 803) στην C-TAD περιοχή του HIF-1α [48]. Το ένζυμο που υδροξυλιώνει την ασπαραγίνη ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών (όπως και οι προλυλο-υδροξυλάσες), απαιτεί Fe^{2+} και 2-οξογλουταρικό για να δράσει και ονομάστηκε FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) [49, 50]. Στο Σχήμα 5 φαίνεται πως, σε συνθήκες νορμοξίας, η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs και την FIH-1 οδηγεί στη μείωση των επιπέδων και της μεταγραφικής ενεργότητας της πρωτεΐνης αντίστοιχα.

Σε αντίθεση με τις προλυλο-υδροξυλάσες, δεν έχει βρεθεί αλληλουχία πρόσδεσης της FIH-1 στο καρβοξυλικό άκρο του HIF-1α [49], αλλά η βαλίνη που βρίσκεται στη θέση 802 φαίνεται να είναι σημαντική για την πρόσδεση του p300/CBP. Η FIH-1 δεν επηρεάζει τη σταθεροποίηση του HIF-1α και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα [51]. Οι σταθερές K_m της FIH-1 για το O_2 , το 2-οξογλουταρικό και το Fe^{2+} είναι χαμηλότερες από αυτές των προλυλο-υδροξυλασών. Αυτό δηλώνει ότι μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση του O_2 θα επηρεάσει πρώτα τη δραστηριότητα των προλυλο-υδροξυλασών και ότι απαιτείται μεγαλύτερη μείωση για να επηρεάσει τη δραστηριότητα της FIH-1. Έτσι, μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση του O_2 θα αυξήσει τα επίπεδα του HIF-1α, αλλά η αναστολή της ενεργοποίησης από την FIH-1 θα διατηρηθεί [51].

Ενδιαφέρον προκαλεί η ανακάλυψη ότι η FIH-1 αλληλεπιδρά και με τον VHL δημιουργώντας σύμπλοκο που περιέχει τον HIF-1α, τον VHL και την FIH-1. Η αλληλεπίδραση αυτή υποδηλώνει ότι ο VHL και η FIH-1 λειτουργούν συνεργατικά στην αναστολή της ενεργοποίησης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Τόσο ο VHL όσο και η FIH-1 αλληλεπιδρούν *in vitro* με απακετυλάσες που τροποποιούν τις ιστόνες της χρωματίνης (HDAC, chromatin modifying histone diacetylases), ένζυμα που παίζουν ρόλο στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων [49]. Άρα, η FIH-1 μπορεί να παίζει και άλλους ρόλους από το να τροποποιεί την περιοχή ενεργοποίησης του HIF-1α.

1.3.3 Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α

Εκτός από την υδροξυλίωση, έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α υπόκειται σε διάφορες άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

1.3.3.1 Ακετυλίωση του HIF-1α

Ο HIF-1α ανακαλύφθηκε ότι ακετυλιώνεται και ότι η ακετυλίωση αυτή ευνοεί την αλληλεπίδραση με τον VHL και επομένως αποσταθεροποιεί τον HIF-1α. Η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την τροποποίηση αυτή βρέθηκε ότι είναι μια ακετυλοτρανσφεράση, η ARD1 (ARrest Defective-1 protein) [52]. Η ακετυλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών, με πιο γνωστό το παράδειγμα αυτό των ιστονών. Πολλοί άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες ακετυλιώνονται, όπως οι p53, E2F1, MyoD, GATA-1. Η ακετυλίωση σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση καθώς σχετίζεται με την πρόσδεση στο DNA μεταγραφικών παραγόντων και την αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν συνενεργοποιητές της μεταγραφής [52].

Ο Jeong και οι συνεργάτες του [52] χρησιμοποίησαν το σύστημα των δυο υβριδίων, έχοντας ως δόλωμα την περιοχή ODD του HIF-1α και βρήκαν ότι η ARD1 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και ακετυλιώνει μια λυσίνη στη θέση 532. Μετάλλαξη της λυσίνης στη θέση αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη μη ακετυλίωση του μεταλλαγμένου HIF-1α, την απουσία αλληλεπίδρασης με τον VHL και τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης σε συνθήκες νορμοξίας. Αντίθετα με τις προλυλο-υδροξυλάσες, η δραστηριότητα των ακετυλοτρανσφερασών δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Ωστόσο, η πρόσδεση της ARD1 στον HIF-1α ήταν ισχυρότερη σε συνθήκες νορμοξίας παρά σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, αναστολή της έκφρασης της ARD1 αύξησε τη σταθερότητα της πρωτεΐνης HIF-1α, υποδηλώνοντας το ρόλο της ARD1 ως αρνητικό ρυθμιστή του HIF-1α.

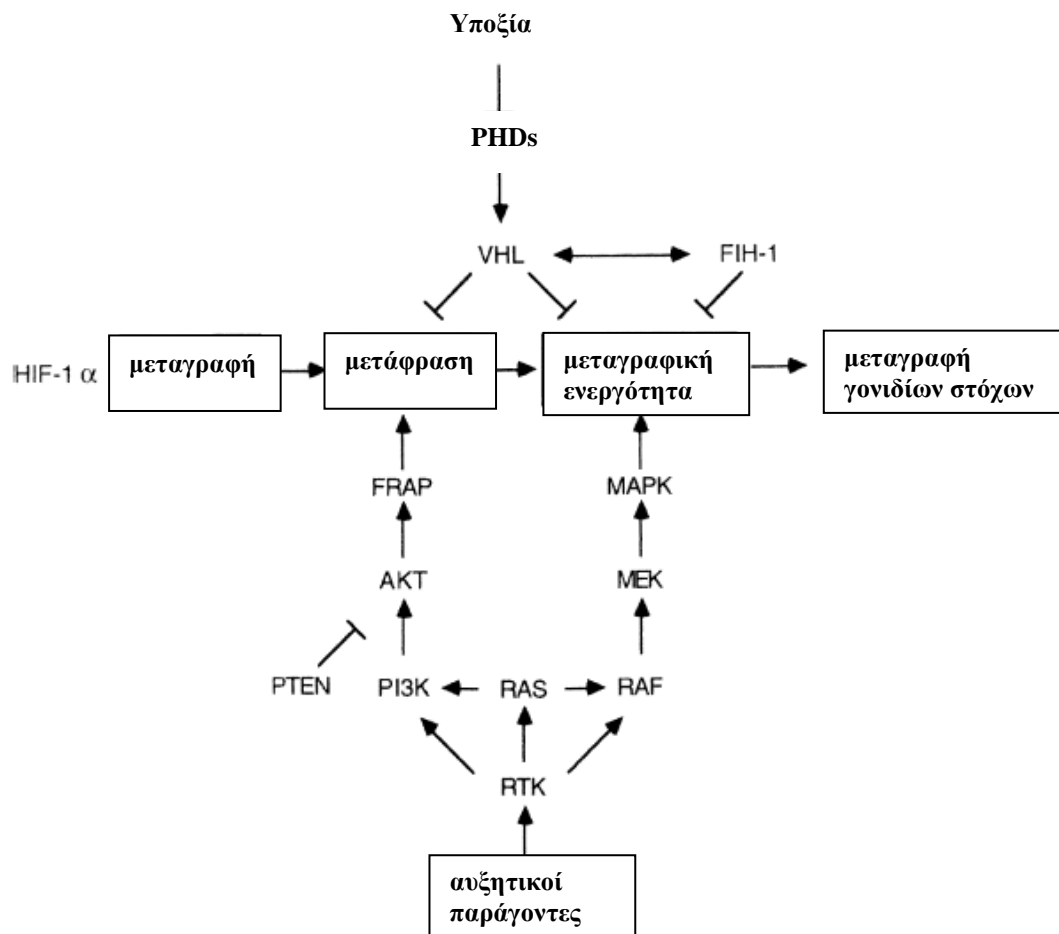
Παρόλα αυτά, ο ρόλος της ARD1 στη ρύθμιση της αποικοδόμησης του HIF-1α αμφισβητείται από πιο πρόσφατες αναφορές. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι αναστολή της έκφρασης ή υπερέκφραση της ARD1 δεν επηρεάζει τη σταθεροποίηση του HIF-1α ενώ τα επίπεδα του mRNA της ARD1 ή της πρωτεΐνης δεν επηρεάζονται από την υποξία [53]. Επιπλέον, η ARD1 δεν ακετυλιώνει τον HIF-1α αν και υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο πρωτεϊνών [54].

1.3.3.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α

Η φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων είναι ένας κοινός μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητάς τους. Πολλά εργαστήρια έχουν αναφέρει ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται, έπειτα από τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης σε συνθήκες υποξίας ή νορμοξίας, αλλά η ακριβής θέση φωσφορυλίωσης δεν έχει βρεθεί.

Οι πρώτες ενδείξεις για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α προέκυψαν από τα πειράματα των Wang και Semenza, οι οποίοι χρησιμοποιώντας αναστολείς κινασών και φωσφατασών έδειξαν ότι τόσο η φωσφορυλίωση σερίνης / θρεονίνης όσο και η φωσφορυλίωση τυροσίνης συμμετέχουν στην επαγωγή του HIF-1α [55]. Λίγα χρόνια αργότερα, αποδείχθηκε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται *in vivo* με αποτέλεσμα την αλλαγή στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του σε διάφορες κυτταρικές σειρές και ότι η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται από την p42/44 MAP κινάση, αλλά όχι από την p38 MAP κινάση ή την JNK [56]. Αν και υπάρχουν σερίνες στον HIF-1α που θα μπορούσαν να αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης από τις MAP κινάσες, μεταλλάξεις αυτών δε μείωσαν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι μια θρεονίνη στη θέση 796 του HIF-1α φωσφορυλιώνεται αυξάνοντας την αλληλεπίδραση με τον p300/CBP, αλλά η φωσφορυλίωση αυτή δε γίνεται από τις MAP κινάσες [57]. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α δε φαίνεται να σχετίζεται με τη σταθερότητα ή την ικανότητα πρόσδεσης του HIF-1 στο DNA, αλλά αυξάνει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α από την MAP κινάση δεν έχει σχέση με τη μεταγραφική του ενεργότητα, αλλά ότι το μονοπάτι των MAP κινασών σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση του συνενεργοποιητή p300 και την ισχυρότερη αλληλεπίδραση αυτού με την περιοχή ενεργοποίησης στο καρβοξυλικό άκρο του HIF-1α [58].

Υπάρχουν αναφορές ότι στην επαγωγή του HIF-1α συμμετέχει, εκτός από το μονοπάτι των MAP κινασών, το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3K). Αναστολή της PI3K ή της Akt οδηγεί σε αναστολή κάποιων εκ των επαγόμενων από την υποξία γονιδίων [59, 60], ενώ απενεργοποίηση του PTEN, που είναι αρνητικός ρυθμιστής της Akt οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του HIF-1α [61]. Μάλιστα, η Akt προτάθηκε ότι επάγει τη μετάφραση του HIF-1α και δε σχετίζεται με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος του μονοπατιού της PI3K / Akt στο μηχανισμό της επαγωγής του HIF-1α, καθώς και η σημασία του σε διάφορους τύπους κυττάρων, παραμένει αδιευκρίνιστος (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α από την υποξία και αυξητικούς παράγοντες. Ο HIF-1α επάγεται σε συνθήκες υποξίας σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον, τα μονοπάτια των MAP κινασών και της PI3K ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α [62].

1.3.3.3 Σουμοϋλίωση του HIF-1α

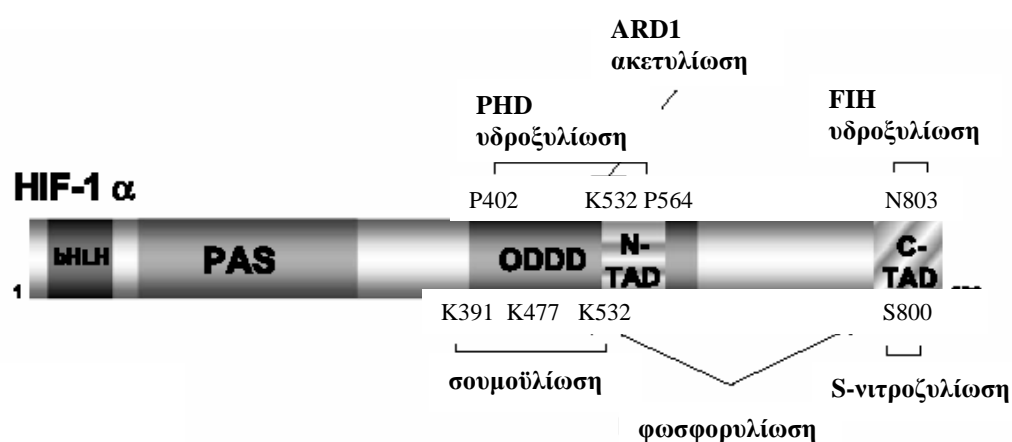
Εκτός από τη ουβικιτίνη υπάρχουν άλλα πολυπεπίδια που προσδένονται σε πρωτεΐνες και ρυθμίζουν τη λειτουργία τους και ένα από αυτά είναι το πολυπεπίδιο SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier). Η σουμοϋλίωση είναι μια διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες δεν οδηγούνται απαραίτητα για αποικοδόμηση, αλλά μπορεί να προστατεύονται από ουβικιτινίωση ή να επηρεάζεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους. Το SUMO είναι ένα μικρό πολυπεπίδιο (περίπου 12kDa) και η πρόσδεσή του σε μια πρωτεΐνη γίνεται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν την ουβικιτίνης.

Υπάρχουν πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να υποστούν τέτοια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, όπως οι p53, c-Myb, AP-1 και η τροποποίηση αυτή

φαίνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με αρνητική ρύθμιση της ενεργότητάς τους. Αρχικά δεδομένα δείχνουν ότι τέτοια τροποποίηση μπορεί να υποστεί και ο HIF-1α. Ο HIF-1α έχει 3 λυσίνες που μπορούν να τροποποιηθούν από το πολυπεπτίδιο SUMO στις θέσεις 391, 477 και 532. Ο πιθανός ρόλος της τροποποίησης αυτής είναι η καταστολή της ενεργοποίησης του HIF-1α [51].

1.3.3.4 S-νιτροζυλίωση του HIF-1α

Υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν την παρουσία NO με τη σταθεροποίηση του HIF-1α σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Οι Yasinska και Sumbayev έδειξαν ότι η νιτροζυλίωση ομάδων SH στον HIF-1α σχετίζεται με την ενεργοποίησή του και έδειξαν ότι η τροποποίηση αυτή γίνεται σε μια κυστείνη στη θέση 800. Η τροποποίηση αυτή γίνεται στην περιοχή ενεργοποίησης του HIF-1α από το NO, που προέρχεται από δωρητές ή από επαγωγή της συνθάσης του NO (iNOS). Η αύξηση της ενεργοποίησης του HIF-1α είναι αποτέλεσμα της ενίσχυσης στην αλληλεπίδραση αυτού με τον συνενεργοποιητή p300 [63].



Σχήμα 7: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α. Η περιοχή ODD ρυθμίζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης μέσω της υδροξυλίωσης των προλινών στις θέσεις 402 και 564 από τις PHDs και της ακετυλίωσης της λυσίνης 532 από την ARD1. Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης στην περιοχή που φαίνεται στο σχήμα και η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται ότι σχετίζεται με τη μεταγραφική ενεργοποίησή του. Η S-νιτροζυλίωση της κυστεΐνης στη θέση 800 ενισχύει την αλληλεπίδραση με το p300/CBP και αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α ρυθμίζεται αρνητικά από την υδροξυλίωση της ασπαραγίνης στη θέση 803 από την FIH-1 και τη σουμοϋλίωση στις λυσίνες 391, 477 και 532 [51].

Συμπερασματικά, ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη που μπορεί να υποστεί πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Σχήμα 7) και πιθανόν ίδια αμινοξέα να υπόκεινται σε διαφορετικές τροποποιήσεις, ανάλογα με το περιβάλλον, ρυθμίζοντας τη σταθερότητα, την αποικοδόμηση ή την ενεργότητά του.

1.3.4 Πυρηνικός εντοπισμός του HIF-1α και πρόσδεση στο DNA

Όταν ο HIF-1α σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας, μετακινείται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας τον HIF-1, ο οποίος προσδένεται στο DNA. Σε αντίθεση με τον HIF-1α, ο ARNT δε ρυθμίζεται από την υποξία και δεν είναι απαραίτητος για τη μετακίνηση του HIF-1α στον πυρήνα. Ο HIF-1α μετακινείται στον πυρήνα εξαιτίας ενός σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που διαθέτει, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη γνωστός [10]. Σε περίπτωση υπερέκφρασης του HIF-1α, η μετακίνηση στον πυρήνα γίνεται ακόμη και σε συνθήκες νορμοξίας [64], γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία αυτή δεν εξαρτάται από την υποξία και ίσως ο πυρηνικός εντοπισμός του HIF-1α να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο κύτταρο.

Ο HIF-1 που σχηματίζεται στον πυρήνα προσδένεται σε μια αλληλουχία πρόσδεσης (HBS, HIF-1 binding site) που βρίσκεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE, hypoxia response elements). Η αλληλουχία αυτή είναι (A/G)CGTG. Τα HRE βρίσκονται είτε στον υποκινητή είτε στον ενισχυτή των γονιδίων στόχων του HIF-1. Η αλληλουχία πρόσδεσης του HIF-1 περιέχει το δινοκλεοτίδιο CpG, το οποίο στις περισσότερες αλληλουχίες πρόσδεσης είναι σε περιοχές που δε μεθυλιώνονται, εκτός από την περίπτωση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO). Η αλληλουχία πρόσδεσης του HIF-1α είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του. Σε πολλές περιπτώσεις τα HRE περιέχουν πολλές αλληλουχίες πρόσδεσης του HIF-1 όσο και αλληλουχίες, στις οποίες προσδένονται άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες [65]. Για παράδειγμα, στο γονίδιο του VEGF υπάρχει αλληλουχία πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Activator protein-1), ενώ στο γονίδιο της EPO υπάρχει αλληλουχία πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα HNF-4 (orphan receptor hepatic nuclear factor-4) [66].

1.3.5 Ρύθμιση του HIF-1α από τα ROS

Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα ROS (reactive oxygen species) δημιουργούνται φυσιολογικά ως παραπροϊόντα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούν O_2 , του κυτοχρώματος P450, των οξειδασών των αμινοξέων, της οξειδάσης της γλυκόζης, των οξειδασών NADH/NADPH, της συνθάσης του NO [67]. Η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O_2 οδηγεί στην παραγωγή ριζών υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να οδηγήσουν στην παραγωγή άλλων ROS, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζες υδροξυλίου (OH^{\cdot}). Τα κύτταρα αμύνονται στην παραγωγή ROS με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση και αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η θειορεδοξίνη, η γλουταθειόνη και οι βιταμίνες E και C [68]. Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου προκαλείται οξειδωτικό stress, το οποίο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες ή τους πολυσακχαρίτες, απορύθμιση του πολλαπλασιασμού ή απόπτωση [69]. Από την άλλη, τα ROS μπορούν να δράσουν ως σήματα για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών, ιδιαίτερα μετά την επαγωγή τους από στρεσογόνες καταστάσεις, που οδηγούν σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης ή σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου ή επιβίωση [70].

Δυο από τα αρχικά μοντέλα που είχαν διατυπωθεί για το μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τη μείωση στα επίπεδα του οξυγόνου είχαν σχέση με την παραγωγή των ROS είτε από NAD(P)H οξειδάσες είτε από τα μιτοχόνδρια. Επειδή η παραγωγή των ROS απαιτεί οξυγόνο, έχει υποστηριχθεί ισχυρά η συμμετοχή τους στην απόκριση στην υποξία, αλλά ο ρόλος τους παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενος [71].

Το μοντέλο των NAD(P)H οξειδασών υποστηρίζει ότι τα ROS παράγονται συνεχώς από μια άγνωστη NAD(P)H οξειδάση, η οποία ανάγει το O_2 σε ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το οποίο οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 . Το μοντέλο αυτό υποστηρίζει ότι η μείωση στη συγκέντρωση του οξυγόνου οδηγεί σε μείωση στην παραγωγή των ROS, η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α και προβλέπει ότι αύξηση των ROS οδηγεί σε μείωση του HIF-1α. Πράγματι, αρχικά πειράματα είχαν δείξει ότι η προσθήκη εξωγενών οξειδωτικών μείωνε την έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-1, όπως της ερυθροποιητίνης [72] και διατυπώθηκε η υπόθεση ότι και ο HIF-1 επηρεάζεται από την οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι κατεργασία με H_2O_2 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρόσδεσης του HIF-1 στο DNA [73] και προσθήκη H_2O_2 σε συνθήκες υποξίας είχε ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του HIF-1α σε κύτταρα Hep3B [74] και του HIF-2α σε κύτταρα HeLa [75]. Ωστόσο, κατεργασία με DPI (diphenylene iodonium), που είναι αναστολέας της παραγωγής των ROS από NAD(P)H οξειδάσες, αναστέλλει την επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1, ενώ αναμενόταν το αντίθετο [76].

Το μοντέλο των μιτοχονδρίων υποστηρίζει ότι η υποξία σταθεροποιεί τον HIF-1α επειδή αυξάνει τα επίπεδα των ROS. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, σε συνθήκες υποξίας, η κατανάλωση του οξυγόνου από την αναπνευστική αλυσίδα μειώνεται και έτσι εμποδίζεται η μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγώντας στην παραγωγή ROS. Πράγματι, αναστολείς των συμπλόκων I και III της αναπνευστικής αλυσίδας σε κύτταρα Hep3B και HeLa ανέστειλαν την επαγωγή του HIF-1α, εξαιτίας αναστολής της παραγωγής ROS [77, 78]. Επιπρόσθετα, σε κύτταρα που στερούνται μιτοχονδρίων, η υποξία απέτυχε να αυξήσει την παραγωγή των ROS και την έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF-1 [79]. Ωστόσο, αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας δείχθηκε ότι οδηγεί σε αυξημένη διαθεσιμότητα του οξυγόνου στο κυτταρόπλασμα και αποσταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [80]. Επιπλέον, σε μια άλλη σειρά πειραμάτων βρέθηκε ότι υπερέκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) και επομένως αύξηση της παραγωγής H_2O_2 οδήγησε σε εξαρτώμενη από τον HIF-1α επαγωγή του VEGF [81]. Παρομοίως, γενετική έλλειψη της JunD, που προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικά, όπως το H_2O_2 , βρέθηκε ότι σταθεροποιεί τον HIF-1α, γεγονός που αποδόθηκε σε απενεργοποίηση των PHDs λόγω οξείδωσης του Fe^{2+} σε ανενεργό Fe^{3+} [82]. Εντούτοις, πολλά εργαστήρια απέδειξαν τη μείωση των ROS σε συνθήκες υποξίας σε ηπατοκύτταρα ή στον πνεύμονα [83, 84].

Συμπερασματικά, η μεταβολή στα επίπεδα των ROS σχετίζεται με την απόκριση στην υποξία μέσω του HIF-1α. Ωστόσο, η πηγή των ROS, οι συνθήκες παραγωγής τους και η σχέση τους με την ενεργοποίηση του HIF-1α δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί.

1.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΝΟΡΜΟΞΙΑΣ

Εκτός της υποξίας, έχουν βρεθεί ουσίες που επάγουν τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Οι επαγωγείς αυτοί μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις που θεωρούνται «μιμητές της υποξίας», όπως είναι η δεσφερριοξαμίνη ή το κοβάλτιο, οι οποίες σταθεροποιούν τον HIF-1α από την αποικοδόμηση παρουσία O₂. Εκτός από τους «μιμητές της υποξίας» υπάρχει μια κατηγορία ενώσεων που περιλαμβάνει βιολογικά σημαντικά μόρια, όπως είναι οι κυτοκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες, ορισμένα ογκογονίδια και ορμόνες, που έχειδειχθεί ότι επάγουν τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν σταθεροποίηση, αυξημένη μεταγραφή ή μετάφραση [62, 65]. Τέλος, πρόσφατα βρέθηκε ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να επάγουν τον HIF-1α, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπό τους, την κερκετίνη, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός επαγωγής.

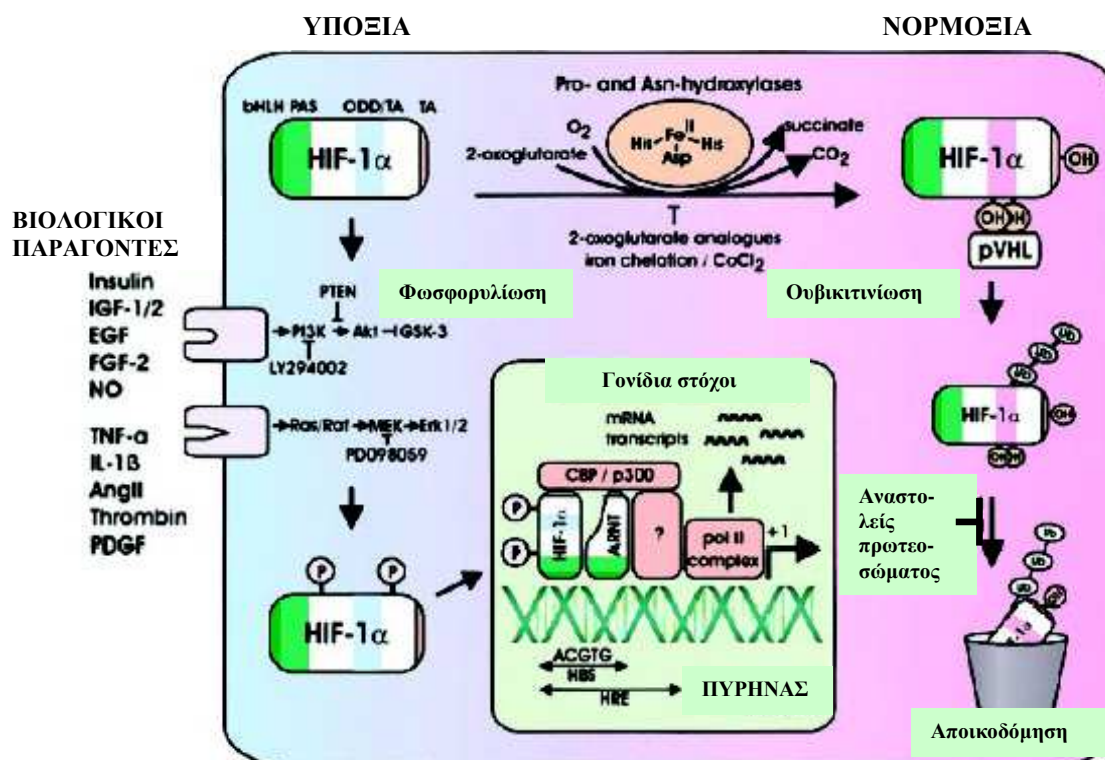
1.4.1 Επαγωγή του HIF-1α από «μιμητές της υποξίας»

Η δεσφερριοξαμίνη είναι μια ένωση με ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου και ήταν από τις πρώτες ενώσεις που βρέθηκε ότι επάγουν τον HIF-1α. Αντίστοιχα, μέταλλα, όπως είναι το κοβάλτιο και το νικέλιο βρέθηκε ότι σταθεροποιούν τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Αρχικά, η δράση αυτή επιβεβαίωνε την υπόθεση ότι ο «αισθητήρας οξυγόνου», δηλαδή το μόριο που αντιλαμβάνεται τις αλλαγές στις συγκεντρώσεις οξυγόνου είναι μια αιμοπρωτεΐνη, οπότε ο HIF-1α επάγεται είτε εξαιτίας συμπλοκοποίησης του σιδήρου της αιμοπρωτεΐνης από τη δεσφερριοξαμίνη [85] είτε εξαιτίας αντικατάστασης του σιδήρου στο μόριο της αιμοπρωτεΐνης από το κοβάλτιο [86]. Ωστόσο, σήμερα, η δράση αυτών των ενώσεων φαίνεται να εξηγείται από την εξάρτηση των PHDs και της FIH-1 από το σίδηρο. Τουλάχιστον για τη δεσφερριοξαμίνη είναι σχεδόν βέβαιο ότι η δράση της στηρίζεται στη συμπλοκοποίηση του σιδήρου που είναι απαραίτητος για τη δράση των PHDs [11]. Αντίθετα, για το κοβάλτιο έχουν προταθεί ποικίλοι μηχανισμοί δράσης και επομένως ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητός. Αρχικά, με *in vitro* μελέτες αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο αναστέλλει τη δραστηριότητα ανασυνδυασμένων PHDs οπότε διατυπώθηκε η υπόθεση ότι το κοβάλτιο αντικαθιστά το σίδηρο στο κέντρο πρόσδεσης του σιδήρου στις PHDs [87].

Πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο μπορεί να ενωθεί απευθείας με τον HIF-1α και να εμποδίσει με τον τρόπο αυτό την αποικοδόμησή του [88]. Στη συγκεκριμένη εργασία, με *in vitro* μελέτες αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο προσδένεται απευθείας στην ODD περιοχή της HIF-α πρωτεΐνης εμποδίζοντας την υδροξυλίωση και την αλληλεπίδρασή του με τον VHL. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το κοβάλτιο εμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω πρόσδεσής του στην κουλίνη 2 [89]. Η κουλίνη 2 είναι συστατικό του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, που οδηγεί τον HIF-1α προς αποικοδόμηση. Το κοβάλτιο έχει την ικανότητα να ενώνεται μόνο με αυτό το συστατικό του συμπλόκου, αναστέλλοντας τη δράση του χωρίς να επηρεάζει το σχηματισμό του. Σε επόμενη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο εμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α με ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τον VHL [90]. Η δράση του κοβαλτίου έχει αποδοθεί και στην ικανότητά του να μειώνει το ασκορβικό οξύ που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του σιδήρου των PHDs στην ενεργή Fe^{2+} μορφή του [91, 40]. Έχει προταθεί ότι κατά την ενζυμική αντίδραση της υδροξυλίωσης ο σίδηρος που είναι συνδεδεμένος στις PHDs στη δισθενή του μορφή μετατρέπεται σε τρισθενή σίδηρο, οδηγώντας σε απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο ρόλος του ασκορβικού οξέος είναι να διατηρεί το σίδηρο στη δισθενή μορφή. Το κοβάλτιο οξειδώνει το ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα να απενεργοποιούνται οι PHDs επειδή δεν ανάγεται ο Fe^{3+} σε Fe^{2+} [40]. Τέλος, έχειδειχθεί ότι το κοβάλτιο συμμετέχει στο σχηματισμό ROS και η επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο εξαρτάται από τα ROS [92, 93] και από το μονοπάτι της PI3K [78, 93].

1.4.2 Επαγωγή του HIF-1α από βιολογικά σημαντικά μόρια

Εκτός από τις χημικές ενώσεις που θεωρούνται ότι μιμούνται την υποξία στη σταθεροποίηση του HIF-1α, πολλοί βιολογικοί παράγοντες, όπως κυτοκίνες, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια [65], έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Συνήθως, η επαγωγή αυτή σχετίζεται με μηνύματα που αυξάνουν τη μεταγραφή ή τη μετάφραση του HIF-1α ή επηρεάζουν τη σταθεροποίηση ή τη μεταγραφική του ενεργότητα. Οι περισσότεροι από τους παραπάνω παράγοντες αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α μέσω μονοπατιών κινασών (Σχήμα 6), που σχετίζονται με ειδικούς για κάθε κύτταρο υποδοχείς, χωρίς όμως ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α να είναι απόλυτα κατανοητός (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις PHDs και οδηγείται στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση. Σε συνθήκες υποξίας, ή παρουσία δεσφερριζαμίνης ή κοβαλτίου, ο HIF-1α σταθεροποιείται, μετακινείται στον πυρήνα, συμπλοκοποιείται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες αυξάνουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω του μονοπατιού της PI3K ή προκαλούν τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών [65].

Πολλοί αυξητικοί παράγοντες, όπως η ινσουλίνη, ο IGF-1 και IGF-2, ο EGF, ο PDGF και κάποιες κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1 επάγουν τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας μέσω του μονοπατιού της PI3K / Akt λόγω αυξημένης πρωτεϊνοσύνθεσης [94-96]. Η επαγωγή του HIF-1α από ορμόνες, όπως η αγγειοτενσίνη ή από τη θρομβίνη γίνεται μέσω διαφόρων μονοπατιών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), που οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή και μετάφραση ή το σχηματισμό ROS και της PI3K [97-99]. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, ο ρόλος των ROS στην επαγωγή του HIF-1α είναι αμφιλεγόμενος [68-71]. Είναι, επίσης, σημαντικό να αναφερθεί πως οι αυξητικοί παράγοντες και οι ορμόνες οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α με φωσφορύλιωση μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών [100].

Ενεργοποίηση ορισμένων ογκογονιδίων, όπως το ras [101] και το src [102, 103] ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το PTEN και ο VHL έχουν εμπλακεί στην επαγωγή του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Η επαγωγή του HIF-1α στις περιπτώσεις αυτές σχετίζεται με την αύξηση της σύνθεσης και της ενεργότητάς του στην περίπτωση των ras, src και PTEN, αλλά και με τη μείωση της αποικοδόμησής του στην περίπτωση του VHL [25].

1.4.3 Επαγωγή του HIF-1α από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO)

Το NO και το CO, δυο βιολογικά σημαντικά μόρια, που ενέχονται στη μεταγωγή μηνυμάτων, επίσης επηρεάζουν την έκφραση του HIF-1α. Ο HIF-1 επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της συνθάσης του NO. Από την άλλη, το NO έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη σταθεροποίηση και την ενεργότητα του HIF-1α, αλλά η επίδραση αυτή δεν είναι ξεκάθαρη. Αρχικές μελέτες είχαν δείξει ότι το NO αναστέλλει την σταθεροποίηση και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [104]. Αργότερα, βρέθηκε ότι δωρητές NO ή NO που παράγεται ενδογενώς σε συνθήκες νορμοξίας σταθεροποιούν τον HIF-1α και ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-1 [105-107]. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η επαγωγή του HIF-1α από το NO σε συνθήκες νορμοξίας γίνεται μέσω αναστολής των PHDs από το NO [108] και ότι το NO αναστέλλει τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, επειδή αναστέλλεται η αναπνευστική αλυσίδα, οπότε αυξάνονται τα επίπεδα O₂ στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται οι PHDs [78]. Το NO έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δισθενή σίδηρο, οπότε θα μπορούσε να αναστέλλει τη δραστηριότητα των PHDs μέσω ανταγωνισμού για την πρόσδεση του μοριακού οξυγόνου στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν εξηγεί την αναστολή του HIF-1α από το NO σε συνθήκες υποξίας. Πιθανόν, η ποικιλία των αποκρίσεων να οφείλεται στους διαφορετικούς δωρητές NO που χρησιμοποιούνται πειραματικά και την αλληλεπίδραση του NO με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Αρχικά είχε αναφερθεί ότι το CO, σε υψηλές συγκεντρώσεις, αναστέλλει την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1α και τη μεταγραφική του ενεργότητα [104]. Ωστόσο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις το CO βρέθηκε ότι επάγει την έκφραση του VEGF [11]. Είναι πιθανό το CO, ως αναστολέας του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, να οδηγεί σε αύξηση των ROS και επομένως σταθεροποίηση του HIF-1α. Πιθανόν, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του

CO, όπως και στην περίπτωση του NO να σχετίζονται με διαφορετικές αποκρίσεις των κυττάρων.

1.4.4 Επαγωγή του HIF-1α από φλαβονοειδή

Πριν από λίγα χρόνια αναφέρθηκε η επαγωγή του HIF-1α από το φλαβονοειδές κερκετίνη, αλλά ο μηχανισμός της επαγωγής από αυτήν δεν έχει μελετηθεί [109]. Τα φλαβονοειδή είναι φυτικές πολυφαινόλες που περιλαμβάνονται στη διατροφή μας. Οι κύριες πηγές τους είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το κόκκινο κρασί και το τσάι. Η πρόσληψη φλαβονοειδών έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιοπάθειας και πιθανόν καρκίνου [110]. Στα φλαβονοειδή έχουν αποδοθεί ποικίλα χαρακτηριστικά, όπως αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, ικανότητα συμπλοκοποίησης μετάλλων, αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων, καθώς επίσης αναστολή της ανάπτυξης πολλών νεοπλασματικών κυττάρων [111, 112]. Έχει, επίσης, αναφερθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις η κερκετίνη είναι ειδικός αναστολέας κινασών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3K) [113], της κινάσης της κασεΐνης II [110, 114] και της κινάσης c-Jun N-terminal (JNK) [115]. Τέλος, η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει ειδικά την F1H-1, παρουσία περίσσειας σιδήρου, επηρεάζοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α [116]. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό αν η αντιοξειδωτική ικανότητα ή η ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου της κερκετίνης ευθύνεται για την επαγωγή του HIF-1α.

Επιπλέον, μια ακόμη ένωση της οικογένειας των πολυφαινολών, η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin gallate), αναφέρθηκε πρόσφατα ότι επάγει τον HIF-1α μέσω συμπλοκοποίησης του σιδήρου και αναστολής των PHDs [117, 118].

1.5 ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Ο ρόλος του HIF-1α στην απόκριση των κυττάρων σε μειωμένες συνθήκες οξυγόνου είναι η προσαρμογή των κυττάρων μέσω ποικίλων μηχανισμών. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς προάγουν την κυτταρική επιβίωση σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αν και ο ρόλος του HIF-1α έχει μελετηθεί εκτενώς, δεν είναι ξεκάθαρο από τη βιβλιογραφία αν ο HIF-1α συμμετέχει και με ποιον τρόπο στην απόπτωση των κυττάρων.

1.5.1 Σχέση του HIF-1α με την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε, η επαγωγή των γλυκολυτικών ενζύμων από τον HIF-1α αυξάνει την αναερόβια παραγωγή γλυκόζης, προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων σε μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η υποξία επάγει, επίσης, μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας (TGFβ) και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) [37]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα της PI3K αυξάνεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους σε συνθήκες υποξίας [119]. Η PI3K αυξάνει την κυτταρική επιβίωση, συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και την αναστολή της απόπτωσης. Το μονοπάτι της PI3K αναστέλλεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN, μεταλλάξεις του οποίου προάγουν τις αποκρίσεις που ρυθμίζονται από τον HIF-1α [120]. Το PTEN ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και λείπει ή είναι μεταλλαγμένο σε πολλούς καρκινικούς τύπους. Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υποξία επάγει τον VEGF και έναν από τους υποδοχείς του, τον VEGFR1, προάγοντας την αγγειογένεση και επομένως την παροχή θρεπτικών υλών και οξυγόνου στα κύτταρα.

1.5.2 Σχέση του HIF-1α με την απόπτωση

Τα κύτταρα που εκθέτονται σε έντονο ή παρατεταμένο περιβαλλοντικό στρες υφίστανται απόπτωση. Η απόπτωση θεωρείται ότι είναι αυστηρά προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και ενεργοποιείται είτε μέσω σύνδεσης ειδικών σηματοδοτικών μορίων σε μεμβρανικούς υποδοχείς (εξωτερική οδός) είτε μέσω των διαταραχών του ηλεκτροχημικού δυναμικού των μιτοχονδρίων (εσωτερική οδός). Τα χαρακτηριστικά της περιλαμβάνουν αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη, συμπύκνωση της χρωματίνης, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων και κατάτμηση του DNA. Η απόπτωση διακρίνεται από τη νέκρωση, γιατί είναι μια διαδικασία εξαρτώμενη από την ενέργεια και ρυθμίζεται από έναν αριθμό πρωτεολυτικών ενζύμων, που ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες αποτελούν τα εκτελεστικά μόρια της απόπτωσης και βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα σε πρόδρομη μορφή. Έπειτα από διάσπαση, οι κασπάσες ενεργοποιούνται και ρυθμίζουν την απόπτωση [121].

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε απόπτωση ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από διάφορους παράγοντες και η ισορροπία μεταξύ αυτών των παραγόντων καθορίζει αν το κύτταρο θα αποπέσει ή θα επιβιώσει. Οι πρωτεΐνες που παίζουν αντι-

αποπτωτικό ρόλο περιλαμβάνουν την Bcl-2 και την Bcl-xL, ενώ αυτές που παίζουν προ-αποπτωτικό ρόλο περιλαμβάνουν τις Bax, Bad, Bak και Bid.

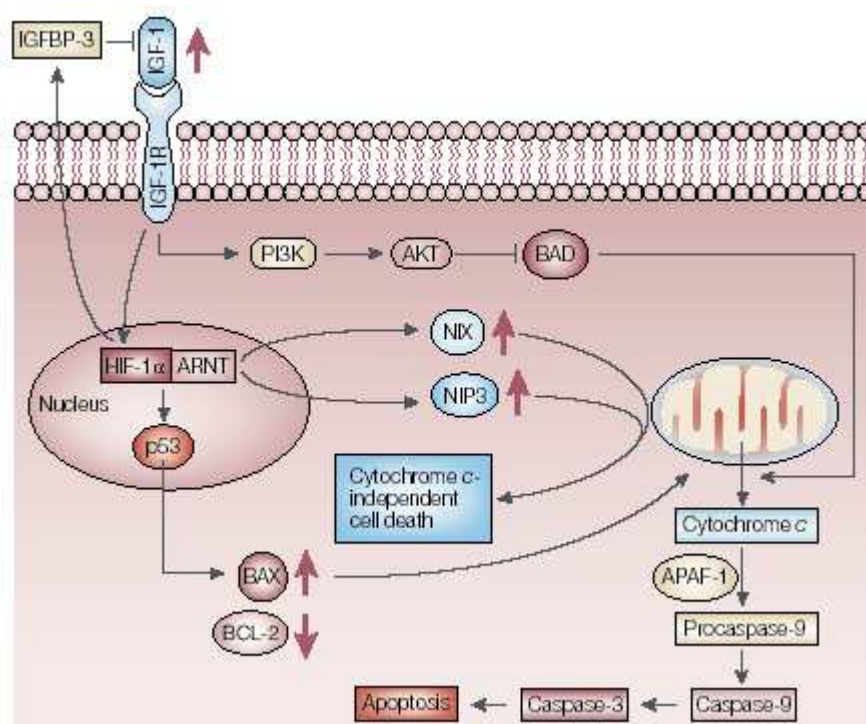
Ο HIF-1α μπορεί να επάγει την απόπτωση μέσω δυο μονοπατιών. Από τη μια πλευρά, ο HIF-1α σταθεροποιεί το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με αυτό και επομένως συμμετέχει στην απόπτωση που εξαρτάται από αυτό [122, 123]. Σε περίπτωση περιβαλλοντικού στρες ή καταστροφής του DNA, το p53 μπορεί να οδηγήσει σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ρυθμίζοντας πρωτεΐνες όπως το Bax, το οποίο οδηγεί σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια ή να προκαλέσει σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου μέσω του p21 [121]. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τη λιγάση της ουβικιτίνης του p53, την mdm2, η οποία οδηγεί τον HIF-1α σε ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση στο κυτταρόπλασμα με έναν μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τον VHL [39, 124]. Μάλιστα, ο Chen και οι συνεργάτες του [124] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την mdm2 είναι ισχυρότερη από αυτή του p53 με την mdm2. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ του HIF-1α, του p53 και της απόπτωσης πρέπει να διαλευκανθεί, γιατί οι περισσότερες μελέτες που έδειξαν απόπτωση μέσω του p53 σε υποξικές συνθήκες, στις περισσότερες περιπτώσεις είχαν εκτελεστεί σε σχεδόν ανοξικές συνθήκες. Ενώ ο HIF-1α αυξάνεται ιδιαίτερα σε ήπια υποξία (1-2% O₂), το p53 δε συσσωρεύεται εκτός και αν υπάρχει έντονη υποξία ή ανοξία (< 0,2% O₂) [125].

Από την άλλη, ο HIF-1α επάγει τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3) και η NIX. Η υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με αναστολή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL και έναρξη της απόπτωσης [121].

Ο HIF-1α μπορεί, επίσης, να εμποδίσει την απόπτωση που προκαλείται από διάφορους παράγοντες, όπως η στέρηση ορού [126, 127] και αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η ταξόλη [128]. Επιπλέον, δεδομένα δείχνουν ότι ο HIF-1α εκφράζεται συνεχώς σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα και τα προστατεύει από απόπτωση προκαλούμενη από την υποξία ή στέρηση γλυκόζης [129, 130].

Συμπερασματικά, παρόλο που ο HIF-1α βοηθάει στην προσαρμογή των κυττάρων με σκοπό την επιβίωσή τους σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, μπορεί να συμμετέχει με κάποιον τρόπο στην προκαλούμενη από την υποξία απόπτωση. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, την ένταση της υποξίας και τη συνεργασία άλλων

παραγόντων, ο HIF-1α μπορεί να οδηγεί σε απόπτωση ή να λειτουργεί ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας [131] (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Σχέση του HIF-1 με την απόπτωση. Ο HIF-1 ενεργοποιεί πολλά προ-αποπτωτικά γονίδια, κάποια από τα οποία φαίνονται στο σχήμα. Ο HIF-1 αλληλεπιδρά με το p53 και οδηγεί σε απόπτωση εξαρτώμενη από το p53. Το p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η Bax, που δρα στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα c (cytochrome c). Το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με τον παράγοντα που ενεργοποιεί τις πρωτεάσες (Apaf-1, protease activating factor-1) ενεργοποιώντας διαδοχικά την κασπάση 9 και την κασπάση 3 και οδηγώντας σε απόπτωση. Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, η οποία αναστέλλεται από την κινάση Akt, δρα με παρόμοιο τρόπο στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ο HIF-1 επάγει, επίσης, τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες NIP3 και NIX και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω ενός μονοπατιού που δεν περιλαμβάνει τη δράση κασπασών. Σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, έχει βρεθεί ότι η υποξία καταστέλλει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 [37].

1.6 HIF-1α ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Η υποξία είναι χαρακτηριστικό σε οξείες και χρόνιες αγγειοπάθειες, πνευμονοπάθειες και καρκίνους, κύριες ασθένειες του δυτικού κόσμου. Η ρύθμιση της απόκρισης στην υποξία και της δράσης του HIF-1α αποτελούν, επομένως, αντικείμενο έντονου βιοϊατρικού ενδιαφέροντος. Η υποξία και ο ρόλος του HIF-1α έχουν μελετηθεί εκτενώς σε περιπτώσεις καρκίνων με σκοπό την ανεύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και αντικαρκινικών φαρμάκων.

1.6.1 HIF-1α και καρκίνος

Η υποξία είναι ένα κοινό φαινόμενο σε συμπαγείς όγκους. Υποξικές συνθήκες δημιουργούνται σε περιοχές του όγκου όπου σχηματίζονται ατελή αγγεία και δεν υπάρχει επαρκής ροή αίματος και επομένως επηρεάζουν έναν πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων [37]. Αν και η παρατεταμένη υποξία είναι τοξική τόσο για τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά κύτταρα, κάποια καρκινικά κύτταρα υφίστανται γενετικές αλλαγές που τα βοηθούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες υποξίας, αποφεύγοντας τη νέκρωση ή την απόπτωση. Η προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία περιλαμβάνει αυξημένη σύνθεση αγγειογενετικών παραγόντων με σκοπό την επαρκή μεταφορά οξυγόνου, προαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού με σκοπό την παραγωγή ενέργειας και ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών παραγόντων ώστε να επιβιώσουν στις αντίξοες συνθήκες [132]. Παρατηρείται, επίσης, αυξημένη γενετική αστάθεια και δράση της τελομεράσης. Οι παραπάνω διαδικασίες οδηγούν σε κακοήγη φαινότυπο και επιθετική καρκινική συμπεριφορά, καθώς επίσης σε αντίσταση των κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία. Ποικίλες μελέτες έδειξαν ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου στο εσωτερικό των όγκων σχετίζονται με αυξημένη μετάσταση και κακή διάγνωση σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου [37].

Η προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία θεωρείται ότι γίνεται με τη συμμετοχή του HIF-1α, ο οποίος αυξάνει την αγγειογένεση και το ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες βρέθηκε ότι ο HIF-1α υπερεκφράζεται σε μια ποικιλία καρκινικών κυττάρων (καρκίνο του δέρματος, του προστάτη, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, των νεφρών) ως αποτέλεσμα της χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στο εσωτερικό των όγκων και των γενετικών αλλαγών των κυττάρων αυτών, οι οποίες συχνά χαρακτηρίζονται από

ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που προάγουν την επαγωγή του HIF-1α [133]. Πράγματι, με μελέτες ανοσοφθορισμού βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα πολλών καρκινικών κυττάρων [134].

Η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με αυξημένη επιθετική συμπεριφορά και θνησιμότητα σε πρώιμα στάδια καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σε ορισμένους τύπους καρκίνου του στήθους. Σε καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του στοματοφάρυγγα, οι ασθενείς με υπερέκφραση του HIF-1α έχουν υψηλό κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας με ακτινοβολία. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει στην περίπτωση ασθενών με καρκίνο του οισοφάγου και ολιγοδενδρογλοίωμα. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Στην περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών, η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το αγρίου τύπου p53, ενώ δεν ισχύει το ίδιο σε κύτταρα που εκφράζουν το μεταλλαγμένο p53. Κάτι ανάλογο ισχύει και στην περίπτωση ενός τύπου καρκίνου των πνευμόνων, όπου τα κύτταρα αποπίπτουν και οι ασθενείς επιβιώνουν. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την προ-αποπτωτική δράση που βρέθηκε να εμφανίζει ο HIF-1α σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES) που υπόκεινται σε υποξία ή στέρηση γλυκόζης [132].

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η αντίσταση ορισμένων τύπων καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία θα μπορούσε να οφείλεται μερικώς στον HIF-1α. Εντούτοις, ο ακριβής ρόλος του εξαρτάται από τον καρκινικό τύπο και τη συνεργασία του με άλλους παράγοντες, όπως το p53 ή το Bcl2, που μπορεί να οδηγήσουν μια ομάδα ασθενών σε γρήγορη εξέλιξη του καρκίνου και μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης.

1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο

Τα δεδομένα για το ρόλο του HIF-1α στην εξέλιξη του καρκίνου οδηγούν σε ποικίλες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η ενεργοποίηση του HIF-1α έχει αναφερθεί σε πολλούς καρκινικούς τύπους κάνοντας το σύστημα του HIF-1α έναν ενδιαφέροντα στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Εκτός από τους παράγοντες που αναστέλλουν την αγγειόγερση και χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα, πολλές γενετικές προσεγγίσεις και νέοι θεραπευτικοί παράγοντες που στοχεύουν στην αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών και πιθανόν αναστολή του HIF-1α δοκιμάζονται κλινικά.

Μια προσέγγιση για να επιτευχθεί αναστολή της απόκρισης στην υποξία των καρκινικών κυττάρων είναι η στόχευση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με το CBP. Η υπερέκφραση πεπτιδίων που κωδικοποιούν για την περιοχή C-TAD του HIF-1α στην οποία προσδένεται ο CBP ανέστειλε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και την ανάπτυξη όγκων [135].

Οι γενετικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι η χρήση αντινοσηματικού HIF-1α ή μορίων που αποτελούν επικρατείς αρνητικές ισομορφές του mRNA του HIF-1α αναστέλλουν την επαγωγή του HIF-1α και της αγγειογένεσης σε διάφορους τύπους καρκίνου [136]. Επιπλέον, ο IPAS (Inhibitory PAS domain protein), που είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α, λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α και -2α [20].

Πολλές προσεγγίσεις δοκιμάζονται που στοχεύουν στη χημική ρύθμιση των μονοπατιών που ενεργοποιούν τον HIF-1α. Για παράδειγμα, ο αναστολέας της Hsp90, γκελνταναμυκίνη (GA) οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα προστάτη [137]. Η Hsp90 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση με έναν μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τον VHL [138]. Ένας άλλος αναστολέας της Hsp90, η ραδισκώλη έχει μεγαλύτερη επίδραση στην ενεργότητα του HIF-1α από τη σταθερότητα της ίδιας της πρωτεΐνης [139]. Επιπλέον, φαρμακολογικοί παράγοντες που αναστέλλουν τα ογκογονίδια *ras* και *src*, τα οποία ενεργοποιούν τον HIF-1α, θα μπορούσαν να έχουν αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας τον HIF-1. Αντίστοιχα, υπερέκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων VHL, PTEN, p53 θα μπορούσε να έχει αντικαρκινική δράση [136].

Η αναζήτηση μικρών μορίων που αποτελούν αναστολείς του HIF-1α και της αγγειογένεσης είναι σε εξέλιξη. Τα πρώτα δεδομένα δείχνουν ότι αναστολείς του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων [140] ή της τοποϊσομεράσης I, όπως η καμπτοτεκίνη (Camptothecin) και η τοποτεκάνη (Topotecan, TPT) εμποδίζουν την έκφραση και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α μέσω ενός αδιευκρίνιστου μέχρι στιγμής μηχανισμού [141]. Οι αναστολείς αυτοί σχετίζονται με σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι το YC-1 [3-(50-hydroxymethyl-20-furyl)-1-benzyl indazole] αναστέλλει την έκφραση του HIF-1α και των γονιδίων στόχων του και εμποδίζει την αγγειογένεση και ανάπτυξη 5 τύπων καρκινικών κυττάρων [142].

Η ανακάλυψη των PHDs και της FIH αποκάλυψε νέους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Ο HIF-1α υπερεκφράζεται σε μια ποικιλία καρκινικών κυττάρων, οπότε η αύξηση της αποικοδόμησής του με ενεργοποίηση των PHDs θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί μόνο μια ουσία που προκαλεί ενεργοποίηση των PHDs, η κυκλοσπορίνη Α (CsA) [143]. Από την άλλη, η προσθήκη ουσιών που αποτελούν συμπαράγοντες των PHDs, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και ο σίδηρος αναστέλλουν την επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1α [91].

Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η νέα τάξη αντικαρκινικών παραγόντων που στοχεύουν στον HIF-1α μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις καρκίνων όπου ο HIF-1α υπερεκφράζεται και να βοηθήσουν στη θεραπεία πολλών καρκίνων.

1.6.3 HIF-1α και αγγειοπάθειες

Η υποξία αποτελεί χαρακτηριστικό της μυοκαρδιακής θρόμβωσης και της ισχαιμίας, επάγοντας μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. Ο HIF-1 είναι ο κύριος ρυθμιστής της απόκρισης έπειτα από ισχαιμία [144]. Προφανώς, η επαγωγή του HIF-1α προάγει την αγγειογένεση μέσω επαγωγής του VEGF και βοηθάει στην προσαρμογή του μυοκαρδίου στην ισχαιμία. Έχει αναφερθεί αύξηση της συγκέντρωσης του mRNA του HIF-1α μέχρι 120 ώρες μετά το θρομβωτικό επεισόδιο και 48 ώρες μετά την ισχαιμία [145], ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε έκφραση του HIF-1α πολύ αργότερα από το θρομβωτικό επεισόδιο [146]. Ο ρόλος του HIF-1α στην ισχαιμία οδηγεί σε πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις, που περιλαμβάνουν αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητάς του με σκοπό την επαγωγή των γονιδίων στόχων (π.χ του VEGF) [147].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προκύπτει από όσα αναφέρθηκαν στην Εισαγωγή, ο μηχανισμός της επαγωγής του HIF-1α από ορισμένους επαγωγείς δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η ρύθμιση της επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α από διάφορα είδη υποξικού στρες και να συσχετιστεί η έκφραση του HIF-1α με την επιβίωση και πολλαπλασιασμό σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές. Πιο αναλυτικά, οι στόχοι ήταν:

- 1) Η σύγκριση της ρύθμισης της έκφρασης του HIF-1α από την υποξία και επιλεγμένους «μιμητές της υποξίας» και βιολογικούς παράγοντες και συγκεκριμένα:
 - α) ο προσδιορισμός του μηχανισμού επαγωγής του HIF-1α από το χλωριούχο κοβάλτιο και το φλαβονοειδές κερκετίνη, η δράση των οποίων είναι αδιευκρίνιστη και η σύγκριση με την επαγωγή του HIF-1α από την υποξία και τη δεσφερριοξαμίνη, η δράση των οποίων είναι γνωστή
 - β) η μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 με την έκφραση των γονιδίων αναφοράς κάτω από τις παραπάνω συνθήκες υποξικού στρες
- 2) Η διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας και των προαναφερθέντων επιλεγμένων «μιμητών της υποξίας» και βιολογικών παραγόντων στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και απόπτωση
- 3) Ο προσδιορισμός της επίδρασης του σιδήρου στην έκφραση του HIF-1α και στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες υποξικού στρες
- 4) Ο συσχετισμός της έκφρασης του HIF-1α και της επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων που καλλιεργούνται απουσία ή παρουσία σιδήρου, σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης, κοβαλτίου ή κερκετίνης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία είναι: HeLa και HepG2, τα οποία προέρχονται από την ATCC (American Type Culture Collection).

Τα HeLa είναι επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου τραχηλικού καρκινώματος. Τα HeLa διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, High Glucose, 1mM sodium pyruvate) (Gibco BRL), στο οποίο προστίθεται 2mM L-γλουταμίνη (L-glutamine) (Biochrom KG Seromed), 10% fetal bovine serum (FBS) (Biochrom KG Seromed) και μίγμα αντιβιοτικών (antibiotic-antimycotic solution) (Gibco BRL). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες ή αποστειρωμένα πιάτα (Greiner) σε έναν επωαστήρα (Forma Scientific Inc) σε θερμοκρασία 37°C και ατμοσφαιρικό αέρα - 5% CO₂. Τα κύτταρα HeLa διπλασιάζονται περίπου κάθε 18 ώρες, οπότε σε ένα πιάτο 10cm² τοποθετούνται 3x10⁶ κύτταρα και αφήνονται για 2-3 μέρες ώσπου να καλύψουν τον πάτο του πιάτου και έπειτα μοιράζονται σε νέα πιάτα. Προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από την επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό, γίνεται πλύση των κυττάρων με 1x PBS χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom KG Seromed) και προστίθεται διάλυμα τρυψίνης (Trypsin 0,25%, 1mM EDTA) (Gibco BRL) ώστε να καλύψει τον πάτο του πιάτου. Το πιάτο αφήνεται για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C, προστίθεται θρεπτικό υλικό, ώστε να σταματήσει η δράση της τρυψίνης και τα κύτταρα μοιράζονται σε νέα πιάτα. Τα κύτταρα δεν πρέπει να υπόκεινται σε πολλά περάσματα με τρυψίνη, γι' αυτό και μετά από 10 περάσματα θα πρέπει να καταψύχονται αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για πείραμα .

Τα HepG2 είναι επιθηλιακά κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Τα HepG2 διατηρούνται στο ίδιο θρεπτικό υλικό με τα HeLa και καλλιεργούνται στις ίδιες συνθήκες. Επειδή τα κύτταρα HepG2 διπλασιάζονται περίπου κάθε 24 ώρες σε ένα πιάτο 10cm² τοποθετούνται 3x10⁶ κύτταρα και αφήνονται για 3-4 μέρες ώσπου να καλύψουν τον πάτο του πιάτου και έπειτα μοιράζονται σε νέα πιάτα [148, 149].

2.1.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

Σε περίπτωση που χρειάζεται κύτταρα να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν να χρησιμοποιηθούν, αυτά καταψύχονται είτε στους -80°C είτε σε υγρό άζωτο. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης (όπως περιγράφηκε παραπάνω) και συλλέγονται με θρεπτικό υλικό σε σωληνάριο. Ακολουθεί μια φυγοκέντρωση των κυττάρων στα 20xg, για 10 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό με 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Τα κύτταρα μοιράζονται σε ειδικά φιαλίδια και τοποθετούνται στους -80°C για 24 ώρες και μετά σε υγρό άζωτο.

Ενώ η επιβίωση μεγαλύτερου ποσοστού κυττάρων επιτυγχάνεται με τη σταδιακή κατάψυξη, η απόψυξη των κυττάρων είναι μια γρήγορη διαδικασία. Το φιαλίδιο με τα κύτταρα από το υγρό άζωτο τοποθετείται σε υδατόλουτρο των 37°C , ώσπου να ρευστοποιηθεί το περιεχόμενο. Ακολουθεί μια φυγοκέντρωση στα 20xg, για 10 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό και προστίθεται σε πιάτο καλλιέργειας. Μόλις τα κύτταρα προσκολληθούν στην επιφάνεια του πιάτου, αλλάζουμε το θρεπτικό υλικό, ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα του διμεθυλοσουλφοξειδίου [149].

2.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Όλες οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι από τη Sigma Chemicals, εκτός από τα θρεπτικά υλικά για τις βακτηριακές καλλιέργειες, που είναι από την Applichem.

Το χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl_2), η δεσφερριoxαμίνη (DFO) και η κερκετίνη (Quercetin) είναι από Sigma Chemicals. Το χλωριούχο κοβάλτιο διαλύεται σε νερό και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση $150\mu\text{M}$, η δεσφερριoxαμίνη διαλύεται σε νερό και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση $150\mu\text{M}$ και η κερκετίνη διαλύεται σε DMSO και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση $100\mu\text{M}$ σε όλα τα πειράματα, εκτός από όπου αναφέρεται κάτι διαφορετικό.

Οι υποξικές συνθήκες δημιουργούνται διατηρώντας τα κύτταρα σε ένα κλειστό πλαστικό θάλαμο (Billups-Rothenberg) στο οποίο διοχετεύεται αέριο μίγμα 94% N_2 , 5% CO_2 και η μερική πίεση οξυγόνου μετράται με ένα οξυγονόμετρο (Greisinger). Όλα τα πειράματα έγιναν σε 1% O_2 , εκτός αν αναφέρεται κάτι

διαφορετικό. Ως νορμοξία θεωρείται συγκέντρωση O_2 ίση με 20,9%, συγκέντρωση οξυγόνου στον ατμοσφαιρικό αέρα.

Ο κιτρικός σίδηρος (Ferric Citrate, FC) είναι από Sigma Chemicals, διαλύεται σε νερό και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.5mM, 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα, εκτός από όπου αναφέρεται κάτι διαφορετικό.

Η ακτινομυκίνη D (actinomycin D), το κυκλοεξιμίδιο (cycloheximide), το N-ακετυλο-L-κυστεΐνη (NAC) και η γλουταθειόνη (glutathione) είναι από Sigma Chemicals. Το Trolox είναι από Fluka.

Η ακτινομυκίνη D αναστέλλει τη μεταγραφή καθώς προσδένεται στο DNA και εμποδίζει την κίνηση της RNA πολυμεράσης. Διαλύεται σε DMSO (1mg/ml) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.5 μ g/ml, 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα.

Το κυκλοεξιμίδιο αναστέλλει την πρωτεϊνσύνθεση στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαλύεται σε DMSO (100mg/ml) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10 μ g/ml, για διάφορους χρόνους μετά την επώαση των κυττάρων με τους διάφορους επαγωγείς.

Το NAC είναι πρόδρομη ένωση της γλουταθειόνης και λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, απενεργοποιώντας τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Διαλύεται σε νερό (0,61 M) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 5mM, 2 ώρες πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα.

Η γλουταθειόνη διαλύεται σε νερό (100 mM) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 20mM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα.

Το Trolox είναι υδατοδιαλυτό παράγωγο της βιταμίνης E με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, το οποίο διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη (100mM) και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100 μ M ή 1mM ταυτόχρονα με τους επαγωγείς.

Οι αναστολείς της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, LY294002 και της κινάσης MEK, PD98059 είναι από Cell Signaling. Και οι δυο αναστολείς διαλύονται σε DMSO (10mM) και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 50 μ M, 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα.

Το αντίσωμα έναντι του HIF-1 α είναι μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, που αναγνωρίζει τα αμινοξέα 610-727 του HIF-1 α (BD Transduction Laboratories) και

χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:500 στην ανοσοαποτύπωση. Το αντίσωμα έναντι του ARNT είναι μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (BD Transduction Laboratories) και χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:500. Το αντίσωμα έναντι της ακτίνης είναι πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Serotec) και χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:500. Το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση έναντι των IgG ποντικού (Biorad) χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:3000. Το δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με FITC έναντι των IgG ποντικού (Biorad) χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:50.

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

2.3.1 Λύση κυττάρων

Υλικά

1x PBS

Διάλυμα λύσης

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Αρχικά, γίνεται πλύση των καλλιεργημένων κυττάρων με κρύο διάλυμα 1xPBS (138mM NaCl, 2,67mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1,47mM KH₂PO₄) και έπειτα προστίθεται διάλυμα λύσης (20mM Tris-Cl pH 7,5, 50mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 0,5% μερκαπτοαιθανόλη, 6 mM MgCl₂, 100μg/ml PMSF και 1mM Na₃VO₄). Οι αναστολείς PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και Na₃VO₄ (αναστολέας φωσφατασών) προστίθενται πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Το διάλυμα του PMSF γίνεται διαλύοντας 174mg PMSF σε 10ml αιθανόλη (τελική συγκέντρωση 100Mm). Το διάλυμα του ορθοβαναδικού νατρίου (Na₃VO₄) ετοιμάζεται σε συγκέντρωση 200mM σε νερό και το pH ρυθμίζεται στο 10. Ακολουθεί βρασμός για 10 λεπτά περίπου και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH ξαναρυθμίζεται στο 10 και τα διάλυμα χωρίζεται και αποθηκεύεται στους -20° C. Τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας με τη βοήθεια σπάτουλας. Το κυτταρικό εκχύλισμα διατηρείται για 10 λεπτά στον πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά, στα 10000xg και σε θερμοκρασία 4°C. Από το υπερκείμενο χρησιμοποιούνται 10μl για προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και στο υπόλοιπο προστίθεται διάλυμα φόρτωσης και τα

δείγματα θερμαίνονται στους 95⁰C για 3 λεπτά. Τα δείγματα διατηρούνται για ηλεκτροφόρηση στους -20⁰C [150].

2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στη χρωματική αλλαγή που προκαλεί η πρόσδεση μιας χρωστικής, του Coomassie brilliant blue G-250, σε μια άγνωστη πρωτεΐνη και στην ποσοτικοποίηση αυτού του συμπλόκου με τη βοήθεια διαφορετικών συγκεντρώσεων μιας πρωτεΐνης αναφοράς. Η πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται συνήθως για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι η αλβουμίνη ορού βοδιού (BSA) [151].

Υλικά

Διάλυμα πρωτεΐνης αναφοράς (1mg/ml BSA)

Διάλυμα Biorad Protein Assay Dye Reagent

Σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf με 790μl H₂O προστίθενται 10μl από το δείγμα της άγνωστης πρωτεΐνης, της οποίας τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε. Σ' αυτό προστίθενται 200μl διαλύματος Biorad Protein Assay Dye Reagent, το δείγμα παραμένει για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση στα 595nm. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης προσδιορίζεται η συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης.

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Υλικά

5x διάλυμα ηλεκτροφόρησης

5x διάλυμα διαχωρισμού

5x διάλυμα επιστοίβαξης

4x διάλυμα φόρτωσης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι είτε συνεχής είτε ασυνεχής. Στη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για την πηκτή και για το δοχείο των ηλεκτροδίων. Στην ασυνεχή

χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές πηκτές, η πηκτή επιστοίβαξης με την οποία επιτυγχάνεται η συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και η πηκτή διαχωρισμού που είναι υπεύθυνη για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σ' αυτή.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες πετυχαίνεται με θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων παρουσία παραγόντων, όπως το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες καθώς δεσμεύεται σε αυτές και καταστρέφει όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις της φυσικής πρωτεΐνης. Τα αποδιαταγμένα, πλέον, πολυπεπτίδια δεσμεύουν SDS και φορτίζονται αρνητικά. Το ποσό του συνδεδεμένου SDS είναι ανάλογο με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου (1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα) και ανεξάρτητο από την αλληλουχία των αμινοξέων.

Ο διαχωρισμός των αποδιαταγμένων πολυπεπτιδίων ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς τα πολυπεπτίδια, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων μιας πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κινητικότητα των πολυπεπτιδίων είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους και η ταχύτητά τους (V) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εκφράζεται από τον τύπο:

$$V = E \cdot z / f$$

όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει το συντελεστή τριβής, z το φορτίο της πρωτεΐνης και E την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου δημιουργούνται με πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου σε πολυακρυλαμίδιο και σύνδεση των αλυσίδων αυτού με το N,N μεθυλενοδισακρυλαμίδιο ή bis-ακρυλαμίδιο. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και ολοκληρώνεται με την προσθήκη της τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται στην πηκτή εξαρτώνται από το βαθμό πολυμερισμού και τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα [152, 153].

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή minigel της Hoefer, σε συνεχές ρεύμα 40mA για 1,5 ώρα περίπου ή σε συσκευή της Biorad, σε 150Volts για 1 ώρα περίπου. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2mM EDTA, 0,1% SDS pH 8.9). Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων αποτελείται από την πηκτή επιστοίβαξης (4,5% ακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,125 M

Tris-Cl pH 6,8, 2mM EDTA, για τον πολυμερισμό προστίθενται: 0,08% APS και 0,04% TEMED) που είναι περίπου 1-2 cm και την πηκτή διαχωρισμού (8% ακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2mM EDTA, για τον πολυμερισμό προστίθενται: 0,04% APS και 0,04% TEMED) που είναι περίπου 7 cm. Η πηκτή έχει πάχος 1mm. Τα προς ανάλυση δείγματα αναμειγνύονται με 4x διαλύματος φόρτωσης (250mM Tris-HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0,2% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης και 100mM DTT το οποίο προστίθεται πριν τη χρήση) (3 όγκοι δείγματος και 1 όγκος διαλύματος φόρτωσης) και ακολουθεί θέρμανσή τους για 5 λεπτά στους 95⁰C, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώνονται 40μg πρωτεΐνης και η επιβεβαίωση του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης γίνεται με τη φόρτωση μάρτυρα με πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών (New England Biolabs).

2.3.4 Χρώση της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

Υλικά

Διάλυμα Χρώσης

Διάλυμα Αποχρωματισμού

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή απομακρύνεται και εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης για 1ώρα με ανακίνηση. Το διάλυμα χρώσης αποτελείται από ίσες ποσότητες από 0,5% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) σε 100% αιθανόλη και 20% οξικού οξέος. Ο αποχρωματισμός της πηκτής με τις μονιμοποιημένες πρωτεΐνες γίνεται με απομάκρυνση του διαλύματος χρώσης και προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού (30 % αιθανόλη, 10 % οξικό οξύ) [154].

2.3.5 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από μια πηκτή ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη μπορεί να γίνει σε υγρή φάση (Wet transfer) ή σε ημι-στεγνή φάση (Semi-dry transfer).

Υλικά

Πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην οποία έχουν αναλυθεί προηγουμένως τα δείγματα πρωτεϊνών

Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)

Διηθητικά χαρτιά Whatman 3MM

Μεμβράνη μεταφοράς, η οποία μπορεί να είναι η νιτροκυτταρίνη ή νάυλον ή μεμβράνη τύπου PVDF

Συσκευή μεταφοράς

α. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)

Σ' αυτή τη διαδικασία, η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε μια συσκευή γεμάτη με διάλυμα μεταφοράς, σε κάθετη θέση, μεταξύ δυο ηλεκτροδίων.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη ακολουθεί την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών (SDS-PAGE). Όταν η ηλεκτροφόρηση έχει ολοκληρωθεί, απομακρύνεται η πηκτή επιστοίβαξης και η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (48mM Tris, 39mM γλυκίνη, 1,3mM SDS, 20% μεθανόλη). Σε ένα μπανάκι που περιέχει διάλυμα μεταφοράς τοποθετούνται 6 διηθητικά χαρτιά Whatman 3MM και η μεμβράνη που θα χρησιμοποιηθεί στη μεταφορά και παραμένουν εκεί για 5-10 λεπτά. Στη συνέχεια, δημιουργείται ένα σάντουιτς, τοποθετώντας από κάτω 3 διηθητικά χαρτιά, στη συνέχεια τη μεμβράνη, την πηκτή και από πάνω άλλα 3 διηθητικά χαρτιά και αφαιρούνται από αυτό όλες τις φυσαλίδες με μια ράβδο. Η συσκευή μεταφοράς γεμίζει με διάλυμα μεταφοράς και το σάντουιτς τοποθετείται στη συσκευή με το σωστό προσανατολισμό. Οι πρωτεΐνες είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένες σε διάλυμα μεταφοράς και κινούνται προς την άνοδο. Άρα, η μεμβράνη τοποθετείται από την πλευρά της ανόδου, ώστε οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν από την πηκτή στη μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται ηλεκτροφορητικά για 1,5 ώρες στα 40mA. Ο χρόνος της μεταφοράς εξαρτάται από το πάχος της πηκτής και το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν. Γενικά, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε 1-6 ώρες, αλλά πρωτεΐνες μεγάλου MB χρειάζονται περισσότερο χρόνο. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή αποσυνδέεται και η μεμβράνη απομακρύνεται.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται με χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue (Serva) ή της μεμβράνης με 0,2% Ponceau S (Serva) για λίγα λεπτά. Αφού εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, σημειώνονται με μολύβι οι ζώνες του μάρτυρα με τα γνωστά MB που χρησιμοποιήθηκε και το Ponceau S απομακρύνεται τοποθετώντας τη μεμβράνη σε νερό. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με αντισώματα [155].

β. Μεταφορά ημι-στεγνής φάσης (Semi-dry Transfer)

Σ' αυτή τη διαδικασία, η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε οριζόντια θέση, μεταξύ 2 μεγάλων ηλεκτροδίων, χωρίς τη χρήση μεγάλης ποσότητας διαλύματος μεταφοράς, το διάλυμα μεταφοράς (48mM Tris, 39mM γλυκίνη, 1.3mM SDS) χρησιμοποιείται μόνο για να βραχεί η μεμβράνη και η πηκτή. Ο τρόπος αυτός μεταφοράς δεν ενδείκνυται για μεγάλους χρόνους μεταφοράς (υπάρχει κίνδυνος καταστροφής των ηλεκτροδίων).

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη ακολουθεί την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών (SDS-PAGE). Όταν η ηλεκτροφόρηση έχει ολοκληρωθεί, απομακρύνεται η πηκτή επιστοίβαξης και η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς. Σε ένα μπανάκι που περιέχει διάλυμα μεταφοράς τοποθετούνται 6 διηθητικά χαρτιά Watman 3MM και η μεμβράνη που θα χρησιμοποιηθεί στη μεταφορά και παραμένουν εκεί για 5-10 λεπτά. Στη συσκευή της μεταφοράς semidry τοποθετούνται πάνω στο ηλεκτρόδιο της ανόδου 3 διηθητικά χαρτιά, στη συνέχεια η μεμβράνη, η πηκτή και από πάνω άλλα 3 διηθητικά χαρτιά. Με μια ράβδο αφαιρούνται όλες τις φυσαλίδες από το σάντουιτς. Το πάνω ηλεκτρόδιο τοποθετείται στη συσκευή και συνδέονται τα καλώδια της συσκευής. Η μεταφορά γίνεται ηλεκτροφορητικά για 1 ώρα στα 10Volts. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή αποσυνδέεται και η μεμβράνη απομακρύνεται.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται με χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue ή της μεμβράνης με Ponceau S 0.2% για λίγα λεπτά, όπως περιγράφηκε παραπάνω [156].

2.3.6 Ανοσοαποτύπωση και εμφάνιση με ECL

Υλικά

Διάλυμα μπλοκαρίσματος

Αντισώματα

1x PBS

Αντιδραστήρια ECL

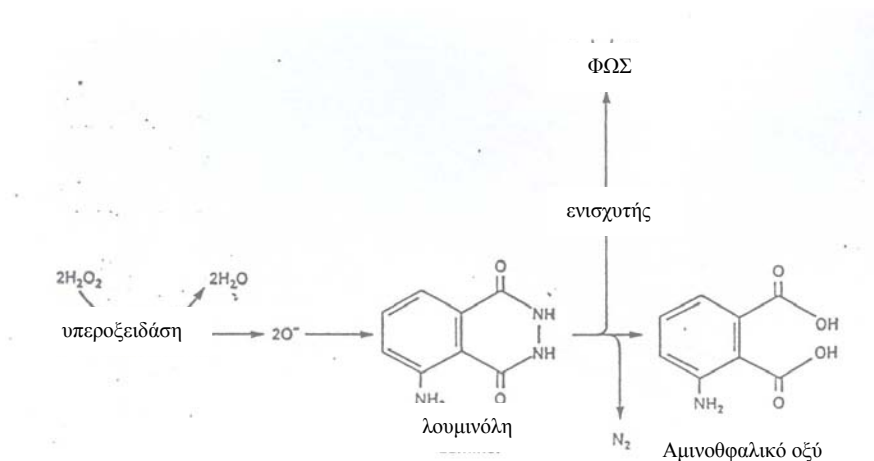
Αντιδραστήρια εμφάνισης

Φωτογραφικό φιλμ

Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, το σάντουιτς ανοίγει και ακολουθεί πλύση της μεμβράνης με 1xPBS. Γίνεται επώαση της

μεμβράνης με το διάλυμα μπλοκαρίσματος (5% γάλα σε σκόνη σε 1xPBS - Tween 20 0,1%) και ακόλουθη πλύση με 1xPBS – Tween 20 0,1% (3 φορές από 5 λεπτά). Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα στους 4°C και πλύση με 1xPBS (3 φορές από 5 λεπτά). Τέλος, η μεμβράνη επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλένεται με PBS (3 φορές από 5 λεπτά). Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP).

Στη μεμβράνη προστίθεται αντιδραστήριο ECL για 1 λεπτό και ακολουθεί εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Το αντιδραστήριο ECL περιέχει 10ml λουμινόλη (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5), 100μl κουμαρικό οξύ (6,8mM σε DMSO) και 30μl υπεροξείδιο του υδρογόνου. Παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου η ραφανιδική υπεροξειδάση οξειδώνει τη λουμινόλη με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, η ένταση του οποίου αυξάνει κατά 1000 φορές με την παρουσία του κουμαρικού οξέος (Σχήμα 10). Η εκπομπή φωτός αποτυπώνεται από τη μεμβράνη σε φωτογραφικό φιλμ. Το φιλμ εμφανίζεται για 3 λεπτά στο διάλυμα ανάπτυξης και το σήμα σταθεροποιείται με παραμονή 3 λεπτών στο διάλυμα σταθεροποίησης [157].



Σχήμα 10: Αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης. Η ραφανιδική υπεροξειδάση οξειδώνει τη λουμινόλη σε αμινοφαιλικό οξύ με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, η ένταση του οποίου αυξάνει παρουσία ενός ενισχυτή, του κουμαρικού οξέος.

2.4 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Υλικά

1x PBS

Φορμαλδεύδη

Triton X-100

BSA

Αντισώματα

90% γλυκερόλη

Καλυπτρίδες

Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος, τα κύτταρα μοιράζονται σε πιάτα με 6 πηγαδάκια, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνειας. Γίνεται προσθήκη των επαγωγέων για τον επιθυμητό χρόνο και μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα κύτταρα και γίνεται πλύση με κρύο 1x PBS (με Ca,Mg). Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με 1x PBS + 3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά και πλύση με κρύο 1x PBS (με Ca,Mg) 2 φορές από 5 λεπτά. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές αφήνοντας τα κύτταρα για 15 λεπτά με 1x PBS + 1% Triton X-100 στους 4°C ή 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται πλύση με κρύο 1x PBS (με Ca,Mg). Στη συνέχεια, γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στις καλυπτρίδες με PBS – 0,1% Tween 20 – 3% BSA στους 4°C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, οι καλυπτρίδες σηκώνονται, στεγνώνονται καλά και τοποθετούνται σε άλλο πιάτο (24 wells), το οποίο είναι στεγνό. Το πρώτο αντίσωμα, mouse anti-HIF 1/200 σε PBS-Tween 1% BSA, προστίθεται για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για όλη τη νύχτα στους 4°C. Το πρώτο αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις 1x PBS-0,1% Tween-1% BSA και ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος, anti-mouse-FITC 1/50 σε PBS-0,1% Tween-1% BSA για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ή παραπάνω στους 4°C. Το δεύτερο αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS-0,1% Tween-1% BSA. Ακολουθεί ένα τελικό πλύσιμο με νερό και οι καλυπτρίδες στεγνώνονται σε χαρτί και τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με 1 σταγόνα 90% γλυκερόλης. Για την παρατήρηση των πυρήνων στην αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται 1% 4', 6-διαμιδινο-2-

φαινυλινδόλιο (DAPI), το οποίο χρωματίζει τους πυρήνες μπλε. Η παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 και η φωτογράφιση με τη χρήση κάμερας UFX-DX (Nikon) [158].

2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ

ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

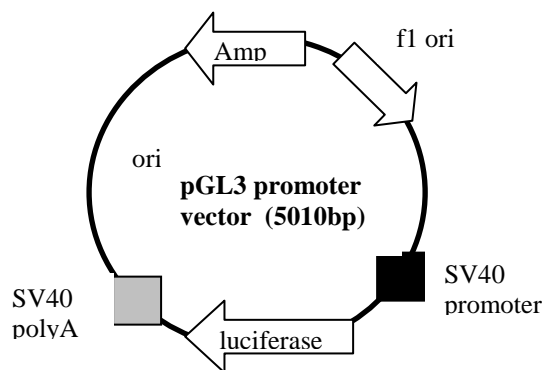
Ο προσδιορισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου γίνεται με τη χρήση της καλσεΐνης (calcein AM, Sigma). Η καλσεΐνη είναι μια πράσινη φθορίζουσα ουσία με ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου, η οποία προστίθεται στα κύτταρα με τη μορφή εστέρα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων υδρολύεται από εστεράσες σε αρνητικά φορτισμένη καλσεΐνη. Αν παραμένει στη μορφή αυτή, χωρίς να έχει συμπλοκοποιήσει το σίδηρο, στο εσωτερικό των κυττάρων φθορίζει. Αν, όμως, υπάρχει ελεύθερος σίδηρος τον συμπλοκοποιεί και δε φθορίζει.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4. Γίνεται προσθήκη των επαγωγών για τον επιθυμητό χρόνο και μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα κύτταρα και προστίθεται 1μM καλσεΐνης διαλυμένης σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η καλσεΐνη αφήνεται στα κύτταρα για 30 λεπτά, ακολουθεί πλύση με κρύο 1x PBS (με Ca,Mg) και μονιμοποίηση των κυττάρων με 1x PBS + 3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά. Έπειτα από πλύση με κρύο 1x PBS (με Ca,Mg) 2 φορές από 5 λεπτά, οι καλυπτρίδες στεγνώνονται σε χαρτί και τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με 1 σταγόνα 90% γλυκερόλης. Για την παρατήρηση των πυρήνων στην αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται DAPI. Η παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 και η φωτογράφιση με τη χρήση κάμερας UFX-DX (Nikon) [159].

2.6 ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.6.1 Πλασμιδιακές κατασκευές

Τα πλασμίδια pGL3-luciferase χρησιμοποιούνται για την ποσοτική ανάλυση παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση ευκαρυωτικών γονιδίων. Τα πλασμίδια αυτά αποτελούνται από το σκελετό των πλασμιδίων pGL2, μόνο που περιέχουν το γονίδιο της λουσιφεράσης από την πυγολαμπίδα (*Photinus pyralis*), το οποίο χρησιμοποιείται για έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας σε διαμολυσμένα ευκαρυωτικά κύτταρα.



Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 4 πλασμίδια για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων:

A. **pGLHIF1 4.2**, το οποίο περιέχει 3 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης μετά το γονίδιο της λουσιφεράσης (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Wenger, Leipzig, Γερμανία).

B. **pGLHIF1mut 2.4**, το οποίο περιέχει 3 μεταλλαγμένα αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης μετά το γονίδιο της λουσιφεράσης (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Wenger, Leipzig, Γερμανία).

Γ. **pGL3-EPO-HBE**, το οποίο περιέχει 3 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Kietzmann, Gottingen, Γερμανία).

Δ. **pGL3-5HRE-VEGF**, το οποίο περιέχει 5 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου του VEGF πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Giaccia, Stanford, Καλιφόρνια).

Για την εκτίμηση της απόδοσης της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο:

CMV-lacZ, το οποίο είναι το πλασμίδιο pUC19 και περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπό τη δράση υποκινητή CMV (χορηγήθηκε από το εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας).

2.6.2 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών σε πλασμιδιακό DNA (Competent T10 E.coli)

Υλικά

Διάλυμα TYM

Διάλυμα TFB I, pH 7

Διάλυμα TFB II, pH 7

Τα βακτηριακά κύτταρα γίνονται δεκτικά σε ξένο DNA με ένα μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός. Στην παρούσα εργασία τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι T10 E.coli.

Τα βακτηριακά κύτταρα επωάζονται σε 5ml θρεπτικού μέσου TYM (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄), με αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, στους 37⁰ C για 16 ώρες περίπου. Την επόμενη ημέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml TYM με στρεπτομυκίνη και επωάζονται περαιτέρω στους 37⁰ C για 2-3 ώρες. Γίνεται νέα αραιώση 1:250 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό και ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας μέχρι η απορρόφηση (OD) στα 590nm των κυττάρων να γίνει 0,35-0,4. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 1800xg για 5 λεπτά, επαναιωρούνται σε 25ml διαλύματος TFB I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη) και αφήνονται για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1800xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 2ml διαλύματος TFB II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη) και αφήνεται για 60 λεπτά στον πάγο. Τα κύτταρα μοιράζονται σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf) και αποθηκεύονται στους -80⁰ C [160].

2.6.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Υλικά

LB υγρό

LB – άγαρ

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων που έγιναν δεκτικά γίνεται ως εξής: 0.05-1 μg πλασμιδιακού DNA προστίθεται σε 200μl δεκτικών κυττάρων και αφήνονται 30 λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων για 2 λεπτά

στους 42°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με 1ml θρεπτικού LB (για 1Lt LB: 10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα ζύμης, 5g NaCl σε νερό) για 1 ώρα στους 37 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 3000xg για 3 λεπτά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε LB και επιστρώνεται σε τριβλίο με LB-άγαρ (για 1Lt: 10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα ζύμης, 5g NaCl, 20g άγαρ) που περιέχει αμπικιλίνη. Το τριβλίο επωάζεται στους 37°C για περίπου 16 με 18 ώρες [160].

2.6.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Qiagen kit)

Υλικά

Qiagen Midi Kit

Το kit αυτό χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων 100ml. Τα κύτταρα καλλιεργούνται όλη τη νύχτα σε LB 100ml και έπειτα από φυγοκέντρωση επαναιωρούνται σε διάλυμα P1 και λύνονται με τα διαλύματα P2 και P3. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 20000xg για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο χορηγείται στη στήλη QIAGEN-tip 100, η οποία έχει εξισορροπηθεί με το διάλυμα QBT, και το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται στη στήλη. Ακολουθούν πλυσίματα με το διάλυμα χαμηλής αλατότητας QC για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών προσμίξεων και το πλασμιδιακό DNA εκλύεται με διάλυμα QF σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Το DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και αφαλατώνεται με 70% αιθανόλη. Το ίζημα του DNA έπειτα από φυγοκέντρωση στεγνώνει και γίνεται επαναιώρησή του σε κατάλληλη ποσότητα νερού.

2.6.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του DNA. Έτσι, το φωτόμετρο μηδενίζεται με νερό και μετράται η απορρόφηση του δείγματος DNA, το οποίο αραιώνεται με νερό, στα 260nm (A_{260}). Επειδή, απορρόφηση ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1μg/ml δίκλωνου DNA, η συγκέντρωση του δείγματος DNA υπολογίζεται ως εξής:

Συγκέντρωση DNA = $50\mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{παράγοντας αραιώσης}$

Ποσότητα DNA = Συγκέντρωση DNA x συνολικός όγκος από όπου πήραμε το δείγμα DNA

Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm (A_{280}) και υπολογίζεται ο λόγος A_{260} / A_{280} . Το καθαρό DNA έχει ένα λόγο A_{260} / A_{280} μεταξύ 1,8-2,0.

2.6.6 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς

Υλικά

Πιάτα 12 πηγαδιών

Πλασμιδιακό DNA

Αντιδραστήριο Transpass D2 (New England BioLabs)

1x PBS

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

Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος, τα κύτταρα μοιράζονται σε πιάτα με 12 πηγαδάκια. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 200.000 κύτταρα, ώστε την ημέρα που θα γίνει η διαμόλυνση να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας. Για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται ένα μίγμα το οποίο περιέχει 0,6ml θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, 1μl από το αντιδραστήριο Transpass D2, 1μg πλασμιδίου pGL3-luciferase με τα HRE και 1μg πλασμιδίου CMV-lacZ και πριν προστεθεί στα κύτταρα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Το μίγμα προστίθεται στα κύτταρα και αφήνεται για 2-3 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, γίνεται αντικατάσταση του μίγματος διαμόλυνσης με φρέσκο θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% ορό και τα κύτταρα αφήνονται για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προσθέτονται οι επαγωγείς για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

2.6.7 Προσδιορισμός μεταγραφικής ενεργότητας με μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης

Υλικά

1x PBS

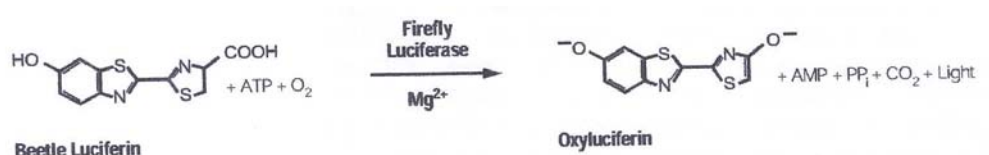
Kit Luciferase Assay System E1500 (Promega)

(το kit περιέχει: 1 μπουκαλάκι luciferase assay substrate που διαλύεται σε 10ml luciferase assay buffer ώστε να προκύψει το luciferase assay reagent και 30ml διάλυμα λύσης κυττάρων 5x)

Διάλυμα lacZ

Διάλυμα ONPG (ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης)

Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος επώασης των κυττάρων με τους επαγωγείς, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα διαμολυσμένα κύτταρα και γίνεται πλύση με 1x PBS. Τα κύτταρα λύνονται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης 1x από το kit της Promega και συλλέγονται σε σωληνάκι τύπου erppendorf. Ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρωση (5 sec) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι τύπου erppendorf. Για τη μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης, 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμειγνύονται με 100μl από το διάλυμα του luciferase assay reagent, το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της λουσιφεράσης και μετράται αμέσως το φως που παράγεται σε λουμινόμετρο. Παρουσία του ενζύμου της λουσιφεράσης, η λουσιφερίνη οξειδώνεται εκπέμποντας φως, το οποίο μετράται στο λουμινόμετρο. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:



Για τη μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμειγνύονται με 200μl από το διάλυμα που περιέχει το ONPG (170μl διαλύματος lacZ και 30μl ONPG). Το διάλυμα lacZ έχει σύσταση: 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 40mM μερκαπτοαιθανόλη. Το ONPG (Sigma Chemicals) διαλύεται σε διάλυμα lacZ ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 4mg/ml. Αφήνεται για λίγα λεπτά στους 30°C μέχρι να γίνει κίτρινο. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 40μl ανθρακικού νατρίου 1M και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 420nm [161].

Τα αποτελέσματα της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης εκφράζονται ως τιμές που έχουν κανονικοποιηθεί προς την ενεργότητα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης.

2.7 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.7.1 Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Υλικά

Αιμοκυτταρόμετρο

Trypan blue

Η απαρίθμηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου. Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια αντικειμενοφόρος πλάκα που περιέχει ένα δίκτυο γραμμών (σχηματίζοντας τα πεδία μέτρησης) και μια καλυπτρίδα. Τα δίκτυα γραμμών καθορίζουν τις επιφάνειες μέτρησης, ενώ η καλυπτρίδα καθορίζει το ύψος του υγρού πάνω από την επιφάνεια. Το αιμοκυτταρόμετρο έχει 9 μεγάλα τετράγωνα με 1mm η κάθε πλευρά και η καλυπτρίδα τοποθετείται ώστε το ύψος να είναι 0.1mm. Επομένως, ο υπολογιζόμενος όγκος σε κάθε τετράγωνο είναι $0,1\text{mm}^3$ και ο αριθμός κυττάρων ανά ml είναι ο μέσος αριθμός κυττάρων που μετρήσαμε επί 10^4 . Σε κάθε θάλαμο του αιμοκυτταρόμετρου μετράμε τα 4 γωνιακά τετράγωνα από τα 9 που έχει και από αυτό υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων [148, 149].

Τα κύτταρα επωάζονται με τους επαγωγείς για τους επιθυμητούς χρόνους και μετά το πέρας της επώασης, μαζεύονται με τρυψίνη σε ένα σωληνάκι πολυπροπυλενίου. Από αυτό παίρνονται 20μl αντιπροσωπευτικού δείγματος κυττάρων, αναμειγνύονται με 20μl Trypan blue και τοποθετούνται στο αιμοκυτταρόμετρο. Η μέτρηση γίνεται στα 4 μεγάλα γωνιακά τετράγωνα και καταγράφεται ο μέσος όρος των ζωντανών και νεκρών κυττάρων (αυτά που βάφονται μπλε). Η συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$C \text{ (cells/ml)} = N \times \text{αραίωση} \times 10^4$$

όπου N= μέσος όρος κυττάρων

αραίωση= η αραίωση που έγινε με το Trypan blue

10^4 = παράγοντας μετατροπής όγκου

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωσή τους επί το συνολικό όγκο των κυττάρων από όπου πήραμε το δείγμα.

$$\text{Αριθμός κυτάρων} = C \text{ (cells/ml)} \times V$$

2.7.2 Ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης

Υλικά

Πιάτα 12 πηγαδιών

Διάλυμα θυμιδίνης

10% TCA

Διάλυμα 0.2 N NaOH , 1% SDS

β-counter

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτα των 12 πηγαδιών με τους επαγωγείς για το επιθυμητό χρονικό διάστημα και η [³H]-θυμιδίνη (44 Ci/mmol, Amersham) προστίθεται στα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 2,5 μCi / ml 4 ώρες πριν το πέρας της επώασης των κυττάρων με τους επαγωγείς. Μετά το πέρας των 4 ωρών, η [³H] θυμιδίνη απομακρύνεται και τα κύτταρα σταθεροποιούνται με 10% TCA κρύο (1ml / πηγαδάκι), το οποίο αφήνεται στα κύτταρα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις με νερό της βρύσης 3 φορές και η πλάκα στεγνώνει σε απορροφητικό χαρτί. Ακολουθεί προσθήκη 500 μl διαλύματος 0,2 N NaOH , 1% SDS, το οποίο αφήνεται για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθέτονται 10 μl HCl 10N. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μπουκαλάκι σπινθηρισμού και προσθέτονται 10 ml του υγρού σπινθηρισμού (Zinsser Analytic). Ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή σπινθηρισμού (Wallac 1409) [162].

2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

2.8.1 Απομόνωση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Υλικά

Διάλυμα λύσης

Διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης

Η απομόνωση του DNA γίνεται με τη φαινόλη-χλωροφόρμιο. Τα κύτταρα επωάζονται με τους επαγωγείς για το επιθυμητό χρονικό διάστημα και μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψίνη και φυγοκεντρούνται με θρεπτικό υλικό σε 500xg για 5 λεπτά στους 4°C. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί μια φυγοκέντρηση με 10ml κρύο PBS σε 500xg για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης (10mM Tris-Cl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 100mM NaCl, 0,5% (w/v) SDS, 0,1mg/ml πρωτεΐνάση K). Η πρωτεΐνάση K προστίθεται πριν τη χρήση. Για $< 3 \times 10^7$ κύτταρα χρησιμοποιούνται 0,3ml διαλύματος λύσης. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 50°C για 12-18 ώρες ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες του δείγματος. Οι πρωτεϊνικές προσμίξεις απομακρύνονται με την προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25όγκοι φαινόλης + 24όγκοι χλωροφορμίου + 1όγκος ισοαμυλικής αλκοόλης) και φυγοκέντρηση στα 1700xg για 10 λεπτά. Η υδατική φάση (επάνω) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και γίνεται προσθήκη ½ όγκου από 7.5M οξικού αμμωνίου και 2 όγκων (του αρχικού ποσού της επάνω φάσης) από 100% αιθανόλη για να κατακρημνιστεί το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1700xg για 10 λεπτά. Το ίζημα πλένεται με 70% αιθανόλη για να αφαλατωθεί το DNA και στεγνώνει για κάποιες ώρες. Το DNA διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα TE (1mg/ml) [163].

2.8.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA γίνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω (2.6.5).

2.8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Υλικά

Αγαρόζη

Διάλυμα 1x TAE

Διάλυμα φόρτωσης

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση DNA. Το αρνητικά φορτισμένο DNA μετακινείται μέσα στους πόρους της πηκτής αγαρόζης και τα μεγαλύτερα σε μέγεθος κομμάτια μετακινούνται πιο αργά σε σχέση με τα

μικρότερα, εξαιτίας του μεγέθους των πόρων της πηκτής, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό κομματιών DNA διαφορετικών μεγεθών.

Για την παρασκευή της πηκτής προστίθεται 1g αгарόζης σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 100⁰ C. Το διάλυμα αφήνεται για λίγο να κρυώσει και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Το διάλυμα προστίθεται σε κατάλληλη συσκευή και αφήνεται να πήξει.

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν αναμειγνύονται με το διάλυμα φόρτωσης (0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% κυανού του ξυλενίου, 5% γλυκερόλη), τοποθετούνται στα πηγαδάκια της πηκτής και ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα TAE στα 100Volts για 30 λεπτά περίπου. Η επιβεβαίωση του μοριακού βάρους του DNA γίνεται με τη φόρτωση μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών (New England Biolabs).

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική τοποθετείται σε πλάκα υπεριώδους και λαμβάνονται φωτογραφίες [163, 164].

2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών των πρωτεϊνών στην ανοσοαποτύπωση έγινε με προσδιορισμό του λόγου της έντασης της ζώνης του HIF-1α προς της ακτίνης με τη χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop.

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad Instat. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SD). Το στατιστικά σημαντικό όριο είναι $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με στόχο να γίνει σύγκριση της επαγωγής του HIF-1α από την υποξία, τις χημικές ενώσεις που μιμούνται την υποξία, δεσφερριοξαμίνη και χλωριούχο κοβάλτιο και το φλαβονοειδές κερκετίνη, μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν την έκφραση και ενεργότητα του HIF-1α. Στα περισσότερα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa και κάποια πειράματα επαναλήφθηκαν σε κύτταρα HepG2.

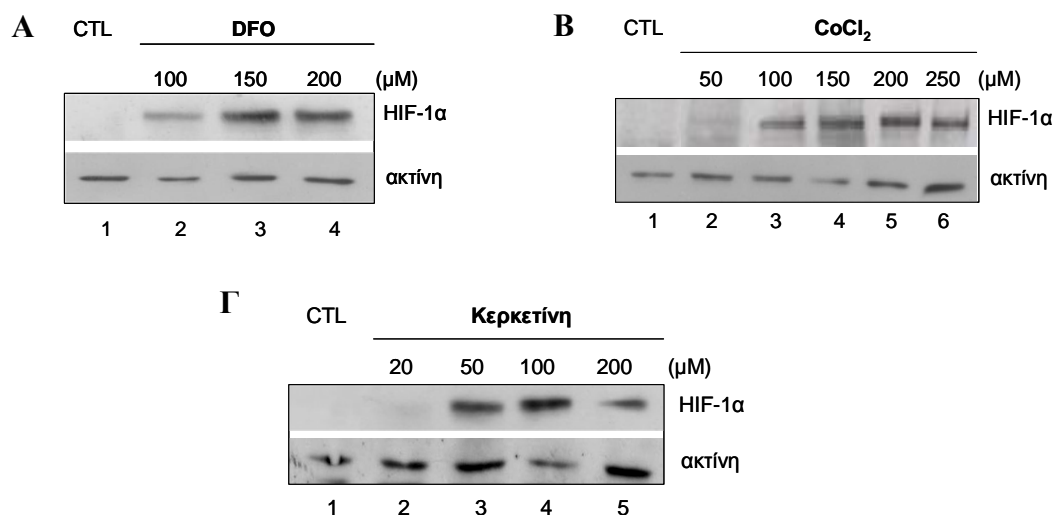
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

3.1.1 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης επαγωγέων υποξικού στρες για έκφραση του HIF-1α

Τα κύτταρα HeLa δεν εκφράζουν ενδογενώς HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Αρχικά έγιναν κάποια πειράματα ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση των επαγωγέων, στην οποία παρατηρείται έντονη έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α. Οι επαγωγείς προστέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε κύτταρα HeLa για 4 ώρες, χρόνος που συνήθως χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία.

Στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης (DFO) χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 100-200μM. Η επαγωγή του HIF-1α ήταν ασθενής χρησιμοποιώντας 100μM, αλλά ήταν παρόμοια ισχυρή χρησιμοποιώντας 150 και 200μM δεσφερριοξαμίνης (Σχήμα 11Α). Στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου (CoCl_2) χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 50-250μM. Παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση 50μM η επαγωγή του HIF-1α ήταν μικρή και η καλύτερη επαγωγή της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με τη χρήση 150-200μM χλωριούχου κοβαλτίου (Σχήμα 11Β). Στην περίπτωση της κερκετίνης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 20-200μM και παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση 20μM η επαγωγή του HIF-1α ήταν ασθενής, η καλύτερη επαγωγή της πρωτεΐνης ήταν με τη χρήση 100μM κερκετίνης, ενώ στα 200μM η επαγωγή μειώθηκε (Σχήμα 11Γ).

Επομένως, στα επόμενα πειράματα, η δεσφερριοξαμίνη χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 150μM, το χλωριούχο κοβάλτιο σε συγκέντρωση 150μM και η κερκετίνη σε συγκέντρωση 100μM.



Σχήμα 11: Ανάλυση κατά Western της δόσοεξαρτώμενης επαγωγής του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Οι επαγωγείς χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για 4 ώρες και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η φόρτωση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με αντίσωμα έναντι της ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.
CTL= κύτταρα μάρτυρες που καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων για 4 ώρες.

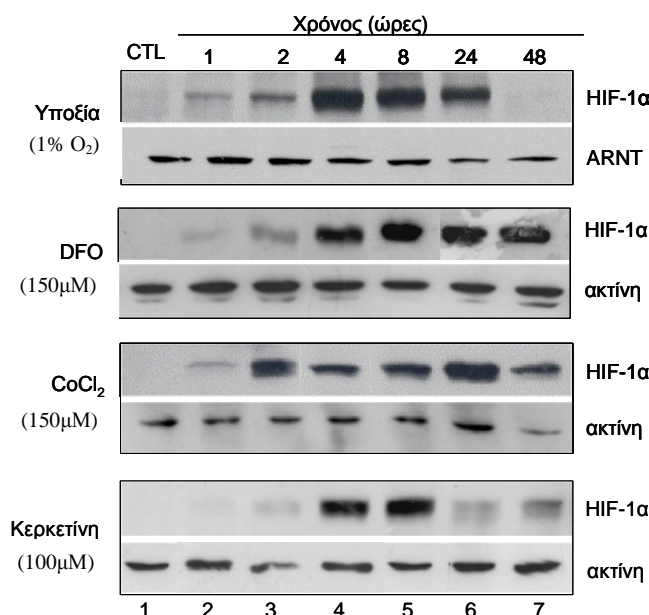
3.1.2 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α

Αφού προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του κάθε επαγωγέα του HIF-1α, επιχειρήθηκε να γίνει σύγκριση των χαρακτηριστικών της επαγωγής του από την υποξία με αυτά της επαγωγής του από τους χημικούς και βιολογικούς παράγοντες που μιμούνται την υποξία. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής της επαγωγής του HIF-1α με τους διάφορους επαγωγείς.

Σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), ο HIF-1α ήταν ανιχνεύσιμος από την 1^η ώρα, εκφραζόταν μέγιστα στις 4-8 ώρες και μειωνόταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 48 ώρες. Αντιθέτως, η έκφραση του ARNT παρέμενε αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των κυττάρων για 48 ώρες σε υποξία. Παρουσία δεσφερριοξαμίνης, ο HIF-1α ήταν ανιχνεύσιμος από την 1^η ώρα, εκφραζόταν μέγιστα στις 4-24 ώρες και υπήρχε σε υψηλά επίπεδα στις 48 ώρες. Παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου, η κινητική της έκφρασης του HIF-1α παρουσίαζε ένα παρόμοιο πρότυπο με αυτό της δεσφερριοξαμίνης, με μέγιστη έκφραση στις 24 ώρες και αρκετά υψηλά επίπεδα στις 48 ώρες. Τέλος, παρουσία κερκετίνης, ο HIF-1α ήταν πρακτικά ανιχνεύσιμος από τη 2^η ώρα, εκφραζόταν μέγιστα στις 4-8 ώρες, μειώνονταν σε χαμηλά επίπεδα στις 24 ώρες, αλλά η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνονταν ξανά στις 48 ώρες (Σχήμα 12). Η

συμπεριφορά αυτή του HIF-1α παρουσία κερκετίνης ήταν επαναλήψιμη. Οι μέσοι όροι 3 πειραμάτων έδειξαν ότι τα επίπεδά του HIF-1α την πρώτη ώρα αντιστοιχούν στο 14% αυτών στις 4 ώρες, στις 2 ώρες στο 58%, στις 8 ώρες στο 118%, στις 24 ώρες στο 28% και στις 48 ώρες στο 54% αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ενώ η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου μειώνει την έκφραση του HIF-1α, δε συμβαίνει κάτι αντίστοιχο στην περίπτωση παρατεταμένης έκθεσης στο χλωριούχο κοβάλτιο ή τη δεσφερριοξαμίνη. Στην περίπτωση της κερκετίνης, η έκφραση του HIF-1α είναι παροδική, ο HIF-1α μειώνεται δραστικά στις 24 ώρες, ενώ τα επίπεδά του επανέρχονται σε υψηλότερες τιμές στις 48 ώρες. Οι λόγοι για αυτήν την κινητική της έκφρασης του HIF-1α παρουσία κερκετίνης εξετάζονται αργότερα.



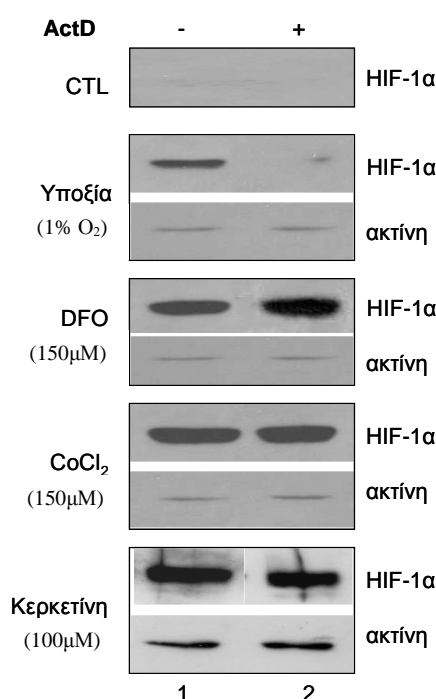
Σχήμα 12: Ανάλυση κατά Western της κινητικής της επαγωγής του HIF-1α σε κύτταρα HeLa.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διαφορετικούς χρόνους σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης. Η φόρτωση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με αντίσωμα έναντι του ARNT ή της ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.1.3 Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στη μεταγραφή του HIF-1α

Η μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α σε κύτταρα σε καλλιέργεια θεωρείται ότι δεν επηρεάζεται από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου [2]. Για να διερευνηθεί αν

οι διάφοροι επαγωγείς επιδρούν στο επίπεδο της μεταγραφής του HIF-1α, χρησιμοποιήθηκε, 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων στα κύτταρα HeLa, ένας γνωστός αναστολέας της μεταγραφής, η ακτινομυκίνη D. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας παρουσία ακτινομυκίνης D, η έκφραση του HIF-1α μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, σε σχέση με την έκφραση του σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία του αναστολέα της μεταγραφής. Σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία δεσφερριόξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης, η παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής δεν επηρέασε τα επίπεδα του HIF-1α (Σχήμα 13).



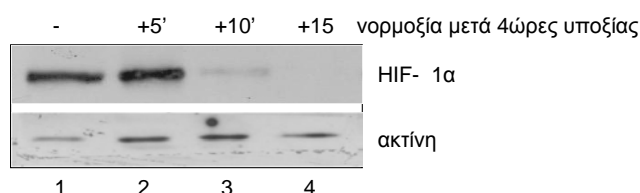
Σχήμα 13: Επίδραση της αναστολής της μεταγραφής στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Η ακτινομυκίνη D (ActD) προστέθηκε 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Παραδόξως, τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η υποξία επάγει τον HIF-1α δρώντας στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου, ενώ δε συμβαίνει κάτι αντίστοιχο με τη δεσφερριόξαμίνη, το χλωριούχο κοβάλτιο ή την κερκετίνη. Επειδή είναι γενικά αποδεκτό ότι η ρύθμιση του HIF-1α στην υποξία δε γίνεται στο επίπεδο της

μεταγραφής, πιθανόν στις δικές μας συνθήκες η αναστολή της μεταγραφής να επηρεάζει μια άλλη πρωτεΐνη, σημαντική για τη ρύθμιση του HIF-1α στην υποξία.

3.1.4 Ρόλος της πρωτεϊνοσύνθεσης στην έκφραση του HIF-1α

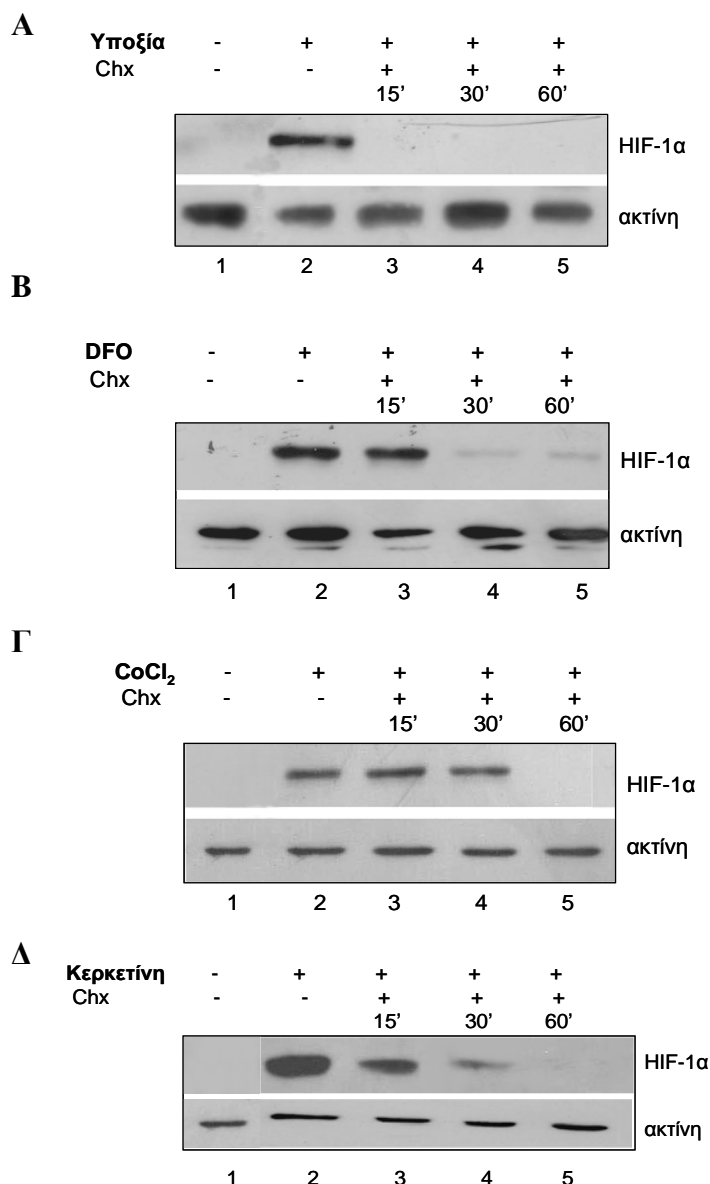
Έχει δειχθεί ότι η παρουσία του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας οφείλεται σε σταθεροποίησή του, επειδή αποφεύγεται η αποικοδόμησή του, η οποία συμβαίνει σε συνθήκες νορμοξίας, όπου ο HIF-1α έχει χρόνο ημιζωής περίπου 5 λεπτά [27]. Επιβεβαιώθηκε ότι όταν κύτταρα HeLa επωάζονται σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και κατόπιν επαναφέρονται σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α που έχει παραχθεί, αποικοδομείται με ένα χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Έλεγχος του χρόνου ημιζωής του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (1% O₂) και επαναφέρθηκαν σε 21% O₂ για 5, 10 ή 15 λεπτά. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι ενός πειράματος.

Τα επίπεδα κάθε πρωτεΐνης αντιπροσωπεύουν την ισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμησή της. Για να διερευνηθεί ο ρόλος της συνεχούς πρωτεϊνοσύνθεσης στην έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες υποξικού στρες, χρησιμοποιήθηκε ένας γνωστός αναστολέας της μετάφρασης, το κυκλοεξιμίδιο. Έγινε επαγωγή του HIF-1α με καλλιέργεια των κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία δεσφερριτοξαμίνης, γλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης για 4 ώρες και το κυκλοεξιμίδιο προστέθηκε στη συνέχεια για διάφορους χρόνους. Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε συγκέντρωση οξυγόνου 1% είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση του HIF-1α μέσα σε 15 λεπτά (Σχήμα 15Α). Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία δεσφερριτοξαμίνης ή γλωριούχου κοβαλτίου οδήγησε σε αποικοδόμηση του HIF-1α με ένα χρόνο ημιζωής μικρότερο των 30 λεπτών (Σχήμα 15Β) ή 60 λεπτών (Σχήμα 15Γ), αντίστοιχα. Στην περίπτωση της κερκετίνης, ο HIF-1α αποικοδομείται με ένα χρόνο ημιζωής περίπου 15 λεπτών (Σχήμα 15Δ). Επιβεβαιώσαμε, λοιπόν, ότι

σε όλες τις περιπτώσεις υποξικού στρες που χρησιμοποιήθηκαν απαιτείται συνεχής πρωτεϊνοσύνθεση για τη διατήρηση των επιπέδων του HIF-1α.



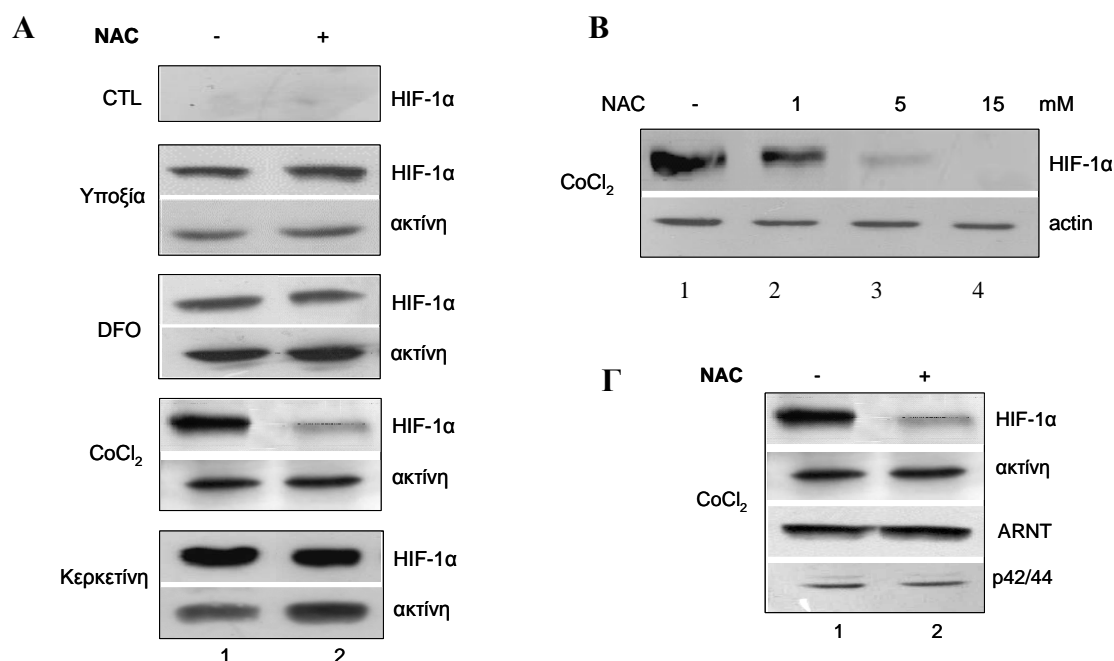
Σχήμα 15: Επίδραση της αναστολής της μετάφρασης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Το κυκλοεξιμίδιο (Chx) προστέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλα 15, 30 ή 60 λεπτά παρουσία των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι όλοι οι επαγωγείς επιδρούν στο επίπεδο της σταθεροποίησης του HIF-1α, η οποία, όμως, δεν είναι πλήρης κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, με τον επαγόμενο από

την υποξία HIF-1α να έχει το μικρότερο χρόνο ημιζωής και τον HIF-1α που επάγεται από το χλωριούχο κοβάλτιο τον μεγαλύτερο.

3.1.5 Ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) στην έκφραση του HIF-1α

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντίθετες αναφορές για το ρόλο των ROS στην επαγωγή του HIF-1α. Με σκοπό να διερευνηθεί η συμμετοχή των ROS στην επαγωγή του HIF-1α στις συνθήκες υποξικού στρες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το αντιοξειδωτικό N-ακετυλοκυστείνη (NAC), πρόδρομη ένωση της γλουταθειόνης. Στα κύτταρα HeLa, η παρουσία 5mM NAC σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία δεσφερριτοξασμίνης ή κερκετίνης δεν επηρέασαν την έκφραση του HIF-1α, ενώ η ίδια συγκεντρώση NAC παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου οδήγησε σε μείωση της επαγωγής του HIF-1α από το κοβάλτιο (Σχήμα 16Α).

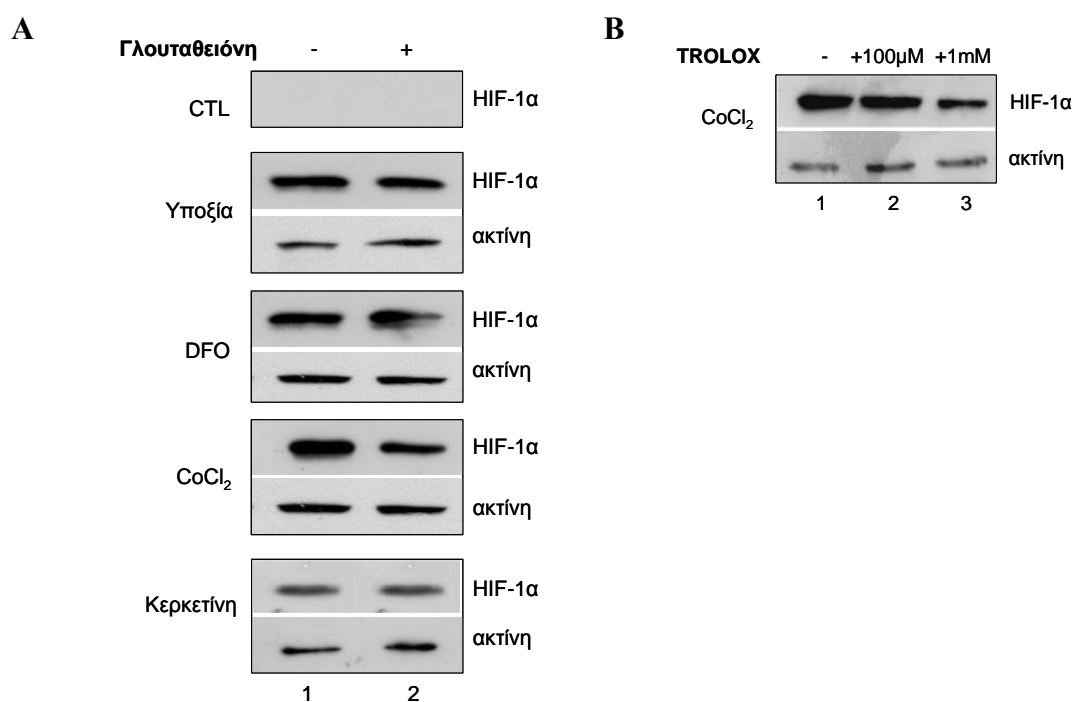


Σχήμα 16: Επίδραση του αντιοξειδωτικού NAC στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Α.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Η N-ακετυλοκυστείνη (NAC) προστέθηκε 2 ώρες πριν την προσθήκη των επαγωγέων. **Β.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου. Η NAC προστέθηκε 2 ώρες πριν την προσθήκη του κοβαλτίου σε συγκεντρώσεις από 1-15mM. **Γ.** Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που περιέχει τις πρωτεΐνες των κυττάρων με χλωριούχο κοβάλτιο, επώαστηκε, εκτός από αντίσωμα για τον HIF-1α και την ακτίνη, με αντίσωμα για τον ARNT και για την p42/44 MAP κινάση. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Επιπλέον, η δράση του NAC στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του NAC που χρησιμοποιήθηκε, μια και συγκεντρώσεις 1-2mM NAC μείωσαν ελάχιστα την έκφραση του HIF-1α ενώ η πρωτεΐνη εξαφανίστηκε με τη χρήση 15mM NAC (Σχήμα 16B). Για να επιβεβαιωθεί η ειδική δράση του NAC για τον HIF-1α έγινε έλεγχος της έκφρασης, εκτός της ακτίνης, δυο άλλων πρωτεϊνών, του ARNT, που είναι το ετεροδιμερές του HIF-1α και της p42/44 MAPK, μιας πρωτεΐνης με μικρό χρόνο ημιζωής. Η έκφραση και των δυο πρωτεϊνών δεν επηρεάστηκε παρουσία NAC (Σχήμα 16Γ).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη χρήση 10mM γλουταθειόνης. Παρουσία γλουταθειόνης δεν επηρεάστηκε η επαγωγή του HIF-1α από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης ή κερκετίνης, ενώ μειώθηκε η έκφραση του παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου (Σχήμα 17A).



Σχήμα 17: Εμπλοκή των ROS στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. A. Επίδραση γλουταθειόνης: Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Η γλουταθειόνη προστέθηκε 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. **B. Επίδραση Trolox:** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου. Το Trolox προστέθηκε ταυτόχρονα με το κοβάλτιο σε συγκέντρωση 100μM και 1mM. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Επειδή το NAC και πιθανόν η γλουταθειόνη μπορεί να συμπλοκοποιούν το κοβάλτιο, το πείραμα με το κοβάλτιο επαναλήφθηκε παρουσία του Trolox, ενός αναλόγου της βιταμίνης E που δεν αναμένεται να συμπλοκοποιεί μέταλλα. Παρουσία 100μM και 1mM Trolox, η επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο μειώθηκε με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του Trolox (Σχήμα 17B).

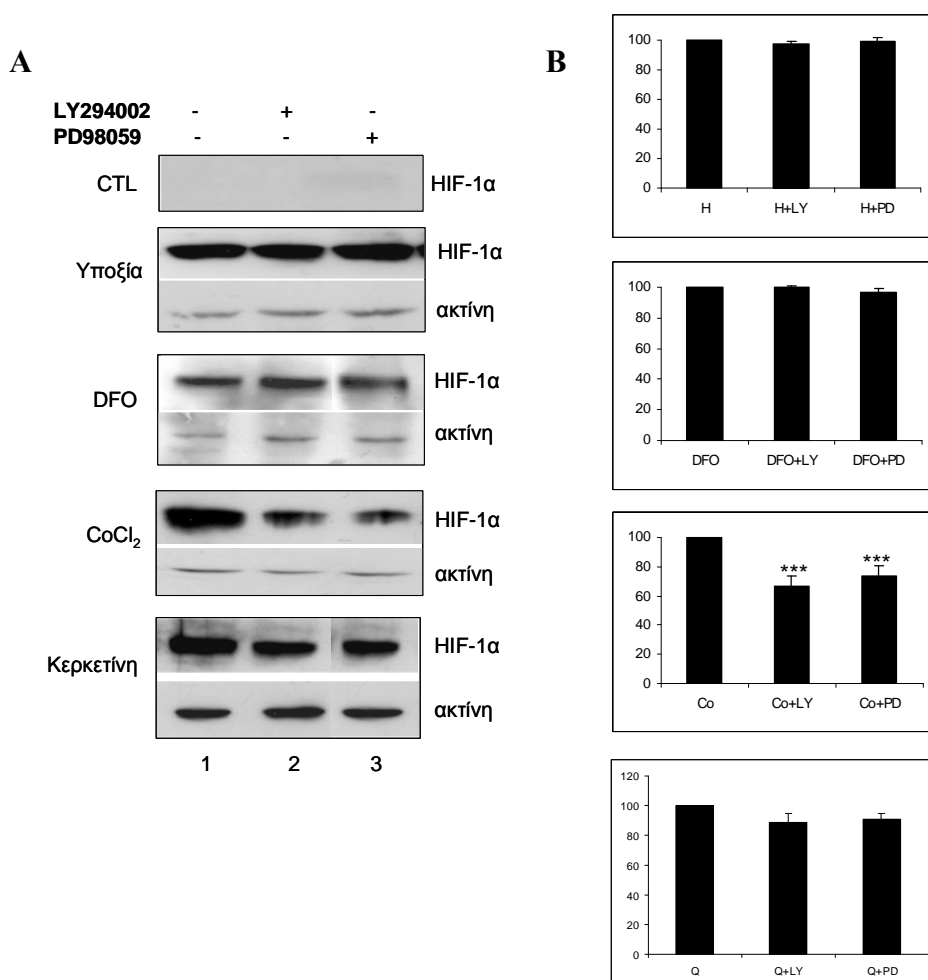
Τα παραπάνω αποτελέσματα (Σχήματα 16-17) δηλώνουν ότι τα ROS ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α από το χλωριούχο κοβάλτιο, αλλά όχι από την υποξία, τη δεσφερριοξαμίνη ή την κερκετίνη.

3.1.6 Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK 1/2 στην έκφραση του HIF-1α

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η συμμετοχή του μονοπατιού των MAP κινασών όσο και του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3K) στην επαγωγή του HIF-1α, αλλά τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες υποξικού στρες που χρησιμοποιούνται. Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος των μονοπατιών αυτών στις συνθήκες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το LY294002, ένας αναστολέας της PI3K και το PD98059, ένας αναστολέας της κινάσης MEK.

Παρουσία των αναστολέων LY294002 ή PD98059, η επαγωγή του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας ή από τη δεσφερριοξαμίνη ή την κερκετίνη δεν επηρεάστηκε. Αντίθετα, παρουσία των αναστολέων αυτών, η επαγωγή του HIF-1α από το χλωριούχο κοβάλτιο μειώθηκε (Σχήμα 18A). Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα έδειξε ότι η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 18B).

Επομένως, τα μονοπάτια των MAP κινασών και της PI3K ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α από το χλωριούχο κοβάλτιο, αλλά όχι από την υποξία, τη δεσφερριοξαμίνη ή την κερκετίνη.



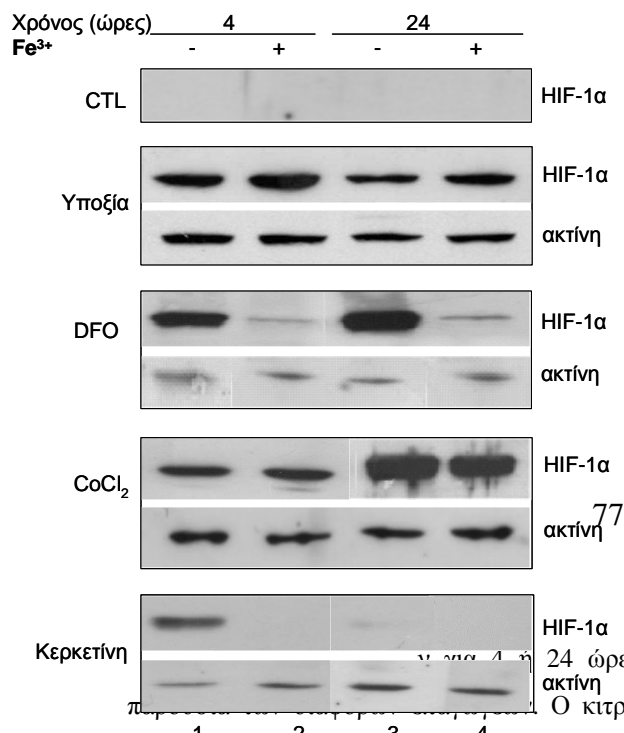
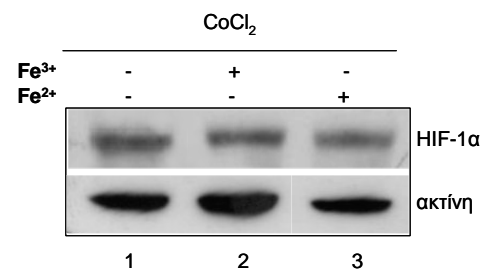
Σχήμα 18: Επίδραση των μονοπατιών PI3K και MAPK στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. **A.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Οι αναστολείς LY294002 και PD98059 προστέθηκαν 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. **B.** Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων του HIF-1α από 3 ανεξάρτητα πειράματα (***=p<0.001).

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

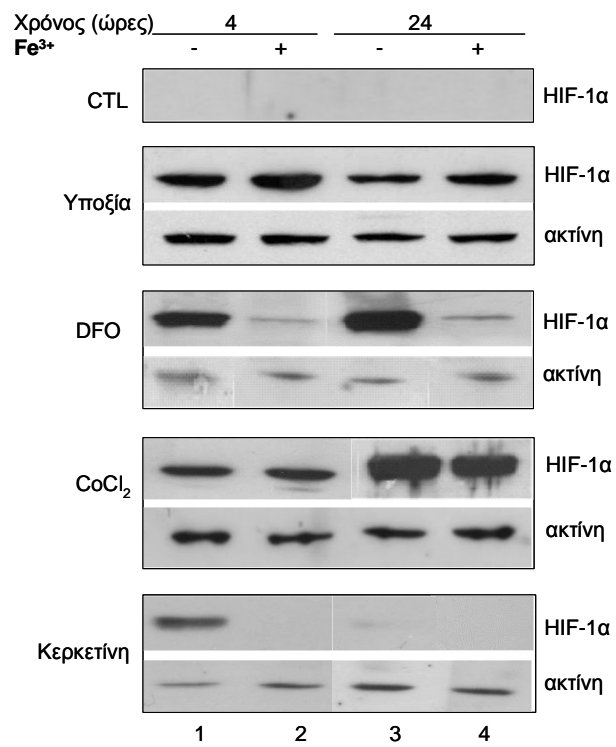
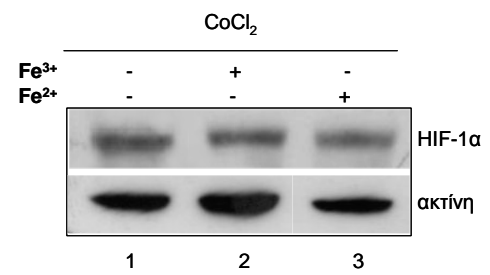
3.2.1 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου παρουσία διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa

Είναι γνωστό ότι η επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριζαμίνη γίνεται μέσω συμπλοκοποίησης του σιδήρου (Fe^{2+}), που είναι απαραίτητος για τη δράση των προλυλο-υδροξυλασών. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει πειράματα αναίρεσης της

δράσης της δεσφερριτοξαμίνης παρουσία περίσσειας σιδήρου. Επιβεβαιώθηκε

A**B**

24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή
 Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση
 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών
 κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο
 κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1
 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών
 ανεξάρτητων πειραμάτων.

A**B**

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κυτταρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κυτταρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

77

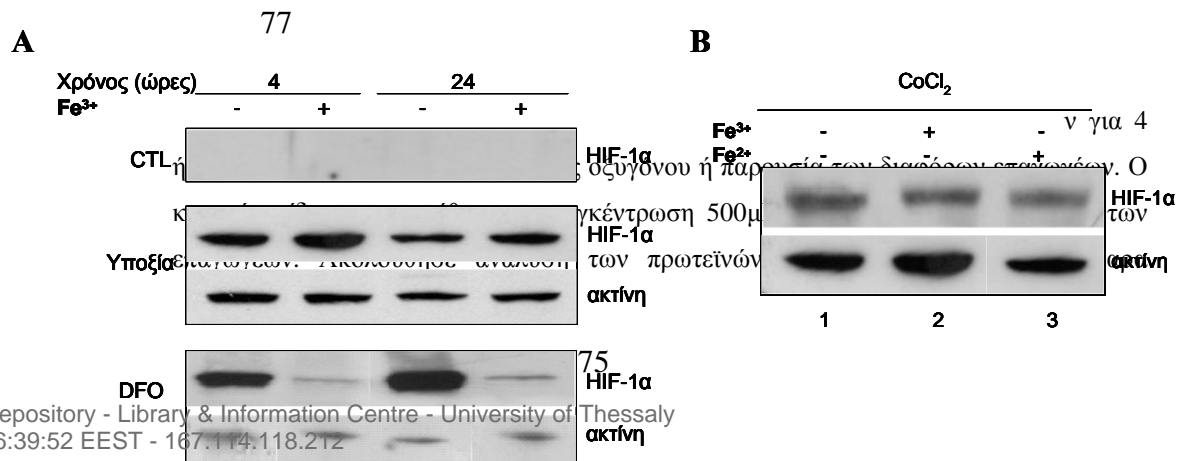
ν

για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κυτταρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κυτταρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

77

ν για

4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κυτταρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κυτταρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

77

ν για 4 ή

24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

77

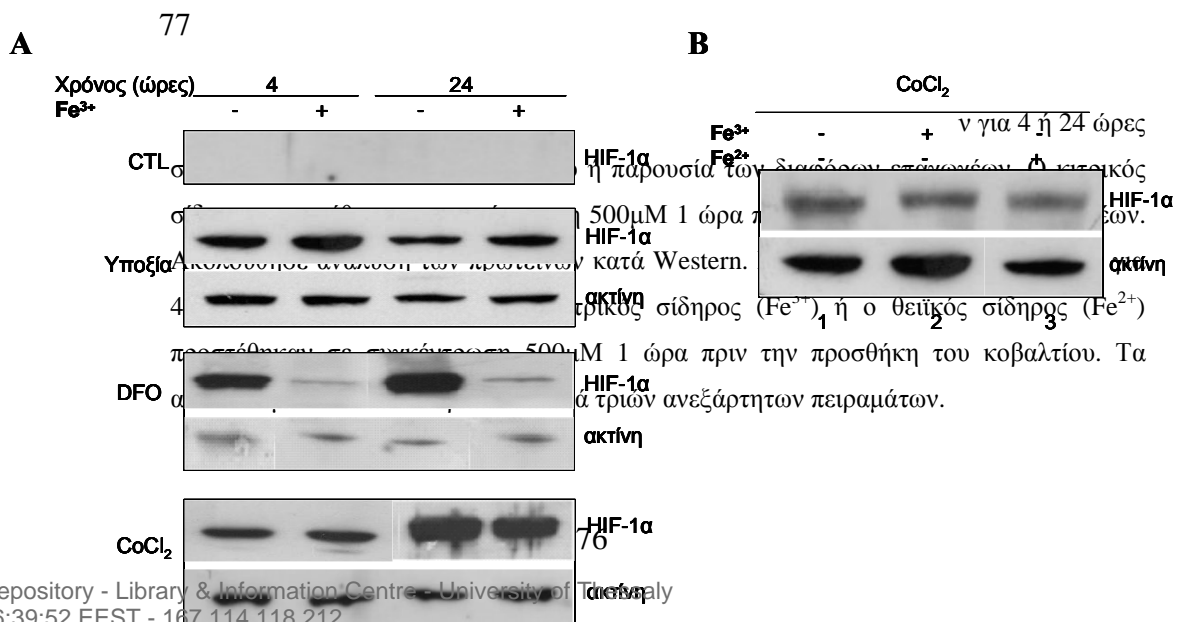
ν για 4 ή 24

ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

77

ν για 4 ή 24

ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για

4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

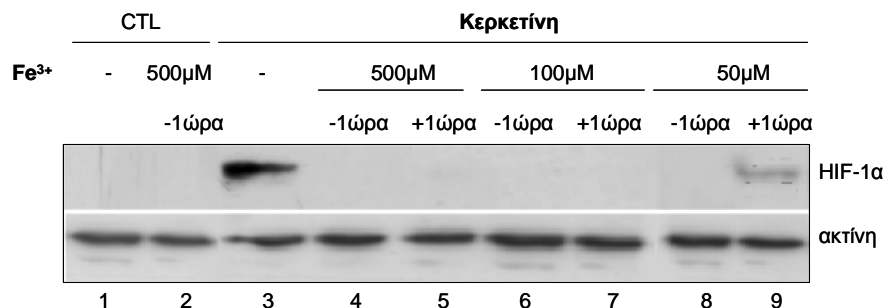
ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

ν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. **B.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κοβαλτίου. Ο κιτρικός σίδηρος (Fe^{3+}) ή ο θειικός σίδηρος (Fe^{2+}) προστέθηκαν σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη του κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Επειδή λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό δράσης της κερκετίνης, θέλοντας να μελετήσουμε περισσότερο το ρόλο του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από την κερκετίνη πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κιτρικού σιδήρου και δοκιμάστηκε η προσθήκη αυτού στα κύτταρα 1 ώρα πριν ή μετά την κερκετίνη. Παρατηρήθηκε ότι όταν ο σίδηρος ήταν σε περίσσεια (500μM) ή στην ίδια συγκέντρωση με την κερκετίνη (100μM), η επαγωγή του HIF-1α από την κερκετίνη αναιρούνταν είτε ο σίδηρος είχε προστεθεί πριν είτε μετά την κερκετίνη. Αλλά, όταν ο σίδηρος ήταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση από την κερκετίνη και είχε προστεθεί 1 ώρα μετά την κερκετίνη, η επαγωγή του HIF-1α μειωνόταν, αλλά η πρωτεΐνη ήταν ανιχνεύσιμη σε χαμηλά

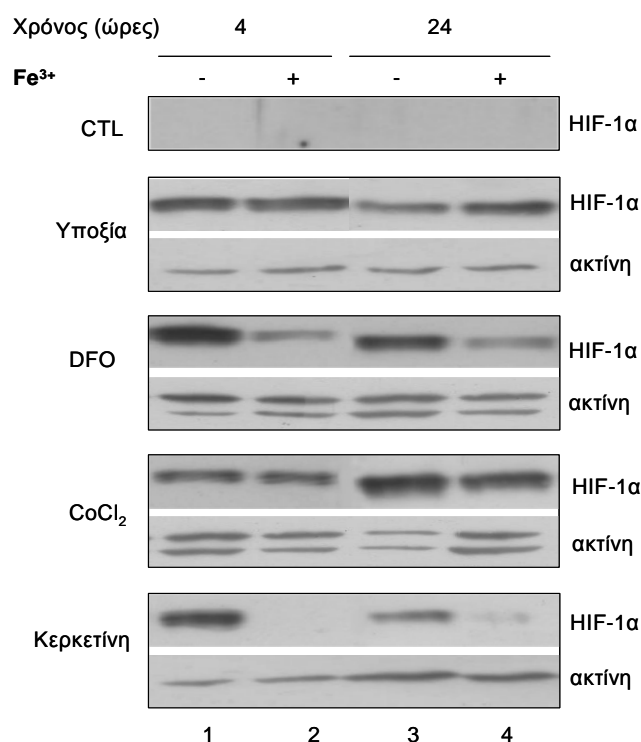
επίπεδα. Πιθανόν, στην περίπτωση αυτή, ο σίδηρος να μην επαρκεί για να επιτελεστεί μια σιδηρο-εξαρτώμενη αντίδραση, προφανώς αυτή των προλυλο-υδροξυλασών και ο HIF-1α να μην αποικοδομείται πλήρως (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Επίδραση του σιδήρου στην επαγόμενη από την κερκετίνη έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία κερκετίνης (100μM). Ο κυτρινός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM, 100μM ή 50μM 1 ώρα πριν ή μετά την προσθήκη της κερκετίνης. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western.

3.2.2 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου παρουσία διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HepG2

Επειδή τα αποτελέσματα της επίδρασης του κιτρικού σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο δεν ήταν αναμενόμενα, θέλαμε να δούμε αν είναι ειδικό για τα κύτταρα HeLa ή συμβαίνουν και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν για το λόγο αυτό κύτταρα HepG2, τα οποία αποκρίνονται στην υποξία, τη δεσφερριτοξαμίνη και το κοβάλτιο με επαγωγή του HIF-1α. Όντως, παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α επάγεται σε όλες τις συνθήκες υποξικού στρες που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 21). Παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου, η επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριτοξαμίνη ή την κερκετίνη μειώθηκε, ενώ η επαγωγή του δεν επηρεάστηκε από την υποξία ή το κοβάλτιο (Σχήμα 21).



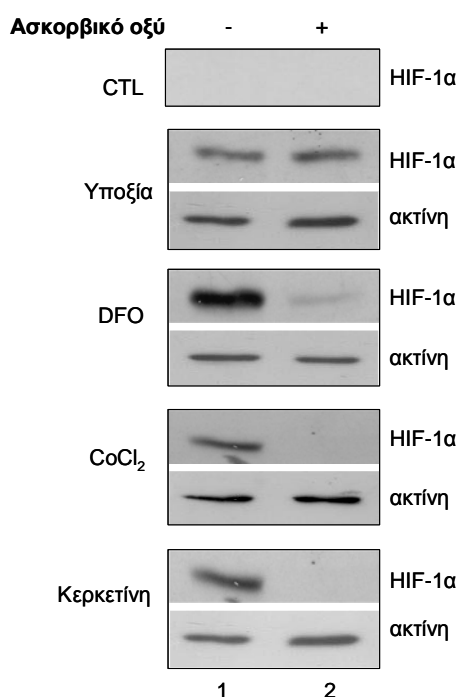
Σχήμα 21: Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HepG2. Τα κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν για 4 ή 24 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western.

3.2.3 Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa

Έχει προταθεί ότι κατά την ενζυμική αντίδραση στην οποία συμμετέχουν οι προλυλο-υδροξυλάσες, ο δισθενής σίδηρος οξειδώνεται σε τρισθενή σίδηρο, προκαλώντας την απενεργοποίηση των ενζύμων. Αυτό σημαίνει ότι εκτός από συμπλοκοποίηση του σιδήρου, η οξείδωσή του από διάφορες ουσίες μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση των προλυλο-υδροξυλασών και επαγωγή του HIF-1α. Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ο ρόλος του ασκορβικού οξέος είναι να διατηρεί το σίδηρο στη δισθενή του μορφή. Επίσης, είναι γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ στα κύτταρα απελευθερώνει σίδηρο από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες σιδήρου, όπως είναι η φερριτίνη [165]. Για να μελετηθεί η επίδραση του ασκορβικού οξέος στην επαγωγή του HIF-1α, έγινε προσθήκη 100μM

ασκορβικού οξέος ταυτόχρονα με τους διάφορους επαγωγείς σε κύτταρα HeLa. Όπως αναμενόταν, παρατηρήθηκε ότι, στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης ή της κερκετίνης, η παρουσία του ασκορβικού οξέος μείωσε την επαγωγή του HIF-1α, ενώ δεν την επηρέασε στην περίπτωση της υποξίας. Αντίθετα με τα αποτελέσματα της προσθήκης περίσσειας εξωγενούς σιδήρου, όμως, η παρουσία του ασκορβικού οξέος μείωσε την επαγωγή του HIF-1α και από το χλωριούχο κοβάλτιο (Σχήμα 22).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δράση του κοβαλτίου, της δεσφερριοξαμίνης και της κερκετίνης σχετίζεται με το σίδηρο, αλλά όχι η δράση της υποξίας.

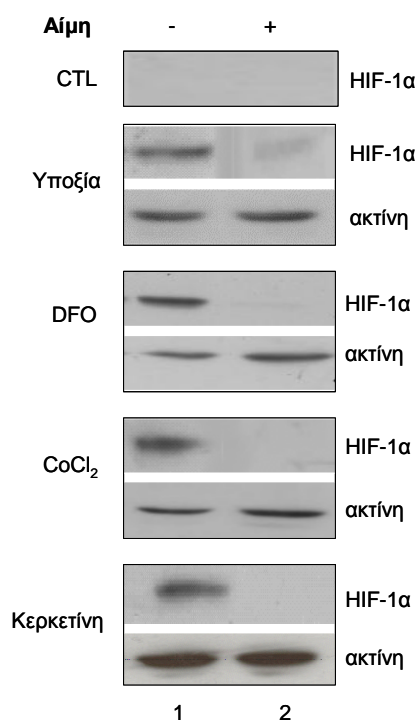


Σχήμα 22: Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Το ασκορβικό οξύ προστέθηκε σε συγκέντρωση 100μM ταυτόχρονα με τους επαγωγείς. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.4 Επίδραση της αίμης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa

Η αίμη είναι μια ένωση που περιέχει συμπλοκοποιημένο Fe^{2+} και λειτουργεί, όπως ο κιτρικός σίδηρος, ως δωρητής σιδήρου. Ωστόσο, έχει πλειοτροπικές δράσεις [166] συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητας να καταστρέφει το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων και, κατά την αποικοδόμησή της προς χολερυθρίνη από την οξυγονάση της αίμης, ελευθερώνεται εκτός από Fe^{2+} και CO. Για να μελετηθεί η

επίδραση της αίμης στην έκφραση του HIF-1α και να συγκριθεί με την αντίστοιχη του κιντρικού σιδήρου, έγινε προσθήκη 100μM αίμης 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων σε κύτταρα HeLa. Παρατηρήθηκε ότι τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και παρουσία δεσφερριτοξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης η έκφραση του HIF-1α πρακτικά εξαφανίστηκε (Σχήμα 23). Επομένως, σε αντίθεση με τον κιντρικό σίδηρο, η αίμη αναιρεί την επαγωγή του HIF-1α και από την υποξία και το κοβάλτιο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δράση της αίμης δε σχετίζεται μόνο με τη διαθεσιμότητα του σιδήρου, αλλά πιθανόν και με άλλες ιδιότητές της. Π.χ., έχει δείχθει ότι ουσίες που διαταράσσουν το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων αυξάνουν τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε αποικοδόμηση του HIF-1α, ακόμη και σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου [80] και ότι υψηλές συγκεντρώσεις CO αναστέλλουν την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1α [104].



Σχήμα 23: Επίδραση της αίμης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Η αίμη προστέθηκε σε συγκέντρωση 100μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.5 Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου σε κύτταρα HeLa

Έχοντας μελετήσει την επίδραση του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη και την κερκετίνη και για να δοθεί μια άμεση απάντηση στην υπόθεση ότι οι δυο αυτοί επαγωγείς δρουν συμπλοκοποιώντας το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δράση των προλυλο-υδροξυλασών, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ελεύθερου σιδήρου, δηλαδή του σιδήρου που βρίσκεται στο μεταβολικά ενεργό διαμέρισμα του κυττάρου (LIP, labile iron pool) στο εσωτερικό των κυττάρων HeLa παρουσία ή απουσία δεσφερριοξαμίνης ή κερκετίνης. Ο προσδιορισμός έγινε με τη χρήση της καλσεΐνης και μικροσκοπίου φθορισμού. Η καλσεΐνη είναι μια ένωση που δε φθορίζει όταν συμπλοκοποιεί τον ελεύθερο σίδηρο, ενώ φθορίζει όταν παραμένει ελεύθερη. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι σε κύτταρα HeLa, που δεν είχε γίνει προσθήκη επαγωγέων, τα επίπεδα φθορισμού ήταν πολύ χαμηλά εξαιτίας αυξημένων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου. Στα κύτταρα που είχαν κατεργαστεί για 4 ώρες με δεσφερριοξαμίνη, ο ελεύθερος σίδηρος ήταν μειωμένος και επομένως υπήρχε αύξηση του φθορισμού. Επιπλέον, η προσθήκη περίσσειας κυτρικού σιδήρου παρουσία δεσφερριοξαμίνης στα κύτταρα μείωσε τα επίπεδα του φθορισμού. Παρόμοια εικόνα είχαμε και στην περίπτωση που τα κύτταρα είχαν καλλιεργηθεί για 4 ώρες παρουσία κερκετίνης. Ο φθορισμός παρουσία κερκετίνης ήταν ιδιαίτερα έντονος, αλλά παρουσία περίσσειας κυτρικού σιδήρου τα επίπεδα φθορισμού μειώνονταν δραστικά (Σχήμα 24). Παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή μείωση του φθορισμού, είχαμε όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία δεσφερριοξαμίνης ή κερκε

ματα είναι αντιπροσωπευτικά

δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο

ανεξάρτητων πειραμάτων.

88

No addition

 $+ \text{Fe}^{3+}$

+ Asc

Control

Quercetin

Quercetin

ματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

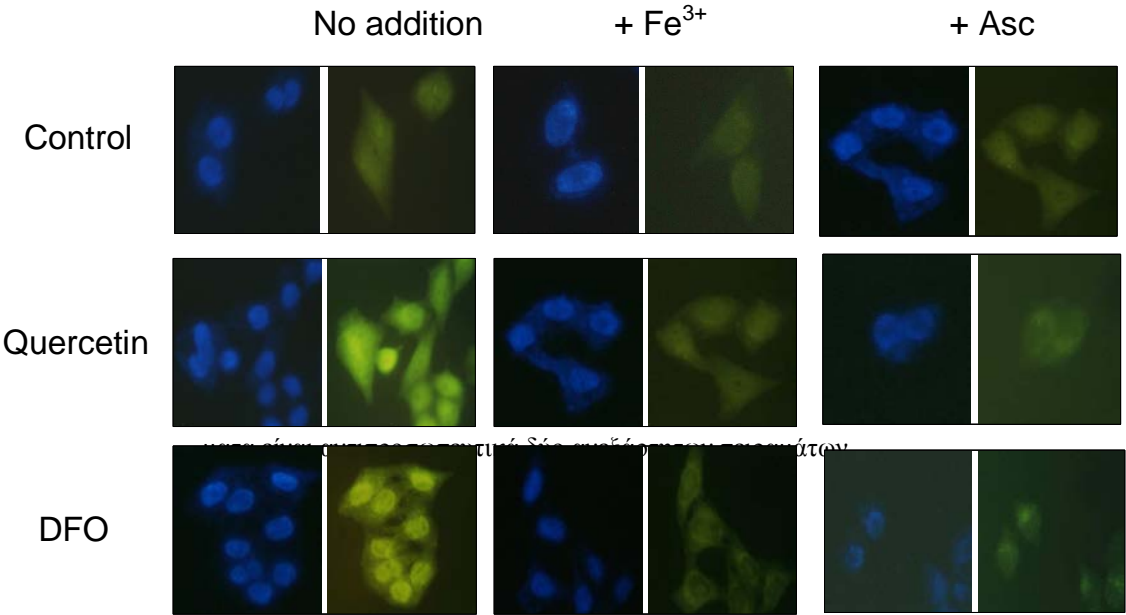
88

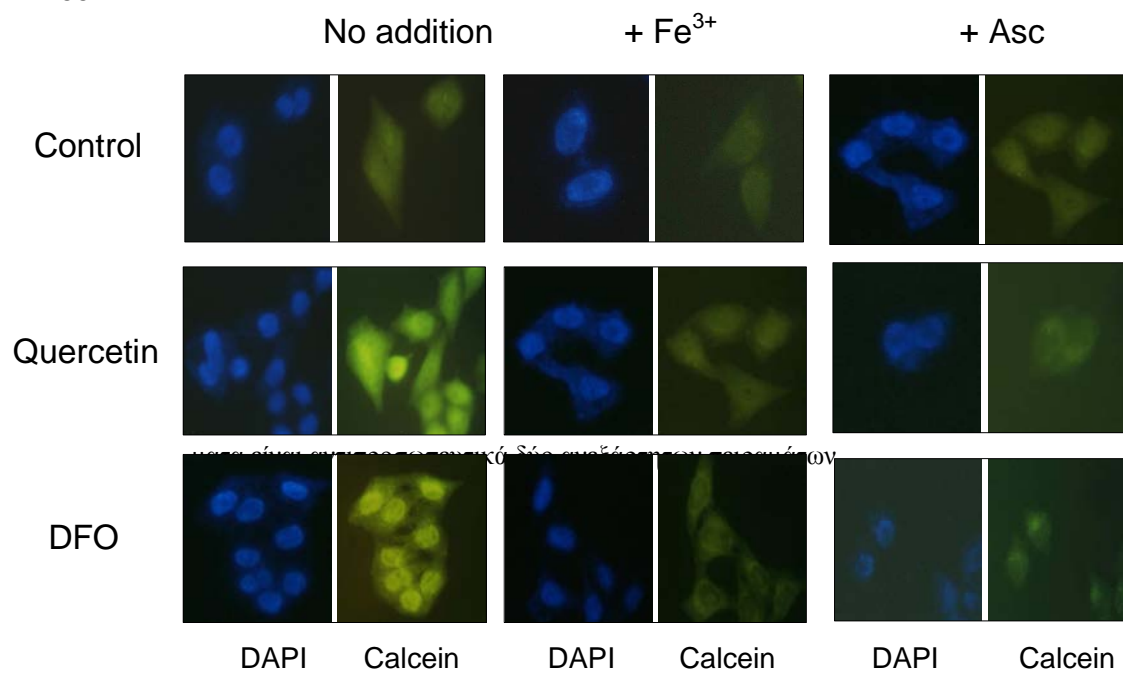
ματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

88

ματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

88





α είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματ

είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματα

ματα

είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι

αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι

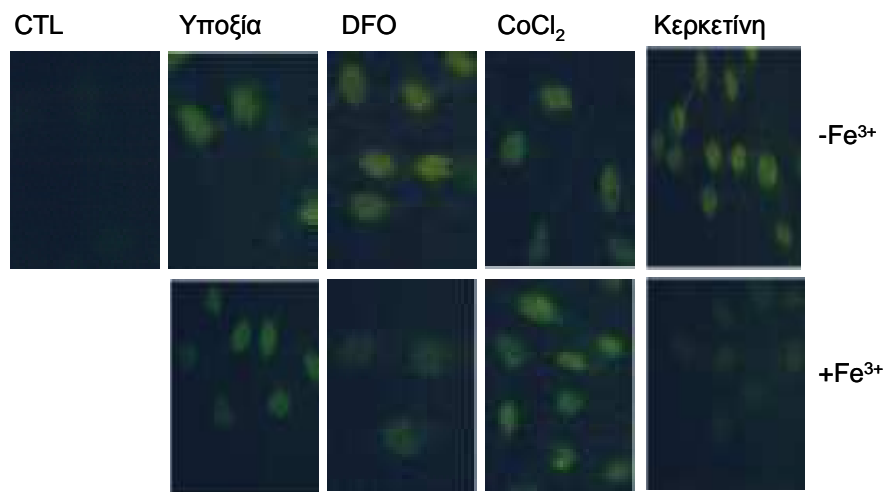
δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι αντιπροσωπευτικά

δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ματα είναι αντιπροσωπευτικά

ματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΠΑΓΩΓΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ HIF-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

Για να επιβεβαιωθούν τα πειράματα με την επίδραση του κιτρικού σιδήρου στην έκφραση του HIF-1α και για να διερευνηθεί αν ο κιτρικός σίδηρος επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού. Είναι γνωστό ότι ο HIF-1α, για να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, μετακινείται στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας τον HIF-1. Θέλοντας να δούμε αν ο HIF-1α που επάγεται από τους διάφορους επαγωγείς εντοπίζεται στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία των επαγωγέων και στη συνέχεια έγινε επώαση με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για τον HIF-1α. Με τη χρήση ενός δευτέρου αντισώματος-FITC παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α δεν εντοπίζεται σε κύτταρα HeLa τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής συγκέντρωσης οξυγόνου (Σχήμα 25). Στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο κοβάλτιο, υπήρχε ένα δυνατό σήμα για τον HIF-1α, το οποίο όπως αναφέρεται και από άλλους, εντοπιζόταν στον πυρήνα των κυττάρων. Παρουσία κιτρικού σιδήρου, η ένταση του φθορισμού δεν επηρεάστηκε, κάτι το οποίο συμφωνεί με την ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western (Σχήμα 19). Στην περίπτωση της υποξίας, η εικόνα ήταν παρόμοια τόσο απουσία κιτρικού σιδήρου όσο και παρουσία του. Στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκε δεσφερριοξαμίνη ή κερκετίνη, ο HIF-1α εντοπιζόταν στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά παρουσία κιτρικού σιδήρου το σήμα ήταν λιγότερο έντονο (Σχήμα 25), κάτι το οποίο, επίσης, συμφωνεί με τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρωτεϊνών κατά Western (Σχήμα 19).



Σχήμα 25: Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν τους επαγωγείς. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων σε καλυπτρίδες, επώαση με αντίσωμα για τον HIF-1α, και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι προσθήκη περίσσειας σιδήρου δεν επηρεάζει την έκφραση και υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α που επάγεται από την υποξία ή το κοβάλτιο, ενώ μειώνει την έκφρασή του από τη δεσφερριοξαμίνη ή την κερκετίνη.

3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ HIF-1

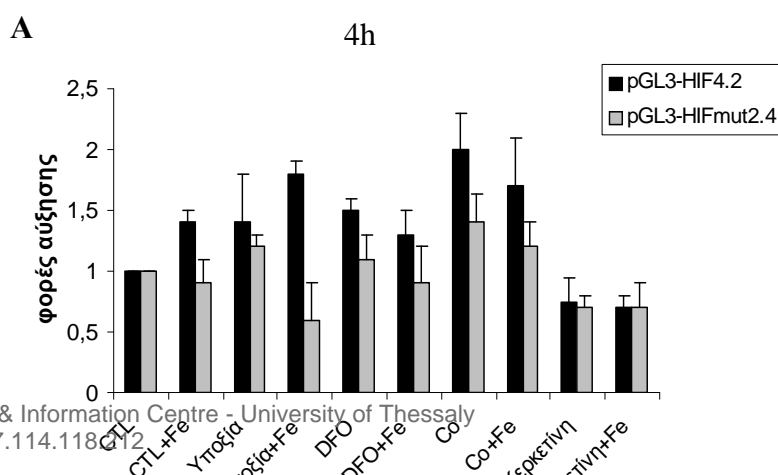
3.4.1 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa

Αφού μελετήθηκε η επαγωγή του HIF-1α και η επίδραση της περίσσειας σιδήρου στα επίπεδά του σε κύτταρα HeLa, το επόμενο ερώτημα ήταν αν ο επαγόμενος HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός σε όλες τις περιπτώσεις. Για το σκοπό αυτό, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) στον προαγωγέα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης και μετρήθηκε η ενεργότητα του παραγόμενου ενζύμου της λουσιφεράσης.

Τα πρώτα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν έχουν 3 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης και είναι το pGL3-HIF4.2 και το pGL3-HIFmut2.4. Στο δεύτερο πλασμίδιο τα αντίγραφα των HRE είναι μεταλλαγμένα και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

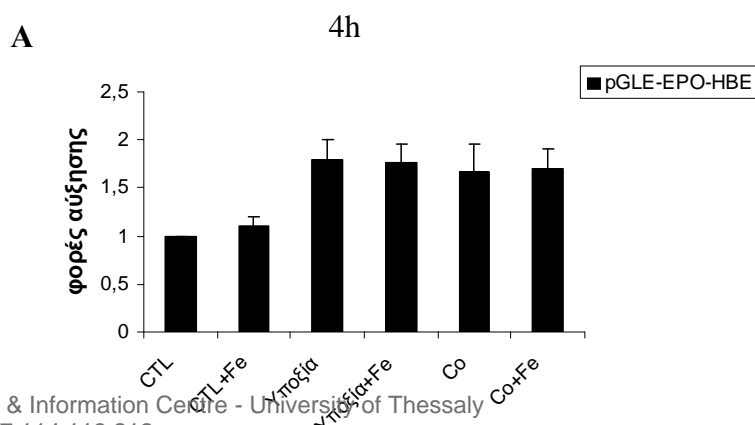
Αρχικά, εξετάστηκε αν ο HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός μετά από 4 ώρες επώασης των κυττάρων με τους διάφορους επαγωγείς. Παρατηρήθηκε ότι έπειτα από τη διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-HIF4.2 και επώαση σε συνθήκες υποξίας, υπήρξε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης κατά 1,5 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς αυξήθηκε ελάχιστα όταν χρησιμοποιήθηκε περίσσεια κιτρικού σιδήρου. Στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης η αύξηση στην έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης ήταν παρόμοια (1,5 φορά) και δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την περίσσεια κιτρικού σιδήρου. Στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου παρατηρήθηκε αύξηση κατά 2 φορές της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης παρουσία ή όχι περισσειας κιτρικού σιδήρου. Τέλος, η κερκετίνη δεν αύξησε την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης, αλλά αντίθετα τα επίπεδα της έκφρασης, παρουσία ή απουσία κιτρικού σιδήρου ήταν ελαφρώς χαμηλότερα των κυττάρων μαρτύρων. Το μεταλλαγμένο πλασμίδιο pGL3-HIFmut2.4 έδωσε, σε όλες τις συνθήκες, τιμές μικρότερες από το pGL3-HIF4.2 και παρόμοιες με τα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν απουσία επαγωγέα για 4 ώρες (Σχήμα 26Α), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα του HIF-1, αν και μικρή, εξαρτάται από την ύπαρξη HRE.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η παρατηρούμενη μικρή εξαρτώμενη από τον HIF-1 μεταγραφική ενεργότητα δεν οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα εκτέθηκαν στους επαγωγείς για σύντομο χρονικό διάστημα (4 ώρες), επαναλάβουμε τα πειράματα και έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης έπειτα από 20 ώρες επώασης των κυττάρων μόνο σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου. Τα αποτελέσματα δε διέφεραν σημαντικά, αφού παρατηρήθηκαν οι ίδιες τιμές αύξησης της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (Σχήμα 26Β). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η χαμηλή εξαρτώμενη από τον HIF-1 ενεργότητα δεν είναι αποτέλεσμα της βραχείας έκθεσης των διαμολυσμένων κυττάρων στους επαγωγείς, αλλά οφείλεται μάλλον στο συγκεκριμένο πλασμίδιο.



Σχήμα 26: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa με χρήση του πλασμιδίου pGL3-HIF4.2. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-HIF4.2 ή pGL3-HIFmut2.4 για 16 ώρες και έπειτα προστέθηκαν οι επαγωγείς για 4 ώρες (διάγραμμα A) ή 20 ώρες (διάγραμμα B). Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν τους επαγωγείς. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα.

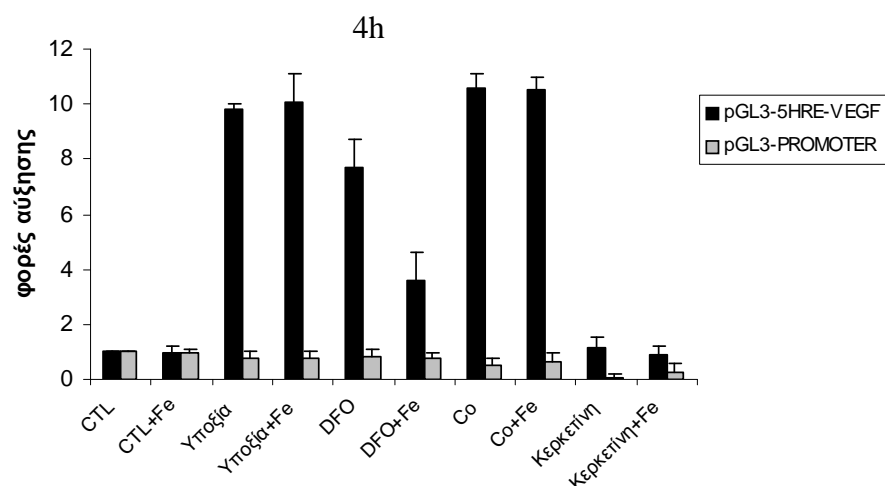
Παρόμοιο με τα προηγούμενα είναι το πλασμίδιο pGL3-EPO-HBE, το οποίο, επίσης, περιέχει 3 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το πλασμίδιο αυτό και καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία χλωριούχου κοβαλτίου για 4 ή 20 ώρες. Οι τιμές της αύξησης της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης, για άλλη μια φορά δεν ξεπερνούσαν σε καμιά συνθήκη τις 1,7 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa με χρήση του πλασμιδίου pGL3-EPO-HBE. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-EPO-HBE για 16 ώρες και έπειτα προστέθηκαν οι επαγωγείς για 4 ώρες (διάγραμμα Α) ή 20 ώρες (διάγραμμα Β). Οι τιμές της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα.

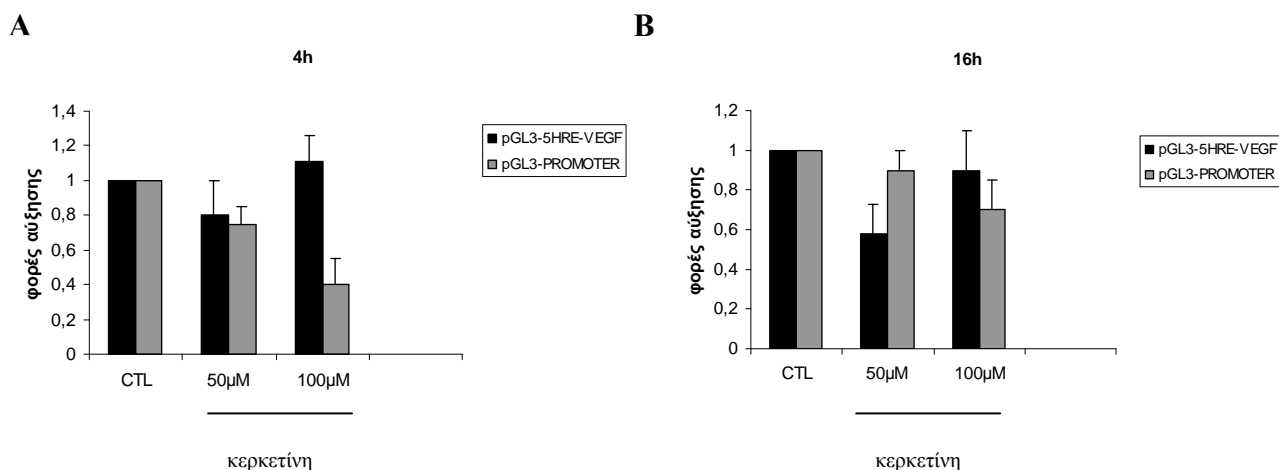
Τα αποτελέσματα με τη χρήση των προηγούμενων πλασμιδίων δεν ήταν ικανοποιητικά, καθώς οι τιμές της μεταγραφικής ενεργότητας ήταν χαμηλές. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκε ένα διαφορετικό πλασμίδιο, το pGL3-5HRE-VEGF, το οποίο περιέχει 5 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου του VEGF. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα πλασμίδιο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, αλλά χωρίς τα HRE, το pGL3-promoter. Έπειτα από τη διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF και επώση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, υπήρξε δεκαπλάσια αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς ήταν ίδια παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου. Στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης η αύξηση στην έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης ήταν περίπου 8 φορές, αλλά παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου μειώθηκε περίπου στις 4 φορές. Στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου παρατηρήθηκε περίπου 11 φορές αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης παρουσία ή όχι περίσσειας κιτρικού σιδήρου. Τέλος, η κερκετίνη δεν αύξησε πάνω από 1,2 φορές την

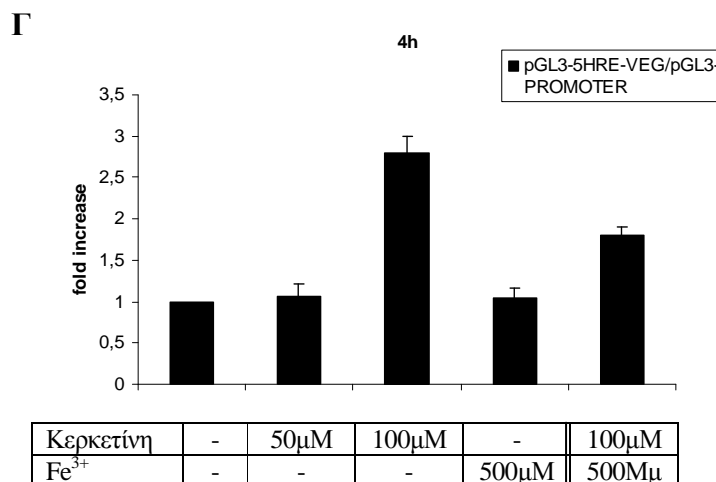
έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης, αλλά παρατηρήθηκε ότι, ενώ παρουσία όλων των επαγωγέων η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης του πλασμιδίου pGL3-promoter δεν αυξήθηκε, στην περίπτωση της κερκετίνης μειώθηκε σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά των φυσιολογικών κυττάρων (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa με χρήση του πλασμιδίου pGL3-5HRE-VEGF. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF για 16 ώρες και έπειτα προστέθηκαν οι επαγωγείς για 4 ώρες. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα.

Τα αποτελέσματα της κερκετίνης δημιούργησαν ορισμένα ερωτήματα σχετικά με τη δράση της κερκετίνης στην αναστολή της μεταγραφής. Γι' αυτό, τα πειράματα επαναλήφθηκαν χρησιμοποιώντας και μικρότερες συγκεντρώσεις κερκετίνης (50 και 100 μ M) και διαφορετικούς χρόνους επώασης των κυττάρων με τον επαγωγέα (4 και 16 ώρες). Βρήκαμε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF ήταν 60-120% αυτής των κυττάρων μαρτύρων (Σχήμα 29A και B), ενώ τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης του πλασμιδίου pGL3-promoter ήταν 40-90% των κυττάρων μαρτύρων.





Σχήμα 29: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη σε κύτταρα HeLa. A, B. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF για 16 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κερκετίνης και μετρήθηκε η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης για 4 ώρες (Σχήμα 29A) ή 16 ώρες (Σχήμα 29B). **Γ.** Έκφραση των αποτελεσμάτων της κερκετίνης του Σχήματος 29A ως λόγος της ενεργότητας που οφείλεται στο πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF προς το πλασμίδιο pGL3-PROMOTER. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα.

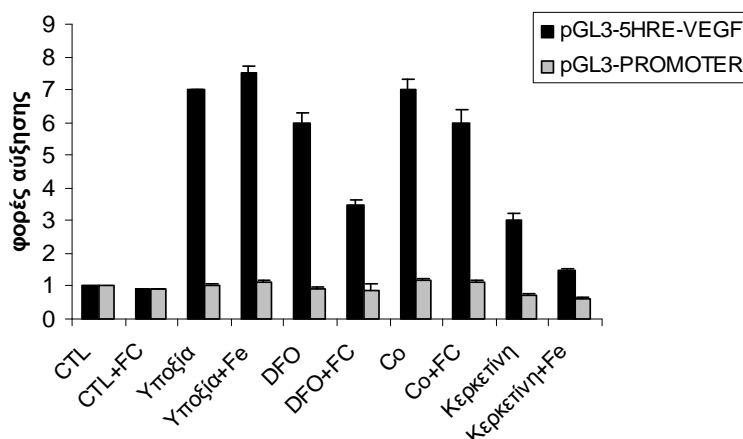
Αν, λοιπόν, ληφθεί υπόψη η γενική μείωση στην έκφραση των γονιδίων που προκαλεί η κερκετίνη στα κύτταρα HeLa, προκύπτει το διάγραμμα του σχήματος 19Γ όπου φαίνεται ότι επώαση με 100μM κερκετίνη για 4 ώρες οδηγεί σε HRE-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης κατά 2,8 φορές περίπου και ότι, παρουσία περίσσειας σιδήρου, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη μειώνεται στο ήμισυ (Σχήμα 29), όπως και με τη δεσφερριοξαμίνη (Σχήμα 28).

3.4.2 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HepG2

Τα πειράματα ελέγχου της εξαρτώμενης από τον HIF-1 μεταγραφικής ενεργότητας έγιναν και σε κύτταρα HepG2. Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF και ως αρνητικός μάρτυρας το πλασμίδιο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, αλλά χωρίς τα HRE, το pGL3-promoter. Μετά από τη διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF και επώαση σε συνθήκες

υποξίας, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 7 φορές της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς ήταν περίπου ίδια όταν χρησιμοποιήθηκε περίσσεια κιτρικού σιδήρου. Στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης η αύξηση στην έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης ήταν περίπου κατά 6 φορές, αλλά παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου μειώθηκε περίπου στις 3,5 φορές. Στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου είχαμε περίπου αύξηση κατά 7 φορές της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης και παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στις 6 φορές. Τέλος, η κερκετίνη δεν αύξησε πάνω από 3 φορές περίπου την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης, ενώ παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου μειώθηκε στις 1,5 φορές (Σχήμα 30) σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα.

Συμπεραίνουμε, ότι, σε γενικές γραμμές η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που επάγεται από την υποξία, τη δεσφερριοξαμίνη και το κοβάλτιο είναι παρόμοια στα κύτταρα HeLa και HepG2, ενώ ο HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη, αν και σημαντικά λιγότερο ενεργός από τον HIF-1 που επάγεται από τις άλλες συνθήκες υποξικού στρες, είναι ελαφρώς δραστικότερος στα HepG2.



Σχήμα 30: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα HeLa με χρήση του πλασμιδίου pGL3-5HRE-VEGF. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF για 16 ώρες και έπειτα προστέθηκαν οι επαγωγείς για 4 ώρες. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν τους επαγωγείς. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος δυο πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα.

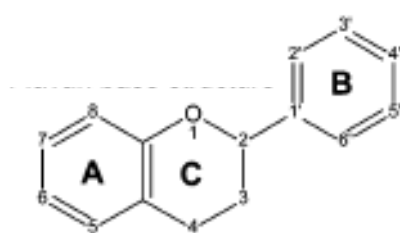
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ HIF-1α

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα ενώσεων με ποικίλες διαφορετικές ιδιότητες. Το πρώτο φλαβονοειδές που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η κερκετίνη και τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι επάγει τον HIF-1α λόγω συμπλοκοποίησης του σιδήρου που απαιτείται για τη δράση των προλυλο-υδροξυλασών. Η κερκετίνη είναι ένα φλαβονοειδές, το οποίο εξαιτίας της δομής του έχει ικανότητα ισχυρής δέσμευσης του σιδήρου. Για να διερευνηθεί η σχέση της δομής με τη δράση των φλαβονοειδών, δοκιμάστηκε μια σειρά φλαβονοειδών με διαφορετική ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου και μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά της επαγωγής του HIF-1α.

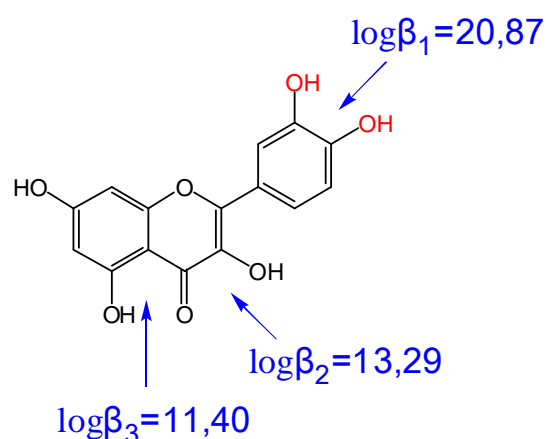
3.5.1 Χαρακτηριστικά της δομής των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που διακρίνονται σε διάφορες ομάδες, αλλά όλες έχουν μια κοινή δομή, που φαίνεται στο Σχήμα 31Α. Αντικαταστάσεις στο δακτύλιο C ορίζουν τις διάφορες τάξεις των φλαβονοειδών και αντικαταστάσεις στους άλλους δακτυλίους τα διάφορα μέλη της κάθε τάξης [167].

Η κερκετίνη ανήκει στην τάξη των φλαβονών και θεωρείται ένα από τα πιο ικανά αντιοξειδωτικά μόρια. Η κερκετίνη διαθέτει 3 πιθανές θέσεις συμπλοκοποίησης κατιόντων (γειτονικές ομάδες OH), μια στο δακτύλιο B, μια στο δακτύλιο C και μια μεταξύ του δακτυλίου A και C. Έχει υπολογιστεί ότι η ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου είναι μεγαλύτερη στην θέση που βρίσκεται στον B δακτύλιο με έναν συντελεστή $\log\beta$ ίσο με 20,87 [167]. Στη θέση αυτή υπάρχουν δυο OH, κάτι που διαφέρει από τις υπόλοιπες θέσεις (Σχήμα 31B). Ο συντελεστής $\log\beta$ είναι ο λογάριθμος του συντελεστή σταθερότητας του συμπλόκου φλαβονοειδούς-σιδήρου.



B

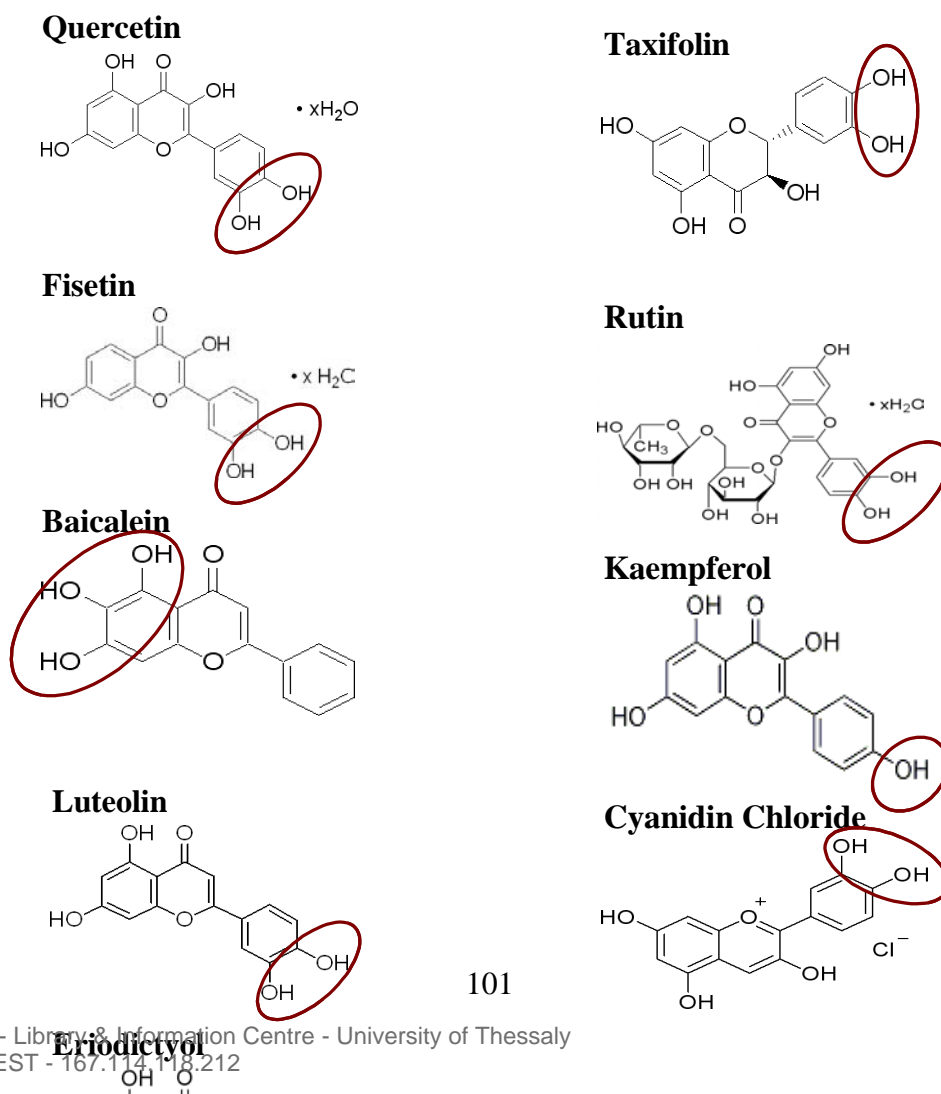


A

Σχήμα 31: Α. Χημική δομή φλαβονοειδών, όπου φαίνονατι οι 3 δακτύλιοι που είναι κοινοί σε όλα τα φλαβονοειδή.

Β. Χημική δομή κερκετίνης. Η κερκετίνη διαθέτει 3 θέσεις δέσμευσης του σιδήρου με διαφορετικά logβ. Η ισχυρότερη δέσμευση παρατηρείται στη θέση που βρίσκεται στο Β δακτύλιο [168].

Με βάση την παρατήρηση αυτή για την ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου στην κερκετίνη και αρχικά πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί με φλαβονοειδή στο εργαστήριο διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή ορίζεται από 2 ιδιότητες: από την δυνατότητα παθητικής διάχυσης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, που ορίζεται από το συντελεστή λιποφιλικότητας logP και από την ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου. Δοκιμάστηκε, λοιπόν, μια σειρά φλαβονοειδών με διαφορετική δομή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 32 και διαφορετική λιποφιλικότητα (Πίνακας 1) και έγινε πρόβλεψη της επαγωγής του HIF-1α με βάση τη σιδηροδεσμευτική ικανότητα και λιποφιλικότητά τους.



Σχήμα 32: Χημική δομή φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για επαγωγή του HIF-1α. Σε κύκλο τονίζονται οι πιθανές θέσεις συμπλοκοποίησης του σιδήρου στο B δακτύλιο (δακτύλιος A στην περίπτωση της μπαϊκαλεΐνης).

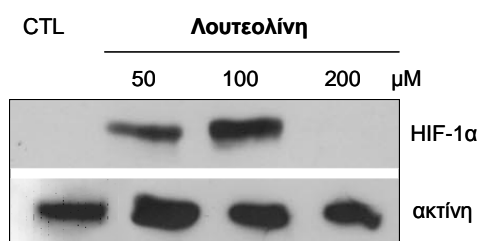
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Λιποφιλικότητα φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν και πρόβλεψη επαγωγής του HIF-1α λαμβάνοντας υπόψη και τη δομή τους από Σχήμα 31.

$\log P$ = λογάριθμος συντελεστή κατανομής οκτανόλης / νερού.

3.5.2 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης φλαβονοειδών για έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ	logP	ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ HIF-1α
Κερκετίνη (Quercetin)	++	2.26	ναι
Φισετίνη (Fisetin)	++	2.2	ναι
Μπαϊκαλείνη (Baicalein)	+++	1.31	ναι
Λουτεολίνη (Luteolin)	++	2.05	ναι
Εριοδικτυόλη (Eriodictyol)	++	1.55	ναι
Ταξιφολίνη (Taxifolin)	++	0.25	όχι
Ρουτίνη (Rutin)	++	- 0.4	όχι
Καμφερόλη (Kaempferol)	+	2.72	όχι
Χλωριούχος κυανιδίνη (Cyanidine chloride)	++	0	;

Αρχικά έγιναν κάποια πειράματα ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση των φλαβονοειδών, στην οποία παρατηρείται έντονη έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α. Τα φλαβονοειδή προστέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, από 50-200μM σε κύτταρα HeLa για 4 ώρες.



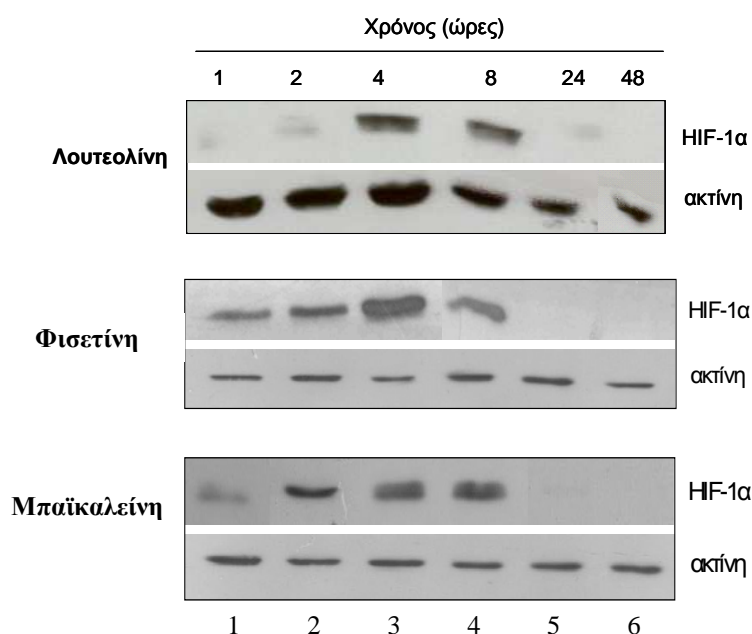
Σχήμα 33: Ανάλυση κατά Western της δόσοεξαρτώμενης επαγωγής του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για 4 ώρες και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η φόρτωση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με αντίσωμα έναντι της ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Από τα φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή του HIF-1α από τη ρουτίνη, την καμφερόλη, την ταξιφολίνη και τη χλωριούχο κυανιδίνη. Στην περίπτωση της λουτεολίνης, ο HIF-1α επαγόταν με τη χρήση 50μM, η επαγωγή ήταν μεγαλύτερη χρησιμοποιώντας 100μM, αλλά δεν επαγόταν με 200μM. Το πρότυπο αυτό έκφρασης του HIF-1α είναι παρόμοιο με αυτό που είχαμε με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης (Σχήμα 11Γ). Στην περίπτωση του φισετίνης, παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση 50μM η επαγωγή του HIF-1α ήταν μικρή και η καλύτερη επαγωγή της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με τη χρήση 100μM, ενώ μειώθηκε με τη χρήση 200μM. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις μπαϊκαλεΐνης, παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α επαγόταν με τη χρήση 100μM και ήταν μέγιστος με τη χρήση 200μM. Τέλος, στην περίπτωση της εριοδικτυόλης, υπήρχε μια μικρή επαγωγή του HIF-1α με τη χρήση 200μM (Σχήμα 33).

Παρατηρώντας τη δομή των φλαβονοειδών (Σχήμα 32) και λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα διάχυσής τους μέσω των μεμβρανών (Πίνακας 1) βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα φλαβονοειδή που επάγουν τον HIF-1α είναι όντως αυτά που συνδυάζουν ισχυρή συμπλοκοποίηση του σιδήρου και μεγάλη λιποφιλικότητα ($\log P \sim 2$), γεγονός που επιβεβαιώνει τις προβλέψεις μας.

3.5.3 Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των φλαβονοειδών στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa

Αφού προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του κάθε φλαβονοειδούς, επιχειρήθηκε να γίνει σύγκριση των χαρακτηριστικών της επαγωγής του HIF-1α από τις ενώσεις αυτές και τους επαγωγείς που είχαν μελετηθεί ως τώρα. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής της επαγωγής του HIF-1α με τα τρία φλαβονοειδή που βρήκαμε ότι επάγουν τον HIF-1α, σε συγκέντρωση 100μM.



Σχήμα 34: Ανάλυση κατά Western της κινητικής της επαγωγής του HIF-1α σε κύτταρα HeLa.

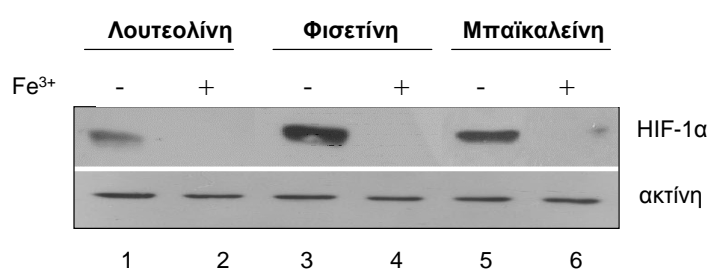
Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διαφορετικούς χρόνους παρουσία λουτεολίνης (100μM), φισετίνης (100μM) ή μπαϊκαλείνης (100μM). Η φόρτωση ίσων ποσοτήτων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με αντίσωμα έναντι της ακτίνης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Παρουσία λουτεολίνης, ο HIF-1α ήταν ανιχνεύσιμος από την 2^η ώρα, εκφραζόταν μέγιστα στις 4-8 ώρες και μειωνόταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 24 και 48 ώρες. Παρουσία φισετίνης ή μπαϊκαλείνης, η επαγωγή του HIF-1α ήταν

ανιχνεύσιμη νωρίτερα (στην 1η ώρα), αλλά έπαυε να είναι ανιχνεύσιμη στις 24 και 48 ώρες (Σχήμα 34). Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, η κινητική της επαγωγής του HIF-1α από τη λουτεολίνη, φισετίνη και μπαϊκαλεΐνη είναι παρόμοια με αυτή της κερκετίνης (Σχήμα 12).

3.5.4 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από διάφορα φλαβονοειδή σε κύτταρα HeLa

Τα αρχικά πειράματα με τη χρήση της κερκετίνης είχαν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η κερκετίνη, και πιθανόν τα άλλα φλαβονοειδή που επάγουν τον HIF-1α, δρουν μέσω συμπλοκοποίησης του σιδήρου. Για να διερευνηθεί αυτός ο μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών, χρησιμοποιήθηκαν 500μM κιτρικού σιδήρου 1 ώρα πριν την προσθήκη 100μM λουτεολίνης, φισετίνης ή μπαϊκαλεΐνης στα κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου, όντως, αναίρεσε την επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή (Σχήμα 35).



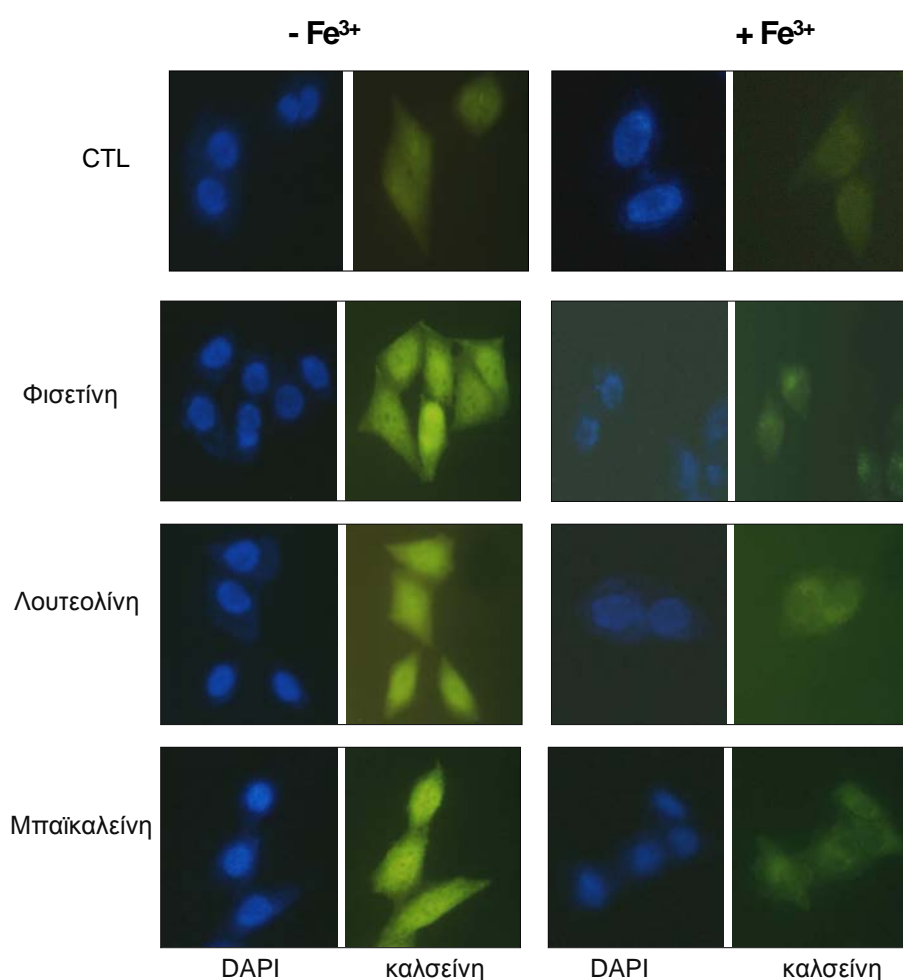
Σχήμα 35: Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία λουτεολίνης (100μM), φισετίνης (100μM) ή μπαϊκαλεΐνης (100μM). Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν την προσθήκη των φλαβονοειδών. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.5.5 Μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου παρουσία διαφόρων φλαβονοειδών σε κύτταρα HeLa

Έχοντας μελετήσει την επίδραση του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ελεύθερου σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων HeLa παρουσία ή απουσία των φλαβονοειδών λουτεολίνη, φισετίνη ή μπαϊκαλεΐνη. Ο προσδιορισμός έγινε με τη χρήση της καλσεΐνης και μικροσκοπίου φθορισμού. Παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα HeLa, στα οποία δεν είχε γίνει προσθήκη επαγωγέων, τα επίπεδα φθορισμού της καλσεΐνης ήταν πολύ χαμηλά εξαιτίας των υψηλών επιπέδων ελεύθερου σιδήρου. Στα κύτταρα που είχαν κατεργαστεί για 4 ώρες

με τα διάφορα φλαβονοειδή, υπήρχε αύξηση του φθορισμού και επομένως ο ελεύθερος σίδηρος ήταν μειωμένος. Όπως αναμενόταν, η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου παρουσία φλαβονοειδών στα κύτταρα μείωσε τα επίπεδα του φθορισμού (Σχήμα 36).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τόσο η λουτεολίνη, όσο και η φισετίνη και η μπαϊκαλείνη συμπλοκοποιούν το σίδηρο στο εσωτερικό των κυττάρων HeLa και η ικανότητά τους αυτή σχετίζεται πιθανόν με την αναστολή των προλυλο-υδροξυλασών και τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Αντίστοιχη διαπίστωση είχε γίνει και με την κερκετίνη (Σχήμα 24).

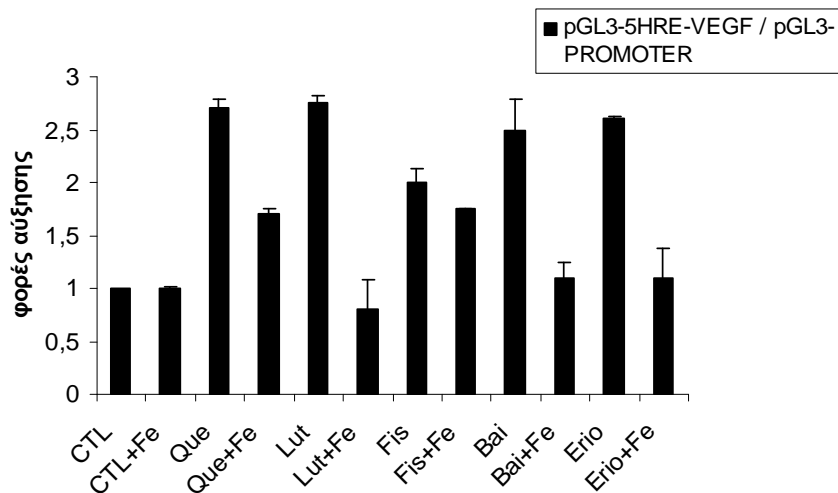


Σχήμα 36: Προσδιορισμός ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες παρουσία λουτεολίνης, φισετίνης ή μπαϊκαλείνης. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν τους επαγωγείς. Ακολούθησε προσθήκη 1μM καλσεΐνης για 30 λεπτά, μονιμοποίηση των κυττάρων σε καλυπτρίδες και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.5.6 Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 που επάγεται από τα φλαβονοειδή σε κύτταρα HeLa

Αφού μελετήθηκε η επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή και η επίδραση της περίσσειας σιδήρου στα επίπεδά του σε κύτταρα HeLa, το επόμενο ερώτημα ήταν αν ο επαγόμενος HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός σε όλες τις περιπτώσεις. Για το σκοπό αυτό, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) πριν από το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης και μετρήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης. Το πλασμίδιο αυτό είναι το pGL3-5HRE-VEGF, το οποίο περιέχει 5 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου του VEGF. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα πλασμίδιο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, αλλά χωρίς τα HRE, το pGL3-promoter. Όπως και στην περίπτωση της κερκετίνης, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης στο πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF προς την έκφραση του ίδιου γονιδίου στο πλασμίδιο pGL3-promoter. Παρουσία λουτεολίνης υπήρξε 3 φορές αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς ήταν στα επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων, όταν χρησιμοποιήθηκε περίσσεια κιτρικού σιδήρου. Παρουσία φισετίνης, υπήρξε 2 φορές αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης και αυτή η εικόνα δεν άλλαξε ιδιαίτερα παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου. Παρουσία μπαϊκαλεΐνης ή εριοδικτυόλης, η εικόνα ήταν παρόμοια με αυτή της λουτεολίνης, με 2 φορές αύξηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς και μηδενική αύξηση παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου (Σχήμα 37).

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι, όπως και με την κερκετίνη, ο HIF-1α που επάγεται από τη λουτεολίνη, φισετίνη, μπαϊκαλεΐνη και εριοδικτυόλη είναι μεταγραφικά ενεργός, η ενεργότητά του εξαρτάται από τα HRE και αναιρείται παρουσία σιδήρου σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της φισετίνης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα με την εριοδικτυόλη υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει αντιστοιχία ανάμεσα στα επίπεδα του HIF-1α και τη μεταγραφική του ενεργότητα.



Σχήμα 37: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του **HIF-1** σε κύτταρα **HeLa** με χρήση του πλασμιδίου **pGL3-5HRE-VEGF**. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF ή pGL3-promoter για 16 ώρες και έπειτα προστέθηκαν τα φλαβονοειδή για 4 ώρες. Ο κιτρικός σίδηρος προστέθηκε σε συγκέντρωση 500μM 1 ώρα πριν τα φλαβονοειδή. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων, με τρεις τιμές ανά συνθήκη σε κάθε πείραμα. Στο διάγραμμα περιλαμβάνονται και οι τιμές που είχαν ληφθεί με τη χρήση κερκετίνης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη χρήση των φλαβονοειδών παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων με τα φλαβονοειδή.

ΔΠ = δεν προσδιορίστηκε

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ HIF-1α	ΕΠΑΓΩΓΗ HIF-1α	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ HIF-1	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΛΣΕΪΝΗΣ
Κερκετίνη (Quercetin)	ναι	ναι	+	ναι
Φισετίνη (Fisetin)	ναι	ναι	+	ναι
Μπαϊκαλεΐνη (Baicalein)	ναι	ναι	+	ναι
Λουτεολίνη (Luteolin)	ναι	ναι	+	ναι
Εριοδικτυόλη (Eriodictyol)	ναι	ναι;	+	ΔΠ
Ταξιφολίνη (Taxifolin)	όχι	όχι	ΔΠ	ΔΠ
Ρουτίνη (Rutin)	όχι	όχι	ΔΠ	ΔΠ
Καμπερόλη (Kaempferol)	όχι	όχι	ΔΠ	ΔΠ
Χλωριούχος κυανιδίνη (Cyanidine chloride)	;	όχι	ΔΠ	ΔΠ

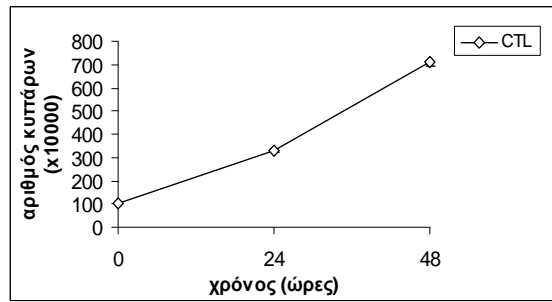
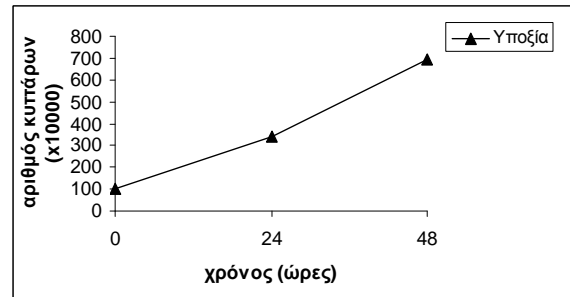
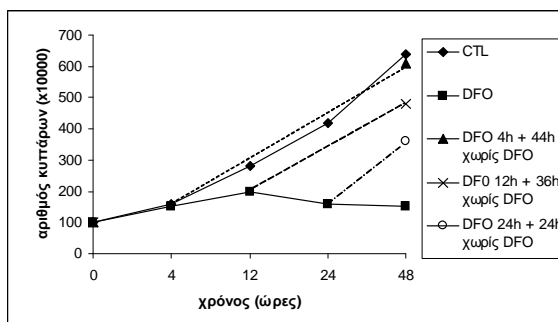
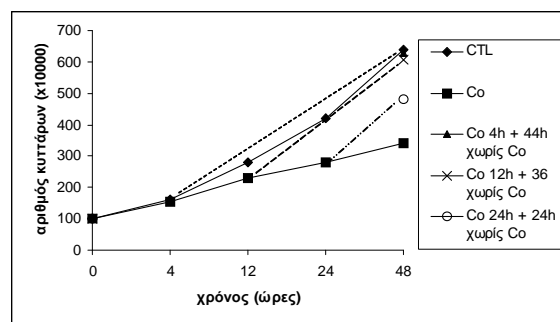
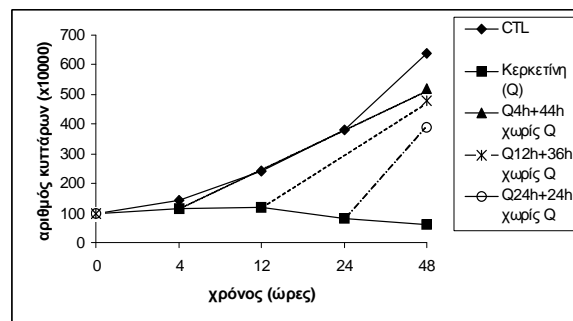
3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΩΓΕΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΞΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε στην Εισαγωγή, ο επαγόμενος HIF-1α βοηθάει τα κύτταρα να προσαρμοστούν στο υποξικό στρες. Για να μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων επαγωγέων στην επιβίωση και τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της έκφρασης του HIF-1α στα κύτταρα και του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, χρησιμοποιήθηκαν οι

επαγωγείς του HIF-1α και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων και η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

3.6.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων HeLa παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες

Αρχικά εξετάστηκε αν οι διάφοροι επαγωγείς υποξικού στρες είναι τοξικοί για τα κύτταρα HeLa και αν τα κύτταρα διατηρούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται μετά από επώαση και απομάκρυνση των επαγωγέων από αυτά. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης και προσδιορίστηκε ο αριθμός τους σε διάφορους χρόνους. Επιπλέον, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία καθενός από τους επαγωγείς για 4, 12 ή 24 ώρες και για το υπόλοιπο των ωρών μέχρι τις 48 ώρες ο επαγωγέας αφαιρέθηκε, έγινε προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού και ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε στις 48 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες νορμοξίας, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάθε 18 ώρες περίπου (Σχήμα 38Α). Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας, οι αριθμοί των κυττάρων δε διέφεραν σημαντικά από αυτούς των κυττάρων σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι και τις 48 ώρες (Σχήμα 38Β). Καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία δεσφερριοξαμίνης οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, καλλιέργεια παρουσία κοβαλτίου σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού στο 50% περίπου των κυττάρων μαρτύρων, ενώ καλλιέργεια παρουσία κερκετίνης για περισσότερο από 12 ώρες ήταν εκτός από κυτταροστατική και κυτταροτοξική. Η αφαίρεση της δεσφερριοξαμίνης, ακόμη και μετά από παραμονή της για 24 ώρες, επανέφερε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων περίπου στα φυσιολογικά επίπεδα (Σχήμα 38Γ). Το ίδιο παρατηρήσαμε και στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου (Σχήμα 38Δ) και της κερκετίνης (Σχήμα 38Ε). Επομένως, σε αντίθεση με την υποξία, οι «μιμητές της υποξίας» μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa. Ωστόσο, επώαση των κυττάρων για 24 ώρες παρουσία δεσφερριοξαμίνης ή χλωριούχου κοβαλτίου δεν οδηγεί σε μη αντιστρεπτές κυτταρικές αλλαγές, αφού η αφαίρεση των επαγωγέων από το μέσο καλλιέργειας επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με φυσιολογικούς ρυθμούς. Το ίδιο ισχύει και για τα κύτταρα που επιβίωσαν έπειτα από 24 ώρες παρουσία κερκετίνης.

A**B****Γ****Δ****E**

Σχήμα 38: Επίδραση του υποξικού στρες στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (A) ή υποξίας (B) ή επώαστηκαν με δεσφερριτοξαμίνη (Γ) ή χλωριούχο κοβάλτιο (Δ) ή κερκετίνη (E). Στο Γ-E, ο επαγωγέας αφαιρέθηκε μετά από 4, 12 ή 24 ώρες και έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων μετά από συνολικά 48 ώρες. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.6.2 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες

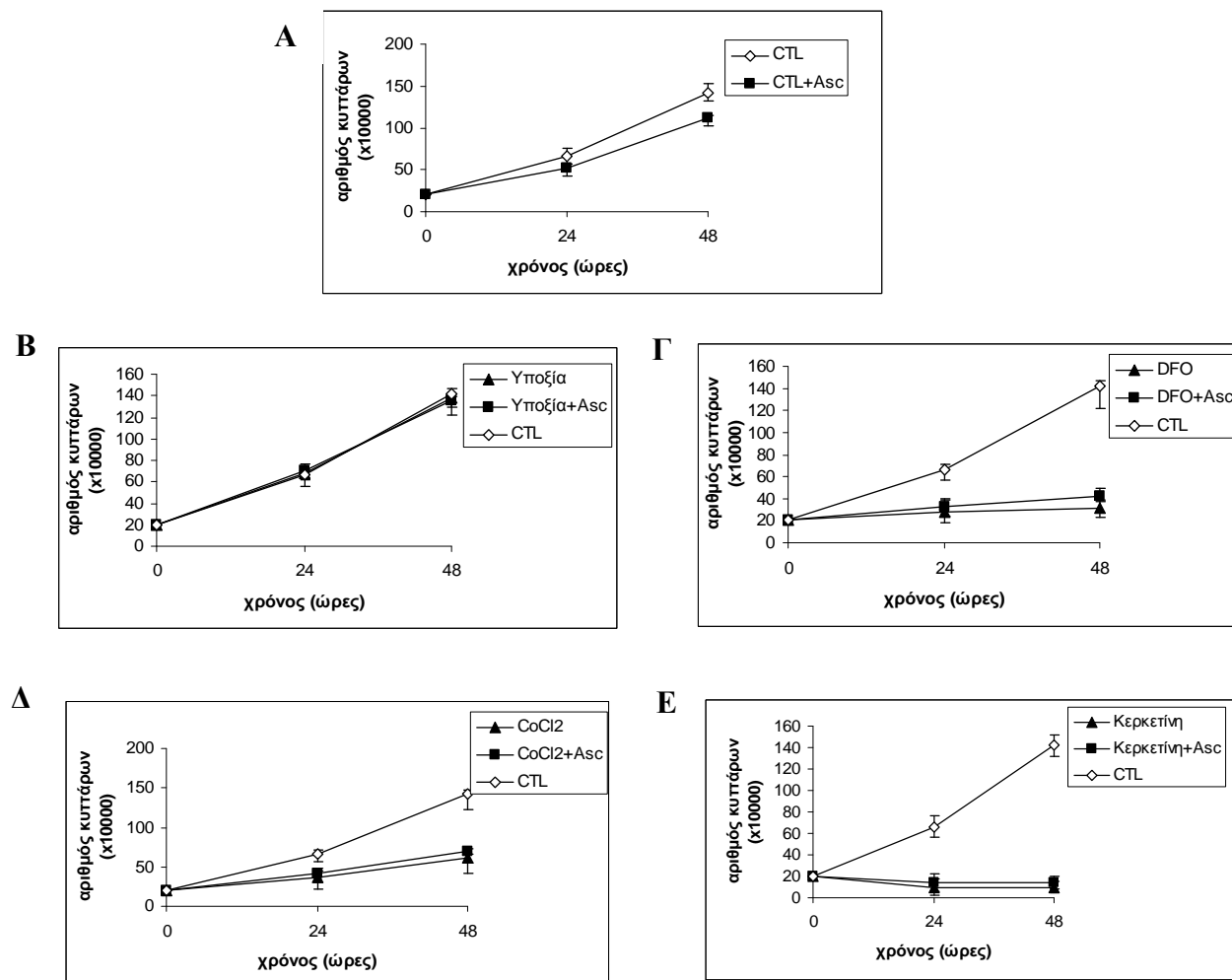
Είναι γνωστό ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος για το μεταβολισμό και την αύξηση των κυττάρων. Επειδή η δεσφερριτοξαμίνη, η κερκετίνη και πιθανόν το κοβάλτιο επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα του σιδήρου στο κύτταρο, τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν σε κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) ή παρουσία δεσφερριτοξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης, παρουσία ή απουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου (500μM) και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε διάφορους χρόνους. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου δεν επηρέασε την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας (Σχήμα 39Α, 39Β). Παρουσία 150μM δεσφερριτοξαμίνης επιβεβαιώθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων δεν αυξήθηκε στις 24 και στις 48 ώρες. Η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επανέφερε τον αριθμό των κυττάρων στα φυσιολογικά επίπεδα (80% των CTL στις 48 ώρες), υποδηλώνοντας τη σημασία του σιδήρου για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa (Σχήμα 39Γ). Παρουσία 150μM χλωριούχου κοβαλτίου, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήταν μειωμένος και η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επανέφερε για άλλη μια φορά τον αριθμό των κυττάρων περίπου στα φυσιολογικά επίπεδα (80% των CTL στις 48 ώρες) (Σχήμα 39Δ). Τέλος, στην περίπτωση της κερκετίνης (100μM) ο αριθμός των κυττάρων ήταν ήδη σημαντικά μειωμένος στις 24 ώρες, ενώ η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επανέφερε τον αριθμό των κυττάρων περίπου στα φυσιολογικά επίπεδα (70% των CTL στις 48 ώρες) (Σχήμα 39Ε).

A



Σχήμα 39: Επίδραση περίσσειας σιδήρου στον αριθμό κυττάρων HeLa παρουσία διαφόρων επαγωγέων. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων (Α) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Β) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (Γ), χλωριούχου κοβαλτίου (Δ) ή κερκετίνης (Ε) για 24 ή 48 ώρες και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Έχοντας επιβεβαιώσει ότι η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τους «μιμητές της υποξίας» αναιρείται με την προσθήκη περίσσειας εξωγενούς σιδήρου, εξετάσαμε αν το ίδιο συμβαίνει με την προσθήκη ασκορβικού οξέος, το οποίο, όπως δείξαμε, αυξάνει τα επίπεδα του ελεύθερου ενδοκυττάριου σιδήρου.



Σχήμα 40: Επίδραση ασκορβικού οξέος στον αριθμό κυττάρων HeLa παρουσία διαφόρων επαγωγέων. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς 100μM ασκορβικού οξέος απουσία επαγωγέων (Α) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Β) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (Γ), χλωριούχου κοβαλτίου (Δ) ή κερκετίνης (Ε) για 24 ή 48 ώρες και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

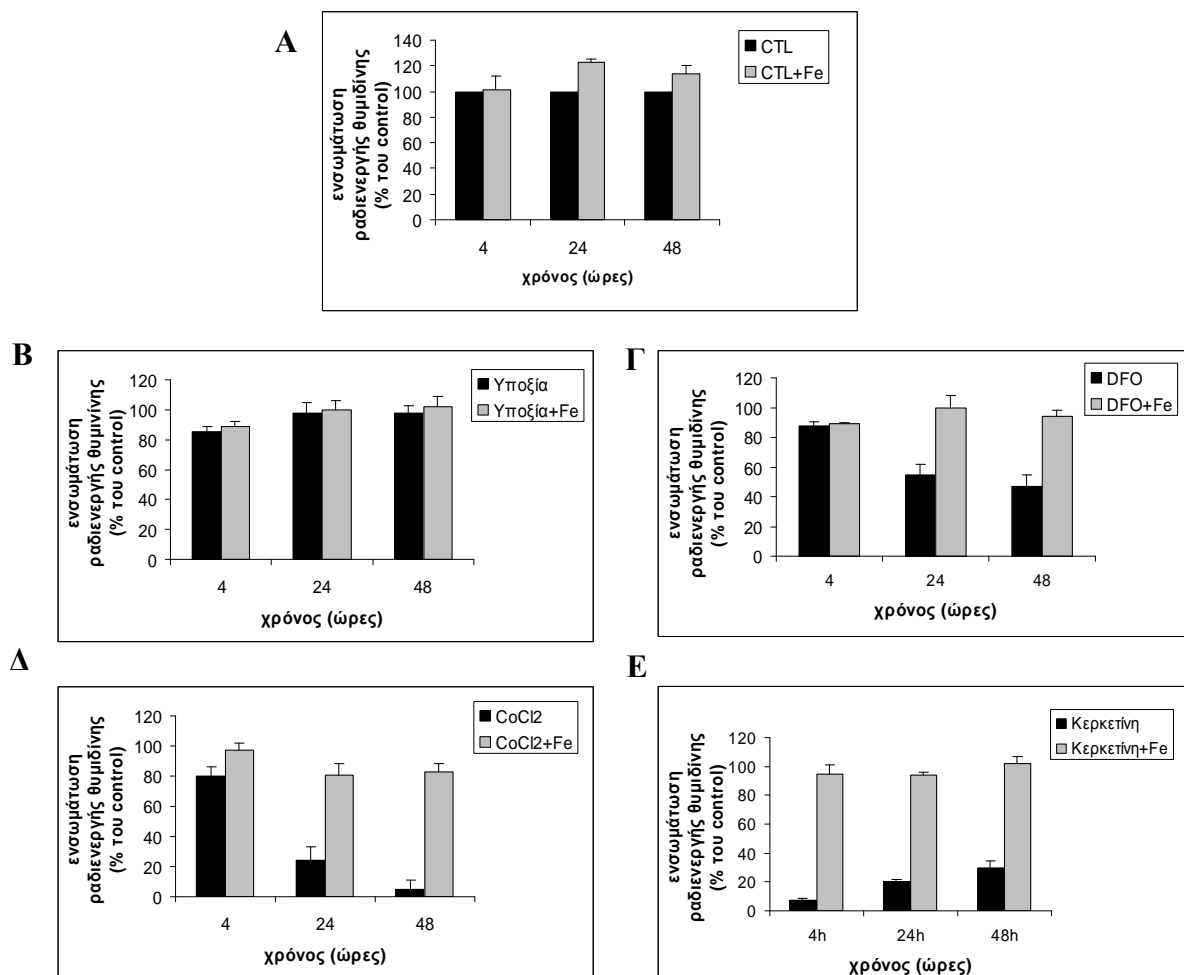
Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι σε αντίθεση με την περίσσεια σιδήρου, η προσθήκη ασκορβικού οξέος δεν επαναφέρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα HeLa παρουσία δεσφερριοξαμίνης, κοβαλτίου ή κερκετίνης (Σχήμα 40). Η δράση αυτή του ασκορβικού οξέος στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa διαφέρει από τη δράση του στην επαγωγή του HIF-1α από τους «μιμητές της υποξίας», όπου όπως δείξαμε (Σχήμα 22) το ασκορβικό οξύ αναιρεί, όπως η περίσσεια σιδήρου, την έκφραση του HIF-1α.

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων HeLa μελετήθηκε και με τη σύνθεση DNA, με μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης, χλωριούχου κοβαλτίου ή κερκετίνης για 4, 24 και 48 ώρες παρουσία ή απουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου και μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης στα κύτταρα. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας παρουσία ή απουσία περίσσειας κιτρικού σιδήρου, η ενσωμάτωση θυμιδίνης και επομένως ο ρυθμός σύνθεσης DNA των κυττάρων δε διέφερε από τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Σχήμα 41B). Παρουσία 150μM δεσφερριοξαμίνης τόσο σε 24 όσο και σε 48 ώρες, η ενσωμάτωση θυμιδίνης ήταν 50% σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επανέφερε το ρυθμό σύνθεσης του DNA σε φυσιολογικά επίπεδα (Σχήμα 41Γ). Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 150μM χλωριούχου κοβαλτίου η ενσωμάτωση θυμιδίνης ήταν περίπου το 20% των φυσιολογικών τιμών στις 24 ώρες και ακόμη χαμηλότερη στις 48 ώρες. Για άλλη μια φορά, η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επανέφερε το ρυθμό σύνθεσης του DNA σε φυσιολογικά επίπεδα (Σχήμα 41Δ). Παρουσία 100μM κερκετίνης, η ενσωμάτωση θυμιδίνης στις 4 ώρες ήταν 8% των φυσιολογικών τιμών, αλλά στις 24 ώρες ήταν περίπου 20% των φυσιολογικών τιμών και στις 48 ώρες περίπου 30% των φυσιολογικών τιμών, ενώ προσθήκη 500μM κιτρικού σιδήρου επανέφερε το ρυθμό σύνθεσης του DNA.

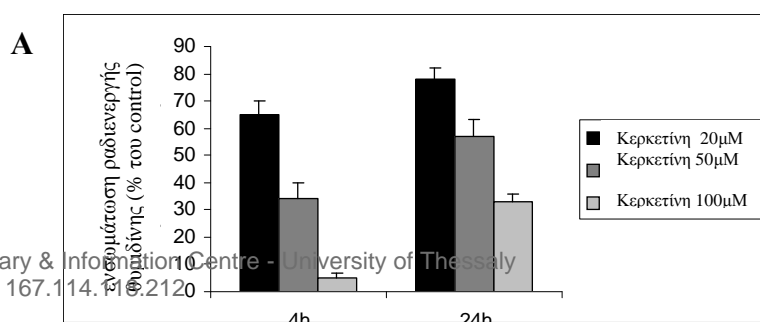
Η επίδραση της κερκετίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διερευνήθηκε περαιτέρω. Η προσθήκη 20-100μM κερκετίνης στα κύτταρα οδήγησε σε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης. Προσθήκη 100μM κιτρικού σιδήρου παρουσία 100μM κερκετίνης επανέφερε το ρυθμό σύνθεσης του DNA στο 50% στις 24 ώρες και στο 70% στις 48 ώρες, ενώ προσθήκη 500μM κιτρικού σιδήρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 41E, επανέφερε το ρυθμό σύνθεσης στο 90% στις 24 ώρες ως και περίπου 100% στις 48 ώρες (Σχήμα 41).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων HeLa και από τη μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης συμπεραίνουμε ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa αφού σε όλες τις περιπτώσεις η παρουσία περίσσειας σιδήρου επαναφέρει τον πολλαπλασιασμό στα φυσιολογικά επίπεδα. Επιπλέον, δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση μεταξύ της επαγωγής του HIF-1α από τους διάφορους επαγωγείς

και της επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο HIF-1α επάγεται έντονα, τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται ή το αντίθετο.



Σχήμα 41: Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες και του σιδήρου στην ενσωμάτωση [³H]-θυμιδίνης σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς 500μM κιτρικό σίδηρο απουσία επαγωγέων (Α) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Β) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (Γ), χλωριούχου κοβαλτίου (Δ) ή κερκετίνης (Ε) για 4, 24 ή 48 ώρες. Τέσσερις ώρες πριν το πέρας της επώασης με τους επαγωγείς έγινε προσθήκη 2,5 μCi / ml [³H] θυμιδίνης. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενσωματωμένης [³H] θυμιδίνης σε β-μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



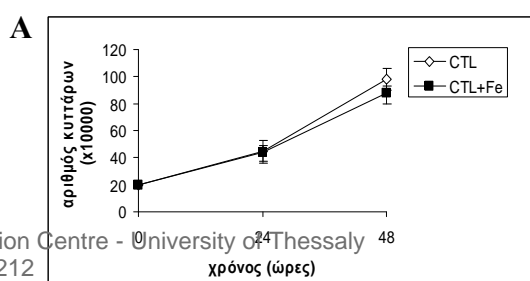
Σχήμα 42: Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης και κιτρικού σιδήρου στην ενσωμάτωση [³H]-θυμιδίνης σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κερκετίνης (Α) ή διαφορετικών συγκεντρώσεων κιτρικού σιδήρου και 100μΜ κερκετίνης (Β) για 4 ή 24 ώρες. Η μέτρηση της ενσωματωμένης [³H] θυμιδίνης έγινε σε β-μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σύγκριση της επίδρασης των επαγωγέων στην έκφραση του HIF-1α (Σχήμα 19) και την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa (Σχήματα 39-42) αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση μεταξύ της επαγωγής του HIF-1α από την υποξία ή το κοβάλτιο και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ενώ και στις δυο περιπτώσεις, ο HIF-1α επάγεται έντονα, τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται έντονα παρουσία κοβαλτίου, αλλά πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες υποξίας, όπως τα κύτταρα σε συνθήκες νορμοξίας. Επιπλέον, η προσθήκη περίσσειας σιδήρου επαναφέρει τον πολλαπλασιασμό παρουσία κοβαλτίου, ενώ δεν επηρεάζει την υψηλή έκφραση του HIF-1α. Από την άλλη, στην περίπτωση της δεσφερριτοξαμίνης ή της κερκετίνης παρατηρείται αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην επαγωγή του HIF-1α και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προσθήκη περίσσειας σιδήρου, η οποία αναιρεί την έκφραση του HIF-1α, επαναφέρει τον πολλαπλασιασμό στα φυσιολογικά επίπεδα.

3.6.3 Επίδραση της περίσσειας σιδήρου στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 παρουσία των επαγωγέων του υποξικού στρες

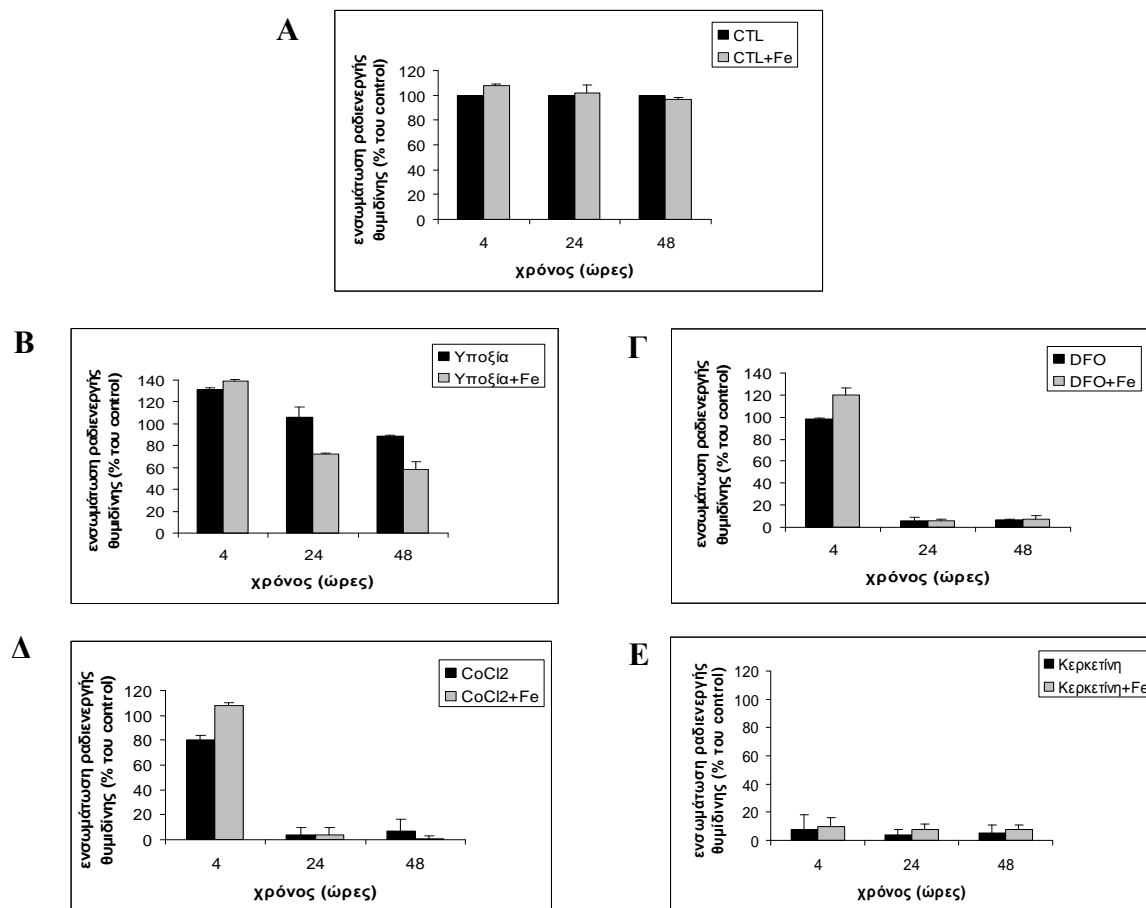
Τα πειράματα μέτρησης του αριθμού κυττάρων και της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης πραγματοποιήθηκαν και σε κύτταρα HepG2, για να διαπιστωθεί αν τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν ειδικά για τα κύτταρα HeLa.

Σε αντίθεση με τα κύτταρα HeLa, η υποξία μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2. Έτσι, όταν κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (1% O₂), η αύξηση του αριθμού κυττάρων μετά από 24 ή 48 ώρες ήταν 50% και 35%, αντίστοιχα, της αύξησης που παρατηρήθηκε σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Επιπλέον, η παρουσία περίσσειας σιδήρου όχι μόνο δεν επανέφερε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των υποξικών κυττάρων, αλλά αντιθέτως οδήγησε σε σχεδόν πλήρες σταμάτημα του πολλαπλασιασμού τους (Σχήμα 43B). Παρουσία 150μM δεσφερριζαμίνης ή 150μM χλωριούχου κοβαλτίου η μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 ήταν σχεδόν πλήρης και η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου δεν οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων (Σχήμα 43Γ, Δ). Τέλος, στην περίπτωση της κερκετίνης (100μM) ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε στο 10% ήδη από τις 24 ώρες και ακόμη περισσότερο στις 48 ώρες, ενώ η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου, αν και εμπόδισε την κυτταροτοξικότητα της κερκετίνης δεν επανέφερε τον αριθμό των κυττάρων στα φυσιολογικά επίπεδα, αλλά ούτε οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού (Σχήμα 43E).



Σχήμα 43: Επίδραση περίσσειας σιδήρου στον αριθμό κυττάρων HepG2 παρουσία διαφόρων επαγωγέων. Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων (Α) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Β) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (Γ), χλωριούχου κοβαλτίου (Δ) ή κερκετίνης (Ε) για 24 ή 48 ώρες και μετρήθηκε ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιήθηκαν και για πειράματα μέτρησης της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης με αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που είχαμε με τη μέτρηση του αριθμού κυττάρων (Σχήμα 43). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (1% O₂) η ενσωμάτωση θυμιδίνης, ενώ στις 4 ώρες ήταν ελαφρώς αυξημένη (125% των φυσιολογικών τιμών), μειώθηκε στο 80% των φυσιολογικών τιμών στις 48 ώρες. Η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου επέτεινε τη μείωση αυτή (Σχήμα 44Β). Παρουσία 150μM δεσφερριοξαμίνης ή 150μM κοβαλτίου η ενσωμάτωση θυμιδίνης μειώθηκε περίπου στο 10% σε 24 και 48 ώρες και η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου δεν αύξησε το ρυθμό σύνθεσης του DNA (Σχήμα 44Γ, Δ). Παρουσία 100μM κερκετίνης, η μείωση της σύνθεσης του DNA στο 10% των φυσιολογικών τιμών παρατηρήθηκε από τις 4 ώρες και η προσθήκη περίσσειας σιδήρου επίσης απέτυχε να αυξήσει την ενσωμάτωση θυμιδίνης (Σχήμα 44Ε).



Σχήμα 44: Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες και του σιδήρου στην ενσωμάτωση [^3H]-θυμιδίνης σε κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν με ή χωρίς 500μM κιτρικό σίδηρο απουσία επαγωγέων (A) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (B) ή παρουσία δεσφερριδοξαμίνης (Γ), χλωριούχου κοβαλτίου (Δ) ή κερκετίνης (E) για 4, 24 ή 48 ώρες. Τέσσερις ώρες πριν το πέρας της επώασης με τους επαγωγείς έγινε προσθήκη 2,5 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$ [^3H] θυμιδίνης. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και μέτρηση της ενσωματωμένης [^3H] θυμιδίνης σε β - μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Διαπιστώνεται ότι και στα κύτταρα HepG2 δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του HIF-1 α (Σχήμα 20) και της κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού (Σχήματα 43-44). Επιπλέον, η απόκριση των κυττάρων HepG2 είναι διαφορετική από αυτή των κυττάρων HeLa, κάτω από διαφορετικές συνθήκες υποξικού στρες και, σε αντίθεση με τα κύτταρα HeLa, ο σίδηρος αδυνατεί να

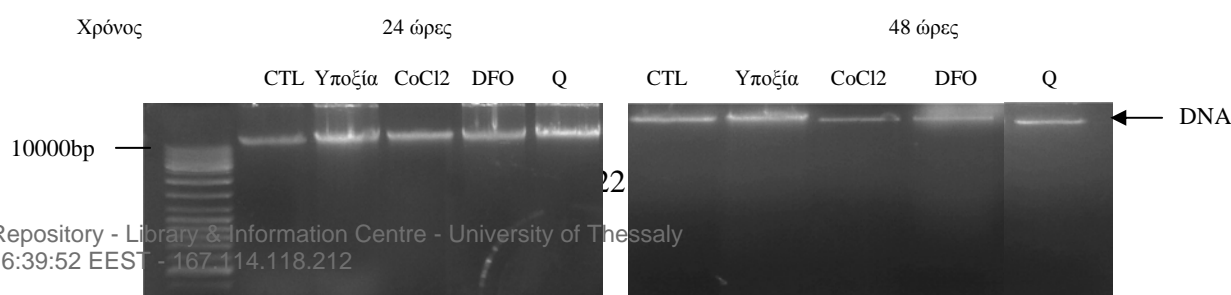
αποκαταστήσει τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων παρουσία των «μιμητών της υποξίας».

3.7 ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΥΠΟΞΙΑ

Στη βιβλιογραφία, ο HIF-1α θεωρείται σε κάποιους κυτταρικούς τύπους και σε συγκεκριμένες συνθήκες αντιαποπτωτικός παράγοντας και σε άλλους κυτταρικούς τύπους προαποπτωτικός. Έχοντας παρατηρήσει το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού μετά από καλλιέργεια 24-48 ώρες παρουσία κοβαλτίου ή δεσφερριόξαμίνης και τη μείωση στον αριθμό των κυττάρων παρουσία κερκετίνης, δημιουργήθηκε το ερώτημα αν τα κύτταρα πεθαίνουν με νέκρωση ή απόπτωση.

3.7.1 Επαγωγή απόπτωσης από διάφορους επαγωγείς υποξικού στρες σε κύτταρα HeLa

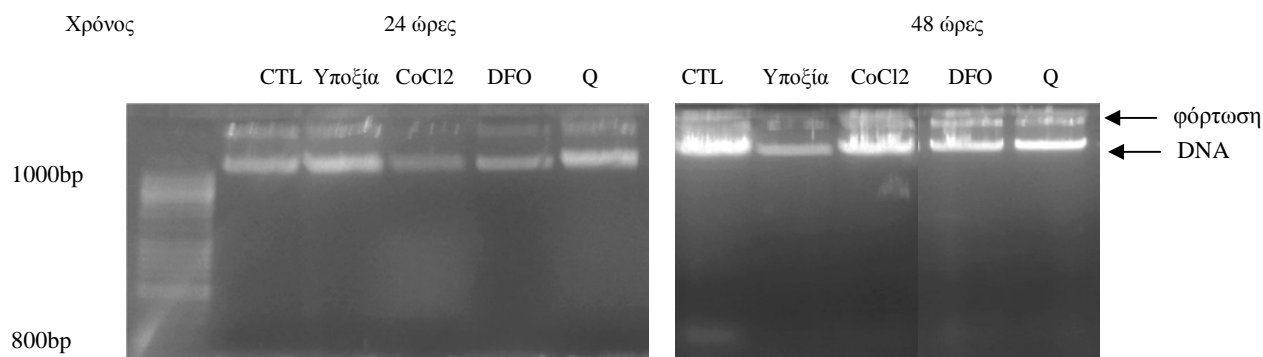
Για να συγκριθεί η επίδραση της υποξίας με αυτή των «μιμητών της υποξίας», κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες για 24 και 48 ώρες. Απομονώθηκε DNA από τα κύτταρα και μελετήθηκε η απόπτωση με κριτήριο το χαρακτηριστικό τεμαχισμό του DNA που παρατηρείται στο τελικό στάδιο της απόπτωσης μετά την ενεργοποίηση νουκλεολυτικών ενζύμων από κασπάσες σε αποπτωτικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις το DNA ήταν υψηλού μοριακού βάρους και ότι σε καμιά περίπτωση δεν υπήρχε τεμαχισμός του DNA με τις συγκεντρώσεις των επαγωγέων που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 45).



Σχήμα 45: Προσδιορισμός απόπτωσης σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων (CTL) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (1% O₂) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (DFO), χλωριούχου κοβαλτίου (CoCl₂) ή κερκετίνης (Q) για 24 ή 48 ώρες. Απομονώθηκε DNA και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης. Στην εικόνα φαίνεται και ο μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.7.2 Επαγωγή απόπτωσης από διάφορους επαγωγείς υποξικού στρες σε κύτταρα HepG2

Αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι επαγωγείς σε κύτταρα HepG2 για 24 και 48 ώρες και δεν παρατηρήθηκε σε καμιά περίπτωση τεμαχισμός του DNA (Σχήμα 46).



Σχήμα 46: Προσδιορισμός απόπτωσης σε κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν απουσία επαγωγέων (CTL) ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (1% O₂) ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης (DFO), χλωριούχου κοβαλτίου (CoCl₂) ή κερκετίνης (Q) για 24 ή 48 ώρες. Απομονώθηκε DNA και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης. Στην εικόνα φαίνεται και ο μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπερασματικά, τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HepG2 δεν παρατηρείται απόπτωση στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Επομένως, η μείωση του αριθμού κυττάρων, όπως αυτή παρατηρείται

επιπρόσθετα της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, πιθανόν να οφείλεται σε νέκρωση ή σε κάποια άλλη διεργασία.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι η έκφραση του HIF-1α, της ρυθμιστικής υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την κυτταρική απόκριση σε μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου, επάγεται εκτός από την υποξία και σε συνθήκες νορμοξίας από ορισμένες ενώσεις. Δεδομένου ότι η υποξία ενέχεται σε πολλές σοβαρές ανθρώπινες ασθένειες, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο καρκίνος, η ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α και της κυτταρικής απόκρισης στο υποξικό στρες, εκτός από επιστημονικούς λόγους, αποτελεί αντικείμενο έντονου ιατρικού ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα εργασία, συγκρίθηκε, σε κύτταρα HeLa και HepG2, η επαγωγή του HIF-1α από την υποξία και από ενώσεις που μιμούνται την υποξία, όπως είναι η δεσφερριοξαμίνη, το κοβάλτιο και η κερκετίνη και διερευνήθηκε η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων παρουσία των ενώσεων αυτών. Η επαγωγή του HIF-1α στην υποξία έχει μελετηθεί εκτενώς, οπότε χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η σύγκριση με τους μηχανισμούς δράσης των υπόλοιπων ενώσεων, αλλά η επίδραση της υποξίας στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό ποικίλει. Η δράση της δεσφερριοξαμίνης, μιας ένωσης που συμπλοκοποιεί το σίδηρο, είναι γνωστό ότι στηρίζεται στη μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου σιδήρου, που είναι απαραίτητος για πολλές λειτουργίες του κυττάρου. Όσον αφορά το μεταβατικό στοιχείο κοβάλτιο, ο μηχανισμός δράσης του αναφορικά με την επαγωγή του HIF-1α είναι αμφιλεγόμενος και η επίδρασή του στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων παραμένει αδιευκρίνιστος. Η κερκετίνη είναι ένα βιοφλαβονοειδές με πολλές και ποικίλες ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, μεταλλοδεσμευτικές και αναστολής κινασών, αλλά ο τρόπος με τον οποίο επάγει τον HIF-1α δεν έχει μελετηθεί και η επίδρασή της στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα και άλλων φλαβονοειδών να επάγουν τον HIF-1α και έγινε πρόβλεψη της δραστηριότητας αυτών με βάση συγκεκριμένες ιδιότητές τους.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κάτω από διάφορες συνθήκες υποξικού στρες. Δεδομένου ότι η δεσφερριοξαμίνη, η κερκετίνη και πιθανόν το κοβάλτιο επηρεάζουν το μεταβολισμό του σιδήρου και ότι οι προλυλο-υδροξυλάσες (PHDs) απαιτούν

σίδηρο για να δράσουν, εξετάσαμε αν η επαγωγή του HIF-1α από τις διάφορες ενώσεις οφείλεται σε έλλειψη του σιδήρου. Επιπλέον, μελετήσαμε αν η προσθήκη σιδήρου επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής υποδηλώνουν ότι α) υπάρχουν διαφορές στην απόκριση στην υποξία και στις ενώσεις που μιμούνται την υποξία τόσο σε μοριακό επίπεδο (έκφραση του HIF-1α) όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικός πολλαπλασιασμός), β) ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α από το κοβάλτιο είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και δεν οφείλεται απλά σε αντικατάσταση του σιδήρου που είναι απαραίτητος για τη δράση των προλυλο-υδροξυλασών, γ) η κερκετίνη επάγει τον HIF-1α με παρόμοιο τρόπο με τη δεσφερριοξαμίνη, συμπλοκοποιώντας τον ελεύθερο σίδηρο, αλλά έχει σοβαρότερες επιπτώσεις στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, δ) η επαγωγή του HIF-1α από ορισμένα φλαβονοειδή εξαρτάται από το αν αυτά διαθέτουν κατάλληλη λιποφιλικότητα και σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ε) ο HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη και άλλα φλαβονοειδή έχει χαμηλότερη μεταγραφική ενεργότητα από τον HIF-1 που επάγεται από άλλες συνθήκες υποξικού στρες, πιθανόν λόγω της πλειοτροπικής δράσης των φλαβονοειδών, στ) το κοβάλτιο, η δεσφερριοξαμίνη και η κερκετίνη μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa επειδή διαταράσσουν τα επίπεδα ή τη διαθεσιμότητα του ενδοκυττάριου ελεύθερου σιδήρου, ζ) το υποξικό στρες και ο σίδηρος επιδρούν στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό με κυτταρο-ειδικό τρόπο. Ο σίδηρος επαναφέρει τον πολλαπλασιασμό παρουσία κοβαλτίου, δεσφερριοξαμίνης ή κερκετίνης πλήρως σε κύτταρα HeLa, αλλά καθόλου σε κύτταρα HepG2 και η) η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων HeLa και HepG2 δεν εξαρτάται από την παρουσία του HIF-1α. Τα σημεία αυτά αναπτύσσονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Γενικά χαρακτηριστικά της επαγωγής του HIF-1α από την υποξία και τις ενώσεις που μιμούνται την υποξία

Αρχικά, οι διάφοροι επαγωγείς δοκιμάστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους για να προσδιοριστεί η κινητική της επαγωγής του HIF-1α. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ισχυρή επαγωγή του HIF-1α στις 4-8 ώρες και, σε αντίθεση με τις ενώσεις που μιμούνται την υποξία δεσφερριοξαμίνη και κοβάλτιο, μόνο η παρατεταμένη υποξία (48 ώρες) οδηγεί σε μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης. Η υποξία σταθεροποιεί τον HIF-1α, γιατί απουσία οξυγόνου οι PHDs δεν μπορούν να

δράσουν [35, 168]. Η μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α σε παρατεταμένη υποξία θα μπορούσε να εξηγηθεί με την επαγωγή των γονιδίων των PHDs από τον HIF-1 ή την παραγωγή αντινοσηματικού HIF-1α, το οποίο αυξάνει την αστάθεια του mRNA του HIF-1α [169] ή άλλων ισομορφών του, που ανταγωνίζονται το διμερισμό με τον ARNT [170] και λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές του. Πιθανόν να μην υφίσταται κάποιος από τους παραπάνω μηχανισμούς στην περίπτωση των ενώσεων που μιμούνται την υποξία, τη δεσφερριοξαμίνη και το κοβάλτιο, οι οποίες, όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια, μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Στην περίπτωση της κερκετίνης παρατηρήθηκε ένα πρότυπο έκφρασης του HIF-1α διαφορετικό από τους άλλους χημικούς επαγωγείς, που είχε μια διφασική κινητική, αφού η έκφραση της πρωτεΐνης παρουσία κερκετίνης μειώνεται στις 24 ώρες και αυξάνεται ελαφρώς στις 48 ώρες. Παρουσία των υπόλοιπων φλαβονοειδών δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της πρωτεΐνης στις 24 και 48 ώρες. Σε αντίθεση με τη δεσφερριοξαμίνη ή το κοβάλτιο, η κερκετίνη είναι μια ένωση που έχει τη δυνατότητα οξείδωσης και βιομετατροπών στο εσωτερικό των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει την απουσία δράσης της στις 24 ώρες. Πράγματι, η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από πειράματα που έγιναν στο Εργαστήριο Βιοχημείας από τον Δρ. Α. Τσακάλωφ, στα οποία προσδιορίστηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κερκετίνης με HPLC. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της κερκετίνης στα κύτταρα κορυφώνεται στις 4 ώρες, χρόνος όπου παρατηρείται η μέγιστη επαγωγή του HIF-1α, και μειώνεται σταδιακά ως τις 48 ώρες, όπου παρατηρείται αύξηση ενός άγνωστου μεταβολίτη της κερκετίνης. Πιθανόν, λοιπόν, η οξείδωση και η βιομετατροπή της κερκετίνης και η ενδεχόμενη απώλεια της ικανότητάς της να συμπλοκοποιεί τα μέταλλα να μπορούν να ερμηνεύσουν τη μείωση της επαγωγής του HIF-1α από αυτήν στις 24 ώρες. Παρόμοια μπορεί να είναι η εξήγηση και για την έλλειψη επαγωγής του HIF-1α έπειτα από παρατεταμένη έκθεση στα άλλα φλαβονοειδή.

Ο HIF-1α επάγεται τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και παρουσία των ενώσεων που μιμούνται την υποξία, αλλά η έκφρασή του εξαρτάται από συνεχιζόμενη μεταγραφή μόνο στην περίπτωση της υποξίας. Χρησιμοποιώντας την ακτινομυκίνη D, έναν αναστολέα της μεταγραφής, παρατηρήθηκε ότι αυτή οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, αλλά όχι παρουσία των υπόλοιπων ενώσεων που μιμούνται την υποξία, κάτι που παρατηρήθηκε επανειλημμένα. Το εύρημα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, διότι είναι γενικά αποδεκτό ότι ο HIF-1α σταθεροποιείται σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε συνθήκες υποξίας

μετα-μεταγραφικά, χωρίς αλλαγή στα επίπεδα του mRNA του σε σχέση με τη νορμοξία [26]. Υπάρχουν, ωστόσο, δεδομένα που υποστηρίζουν την αύξηση των επιπέδων του mRNA του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας σε ποντικούς *in vivo* [171]. Αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε σταθεροποίηση του mRNA του HIF-1α [5], αφού δεν υπάρχουν ενδείξεις για επαγωγή του υποκινητή του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [172]. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας δεν αποκλείουν την πιθανότητα η έκφραση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας να εξαρτάται από τη συνεχή μεταγραφή ενός άλλου γονιδίου, ο χρόνος ημιζωής του mRNA ή του πρωτεϊνικού προϊόντος του οποίου είναι μικρότερος.

Είναι γνωστό ότι ο HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) αποικοδομείται με έναν χρόνο ημιζωής μικρότερο από 5 λεπτά [1]. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκε ότι, όταν κύτταρα HeLa επωάζονται σε συνθήκες υποξίας και κατόπιν επαναφέρονται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ο HIF-1α που έχει επαχθεί, αποικοδομείται με ένα χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών.

Σε όλες τις συνθήκες υποξικού στρες που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του HIF-1α εξαρτάται από συνεχιζόμενη πρωτεϊνοσύνθεση. Μάλιστα, όταν η μετάφραση αναστέλλεται, ο χρόνος ημιζωής του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (μικρότερος από 15 λεπτά) δε διαφέρει πολύ από αυτόν σε συνθήκες νορμοξίας. Παρουσία δεσφερριοξαμίνης ή κερκετίνης, ο χρόνος ημιζωής του HIF-1α είναι μικρότερος από 30 λεπτά, ενώ παρουσία κοβαλτίου ο χρόνος ημιζωής είναι μικρότερος από 60 λεπτά. Δεδομένου, όμως, ότι σε όλες τις περιπτώσεις ο χρόνος ημιζωής του HIF-1α απουσία νέας πρωτεϊνοσύνθεσης είναι μεγαλύτερος από 5-10 λεπτά, το χρόνο ημιζωής του επαγόμενου από την υποξία HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας, συμπεραίνουμε ότι όλες οι συνθήκες υποξικού στρες που δοκιμάσαμε αυξάνουν τα επίπεδα του HIF-1α με σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Πιθανόν, στην περίπτωση της σχετικά ήπιας υποξίας (1% O₂) ή με τις συγκεντρώσεις των χημικών επαγωγέων που χρησιμοποιήθηκαν, η αναστολή της αποικοδόμησης του HIF-1α να μην είναι πλήρης, επειδή οι προλυλο-υδροξυλάσες έχουν προσαρμοστεί στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ή ο HIF-1α να αποικοδομείται από διαφορετικά μονοπάτια, που δεν εξαρτώνται από τις PHDs ή τον VHL [51]. Η ανάγκη συνεχούς πρωτεϊνοσύνθεσης για τη σταθεροποίηση του HIF-1α έχει αναφερθεί, επίσης, για διαφορετικούς χημικούς και βιολογικούς παράγοντες σε άλλα είδη κυττάρων [93, 99].

Σύγκριση των μηχανισμών επαγωγής του HIF-1α από τις διάφορες ενώσεις – μιμητές της υποξίας

Στην προσπάθεια να μελετηθεί ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α από το κοβάλτιο και την κερκετίνη και να συγκριθεί με το μηχανισμό επαγωγής του από την υποξία ή τη δεσφερριοξαμίνη, εξετάστηκαν σε κύτταρα HeLa τόσο ο ρόλος του σιδήρου όσο και η πιθανή εμπλοκή διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται ορισμένες ενδιαφέρουσες διαφορές στη σχέση του σιδήρου με την επαγωγή του HIF-1α από τις διάφορες ενώσεις. Είναι γνωστό ότι οι PHDs, τα ένζυμα που υδροξυλιώνουν τον HIF-1α οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση σε συνθήκες νορμοξίας απαιτούν οξυγόνο και σίδηρο για να δράσουν. Η επαγωγή του HIF-1α από την υποξία οφείλεται στην ελάττωση των επιπέδων οξυγόνου και ως εκ τούτου στη μείωση της ενεργότητας των ενζύμων αυτών. Βρήκαμε ότι η προσθήκη περίσσειας σιδήρου ή ασκορβικού οξέος στα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας δεν επηρέασε την επαγωγή του HIF-1α από την υποξία. Αυτό υποδεικνύει ότι η έλλειψη του υποστρώματος O_2 αδρανοποιεί τις PHDs και η περίσσεια σιδήρου ή ασκορβικού οξέος, το οποίο αυξάνει τη διαθεσιμότητα του σιδήρου, δεν επαρκούν για να τις ενεργοποιήσει.

Η επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη αποδίδεται στην ικανότητα της ένωσης αυτής να συμπλοκοποιεί το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δράση των PHDs οδηγώντας στην απενεργοποίηση των ενζύμων αυτών. Έχειδειχθεί ότι προσθήκη περίσσειας σιδήρου, με τη μορφή θειϊκού σιδήρου (Fe^{2+}) μειώνει δραματικά την επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη [173, 174]. Παρότι οι λεπτομέρειες της πρόσληψης και διακίνησης σιδήρου ενδοκυττάρια δεν είναι πλήρως κατανοητές, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο σίδηρος εισέρχεται πολύ γρήγορα στα κύτταρα μέσω μεμβρανικών υποδοχέων τρανσφερρίνης, αλλά και μεταφορέων δισθενών μετάλλων, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ελεύθερου σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων, η οποία συνήθως διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα ($< 1\mu M$) [175]. Η δεσφερριοξαμίνη, από την άλλη, εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκύτωση και μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ελεύθερου σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων εξαιτίας συμπλοκοποίησής του στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια [176]. Χρησιμοποιώντας περίσσεια σιδήρου πριν την προσθήκη δεσφερριοξαμίνης στα κύτταρα, επιβεβαιώθηκε η αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν επιχειρήθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων με την προσθήκη

ασκορβικού οξέος ή αίμης. Το ασκορβικό οξύ έχει την ιδιότητα να διατηρεί το σίδηρο στη διασθενή μορφή του [91], καθώς επίσης να απελευθερώνει σίδηρο από τις ενδοκυττάρια αποθήκες σιδήρου [165] και έχειδειχθεί ότι αναιρεί την επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη. Η αίμη θεωρείται, μεταξύ άλλων, δωρητής σιδήρου, αλλά η δράση της στην επαγωγή του HIF-1α από ενώσεις συμπλοκοποιητές του σιδήρου δεν είναι γνωστή. Η αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη και στις τρεις περιπτώσεις (προσθήκη περίσσειας σιδήρου ή ασκορβικού οξέος ή αίμης) επιβεβαιώνει ότι η δράση της δεσφερριοξαμίνης κάτω από αυτές τις συνθήκες οφείλεται σε συμπλοκοποίηση του σιδήρου.

Ο μηχανισμός δράσης της κερκετίνης δεν είναι γνωστός, αλλά λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητα της ένωσης αυτής να συμπλοκοποιεί το σίδηρο, υποθέσαμε ότι η ιδιότητά της αυτή ευθύνεται για την απενεργοποίηση των PHDs και την επαγωγή του HIF-1α. Πράγματι, η προσθήκη περίσσειας κιτρικού σιδήρου αναιρεί την επαγωγή του HIF-1α από την κερκετίνη, όπως συμβαίνει και με τη δεσφερριοξαμίνη. Επιπρόσθετα, η χρήση ασκορβικού οξέος ή αίμης παρουσία κερκετίνης οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα.

Παρόλο ότι τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν τη σημασία του σιδήρου στη σταθεροποίηση του HIF-1α, η άμεση απάντηση για το ρόλο του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη και την κερκετίνη δόθηκε με τη χρήση καλσεΐνης. Η καλσεΐνη είναι μια ένωση που έχει την ικανότητα να συμπλοκοποιεί τον ελεύθερο σίδηρο στο εσωτερικό των κυττάρων και να φθορίζει όταν δεν υπάρχει ελεύθερος σίδηρος. Η παρατήρηση ότι η δεσφερριοξαμίνη και η κερκετίνη αυξάνουν το φθορισμό της καλσεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει χαμηλά επίπεδα ελεύθερου σιδήρου στα κύτταρα, αποδεικνύει ότι οι δυο αυτές ενώσεις μειώνουν το σίδηρο, πιθανόν εξαιτίας συμπλοκοποίησης.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η κερκετίνη φαίνεται ότι δρα με παρόμοιο τρόπο με τη δεσφερριοξαμίνη στην επαγωγή του HIF-1α. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν το μοντέλο της σταθεροποίησης του HIF-1α εξαιτίας συμπλοκοποίησης του σιδήρου από την κερκετίνη και αναστολής της αποικοδόμησής του, μιας διαδικασίας που εξαρτάται από το σίδηρο. Ωστόσο, η κερκετίνη είναι μια ένωση στην οποία αποδίδονται ποικίλες άλλες ιδιότητες [111-115, 177, 178], όπως αντιοξειδωτικές, αναστολέα του πρωτεοσώματος, της RNA πολυμεράσης και των κινασών. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η κερκετίνη αναστέλλει την FIH-1, παρουσία περίσσειας σιδήρου, επηρεάζοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α [116]. Η

επαγωγή του HIF-1α από την κερκετίνη εξαιτίας συμπλοκοποίησης του σιδήρου δεν αποκλείει τη συμβολή και άλλων ιδιοτήτων της ένωσης αυτής. Πιθανόν, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση κερκετίνης, οι διαφορετικές ιδιότητες της κερκετίνης να δρουν μεμονωμένα ή παράλληλα στην επαγωγή του HIF-1α.

Σε αντίθεση με τη δεσφερριζαμίνη και την κερκετίνη, στην περίπτωση του χλωριούχου κοβαλτίου δεν παρατηρήθηκε αναστολή της επαγωγής του HIF-1α χρησιμοποιώντας περίσσεια σιδήρου. Η παρατήρηση αυτή είναι αντίθετη στην επικρατούσα άποψη ότι το κοβάλτιο δρα αντικαθιστώντας το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δράση των PHDs [179]. Όπως αναπτύχθηκε στην Εισαγωγή, ο μηχανισμός δράσης του κοβαλτίου στην επαγωγή του HIF-1α παραμένει αμφιλεγόμενος και στη βιβλιογραφία έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις, με τη χρήση κυττάρων αλλά και πειραμάτων *in vitro*, οι οποίες ενισχύουν την άποψη ότι η δράση του κοβαλτίου δε συνίσταται απλά στην αντικατάσταση του σιδήρου, που είναι απαραίτητος για τη δράση των PHDs. Σε συμφωνία με αυτό, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι το κοβάλτιο επάγει τον HIF-1α με περισσότερο πολύπλοκους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α μόνο από το κοβάλτιο, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται με τους άλλους επαγωγείς υποξικού στρες. Κάτι ανάλογο συμβαίνει και με τα μονοπάτια των MAP κινασών και της PI3K, τα οποία ενέχονται, μερικώς τουλάχιστον, στην επαγωγή του HIF-1α μόνο από το κοβάλτιο. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ο ρόλος των παραπάνω μονοπατιών στην επαγωγή του HIF-1α από διάφορους παράγοντες, αλλά οι αποκρίσεις εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και τον επαγωγέα.

Όσον αφορά τα ROS, έχει προταθεί η συμμετοχή τους στη σταθεροποίηση του HIF-1α, αλλά έχει δειχθεί τόσο η αύξηση όσο και η μείωσή τους σε συνθήκες υποξίας. Ο Chandel και οι συνεργάτες του [77] βρήκαν ότι τόσο το κοβάλτιο όσο και η υποξία παράγουν ROS, αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Η παραγωγή των ROS από την υποξία απαιτεί λειτουργικά μιτοχόνδρια, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με το κοβάλτιο. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ότι το NAC έχει επίδραση στον επαγόμενο από το κοβάλτιο, αλλά όχι από την υποξία, HIF-1α σε διάφορα είδη κυττάρων [180, 181, 92, 93]. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώσαμε ότι τα ROS ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1α μόνο από το κοβάλτιο και όχι από την υποξία, τη δεσφερριζαμίνη ή την κερκετίνη. Μάλιστα, πειράματα που έγιναν από

τον Δρ. Π. Λιάκο με τη φθορίζουσα ουσία H2DCF-DA επιβεβαίωσαν την παραγωγή ROS από το κοβάλτιο και τη μείωση αυτών παρουσία NAC, Trolox ή γλουταθειόνης [182].

Τα μονοπάτια της PI3K και των p42/p44 MAP κινασών ενέχονται στην ενεργοποίηση της μετάφρασης, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται από τα ROS και σχετίζονται με τη ρύθμιση της επαγωγής του HIF-1α [183]. Η συμμετοχή των παραπάνω μονοπατιών έχει προταθεί για την επαγωγή του HIF-1α από βιολογικούς παράγοντες, όπως η αγγειοτενσίνη II σε συνθήκες νορμοξίας [99]. Υπάρχουν αναφορές ότι το κοβάλτιο ενεργοποιεί το μονοπάτι των p42/p44 MAP κινασών [184], όπως επίσης και το μονοπάτι της PI3K μέσω αύξησης των ROS [78, 183].

Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο δεν οφείλεται σε απλή αντικατάσταση του σιδήρου των PHDs, διότι η προσθήκη περίσσειας σιδήρου δεν αναστέλλει τη δράση του, αλλά εξαρτάται από τα ROS, την PI3K και τις p42/44 MAP κινάσες. Βέβαια, τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη χρήση ασκορβικού οξέος ή αίμης δε συμφωνούν απόλυτα με την ανεξάρτητη από το σίδηρο δράση του κοβαλτίου. Ωστόσο, επειδή τόσο το ασκορβικό οξύ όσο και η αίμη έχουν ποικίλες άλλες δράσεις στα κύτταρα, όπως αντιοξειδωτικές, πιθανόν η αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από το κοβάλτιο παρουσία τους να οφείλεται σε διαφορετικές δράσεις των ουσιών αυτών στα κύτταρα. Είναι προφανές ότι η δράση αυτή του ασκορβικού οξέος και της αίμης στην περίπτωση του κοβαλτίου δεν είναι κατανοητή και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Παρομοίως, χρειάζεται να διευκρινιστεί ο μηχανισμός αναίρεσης της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας παρουσία αίμης.

Χρησιμοποιώντας μια άλλη κυτταρική σειρά, τα HepG2, επιβεβαιώθηκε η επαγωγή του HIF-1α από την υποξία, τη δεσφερριοξαμίνη και το κοβάλτιο και βρέθηκε ότι ο HIF-1α επάγεται και από την κερκετίνη. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν τα ίδια με τα κύτταρα HeLa αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση του σιδήρου στην επαγωγή του HIF-1α από τις διάφορες ενώσεις. Η περίσσεια σιδήρου αναιρεί την επαγωγή του HIF-1α από τη δεσφερριοξαμίνη και την κερκετίνη, αλλά όχι από την υποξία και το κοβάλτιο.

Υποκυτταρικός εντοπισμός και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που επάγεται από τα διάφορα είδη υποξικού στρες

Όταν ο HIF-1α επάγεται, μετακινείται στον πυρήνα του κυττάρου, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Παρουσία όλων των επαγωγέων, παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων HeLa και ότι το διμερές HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργό. Τα επίπεδα του πυρηνικού HIF-1α μειώνονται παρουσία περίσσειας σιδήρου και δεσφερριοξαμίνης ή κερκετίνης, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την έκφραση της πρωτεΐνης σε αυτές τις συνθήκες. Αντίθετα, τα επίπεδα του HIF-1α στον πυρήνα δε μεταβάλλονται όταν η περίσσεια σιδήρου συνδυάζεται με την υποξία ή το κοβάλτιο.

Ο HIF-1 που επάγεται από όλα τα είδη υποξικού στρες είναι ικανός να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς, της λουσιφεράσης, με έναν τρόπο που εξαρτάται από τα HRE. Η δράση του σιδήρου φαίνεται και στα επίπεδα της μεταγραφικής ενεργότητας του επαγόμενου HIF-1. Μόνο στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης και της κερκετίνης, η παρουσία περίσσειας σιδήρου μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταγραφική ενεργότητα του επαγόμενου από την κερκετίνη HIF-1 είναι μικρή στα κύτταρα HeLa (περίπου 2-3 φορές αυτής των κυττάρων μαρτύρων). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες αναφορές για υψηλή μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη [109]. Ωστόσο, ένα άλλο μέλος της οικογένειας των πολυφαινολών, η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη βρέθηκε ότι επάγει τον HIF-1α σε κύτταρα PC-3 και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF σ' αυτήν την περίπτωση είναι επίσης χαμηλή [118]. Πιθανόν, οι ποικίλες δράσεις της κερκετίνης, μεταξύ των οποίων η αναστολή της μεταγραφής, να εξηγούν τη χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.

Ο έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα HepG2 και σε όλες τις περιπτώσεις, ο HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός, με τη διαφορά ότι ο HIF-1 που επάγεται από την κερκετίνη είναι ελαφρώς δραστικότερος στα HepG2, ενώ ο HIF-1 που επάγεται από τους άλλους επαγωγείς είναι λιγότερο δραστικός.

Χαρακτηριστικά της επαγωγής του HIF-1α από τα φλαβονοειδή

Ο προσδιορισμός του μηχανισμού επαγωγής του HIF-1α από την κερκετίνη και η δοκιμή δυο άλλων φλαβονοειδών, της ρουτίνης και της καμφερόλης, που δεν επάγουν τον HIF-1α οδήγησαν στην υπόθεση ότι η επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή ορίζεται από δυο ιδιότητές τους: την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση και την ικανότητα να συμπλοκοποιούν το σίδηρο. Η ικανότητα παθητικής διάχυσης των φλαβονοειδών ορίζεται από το συντελεστή κατανομής $\log P$. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής αυτός τόσο πιο λιπόφιλη είναι η ένωση και επομένως μπορεί να διαχυθεί μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέλθει στο κύτταρο. Η ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου από γειτονικές υδροξυλομάδες καθορίζεται από τη δομή και εκφράζεται με το συντελεστή δέσμευσης του σιδήρου $\log \beta$. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής αυτός τόσο εντονότερη είναι και η δέσμευση του σιδήρου.

Η κερκετίνη είναι ένα φλαβονοειδές αρκετά λιπόφιλο και με δυο υδροξυλομάδες στο B δακτύλιο, που έχουν ένα συντελεστή $\log \beta$ ίσο με 20,87. Επομένως μπορεί να δεσμεύσει ισχυρά το σίδηρο. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά φλαβονοειδών, που είχαν διαφορετική ικανότητα διάχυσης και διαφορετική ικανότητα συμπλοκοποίησης του σιδήρου. Από τα φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν, αυτά που συνδύαζαν τις δυο ιδιότητες που προαναφέρθηκαν ήταν η φισετίνη, η μπαϊκαλεΐνη, η λουτεολίνη και η εριοδικτυόλη και αναμένονταν να επάγουν τον HIF-1α. Πράγματι, τα παραπάνω φλαβονοειδή επάγουν τον HIF-1α με εξαίρεση την εριοδικτυόλη, που προκάλεσε μια ασθενή επαγωγή του HIF-1α στα 200 μ M. Ίσως η εριοδικτυόλη να επάγει τον HIF-1α σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ή σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επειδή έχει ένα μικρότερο συντελεστή $\log P$ και επομένως εισέρχεται πιο αργά στα κύτταρα. Από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν, η ταξιφολίνη, η ρουτίνη και η χλωριούχος κυανιδίνη δεν επάγουν τον HIF-1α, αν και έχουν τη δυνατότητα ισχυρής συμπλοκοποίησης του σιδήρου, διότι δεν είναι αρκετά λιπόφιλες ενώσεις και επομένως δεν μπορούν να περάσουν με διάχυση στο εσωτερικό των κυττάρων. Αντίθετα, η καμφερόλη δεν επάγει τον HIF-1α, διότι δεν μπορεί να δεσμεύσει ισχυρά το σίδηρο, αν και είναι λιπόφιλη ένωση.

Η επαγωγή του HIF-1α από τα φλαβονοειδή εξαιτίας συμπλοκοποίησης του σιδήρου επιβεβαιώθηκε με τη χρήση περίσσειας κιτρικού σιδήρου και πιο άμεσα με τη χρήση καλσεΐνης. Παρουσία περίσσειας σιδήρου αναιρείται η επαγωγή του HIF-

1α από τη φισετίνη, τη λουτεολίνη και τη μπαϊκαλεΐνη, όπως έχει προαναφερθεί και για την κερκετίνη. Επιπλέον τα επίπεδα ελεύθερου ενδοκυττάριου σιδήρου μειώνονται παρουσία των τριών αυτών φλαβονοειδών, εξαιτίας συμπλοκοποίησής του από αυτά. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που επάγεται από τα φλαβονοειδή, εξαρτάται από τα HRE και κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτά του επαγόμενου από την κερκετίνη HIF-1.

Τέλος, η παρατηρούμενη παροδική επαγωγή του HIF-1α από τα διάφορα φλαβονοειδή, η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής από υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και η χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 παρουσία τους, πιθανόν οφείλονται στην οξειδωση, βιομετατροπές και πλειοτροπικές δράσεις των μορίων αυτών, όπως και στην περίπτωση της κερκετίνης.

Τα αποτελέσματα από τη χρήση των φλαβονοειδών στην επαγωγή του HIF-1α επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι ο μηχανισμός δράσης της κερκετίνης και των υπόλοιπων πολυφαινολικών ενώσεων εξαρτάται από την ικανότητά τους να περνούν στο εσωτερικό των κυττάρων με διάχυση και να συμπλοκοποιούν το σίδηρο.

Επίδραση του υποξικού στρες και του σιδήρου στην επιβίωση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση

Έχοντας μελετήσει τα χαρακτηριστικά της επαγωγής του HIF-1α από τις διάφορες ενώσεις, θέλαμε να δούμε ποια είναι η σχέση της παρουσίας του HIF-1α με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa και HepG2. Επιπλέον, θέλαμε να εξετάσουμε τη σημασία του σιδήρου για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για όλα τα κύτταρα, καθώς συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων στις οξειδωτικές αντιδράσεις, είναι απαραίτητος για τη διεξαγωγή πολλών ενζυμικών αντιδράσεων και συμμετέχει στην παραγωγή ενέργειας [185, 186]. Είναι, επίσης, απαραίτητος για πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση DNA, λόγω της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων, ενζύμου που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση δεοξυριβονουκλεοτιδίων και περιέχει σίδηρο.

Στα κύτταρα HeLa, η υποξία δεν επηρεάζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τουλάχιστον μέχρι τις 48 ώρες που εξετάστηκαν. Η προσθήκη περίσσειας σιδήρου δεν αλλάζει την εικόνα. Από την άλλη, η δεσφερριοξαμίνη προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία είναι αναστρέψιμη, είτε με αφαίρεση του επαγωγέα είτε με προσθήκη περίσσειας

σιδήρου, επιβεβαιώνοντας ότι η αναστολή αυτή οφείλεται στην ικανότητα της δεσφερριοξαμίνης να συμπλοκοποιεί το σίδηρο, που είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό. Το κοβάλτιο προκαλεί, επίσης, μείωση της σύνθεσης DNA και η εικόνα είναι αναστρέψιμη είτε με αφαίρεση του κοβαλτίου είτε με προσθήκη περίσσειας σιδήρου, υποδηλώνοντας ότι, σε αντίθεση με την επαγωγή του HIF-1α, η δράση του κοβαλτίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξαρτάται άμεσα από το σίδηρο. Η κερκετίνη έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων και προκαλεί τη μεγαλύτερη αναστολή στον πολλαπλασιασμό τους ήδη από τις 4 ώρες, αλλά η προσθήκη σιδήρου για άλλη μια φορά επαναφέρει το ρυθμό σύνθεσης του DNA. Ωστόσο, σε αντίθεση με την παρόμοια με την περίσσεια σιδήρου δράση του στην αναίρεση της επαγωγής του HIF-1α στις 4 ώρες, το ασκορβικό οξύ δεν επαναφέρει, όπως η περίσσεια σιδήρου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν παρουσία των μιμητών της υποξίας για 24 ώρες. Το αν η διαφορά αυτή οφείλεται στην παροδική δραστηριότητα του ασκορβικού οξέος ή στην ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών σε κάθε περίπτωση, παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστο.

Μελέτες με τη χρήση συμπλοκοποιητών του σιδήρου έχουν δείξει ότι η απουσία σιδήρου οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S και απόπτωση [187, 188]. Μάλιστα, έχειδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι περισσότερο ευαίσθητα από τα φυσιολογικά στη μείωση του σιδήρου, πιθανόν εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεων που έχουν σε σίδηρο [189, 190]. Τόσο η δεσφερριοξαμίνη όσο και το κοβάλτιο, σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν το θάνατο λευχαιμικών κυττάρων μέσω απόπτωσης [191]. Σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η δεσφερριοξαμίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξαιτίας συμπλοκοποίησης του σιδήρου. Η αναίρεση της αναστολής του πολλαπλασιασμού που προκαλεί το κοβάλτιο από την περίσσεια σιδήρου υποδηλώνει ότι το κοβάλτιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό με έναν μηχανισμό που εξαρτάται από το σίδηρο.

Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση ιωδιούχου προπιδίου και κυτταρομετρία ροής, που έγινε από τον Δρ. Π. Λιάκο έδειξε ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HeLa από τη δεσφερριοξαμίνη ή την κερκετίνη οφείλεται σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ενώ από το κοβάλτιο σε συγκέντρωση των κυττάρων στη φάση G2/M [182]. Σε όλες τις περιπτώσεις ο κυτταρικός κύκλος ομαλοποιείται με την προσθήκη σιδήρου. Η παρατήρηση αυτή

επιβεβαιώνει ότι το κοβάλτιο, παρότι επηρεάζει το σίδηρο, δρα με διαφορετικό μηχανισμό από τη δεσφερριοξαμίνη.

Η κερκετίνη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού σε διάφορες κυτταρικές σειρές εξαιτίας, μεταξύ των άλλων, αναστολής της αντιγραφής του DNA μέσω αλληλεπίδρασης με την τοποϊσομεράση II ή την DNA πολυμεράση ή εξαιτίας αναστολής κινασών [112]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τις κινάσες του κυτταρικού κύκλου CDK1 και CDK2 και επομένως προκαλούν σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ή G2, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο [192]. Στην παρούσα εργασία, φαίνεται ότι η κερκετίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό μέσω συμπλοκοποίησης του απαραίτητου για τη διαδικασία αυτή σιδήρου και οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G1, γεγονός που εξηγεί την αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση της.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου με τη δεσφερριοξαμίνη και την κερκετίνη σε κύτταρα HeLa εξηγούνται πλήρως από τη σιδηροδεσμευτική τους δράση. Επιπλέον, υποδηλώνουν ότι η μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HeLa από το κοβάλτιο οφείλεται στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, η λειτουργία των οποίων εξαρτάται από το σίδηρο.

Όσον αφορά την επίδραση του υποξικού στρες στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2, οι διαφορές είναι ότι η παρατεταμένη υποξία (48 ώρες) αναστέλλει ελαφρώς το ρυθμό σύνθεσης του DNA και ότι η προσθήκη περίσσειας σιδήρου επιτείνει αυτή τη μείωση. Παρουσία δεσφερριοξαμίνης ή κοβαλτίου, η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2 είναι πλήρης στις 48 ώρες και αναστρέψιμη στις 4 ώρες, αλλά μη αναστρέψιμη ούτε στις 24 ούτε και στις 48 ώρες από την περίσσεια σιδήρου. Τέλος, παρουσία κερκετίνης η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι πλήρης ήδη από τις 4 ώρες και ο πολλαπλασιασμός δεν επαναφέρεται με την προσθήκη περίσσειας σιδήρου. Επομένως, επιβεβαιώνεται η παρατήρηση ότι τόσο το κοβάλτιο, όσο και η δεσφερριοξαμίνη και η κερκετίνη μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά σε αντίθεση με τα κύτταρα HeLa, η προσθήκη περίσσειας σιδήρου δεν τον επαναφέρει στα φυσιολογικά επίπεδα. Προφανώς, η ευαισθησία των δυο κυτταρικών σειρών στο σίδηρο διαφέρει. Πιθανόν, τα κύτταρα HeLa να είναι πιο ικανά να χειριστούν πιθανή υπερφόρτωση σιδήρου, σε αντίθεση με τα HepG2. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει αρνητικές επιπτώσεις στο

κύτταρο. Μια από τις αρνητικές δράσεις του σιδήρου είναι η παραγωγή μέσω της αντίδρασης Fenton των ROS, τα οποία οξειδώνουν μακρομόρια, αλλά επιπλέον ενέχονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα κύτταρα HepG2 μπορεί να είναι περισσότερο ευαίσθητα στα ROS και λιγότερο ικανά να αμυνθούν στην αύξησή τους ή τα ROS να ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για το λόγο αυτό, η προσθήκη περίσσειας σιδήρου να αδυνατεί να επαναφέρει το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.

Η απόπτωση είναι μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που χρησιμοποιείται από τα μετάζωα και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση ιστών. Η απόπτωση μπορεί να διεγερθεί από ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μηνύματα. Επειδή η υποξία σχετίζεται με γενετική αστάθεια, πιστεύεται ότι οδηγεί σε απόπτωση για την αποφυγή συγκέντρωσης κυττάρων με μεταλλάξεις [192]. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές τόσο για τον αντιαποπτωτικό ρόλο του HIF-1α όσο και για τον προαποπτωτικό του ρόλο. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τόσο η υποξία όσο και οι ενώσεις που μιμούνται την υποξία προκαλούν απόπτωση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους [131, 184, 193, 194]. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που οδηγούν σε απόπτωση δεν είναι πλήρως γνωστοί.

Στην παρούσα εργασία, παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των κυττάρων HeLa ή HepG2 παρουσία δεσφερριονοξαμίνης, κοβαλτίου και κερκετίνης ήταν μικρότερος, δεν παρατηρήθηκε σε καμιά περίπτωση απόπτωση προκαλούμενη από τις ενώσεις αυτές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα κύτταρα HeLa και HepG2, απόπτωση παρατηρείται σε περιπτώσεις που οι συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων ουσιών ήταν πολύ μεγαλύτερες.

Σχέση του HIF-1α με την επιβίωση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο HIF-1α δε σχετίζεται ξεκάθαρα με την επιβίωση ή την απόπτωση των κυττάρων HeLa και HepG2. Και στα δυο είδη κυττάρων, η επαγωγή του HIF-1α από την υποξία δεν επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων. Αντιθέτως, οι τρεις άλλοι επαγωγείς του HIF-1α που μελετήθηκαν, η δεσφερριονοξαμίνη, το κοβάλτιο και η κερκετίνη μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επειδή διαταράσσουν την κυτταρική ομοιοστασία του σιδήρου. Όπως δείξαμε, σε κύτταρα HeLa η διαταραχή αυτή είναι αναστρέψιμη είτε με αφαίρεση του επαγωγέα είτε με προσθήκη περίσσειας σιδήρου στην καλλιέργεια. Επομένως, σε συνθήκες που ο HIF-1α είναι σταθερός και ενεργός, τα κύτταρα ή

πολλαπλασιάζονται (υποξία) ή μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και δεν επιβιώνουν (μιμητές της υποξίας). Στις ίδιες συνθήκες, τα κύτταρα δεν πεθαίνουν με απόπτωση, τουλάχιστον μέχρι 48 ώρες καλλιέργειας. Επιπλέον, η προσθήκη σιδήρου, η οποία επαναφέρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναιρεί (στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης και της κερκετίνης) ή διατηρεί (στην περίπτωση του κοβαλτίου) την έκφραση του HIF-1α. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε κύτταρα HeLa, στην περίπτωση της δεσφερριοξαμίνης και της κερκετίνης, ενώσεις που συμπλοκοποιούν το σίδηρο, η έκφραση του HIF-1α σχετίζεται αρνητικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ στην περίπτωση της υποξίας και του κοβαλτίου, ο HIF-1α δε σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα παραπάνω τονίζουν τη σημασία του σιδήρου και όχι του HIF-1α για την επιβίωση και πολλαπλασιασμό αυτών των γρήγορα αυξανόμενων καρκινικών κυττάρων. Αντιθέτως, στα κύτταρα HepG2, η δράση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό δεν αναιρείται πλήρως από το σίδηρο και του κοβαλτίου παραμένει η ίδια με την προσθήκη σιδήρου, ενώ και στις δυο περιπτώσεις διατηρείται η έκφραση του HIF-1α. Η δράση της δεσφερριοξαμίνης και της κερκετίνης δεν αναιρείται από το σίδηρο, όπως και η έκφραση του HIF-1α.

Ίσως, το σημαντικότερο συμπέρασμα από την εργασία αυτή είναι η εμπλοκή του μονοπατιού του HIF-1 σε διάφορους βασικούς κυτταρικούς μηχανισμούς, όπως ο μεταβολισμός του σιδήρου και ο πολλαπλασιασμός και η διαπίστωση ότι οι διαφορετικές ιδιότητες που πολλοί «μιμητές της υποξίας» διαθέτουν είναι μεγαλύτερης σημασίας από την έκφραση του HIF-1α στην τελική απόκριση των κυττάρων κάτω από συνθήκες υποξικού στρες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποξία (μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου) αυξάνει την έκφραση του HIF-1α, της ρυθμιστικής υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), επειδή εμποδίζει τη δράση O_2 και Fe^{2+} - εξαρτώμενων προλυλοϋδροξυλασών, οι οποίες προάγουν την πρωτεόλυσή του. Ο HIF-1α επάγεται και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία) από ορισμένες ενώσεις με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί σε όλες τις περιπτώσεις. Στην παρούσα διατριβή συγκρίθηκε, σε κύτταρα HeLa και HepG2, η ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α από την υποξία και τις ενώσεις δεσφερριοξαμίνη, χλωριούχο κοβάλτιο και κερκετίνη, μελετήθηκε η επίδραση των ανωτέρω συνθηκών στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και απόπτωση και διερευνήθηκε ο ρόλος του σιδήρου. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι, όπως η υποξία, οι «μιμητές της υποξίας» που χρησιμοποιήθηκαν επάγουν μεταγραφικά ενεργό HIF-1 σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη, η έκφραση της οποίας όμως απαιτεί συνεχιζόμενη πρωτεϊνοσύνθεση. Όπως είχεδειχθεί για τη δεσφερριοξαμίνη, η επαγωγή του HIF-1α από την κερκετίνη και ορισμένα άλλα φλαβονοειδή, κατάλληλης δομής και λιποφιλικότητας, οφείλεται στη συμπλοκοποίηση του ενδοκυττάριου ελεύθερου σιδήρου και αναιρείται από την προσθήκη περίσσειας σιδήρου. Αντιθέτως, η επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο δεν αναιρείται από την προσθήκη περίσσειας σιδήρου, αλλά εξαρτάται από την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και τη λειτουργία των PI-3K και MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών. Σε αντίθεση με την υποξία, όλοι οι «μιμητές της υποξίας» μειώνουν, σε διαφορετικό βαθμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επειδή επηρεάζουν το μεταβολισμό του σιδήρου. Η επαναφορά του πολλαπλασιασμού σε φυσιολογικά επίπεδα με την προσθήκη περίσσειας σιδήρου παρατηρείται σε κύτταρα HeLa, αλλά όχι σε HepG2. Και στις δυο κυτταρικές σειρές, ωστόσο, η έκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό ή απόπτωση. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τις διαφορές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και τους «μιμητές της υποξίας» και υπογραμμίζουν την πλειοτροπική δράση των τελευταίων στο μεταβολισμό του σιδήρου και άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

SUMMARY

Hypoxia induces the expression of HIF-1 α , the regulatory subunit of transcriptional factor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), by inhibiting the action of O₂- and iron-dependent prolyl hydroxylases. HIF-1 α can be induced in normoxia by certain chemicals, but their mechanism of action has not been determined. In the present study we compared, in HeLa and HepG2 cells, the regulation of the expression of HIF-1 α by hypoxia and by desferrioxamine, cobalt chloride or quercetin, investigated the effect of these conditions on cell survival, proliferation and apoptosis and examined the role of iron. Our results show that, like hypoxia, the “hypoxia mimetics” employed induce transcriptionally active HIF-1 by stabilizing the protein, the expression of which, however, requires ongoing protein synthesis. As it has been shown for desferrioxamine, the induction of HIF-1 α by quercetin and other flavonoids, of appropriate structure and lipophilicity, is due to the reduction of the concentration of intracellular iron through chelation and is reversed by excess iron. On the contrary, the induction of HIF-1 α by cobalt is not reversed by excess iron, but involves the production of reactive oxygen species and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and MAP kinase pathways. Unlike hypoxia, the “hypoxia mimetics” decrease cell proliferation by influencing iron metabolism. Proliferation is restored by the addition of excess iron in HeLa cells, but not in HepG2 cells. However, in both cell lines, the expression of HIF-1 α does not correlate with cell survival, proliferation or apoptosis. These results address the differences in cellular response to hypoxia and “hypoxia mimetics” and highlight the multiple actions of “hypoxia mimetics” in iron metabolism and other basic cellular processes.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999, 15:551–578.
2. Bardos JI and Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. Biochim Biophys Acta 2005, 1755:107–120.
3. William G. and Kaelin Jr. How oxygen makes its presence felt. Genes Dev 2002, 16:1441–1445.
4. Ikeda E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. Pathology International 2005; 55: 603-610.
5. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 5510–5514.
6. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1996, 271:17771–17778.
7. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1a. J Biol Chem 1997, 272:19253–19260.
8. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1: definition of regulatory domains within the alpha subunit. J Biol Chem 1997, 272:11205–11214.
9. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 1996, 21:267–271.

10. 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-1 α . *EMBO J.*1998, 17:6573–6586.
11. Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica* 2004, 51:563–585.
12. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36:189–204.
13. Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, Kikuchi Y, Ohe N, Matsushita N, et al., Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:1936–1940.
14. 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.
15. Flamme I, Frohlich T, Von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech. Dev.*1997, 63:51–60.
16. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujji-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94:4273–4278.
17. Hogenesch JB, Chan WC, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J Biol Chem* 1997, 272:8581–8593.

18. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third a-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3a. *Gene Expression* 1998, 7:205–213.
19. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 287:808-813.
20. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001, 414:550-554.
21. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS Domain Protein (IPAS) Is a Hypoxia-inducible Splicing Variant of the Hypoxia inducible Factor-3 α Locus. *J Biol Chem* 2002, 277:32405–32408.
22. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 30 to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88:5680–5684.
23. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994, 269:23757–23763.
24. Wenger RH, Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000, 203:1253–1263.
25. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3:721-732.
26. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 1996, 271:32253–32259.

27. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 94:5667–5672.

28. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitinproteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997, 272:22642–22647.

29. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998, 95:7987–7992.

30. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999, 399:271–275.

31. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyc-Kizesca M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 2000, 97:10430–10435.

32. Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML, Peet DJ. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem* 2003, 270:781–790.

33. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by praline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001, 292:464–468.

34. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 2001, 20:5197-5206.
35. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001, 107:43–54.
36. Semenza GL. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How Animal Cells Signal Hypoxia to the Nucleus. *Cell* 2001, 107:1–3.
37. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:38–47.
38. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, and Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 α - degradative pathway. *J Biol Chem* 2002, 277:29936-29944.
39. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, and Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 2000, 14:34–44.
40. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 2004, 279:40337-40344.
41. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* 2004, 383: 429-437.

42. Hirsila M, Koivunen P, Xu L, Seey T, Kivirikko KI, Myllyharju J. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J* 2005, 19:1308-1310.
43. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.*2003, 116:1319–1326.
44. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia inducible factor-1a for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 2002, 277:39792-39800.
45. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003, 22:4082-4090.
46. Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 2004, 381:761–767.
47. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 2005, 90:791-797.
48. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002a, 295:858–861.
49. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1a and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001, 15:2675–2686.
50. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002b, 16:1466–1471.

- 51.** Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cellular Signalling* 2005, 17:1–9.
- 52.** Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SHK, Sohn TK, Bae MH et al. Regulation and Destabilization of HIF-1 α by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell* 2002, 111:709–720.
- 53.** Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, Pouyssegur J, Brahimi-Horn M. Arrest-defective-1 Protein, an Acetyltransferase, Does Not Alter Stability of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and Is Not Induced by Hypoxia or HIF. *J Biol Chem* 2005, 280:31132–31140.
- 54.** Arnesen T, Kong H, Evjenth R, Gromyko D, Varhaug JE, Lin Z et al. Interaction between HIF-1 α (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 α . *FEBS Lett* 2005, 579:6428–6432.
- 55.** Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 216:669–675.
- 56.** Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999, 274:32631–32637.
- 57.** 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.
- 58.** Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling up-regulates the activity of

hypoxia inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 2003, 278:14013–14019.

59. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1749–1753.
60. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000, 60:1541–1545.
61. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000, 14:391–396.
62. Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002, 64:993–998.
63. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1K protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 2003, 549:105–109.
64. Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J.* 2001, 15:2715–2717.
65. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002, 16:1151–1162.

- 66.** Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T, Bunn HF. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 1995, 15:2135–2144.
- 67.** Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* 2001, 52:3–6.
- 68.** Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars Cell Dev Biol* 2005, 16:474–486.
- 69.** Gorlach A, Kietzmann T, Hess J. Redox signaling through NADPH oxidases: involvement in vascular proliferation and coagulation. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 973:505–507.
- 70.** Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep.* 2002, 3:420–425.
- 71.** Kaelin WG Jr: ROS: Really involved in oxygen sensing. *Cell Metabolism* 2005, 1:357–358.
- 72.** Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988, 242:1412–1415.
- 73.** Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 212:550–556.
- 74.** Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996, 271:32253–32259.

- 75.** Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 1998, 92:2260–2268.
- 76.** Gleadle JM, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing. *Eur J Biochem* 1995, 234:92–99.
- 77.** Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:11715–11720.
- 78.** Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1a during Hypoxia. *J Biol Chem* 2000, 275:25130–25138.
- 79.** Enomoto N, Koshikawa N, Gassmann M, Hayashi J, Takenaga K. Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and oxygenregulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 297:346–352.
- 80.** Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 α . *Science* 2003, 302:1975–1978.
- 81.** Grzenkowicz-Wydra J, Cisowski J, Nakonieczna J, Zarkbski A, Udilova N, Nohl H, Jozkowicz A, Podhajska A, Dulak J. Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell Biochem* 2004, 264:169–181.

82. Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 2004, 118: 781-794.
83. Paky A, Michael JR, Burke-Wolin TM, Wolin MS, Gurtner GH. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J Appl Physiol* 1993, 74:2868–2874.
84. Kietzmann T, Freimann S, Bratke J, Jungermann K. Regulation of the gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glycolytic aldolase A gene expression by O₂ in rat hepatocyte cultures. Involvement of hydrogen peroxide as mediator in the response to O₂. *FEBS Lett* 1996, 388:228–232.
85. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993, 82:3610–3615.
86. Huang LE, Ho V, Arany Z, Krainc D, Galson D, Tendler D, Livingston DM, Bunn HF. Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int* 1997, 51:548–552.
87. Schofield CJ and Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:343-354.
88. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 2003, 278:15911-15916.
89. Kanaya K, Tsai Ah-Lim, Kamitani T. Cobalt- and Nickel-Binding Property of Cullin-2. *Biochem Biophys Res Comm* 2002, 290:294–299.

- 90.** Kanaya K, Kamitani T. pVHL-independent ubiquitination of HIF-1 α and its stabilization by cobalt ion. *Biochem Biophys Res Comm* 2003, 306:750-755.
- 91.** Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor 1 α in cancer cells. *Cancer Res* 2003, 63:1764-1768.
- 92.** Gong Y, Agani FH. Oligomycin inhibits HIF-1 α expression in hypoxic tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005, 288:1023-1029.
- 93.** Chachami G, Simos G, Hatziefthymiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2004, 31:544-552.
- 94.** Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999, 94:1561–1567.
- 95.** Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, Mochan E. Interleukin 1 induces hypoxia inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J.* 2000, 350:307–312.
- 96.** Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 α by insulin and interleukin-1 β involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 2002, 512:157–162.
- 97.** Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000, 275:26765–26771.
- 98.** Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, et al. Thrombin activates the hypoxia inducible factor-1 signaling

pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001, 89:47–54.

- 99.** Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE: Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48403-48409.
- 100.** Bilton RL and Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochem*. 2003. 270:791-798.
- 101.** Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity F. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*. 2001, 276:9519– 9525.
- 102.** Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res*. 1997, 57:5328–5335.
- 103.** Karni R, Dor Y, Keshet E, Meyuhas O, Levitzki A. Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression under normoxia. *J Biol Chem* 2002, 277:42919–42925.
- 104.** Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 1999, 274:9038–9044.
- 105.** Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000, 95:189–197.

- 106.** Sandau KB, Fandrey J, Brune B. Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. *Blood* 2001a, 97:1009–1015.
- 107.** Sandau KB, Zhou J, Kietzmann T, Brune B. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1 α by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor- α in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 2001b, 276:39805–39811.
- 108.** Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 2003, 14:3470–3481.
- 109.** Wilson WJ and Poellinger L. The dietary flavonoid quercetin modulates HIF-1 α activity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2002, 293:446–450.
- 110.** Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999, 220:198–202.
- 111.** Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996, 20:933-956.
- 112.** Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000, 52:673-751.
- 113.** Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* 1999, 32:279-286.
- 114.** Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36:838-849.

- 115.** Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Kyaw M, Suzaki Y, Tamaki T. Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 2001, 60:656-665.
- 116.** Elkins JM, Hewitson KS, McNeill LA, Seibel JF, Schlemminger I, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ. Structure of Factor-inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) Reveals Mechanism of Oxidative Modification of HIF-1 α . *J Biol Chem* 2003, 278:1802–1806.
- 117.** Zhou YD, Kim YP, Li XC, Baerson SR, Agarwal AK, Hodges TW et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation by (-)-Epicatechin Gallate: Potential Adverse Effects of Cancer Chemoprevention with High-Dose Green Tea Extracts. *J Nat Prod* 2004, 67:2063-2069.
- 118.** Thomas R and Kim MH. Epigallocatechin gallate inhibits HIF-1 α degradation in prostate cancer cells. *BBRC* 2005, 334:543–548.
- 119.** Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 2001, 61:2429–2433.
- 120.** Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000, 14:391–396.
- 121.** Greijer AE and Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004, 57:1009–1014.
- 122.** Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998, 394:485-490.

- 123.** An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 1998, 392: 405-408.
- 124.** Chen D, Li M, Luo J et al. Direct interactions between HIF-1 α and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003, 278:13595–13598.
- 125.** Hammond EM and Giaccia AJ. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *BBRC* 2005, 331:718–725.
- 126.** Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000, 19:4621– 4631.
- 127.** Piret JP, Lecocq C, Toffoli S, Ninane N, Raes M, Michiels C. Hypoxia and CoCl₂ protect HepG2 cells against serum deprivation- and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1. *Exp Cell Res* 2004, 295:340-349.
- 128.** Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells. *J Biol Chem* 2001, 276:22368– 22374.
- 129.** Moritz W, Meier F, Stroka DM, et al. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1 α expression. *FASEB J* 2002, 16:745–747.
- 130.** Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 α renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* 2001, 61:6548– 6554.

- 131.** Piret J-P, Motter D, Raes M, Michiels C: Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002, 64:889-892.
- 132.** Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 2002, 8(4):Suppl.
- 133.** Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999, 59:5830–5835.
- 134.** Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Expression and distribution of the hypoxia inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000, 157:411–421.
- 135.** Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 2000, 6:1335–1340.
- 136.** Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 2004, 68:1061–1069.
- 137.** Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1 α protein via the proteosome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002, 62:2478–2482.
- 138.** Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia inducible factor-1 α -degradative pathway. *J Biol Chem* 2002, 277:29936–29944.
- 139.** Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ et al. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the

- 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol* 2002, 62:975–982.
- 140.** Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003, 3:363–375.
- 141.** Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RA et al. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res.* 2002, 62: 4316–4324.
- 142.** Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J. Natl Cancer Inst.* 2003, 95:516–525.
- 143.** D'Angelo G, Duplan E, Vigne P, Frelin C. Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1 α Pro-564 hydroxylation. *J Biol Chem* 2003, 278:15406–15411.
- 144.** Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, and Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci.* 1999, 11:4159-4170.
- 145.** Lee SH, Wolf PL, Escudero RBS, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000, 342:626-633.
- 146.** Parisi Q, Biondi-Zoccai G, Abbate A, Santini D, Vasaturo F, Scarpa S et al. Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction. *Cardiology* 2005, 99:337-339.
- 147.** Kido M, Du L, Sullivan CC, Li X, Deutsch R, Jamieson SW et al. Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha Reduces Infarction and Attenuates

Progression Dysfunction after Myocardial Infarction in the mouse. J American College of Cardiology 2005, 46: 2116-2124.

- 148.** Davis JM, Basic Cell Culture, Oxford University Press 2002, 149-152.
- 149.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 23.2-23.3.
- 150.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 12.1.4-12.1.5.
- 151.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.1.4-10.1.5.
- 152.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.2A.1-10.2A.9.
- 153.** Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 18.47-18.54.
- 154.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.6.1-10.6.2.
- 155.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.8.1-10.8.3.
- 156.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.8.4-10.8.6.
- 157.** Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 10.8.8-10.8.21.

158. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 14.6.1-14.6.2.
159. Melidou M, Riganakos K, Galaris D, Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med.* 2005, 39:1591-1600.
160. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 1.8.1-1.8.3.
161. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 9.7.12-9.7.21.
162. Chabre O, Liakos P, Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M et al. Cushing's Syndrome due to a Gastric Inhibitory Polypeptide-Dependent Adrenal Adenoma: Insights into Hormonal Control of Adrenocortical Tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:3134-3143.
163. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999, 2.2.1-2.2.3.
164. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore R, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press 1999. 2.5A.1-2.5A.5.
165. Herbert V, Shaw S, Jayatilake E. Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr* 1996, 126:1213S-1220S.
166. Tsiftoglou AS, Tsimadou AI, Papadopoulou LC, Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 2006, article in press.
167. Engelmann MD, Hutcheson R, Cheng I.F. Stability of ferric complexes with 3 hydroxyflavone (flavonol) 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) and 3,4 dihydroxyflavone. *J Agric Food Chem* 2005, 53:2953-2960.

168. Apprelikova O, Chandramouli GVR, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 2004, 92:491-501.
169. Rossignol F, Vache C, Clottes E. Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1 alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 2002, 299:135-142.
170. Lee JIW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004, 36:1-12.
171. Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225:485-488.
172. Iyer NV, Leung SW, Semenza GL. The human hypoxia-inducible factor 1 α gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* 1998, 52:159-165.
173. Jeong HJ, Chung HS, Lee BR, Kim SJ, Yoo SJ, Hong SH, Kim HM. Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1 α and NF-kappaB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306:805-811.
174. Callapina M, Zhou J, Schnitzer S, Metzen E, Lohr C, Deitmer JW, Brune B. Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1 α accumulation—Implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res* 2005, 306:274-284.
175. Kakhlon O, Cabantchik ZL. The labile iron pool: characterization, measurement and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:1037-1046.

- 176.** Doulias PT, Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:719-728.
- 177.** Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2005, 69:1421-1432.
- 178.** Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 1997, 57:2916-2921.
- 179.** Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:343-354.
- 180.** Kim HH, Lee SE, Chung WJ, Choi Y, Kwack KB, Kim SW et al. Stabilization of Hypoxia Inducible factor 1 α is involved in the hypoxic stimuli-induced expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Cytokine* 2002, 17:14–27.
- 181.** Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J, Brune B. Oxidized lowdensity lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1{alpha} (HIF-1{alpha}) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* 2003, 101: 4847-4849.
- 182.** Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Rad Res* 2006, in press.
- 183.** Gao N, Ding M, Zheng JZ, Zhang Z, Leonard SS, Liu KJ et al. Vanadate-induced Expression of Hypoxia-inducible Factor 1alpha and

Vascular Endothelial Growth Factor through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem* 2002, 277:31963-31971.

184. Kim HJ, Yang SJ, Kim YS, Kim TU. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase activation in human cervical cancer HeLa cells. *J Biochem Mol Biol* 2003, 36:468-474.
185. Le NT, Richardson DR. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 2004, 104: 2967-2975.
186. Le NT, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1603:31-46.
187. Estrov Z, Tawa A, Wang XH, et al. In vitro and in vivo effects of desferrioxamine in neonatal acute leukemia. *Blood* 1987, 69:757-761.
188. Becton DL, Bryles P. Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation. *Cancer Res.* 1988, 48:7189-7192.
189. Lovejoy DB, Richardson DR. Novel “hybrid” iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood* 2002, 100:666-676.
190. Richardson DR, Baker E. Two saturable mechanisms of iron uptake from transferrin in human melanoma cells: the effect of transferrin concentration, chelators and metabolic probes on transferrin and iron uptake. *J Cell Physiol* 1994, 161:160-168.
191. Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis

through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. Apoptosis 2006, 11:67-77.

- 192.** O'Prey J, Brown J, Fleming J, Harrison PR. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. Biochem Pharmacol 2003, 66:2075-2088.
- 193.** Hileti D, Panayiotidis P, Hoffbrand AV. Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells. Br J Haematol 1995, 89:181-187.
- 194.** Zou W, Yan M, Xu W, Huo H, Sun L, Zheng Z, Liu X. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. J Neurosci Res 2001, 64:646-653.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

- **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Επώνυμο: Τριανταφύλλου

Όνομα: Αναστασία

Πατρώνυμο: Γεώργιος

Ημερομηνία γέννησης: 21 Νοεμβρίου 1977

Τόπος: Λάρισα

Διεύθυνση: Μητροπούλου 64

Τηλ.: 2410230711

6977353876

email: atriand@med.uth.gr

Επαγγελματική ιδιότητα: Βιολόγος

- **ΣΠΟΥΔΕΣ**

Σεπτέμβριος 1996 – 2000 : Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας του Α.Π.Θ.
Αποφοίτηση με βαθμό πτυχίου 7.7, «Λίαν Καλώς»

Μάιος 2002 - σήμερα : Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας με θέμα:
«Μελέτη της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία.»,
σε Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2001 (01ΕΔ121).

- **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά: πάρα πολύ καλή γνώση (κάτοχος Lower Cambridge, με B)

Ιταλικά: πάρα πολύ καλή γνώση (κάτοχος Diploma di lingua italiana)

- **ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ**

Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB)

- **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Εργαστηριακή εμπειρία:

Σεπτέμβριος 1999 - Ιούλιος 2000 :

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στον τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας του Α.Π.Θ., με θέμα: «Γενετική ανάλυση των κατοίκων των νομών Λακωνίας και Εύβοιας με τη χρήση δύο μικροδορυφορικών δεικτών. Χρησιμοποίηση αυτοσωματικών μικροδορυφορικών DNA δεικτών στην επίλυση υποθέσεων πατρότητας» και επιβλέποντα Καθηγητή τον κ. Κ. Τριανταφυλλίδη. Απόκτηση εμπειρίας σε τεχνικές όπως: απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), πέψεις με ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορήσεις.

2 Μαΐου 2000 - 2 Ιουλίου 2000 :

Εκπόνηση πρακτικής άσκησης σε Εργαστηριακό Διαγνωστικό Κέντρο Βιοπαθολογίας, στη Θεσσαλονίκη, με θέμα: «Ενδοκρινείς αδένες. Εργαστηριακός προσδιορισμός ορμονικών εξετάσεων.» Εκπαίδευση στις αιμοληψίες. Παρακολούθηση εργασιών στα τμήματα: αιματολογικό, βιοχημικό, ανοσολογικό και ορμονολογικό.

Ιούνιος 2004 :

Εξειδίκευση στις τεχνικές διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης.

Λιδακτική εμπειρία:

Δεκέμβριος 2004, Δεκέμβριος 2005 :

Συμμετοχή στην οργάνωση των εργαστηρίων του μαθήματος "Κυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης" του μεταπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας με τίτλο: "Κλινικές εφαρμογές μοριακής ιατρικής" και επίβλεψη των μεταπτυχιακών φοιτητών στα εργαστήρια.

• **ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

Παρουσιάσεις εργασιών

Σεπτέμβριος 2000:

Παρουσίαση διπλωματικής εργασίας.

(Βαθμός 10)

Παρουσίαση πρακτικής άσκησης.

(Βαθμός 10)

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. Κουβάτση Α., Κοντοπούλου Ε., Μανιατάκος Ν., Χατζηκυριακίδου Α., Τριανταφύλλου Α., Κεραμάρη Μ., Δεληγιαννίδης Π. και Τριανταφυλλίδης Κ., Αθήνα 8-10 Δεκεμβρίου 2000. “Χρησιμοποίηση DNA δεικτών στην επίλυση ιατροδικαστικών υποθέσεων”, Πρακτικά Πανελλήνιου Συνεδρίου Μοριακής Βιολογίας- Κυτταρογενετικής στην Υγεία (σελ 162)
2. Ιερεμιάδου Φ., Τριανταφυλλίδης Α., Μανιατάκος Ν., Τριανταφύλλου Α., Δεληγιαννίδης Π., Κουβάτση Α. και Τριανταφυλλίδης Κ., Χίος 24-27 Μαΐου 2001. “Γενετική ανάλυση των κατοίκων των νομών Κορινθίας, Λακωνίας και Εύβοιας με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών”, Proceedings of the 23th Meeting of the Hellenic Society of Biological Sciences (EEBE) (σελ 55)
3. A.Triantafyllou, P.Liakos, A. Tsakalof, E. Georgatsou, G. Simos and S. Bonanou, Αθήνα Δεκέμβριος 2003. “*Hypoxia, desferrioxamine and quercetin differentially regulate hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) expression and cell proliferation in HeLa cells*”, Proceedings of the 55th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (EEBMB). Newsletter, vol 50 (σελ 675-680)
4. M. Samara, I. Chiotoglou, S. Likousi, A. Triantafyllou, S. Bonanou, N. Vamvakopoulos, P. Liakos, P. Kollia, Στοκχόλμη 2-5 Ιουνίου 2005. “*Parallel assessment of transferrin receptor-1 and -2, ferritin and NRAMP2 expression during human erythropoiesis*”, 10th Congress of the European Hematology Association, Haematologica/the hematology journal (σελ.32)
5. A.Triantafyllou, P.Liakos, A. Tsakalof, E. Georgatsou, G. Simos and S. Bonanou, Βουδαπέστη 2-7 Ιουλίου 2005. “*Differential Regulation of Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF-1α) Expression and HeLa Cell Survival and Proliferation by Hypoxia, Desferrioxamine, Cobalt and Quercetin: The Role of Iron.*”, FEBS Journal 272: 1 July 2005 (σελ 567)

6. Τριανταφύλλου Α., Λιάκος Π., Τσακάλωφ Α., Γεωργάτσου Ε., Σίμος Γ. και Μπονάνου Σ., Αθήνα 7-10 Δεκεμβρίου 2005. *“Ο ρόλος του σιδήρου στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, της επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων HeLa σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία δεσφερριοξαμίνης, κοβαλτίου ή κερκετίνης.”*, Πρακτικά 1^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Βασικών Ιατρικών Εφαρμογών (σελ 105)
7. Anastasia Triantafyllou, Panagiotis Liakos, Andreas Tsakalof, Georgia Chachami, Efrosyni Paraskeva, Ilias Athanasiadis, Paschalis-Adam Molyvdas, Eleni Georgatsou, George Simos and Sophia Bonanou, Λουξεμβούργο 25-28 Ιανουαρίου 2006. *"Ferric citrate abolishes the induction of the Hypoxia Inducible Factor HIF-1α expression and restores the inhibition of cell proliferation produced by the flavonoid quercetin."* Proceedings of the Meeting of Cell Signaling World 2006, Signal Transduction Pathways as therapeutic targets (σελ 574)

Δημοσιεύσεις

1. Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI3K- and MAPK-dependent mechanism.* Free Radical Research, June 2006 (in press)
2. Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Chachami G, Paraskeva E, Molyvdas PA, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. *Quercetin induces HIF-1α and inhibits cell proliferation by depleting iron.* (submitted)