



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘ. Χ. ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ

**ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ
ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ:
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (HIF)-1**

ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΤΣΑΠΟΥΡΝΙΩΤΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παρασκευά Ευφροσύνη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ (Επιβλέπουσα)
2. **Μολυβδάς Πασχάλης –Αδάμ:** Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
3. **Σίμος Γεώργιος:** Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ (10⁴/Α.10 2012 Γ.Σ.Ε.Σ.)

1. **Παρασκευά Ευφροσύνη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)
2. **Μολυβδάς Πασχάλης –Αδάμ:** Καθηγητής Τμήματος Φυσιολογίας Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Σίμος Γεώργιος:** Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
4. **Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Πνευμονολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. **Γερμενής Αναστάσιος:** Καθηγητής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. **Χατζηευθυμίου Αποστολία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. **Ιωάννου Μαρία:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στην οικογένεια μου....

**Στην καθηγήτρια μου
κ. Ευφροσύνη Παρασκευά...**

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	14
ABSTRACT	16
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	18
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
1.1 Το αναπνευστικό σύστημα	21
1.2 Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι των αεραγωγών	22
1.2.1 Το Άσθμα	22
1.2.2. Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια - ΧΑΠ	24
1.3. Η επίδραση της φλεγμονής στα λεία μυϊκά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος	25
1.3.1 Ο δομικός ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων	25
1.3.2. Ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων	28
1.4 Οι παράγοντες που συμμετέχουν στη φλεγμονή των αεραγωγών	31
1.4.1 Κυτοκίνες και χημειοκίνες	31
1.4.2 Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs)	32
1.5 Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF)-α	33
1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	35
1.7 Υποξία και φλεγμονή	40
1.8. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF	42
1.8.1 HIF-1α	42
1.8.2 HIF-1β ή ARNT	43
1.8.3 HIF-2α	44
1.8.4 HIF-3α	45
1.9 Η ρύθμιση του του HIF-1α	46
1.9.1 Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο	46
1.9.2 Ρύθμιση του HIF-1 από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου	49
1.9.3 Ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το οξυγόνο	50
1.9.3.1 Ρύθμιση του HIF-1α στο επίπεδο της μεταγραφής	50
1.9.3.2 Ρύθμιση του HIF-1α στο επίπεδο της μετάφρασης	51
1.9.3.3 Η ρύθμιση του HIF-1α σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο	52
1.9.3.4 Ρύθμιση της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα	54
1.10 Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες	54
1.10.1 Ρυθμιση της σταθερότητας μέσω Hsp90/RACK11	54
1.10.2 Η ρυθμιση του HIF-1α από την πρωτεΐνη p300	55
1.15 Ρύθμιση του HIF-1α κατά την φλεγμονή	56
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	58
2.1 Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων και In vitro διαφοροποίηση	58
2.2 Κατεργασία των κυττάρων	58
2.3 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών	59
2.4 Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΛΜΚ	59

2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	60
2.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	60
2.7 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	61
2.8 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο Ανοσοφθορισμό	64
2.9 Απομόνωση ολικού RNA	65
2.10 Μέθοδος φωτομετρικού προσδιορισμού συγκέντρωσης RNA	66
2.11 Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή	66
2.12 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time-PCR)	67
2.13 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α με δοκιμασία λουσιφεράσης	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
3.1 Η έκθεση των ανθρώπινων βρογχικών ΛΜΚ στον TNFα αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του mRNA του HIF-1α	70
3.2 Ο TNFα επάγει την φωσφορυλίωση και την μετακίνηση στον πυρήνα της p65 υπομονάδας του NF-κΒ στα βρογχικά ΛΜΚ	72
3.4. Η συμμετοχή των ROS στην μεσολαβούμενη από τον NFκΒ επαγωγή του HIF-1α.	78
3.5 Ο TNFα καταστέλλει την επαγωγή της εξαρτώμενης από τα HRE μεταγραφικής δράσης του HIF-1α στην υποξία	80
3.6 Η επαγωγή του HIF-1α από τον TNFα συνοδεύεται από την πυρηνική μετατόπιση του	83
3.7 Η έκφραση γονιδίων της φλεγμονής επάγεται από τον TNFα αλλά όχι από την υποξία στα ανθρώπινα ΛΜΚ των βρόγχων	84
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Σταματίνα Τσαπουρνιώτη

Διεύθυνση: Καραϊσκάκη 42-44, Λάρισα, ΤΚ:41222

Τηλ. Επικοινωνίας: 6979672672

E-mail: mat.tsapournioti@gmail.com

Ημ. Γέννησης: 18/05/1983

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2001: Αποφοίτηση από το 3^ο Ενιαίο Λύκειο Χαλκίδας. Βαθμός Απολυτηρίου: 19.3.
- 10ος/2001-7ος/2008: Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βαθμός πτυχίου: “Λίαν Καλώς” .
- 10ος/2008 ως σήμερα : Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τίτλο «Αναδιαμόρφωση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών από παράγοντες φλεγμονής: Ο ρόλος του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα (HIF)-1».

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 14/1/2010-13/10/2011: Έμμισθη εσωτερική βοηθός στο Αναισθησιολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας (συμπλήρωση 21 μηνών άσκησης ειδίκευσης στην Αναισθησιολογία).
- 14/10/2011-18/3/2012: Έμμισθη εσωτερική βοηθός ως υπεράριθμη στο Αναισθησιολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας.
- 19/3/2012-26/9/2012: Επλήρωση υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου σε προσωρινή θέση στο Κέντρο Υγείας Παλαμά για το Π.Ι. Ιτέας.
- 27/9/2012 ως σήμερα: Έμμισθη εσωτερική βοηθός στο Αναισθησιολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας προς συνέχιση και ολοκλήρωση της άσκησης στην ιατρική ειδικότητα της Αναισθησιολογίας.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

- 2011 ως σήμερα: Μέλος της Εταιρείας Αναισθησιολογίας και Εντατικής Ιατρικής Βορείου Ελλάδας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Tsapournioti, S., I. Mylonis, A. Hatziefthimiou, M. G. Ioannou, R. Stamatiou, G. K. Koukoulis, G. Simos, P. A. Molyvdas and E. Paraskeva (2013). "TNF α induces expression of HIF-1 α mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells." J Cell Physiol **228**(8): 1745-1753.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Tsapournioti S, Molyvdas P-A and Paraskeva E (2009). The role of Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the inflammatory response of airway smooth muscle cells. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Book of Abstracts of the 60th meeting 55, p.242.
- Tsapournioti S, Mylonis I, Molyvdas P-A, Simos G and Paraskeva E (2010). The involvement of HIF-1 α in the airway smooth muscle inflammatory response. HypoxiaNet, EU COST ACTION TD0901 Meeting of the 4 Working Groups "Therapeutic aspects of hypoxia-dependent pathways" Dublin, Ireland, 2010, p.21.
- Tsapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R, Koukoulis GK, Simos G, Molyvdas P-A and Paraskeva E (2012). TNF α induces HIF-1 α mRNA and protein via NF- κ B but inhibits hypoxic HIF-1 α /ARNT complex formation and HRE-dependent transcriptional activity in Airway Smooth Muscle Cells. HypoxiaNet (COST TD0901) "Sensing Hypoxia in the cell and the organism" Essen, Germany, 2012, p.84.
- Tsioungkos N, Tsapournioti S, Molyvdas P-A and Paraskeva E (2013). TNF- α and hypoxia alter the expression of ASM cell contractile protein genes. 3rd Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM), Athens Greece 2013, Clinical and Translational Allergy 2014, 4(Suppl 1):P7.
- Triantafyllou E-A, Tsapournioti S, Mylonis I, Simos G, Molyvdas P-A, and Paraskeva E (2014). The inflammatory mediator tumor necrosis factor α (TNF α) has cell type-dependent effects on hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). The FEBS Journal 281 (Suppl. 1), Paris France 2014, Abstracts, p. 176.
- Triantafyllou E.-A., Tsapournioti S., Mylonis I., Simos G., Molyvdas P.-A and Paraskeva E (2014). The effects of tumor necrosis factor α (TNF α) and hypoxia on the induction of nuclear factor- κ B (NF- κ B), HIF-1 and inflammation marker genes. Views Into Nuclear Function -A SEEDRUG Workshop and practical sessions on live-cell imaging methods. 11-13 September 2014, Patras.
- Triantafyllou E.A., Tsapournioti S., Myloni I., Simos G. and Paraskeva E. (2014).

Interplay of inflammation and hypoxia on the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and HIF-1 pathways. 65th National Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 28-30 November 2014, Thessaloniki. Abstracts, P091.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Αγγλικά: -Certificate of Proficiency in English. University of Cambridge – Local Examination Syndicate. Certificate of Proficiency in English, The University of Michigan English Language Institute.
- Γαλλικά: Diplome d' Etudes en Langue Francaise - Delf 1er Degre (A1,A2,A3,A4).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Κατά πρώτο λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Παρασκευά Ευφροσύνη για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής που υπήρξε ανεκτίμητη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την στήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές, την συμπαράσταση και την μεγάλη υπομονή που έδειξε σε όλο το διάστημα που απαιτήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα δύο άλλα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Μολυβδά Πασχάλη-Αδάμ που μου έδωσε την ευκαιρία ως διευθυντής να πραγματοποιήσω αυτή την μελέτη στο εργαστήριο Φυσιολογίας, καθώς και για τις ουσιαστικές συμβουλές του κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Σίμο Γεώργιο για την δυνατότητα που μου έδωσε να συνεργαστώ και να πραγματοποιήσω σημαντικό μέρος των πειραμάτων μου στο εργαστήριο Βιοχημείας, καθώς επίσης και τις επιστημονικές του συμβουλές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Χατζηευθυμίου Αποστολία για τα εποικοδομητικά της σχόλια καθώς και για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση μέρους των πειραμάτων. Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Ιωάννου Μαρία για το χρόνο που μου διέθεσε και για την συνεργασία της στη δημιουργία και τη δημοσίευση μέρους των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και συγκεκριμένα τον καθηγητή Πνευμονολογίας κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο και τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Γερμενή Αναστάσιο για το χρόνο που διέθεσαν για να διαβάσουν και να παρακολουθήσουν την παρούσα διατριβή.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία καθώς πέραν της πολύ μεγάλης βοήθειας και των συμβουλών που μου

προσέφερε, υπήρξε καθοδηγητής μου σε σημαντικό μλερος των πειραματικών διαδικασιών καθώς επίσης συνέβαλλε καταλυτικά στην δημιουργία της δημοσίευσης που προέκυψε από την παρούσα μελέτη. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την κ. Σταματίου Ροδόπη για την άψογη συνεργασία και την προθυμία της να με βοηθήσει όποτε το είχα ανάγκη.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κ. Καλούση Αλκμήνη και κ. Λυμπεροπούλου Αγγελική, πρώην μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας για την άριστη συνεργασία που είχα μαζί τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδερφή μου για την απεριόριστη στήριξη που πάντα μου προσφέρουν. Όπως επίσης και τους φίλους μου Ελένη, Ειρήνη, Νίκο, Νικήτα, Γιώργο που ο καθένας με τον τρόπο του με βοήθησε όλο αυτό το διάστημα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) των αεραγωγών είναι γνωστό ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλλαγές που παρατηρούνται στο βρογχικό δένδρο κατά τις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού όπως το άσθμα και η ΧΑΠ. Τα ΛΜΚ συμμετέχουν τόσο ως δομικά κύτταρα που ρυθμίζουν τον βρογχοκινητικό τόνο όσο κι ως ρυθμιστικά της φλεγμονής κύτταρα, καθώς η έκθεση τους σε προφλεγμονώδεις παράγοντες και στην πληθώρα των κυττάρων του ανοσοποιητικού που συσσωρεύονται στους αεραγωγούς κατά την φλεγμονή, έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση μεσολαβητών της φλεγμονής από τα ίδια τα ΛΜΚ.

Η φλεγμονή των αεραγωγών συνοδεύεται από ανάπτυξη τοπικής υποξίας εξαιτίας της αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου από τα πολυάριθμα φλεγμονώδη κύτταρα που συγκεντρώνονται στους αεραγωγούς και της ταυτόχρονης μειωμένης παροχής αυτού λόγω της συνυπάρχουσας αγγειακής βλάβης. Κύριος ρυθμιστής της υποξίας είναι ο παράγοντας HIF-1, ο οποίος ενεργοποιείται κατά την υποξία προωθώντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων που ρυθμίζουν την επιβίωση των κυττάρων στο υποξικό περιβάλλον. Ο HIF-1 επάγεται και σε συνθήκες νορμοξίας υπό την επίδραση αυξητικών, ογκογόνων ή φλεγμονωδών παραγόντων.

Ο HIF-1 έχειδειχθεί ότι επάγεται από πολυάριθμους παράγοντες φλεγμονής σε διάφορους τύπους κυττάρων κυρίως του ανοσιακού συστήματος. Παράλληλα έχειδειχθεί ότι εκφράζεται στα ΛΜΚ των αεραγωγών υπό την επίδραση μιμητικών υποξίας και FBS. Ωστόσο δεν είναι γνωστό αν επάγεται και ποια είναι η δράση του στα ΛΜΚ σε συνθήκες φλεγμονής σαν αυτές που παρατηρούνται κατά τις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού.

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNFα στην επαγωγή του HIF-1α και στη μεταγραφική δράση του HIF-1 σε ανθρώπινα βρογχικά λεία μυϊκά κύτταρα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Παράλληλα, ελέγχθηκε η επίδραση της φλεγμονής και της υποξίας στα ΛΜΚ ως προς την έκκριση κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων προσκολλησης. Η κατανόηση των ενδοκυττάρων μηχανισμών που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση φλεγμονής και υποξίας στις νόσους του αναπνευστικού μπορεί να συμβάλλει στη μελλοντική ανακάλυψη νέων στοχοποιημένων θεραπειών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) των αεραγωγών συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών που παρατηρούνται στις φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού όπως το άσθμα και η ΧΑΠ τόσο ως δομικά κύτταρα που ρυθμίζουν το βρογχοκινητικό τόνο και το πάχος των τοιχωμάτων των αεραγωγών όσο και ως ανοσορυθμιστικά κύτταρα μέσω της δυνατότητας τους να εκκρίνουν μια ποικιλία κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης. Η φλεγμονή των αεραγωγών συνοδεύεται από την ανάπτυξη τοπικής υποξίας λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου και της ταυτόχρονης μεγάλης κατανάλωσης αυτού από τα πολυάριθμα κύτταρα που συγκεντρώνονται στους αεραγωγούς. Ο κύριος ρυθμιστής της υποξίας έχειδειχθεί ότι είναι ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1. Σε συνθήκες υποξίας η ρυθμιστική υπομονάδα του HIF-1α σταθεροποιείται, μετατοπίζεται στον πυρήνα και ο HIF-1 επάγει την μεταγραφή γονιδίων που εξασφαλίζουν την επιβίωση των κυττάρων στο υποξικό περιβάλλον. Πέραν των συνθηκών υποξίας, ο HIF-1α επάγεται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες και σε συνθήκες νορμοξίας σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNFα στην επαγωγή του HIF-1α, στη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-1 και στη μεταγραφή γονιδίων μεσολαβητών της φλεγμονώδους απόκρισης σε πρωτογενείς καλλιέργειες διαφοροποιημένων ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων και καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Ο TNFα αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του mRNA του HIF-1α, τόσο στην νορμοξία όσο και στην υποξία. Η επαγωγή αυτή μεσολαβείται από το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ καθώς παρατηρήθηκε μια ανάλογη αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης και του πυρηνικού πολλαπλασιασμού της υπομονάδας p65 του NF-κΒ με τα επίπεδα mRNA του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Ταυτόχρονα, η χρήση του αναστολέα RO 106-9920 του NF-κΒ συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων του mRNA του HIF-1α. Παράλληλα, με χρήση του αναστολέα της μεταγραφής ακτινομυκίνη Dδείχθηκε ότι η επαγωγή του HIF-1α προκύπτει μέσω αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου του.

Ωστόσο, η παρατηρούμενη επαγωγή του HIF-1α τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης, όσο και σε επίπεδο mRNA δεν συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της μεταγραφικής

ενεργότητας του HIF-1, καθώς η μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, παρέμεινε χαμηλή παρουσία του TNFα στη νορμοξία και ταυτόχρονα μειώθηκε στην υποξία. Η μείωση αυτή πιθανόν οφείλεται στην αναστολή της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τον ARNT με αποτέλεσμα την αδυναμία δέσμευσης τους στα HREs.

Επίσης, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στις επιδράσεις του TNFα και της υποξίας στην έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων από τα ΛΜΚ των αεραγωγών. Συγκεκριμένα, παρουσία TNFα αυξήθηκαν σημαντικά τα επιπέδα mRNA των φλεγμονωδών παραγόντων IL-6 και RANTES καθώς και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM. Σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή των RANTES και ICAM παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ μειώθηκε η επαγωγή του VCAM από τον TNFα.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι ο TNFα επάγει τον HIF-1α μέσω αύξησης της μεταγραφής του με τη μεσολάβηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB. Παρόλα αυτά, η επαγωγή αυτή δεν επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 στην νορμοξία, ενώ την καταστέλλει κατά την υποξία εξαιτίας της αναστολής της σύνδεσης του HIF-1α με τον ARNT. Φαίνεται λοιπόν ότι ο TNFα και η υποξία δρουν ανταγωνιστικά στην έκφραση γονιδίων στα ΛΜΚ, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό πιθανώς ανεξάρτητα από τα HREs ρόλο του HIF-1α στην απόκριση των ΛΜΚ στη φλεγμονή των αεραγωγών.

ABSTRACT

Airway smooth muscle cells (SMC) participate in remodeling observed in airway inflammatory diseases such as asthma and COPD both as structural cells, regulating bronchomotor tone and thickness of the airway wall, and as immunomodulatory cells, via their ability to express a variety of cytokines, chemokines and adhesion molecules. Airway inflammation is accompanied by the development of local hypoxia due to reduced oxygen supply and parallel high consumption of oxygen by numerous cells which accumulate in the airways. The major mediator of the cellular response to hypoxia is the Hypoxia Inducible Factor, HIF-1. Its regulatory subunit HIF-1 α is stabilized during hypoxia, translocates to the nucleus, dimerizes with the HIF-1 β subunit and induces the transcription of genes that regulate the survival of cells in the hypoxic environment. In addition to hypoxia, HIF-1 α is induced by cytokines and growth factors under normoxic conditions in various cell types.

In this study we investigated the effect of the proinflammatory cytokine TNF α on the induction of HIF-1 α , its target genes and inflammatory mediators in primary cultures of differentiated human bronchial SMC and rabbit trachea SMC at normoxic and hypoxic conditions.

TNF α increases the levels of HIF-1 α mRNA and protein at normoxia and hypoxia. This induction is mediated by the NF- κ B intracellular signaling pathway by TNF α and is abolished by the NF- κ B inhibitor RO 106-9920. Similar results were revealed by using the ROS inhibitor, DPI. Furthermore, the use of the transcription inhibitor Actinomycin D showed that induction of HIF-1 α was a result of increased HIF-1 α gene transcription.

However, the observed induction of HIF-1 α , both at the protein and at the mRNA level, was not followed by a corresponding increase in its transcriptional activity as the transcription of HIF target genes remained low in the presence of TNF α during normoxia and was even decreased at hypoxia. This decrease is likely due to inhibition of dimerization between HIF-1 α and ARNT and binding to HREs.

In addition, there were significant differences in the effect of TNF α and hypoxia at the expression of inflammatory mediators from airway SMC. Specifically, TNF α increased significantly the mRNA levels of the inflammatory factors IL-6 and RANTES

and the adhesion molecules ICAM and VCAM. Under hypoxia, while the induction of IL-6 was increased further, the induction of RANTES and ICAM remained unchanged while the induction of VCAM was decreased by TNF α .

In conclusion, it has been shown that TNF α induces HIF-1 α by increasing the transcription of HIF-1 α via an NF- κ B dependent pathway. However, at the same time TNF α inhibits the dimerisation of HIF-1 α with ARNT, binding to HRES and HIF-1 transcriptional activity. It appears that TNF α and hypoxia have opposing effects on gene expression in SMC, indicating a protective probably independent of HREs role of HIF-1 to the airway SMC in response to inflammation.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΛΜΚ: Λεία Μυϊκά Κύτταρα

ΧΑΠ: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

APS (ammonium persulfate): υπερθειϊκό αμμώνιο

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

ATP (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη

bFGF (basic fibroblast growth factor): βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

bHLH (basic helix loop helix): βασική περιοχή έλικα ανθέλικας

BSA (bovine serum albumin): αλβουμίνη ορού βοός

CA-IX (carbonic anhydrase IX): καρβονική ανυδράση 9

CAMs (cell adhesion molecules): μόρια κυταρικής προσκόλλησης

CBP (CREB-binding protein): συνδεόμενη με τον CREB πρωτεΐνη

cDNA (complementary DNA): συμπληρωματικό DNA

CK (casein kinase): κινάση καζεΐνης

CRM1: chromosomal maintenance 1

CXCL: C-X-C motif ligand

DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole): 4', 6 διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο

DFO (desferrioxamine): δεσφεριοξαμίνη

DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12): θρεπτικό υλικό για ΛΜΚ

DMOG (dimethylloxalylglycine): διμεθυλοξαλλο-γλυκίνη

DMSO (dimethylsulfoxide): διμεθυλοσουλφοξείδιο

DNA (deoxyribonucleic acid): Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DPI: diphenyliodonium

DTT (dithiothreitol) διθειοθρεϊτόλη

ECM (extracellular matrix): εξωκυττάρια ουσία

EDTA (ethylenediamine): αιθυλενοδιαμίνη

EGF (epidermal growth factor): επιδερμικός παράγοντα αύξησης

ERK (extracellular signal regulated kinases): κινάσες που ενεργοποιούνται από εξωκυτάρια ερεθίσματα

FBS (fetal bovine serum) ορός εμβρύου βοός

FGF (fibroblast growth factor): αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

FIH-1 (factor inhibiting HIF) παράγοντας αναστολής του HIF
 FITC (fluorescein isothiocyanate): ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη
 GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor): παράγοντας διέγερσης των μακροφάγων
 GPCR (G protein coupled receptors) υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες
 HIF (hypoxia inducible factor): επαγόμενος από την υποξία παράγοντας
 HRE (hypoxia response element): στοιχείο απόκρισης στην υποξία
 HRP (horseradish peroxidase): υπεροξειδάση του αγριοραδικιού
 Hsp90 (heat shock protein 90): πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90
 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1): μόριο διακυττατικής προσκόλλησης
 IFN- γ (interferon γ): ιντερφερόνη γ
 IL (interleukin): ιντερλευκίνη
 IPAS (inhibitory PAS-domain protein), ανασταλτική πρωτεΐνης PAS
 LOX (lysyl oxidase): λυσηλο-οξειδάση
 LPS (lipopolysaccharides): λιποπολυσακχαρίτης
 MAPK (mitogen activated protein kinase): κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα
 MMPs (matrix metalloproteinases): μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας
 mTOR (mammalian target of rapamycin): στόχος της ραπαμυκίνης σε θηλαστικά
 NES (nuclear export signal): σήμα πυρηνικής εξόδου
 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): πυρηνικός παράγοντας κάπα-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτή των ενεργοποιημένων B κυττάρων/
 NLS (nuclear localization signal) σήματα πυρηνικού εντοπισμού,
 NO (nitric oxide) : μονοξείδιο του αζώτου
 PAS: Per-Arnt-Sim
 PBS: (phosphate buffered saline): διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
 PDGF (platelet derived growth factor): αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από τα αιμοπετάλια
 PHDs (prolyl hydroxylase domain proteins): προλυλ-υδροξυλάσες
 PKD1 (protein kinase D1): πρωτεϊνική κινάση D1

PMSF (phenylmethylsulfoxide): φαινυλομεθυλο-φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

pVHL: protein von Hippel-Lindau

PI3K: phosphatidylinositol -3 kinase, κινάση της 3- φωσφατιδυλινωσιτόλης

qRT-PCR (quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction): ποσοτική πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1

RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RHD (Rel-homology domain): περιοχή ομόλογη των Rel

RNA (ribonucleic acid) ριβονουκλεϊνικό οξύ

ROS (reactive oxygen species): ενεργές ρίζες οξυγόνου

SDS (sodium dodecyl sulfate): σουλφοξείδιο του νατρίου

Sp1: specificity protein 1

Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3): μετατροπέας σήματος και ενισχυτής της μεταγραφής

TADs (trans activation domains): περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής

TARC: thymus and activation-regulated chemokine

TEMED (tetramethylethylenediamine): τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

TGF (transforming growth factor): αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης

TLR: toll like receptor

TNFR (TNF receptor): υποδοχέας TNF

TNF α (tumor necrosis factor α): παράγοντας νέκρωσης όγκων α

VCAM-1(vascular cell adhesion molecule 1): μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
1

VEGF (vascular endothelial growth factor): αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το αναπνευστικό σύστημα

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τους πνεύμονες και μια σειρά αεραγωγών που τους συνδέουν με το εξωτερικό περιβάλλον. Οι βασικές λειτουργίες του αναπνευστικού συστήματος είναι οι εξής: α) η αναπνοή, δηλαδή η εισπνοή και η εκπνοή (πνευμονικός αερισμός), β) η ανταλλαγή, με διάχυση, των αναπνευστικών αερίων (O_2 , CO_2), τα οποία μεταφέρονται δια του αίματος στους πνεύμονες, γ) η παροχή οξυγόνου στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, δ) η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από το αίμα.

Το αναπνευστικό σύστημα υποδιαιρείται σε δύο μείζονα τμήματα το μεταγωγικό και το αναπνευστικό τμήμα. Το μεταγωγικό τμήμα εντοπιζόμενο εντός και εκτός πνευμόνων μεταφέρει αέρα από το εξωτερικό περιβάλλον στους πνεύμονες. Το αναπνευστικό τμήμα εντοπίζεται αποκλειστικά ενδοπνευμονικά και επιτελεί την ανταλλαγή αερίων. Το μεταγωγικό τμήμα αποτελείται από τους αναπνευστικούς αεραγωγούς περιλαμβάνει : α) την μύτη και τη στοματική κοιλότητα, β) τον φάρυγγα, γ) τον λάρυγγα, δ) την τραχεία, ε) τους κύριους βρόγχους, στ) τους λοβαίους και τμηματικούς βρόγχους και ζ) τα βρογχιόλια και τα τελικά βρογχιόλια. Το αναπνευστικό τμήμα αποτελείται από τα αναπνευστικά βρογχιόλια, τους κυψελιδικούς πόρους, τους κυψελιδικούς σάκους και τις κυψελίδες.

Η τραχεία μήκους 10-20 εκατοστών παρεμβάλλεται μεταξύ του λάρυγγα και των κυρίων βρόγχων και αποτελείται από 16-20 ημικρίκια πεταλοειδούς σχήματος από υαλοειδή χόνδρο που συνδέονται μεταξύ τους με τους μεσοκρίκιους δακτυλιοειδείς συνδέσμους. Το οπίσθιο υμενώδες τοίχωμα συμπληρώνει τα κενά που αφήνουν τα χόνδρινα ημικρίκια με ινώδη συνδετικό και λείο μυϊκό ιστό, τον τραχειακό μυ. Ο τραχειακός μυς στη φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία μεταβάλλει την διάμετρο του αυλού της τραχείας, με αποτέλεσμα την ταχύτερη ροή αέρα και την απομάκρυνση ξένων σωμάτων, βλέννας ή άλλων ερεθιστικών ουσιών. Η τραχεία διαθέτει τρεις χιτώνες τον βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο και τον έξω χιτώνα. Ο βλεννογόνος της τραχείας αποτελείται από ψευδοπολύστοιβο κροσσωτό κυλινδρικό . τον υποεπιθηλιακό συνδετικό

ιστό, κι ένα στρώμα ελαστικών ινών που χωρίζει τον βλεννογόνο από τον υποβλεννογόνιο χιτώνα. Ο υποβλεννογόνιος της τραχείας αποτελείται από πυκνό ακανόνιστο ινοελαστικό συνδετικό ιστό, ο οποίος περιέχει πολυάριθμους βλεννοεκκριτικούς και οροβλεννοεκκριτικούς αδένες. Ο έξω χιτώνας περικλείει τα χόνδρινα ημικρίκια (1).

1.2 Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι των αεραγωγών

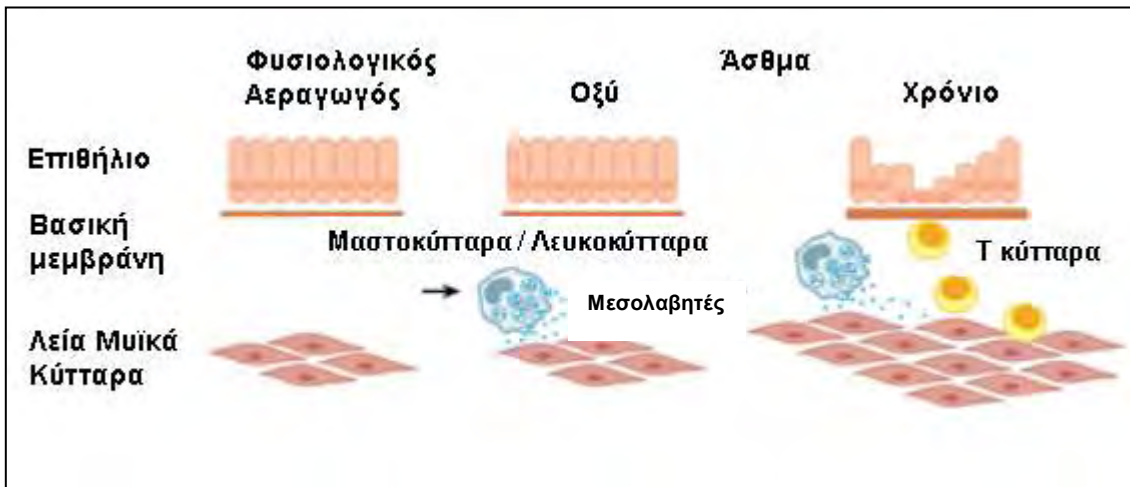
Οι πιο κοινές φλεγμονώδεις νόσοι του αναπνευστικού είναι το άσθμα κι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Αμφότερες οι ασθένειες χαρακτηρίζονται από απόφραξη των αεραγωγών, η οποία είναι μεταβλητή και αναστρέψιμη στο άσθμα ενώ είναι προοδευτική και μη αναστρέψιμη στη ΧΑΠ. Κλινικά οι κύριες εκδηλώσεις τους περιλαμβάνουν βήχα, συριγμό, δύσπνοια κι υπερπαραγωγή βλέννας. Η απόφραξη των αεραγωγών οφείλεται σε μια ποικιλία δομικών αλλαγών που παρατηρούνται στους αεραγωγούς ως αποτέλεσμα της χρόνιας τοπικής φλεγμονής. Η χρόνια φλεγμονή μεσολαβείται από την αυξημένη έκφραση πολυάριθμων φλεγμονωδών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται κυτοκίνες, χημειοκίνες, μόρια προσκόλλησης, φλεγμονώδη ένζυμα και υποδοχείς (2).

Παρά την ομοιότητα των κλινικών χαρακτηριστικών των δύο νόσων, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές που αφορούν, την ηλικία εκδήλωσης της κάθε νόσου, τον εντοπισμό και το πρότυπο της φλεγμονής που εμφανίζεται στην αναπνευστική οδό, με την παρουσία διαφορετικών φλεγμονωδών κυττάρων, την παραγωγή διαφορετικών μεσολαβητών, με τελικό αποτέλεσμα ετερογενής επιπτώσεις της φλεγμονής και διαφορετικές αποκρίσεις στη θεραπεία.

1.2.1 Το Άσθμα

Το άσθμα αποτελεί χρόνια φλεγμονώδη νόσο του αναπνευστικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από αντιστρεπτή στένωση των αεραγωγών, φλεγμονή και δομικές αλλαγές στα τοιχώματα του βρογχικού δένδρου, την λεγόμενη αναδιαμόρφωση των αεραγωγών. Οι χαρακτηριστικές δομικές μεταβολές των αεραγωγών (Εικόνα 1) περιλαμβάνουν την νέκρωση κατά περιοχές και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων που γίνονται πιο εύθρυπτα και αποκολλώνται ευκολότερα από τη βασική μεμβράνη, την αύξηση της υπο-επιθηλιακής εξωκυττάριας ουσίας, την υπερπλασία των

υποβλεννογόνιων αδένων και την ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού τους και της εκκριτικής τους δράσης, την πάχυνσή της βασικής μεμβράνης εξαιτίας αυξημένης εναπόθεσης κολλαγόνου κάτω από το επιθήλιο, την υπερτροφία και υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων, την αύξηση του αριθμού των μυοινοβλαστών και την επαγωγή της αγγειογένεσης ως απάντηση στην έκκριση του VEGF (3, 4).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των κύριων μεταβολών του αναπνευστικού τοιχώματος στο οξύ και χρόνια άσθμα. Απεικονίζεται η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, η πάχυνση της βασικής μεμβράνης, η υπερπλασία και η υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και η συσσώρευση κυττάρων φλεγμονής (προσαρμογή από: (5)).

Η εκδήλωση του άσθματος συμβαίνει κατά την παιδική ηλικία και η πορεία της νόσου παρουσιάζει εξάρσεις και υφέσεις. Η πυροδότηση των εξάρσεων συσχετίζεται με την έκθεση του ασθενούς σε μια ποικιλία ερεθιστικών παραγόντων στους οποίους περιλαμβάνονται τα αλλεργιογόνα και οι ιογενείς ή βακτηριακές προσβολές του αναπνευστικού. Οι φλεγμονώδεις διεργασίες εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στους ανώτερους αεραγωγούς (κύριους βρόγχους) και προχωρούν στους κατώτερους αεραγωγούς στο σοβαρό άσθμα ενώ δεν επηρεάζεται το πνευμονικό παρέγχυμα (6).

Οι κλινικές εκδηλώσεις του άσθματος σχετίζονται κυρίως με τον βρογχόσπασμο που προκαλείται λόγω της συστολής και της υπερτροφίας των ΛΜΚ και της φλεγμονής του τοιχώματος των αεραγωγών. Βρογχικές βιοψίες από ασθματικούς ασθενείς έδειξαν διήθηση από ιωσινόφιλα, ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα και ενεργοποιημένα Th2 κύτταρα (2).

Η ιογενής ή βακτηριακή προσβολή των αεραγωγών αποτελούν την κυριότερη αιτία των παροξύνσεων του άσθματος. Κατά τις παροξύνσεις παρατηρείται στους αεραγωγούς η συσσώρευση μιας πληθώρας προ-φλεγμονωδών μορίων που περιλαμβάνουν χημειοκίνες από τα ουδετερόφιλα (IL-8, CXCL5, CXCL1), και τα T κύτταρα (CXCL10, Rantes, eotaxin), κυτοκίνες (IL-6, GM-CSF, IL-11), αυξητικούς παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor/FGF-2) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor/VEGF) και μόρια προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα επίσης παράγουν TNF-α μια φλεγμονώδη κυτοκίνη που διατηρεί το φλεγμονώδες περιβάλλον εντός του αναπνευστικού τοιχώματος και λειτουργεί ταυτόχρονα επαγωγικά για άλλες χημειοκίνες προερχόμενες από τα ουδετερόφιλα και τα T κύτταρα (7).

Μετά την έκθεση σε αλλεργιογόνο παράγοντα, τα μαστοκύτταρα των αεραγωγών ευαισθητοποιούνται κι απελευθερώνουν μια ποικιλία προσχηματισμένων μεσολαβητών με κύρια την ισταμίνη που δρα στα ΛΜΚ και προκαλεί άμεσα βρογχόσπασμο. Τα μαστοκύτταρα εκκρίνουν επίσης προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και κινίνες που πέραν της συμμετοχής τους στον βρογχόσπασμο αποτελούν πηγή των Th2 κυτοκινών IL-4 και IL-13 που με την σειρά τους αυξάνουν την παραγωγή ποικίλων Th2 χημειοκινών από τα επιθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον, τα μαστοκύτταρα παράγουν μια ποικιλία χημειοκινών που προσελκύουν ουδετερόφιλα, ιωσινόφιλα και Th1 και Th2 λεμφοκύτταρα στους αεραγωγούς. Τα Th2 λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι συμμετέχουν στην καθυστερημένη ασθματική απάντηση που συνοδεύεται από εντονότερο βρογχόσπασμο και υπεραντιδραστικότητα. Στο σοβαρό άσθμα ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ και η διαφοροποίηση των ινοβλαστών συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών με αποτέλεσμα επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας (6).

1.2.2. Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια - ΧΑΠ

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί χρόνια φλεγμονώδη νόσο του αναπνευστικού που χαρακτηρίζεται από χρόνια περιορισμό στη ροή αέρα, ο οποίος δεν αναστρέφεται πλήρως (ERS / ATS Οδηγίες ΧΑΠ 2005). Ο περιορισμός της ροής του αέρα είναι συνήθως προοδευτικός και εκδηλώνεται ως μια παθολογική

φλεγμονώδης απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα όπως ο καπνός τσιγάρου, η ρύπανση και οι πνευμονικές λοιμώξεις. Οι κλινικές εκδηλώσεις που περιλαμβάνουν βήχα, δύσπνοια και παραγωγή πτυέλων αντανακλούν τις υποκείμενες παθολογικές αλλαγές. Αιτιολογικά η ΧΑΠ συνδέεται κυρίως με το κάπνισμα, ωστόσο η εικόνα της είναι αρκετά μεταβλητή και πολύπλοκη και φαίνεται ότι συνδέεται επίσης με ποικίλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιδημιολογικά η ΧΑΠ αποτελεί νόσο των ενηλίκων κι η επίπτωση της αυξάνεται με τη γήρανση του πληθυσμού. Επηρεάζει πάνω από 5% των ενηλίκων και είναι η τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως (2).

Η ΧΑΠ παρουσιάζει εξάρσεις συχνότερα οφειλόμενες σε βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού, οι οποίες αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας από την νόσο, καθώς οδηγούν σε ταχύτερη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας (7). Στη σταθερή ΧΑΠ παρατηρείται αύξηση των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων και σε μερικούς ασθενείς των ηωσινόφιλων των αεραγωγών. Κατά τη διάρκεια των παροξύνσεων παρατηρείται αύξηση των χημειοκινών των ουδετερόφιλων όπως το ENA-78 και η IL-8 και συστηματικών μορίων της φλεγμονής όπως η CRP κι ο TNFα (6).

1.3. Η επίδραση της φλεγμονής στα λεία μυϊκά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος

1.3.1 Ο δομικός ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) των αεραγωγών δεν παρουσιάζουν εγκάρσια γράμμωση όπως παρατηρείται στους γραμμωτούς μύες και η ρύθμιση της λειτουργίας τους εξαρτάται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα καθώς κι από την έκκριση ορμονών κι ως εκ τούτου δεν υπόκεινται στη βούληση. Η ακτίνη και η μυοσίνη αποτελούν τα κύρια συστατικά της συσταλτικής συσκευής σε κύτταρα λείου μυός και περιέχουν παχέα και λεπτά νήματα. Τα λεπτά νημάτια αποτελούνται κυρίως από ακτίνη ενώ τα παχέα κυρίως από μυοσίνη. Τα νημάτια ακτίνης διατάσσονται σε εξαγωνικές συστοιχίες που δημιουργούν δέσμες σαν καλώδια. Τα διαστήματα γύρω από τις δέσμες ινιδίων ακτίνης καλύπτονται από ινίδια μυοσίνης. Στα ΛΜΚ των αεραγωγών, δέσμες παράλληλων ινιδίων ακτίνης προσανατολίζονται κατά μήκος του επιμήκη άξονα του κυττάρου. Ένα

τρίτο είδος νηματίων, τα ενδιάμεσα νημάτια, αποτελούν μέρος του συστήματος συστολής των λείων μυοκυττάρων. Τα ενδιάμεσα ινίδια είναι πολύ λιγότερα αριθμητικά από τα μυοινίδια και γενικά πιστεύεται ότι παίζουν ένα δομικό ρόλο στη διατήρηση της οργάνωσης του συστήματος μυοινιδίων. Η ρύθμιση της συστολής στο λείο μυ εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}). Ιόντα Ca^{2+} απελευθερούμενα από τα κυστίδια συνδέονται με την ρυθμιστική πρωτεΐνη καλμοντουλίνη και μεταβάλλουν το σχήμα της. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα ασβεστίου–καλμοντουλίνης ενεργοποιεί την κινάση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης, η οποία φωσφορυλιώνει μία από τις ελαφρές αλυσίδες της μυοσίνης, γνωστής κι ως ρυθμιστική αλυσίδα. Η φωσφορυλιωμένη ελαφρά αλυσίδα αποκαλύπτει την θέση της μυοσίνης που συνδέεται με την ακτίνη κι η μεταξύ τους αλληλεπίδραση επιτρέπει την συστολή (8).

Τα ΛΜΚ διατηρούν μια πολυλειτουργική ικανότητα για συστολή, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό, σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και έκκριση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τα ΛΜΚ των αεραγωγών ικανά να ρυθμίζουν τη διάμετρο του αυλού των αεραγωγών τόσο παροδικά μέσω της δυνατότητας για αναστρέψιμη συρρίκνωση όσο και χρόνια μέσω της δομικής αναδιαμόρφωσής τους λόγω ίνωσης και υπερτροφίας (9). Ο κύριος ρόλος των ΛΜΚ στο αναπνευστικό σύστημα είναι η διατήρηση του βρογχοκινητικού τόνου των αεραγωγών σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω της δυνατότητάς τους να διατηρούν την λεγόμενη λειτουργική πλαστικότητα, δηλαδή την ικανότητα αντιστρεπτής μετάβασης μεταξύ ενός συνθετικού (ανώριμου) κι ενός συσταλτού (ώριμου) φαινότυπου υπό την επίδραση διαφόρων εξωγενών παραγόντων *in vitro* και *in vivo* (Εικόνα 2). Η μετάβαση προς τον συνθετικό φαινότυπο καλείται διαμόρφωση και πραγματοποιείται παρουσία μιτογόνων και αυξητικών παραγόντων. Ο συνθετικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη άφθονων οργανιδίων σύνθεσης πρωτεϊνών και λιπιδίων καθώς και πολυάριθμων μιτοχονδρίων. Παράλληλα, τα ΛΜΚ εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού αλλά παρουσιάζουν μείωση της συσκευής συστολής και των αντίστοιχων πρωτεϊνών με ταυτόχρονη μείωση της απόκρισης σε αγωνιστές συστολής. Η ανάκτηση του συσταλτού φαινότυπου καλείται ωρίμανση και *in vitro* επιτυγχάνεται απουσία ορού ή άλλων μιτογόνων κατά την κυτταρική καλλιέργεια και προωθείται με προσθήκη ινσουλίνης ή αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β ($\text{TGF-}\beta$). Τα ΛΜΚ

των αεραγωγών σε αυτή την περίπτωση αποκτούν ένα συσταλτό φαινότυπο με κύρια χαρακτηριστικά την αύξηση του αριθμού των μυοϊνιδίων, της συσκευής συστολής καθώς και των συνοδών πρωτεϊνών, την μείωση των συνθετικών οργανιδίων και την ανάκτηση της τυπικής φαρμακολογικής αντίδρασης στους αγωνιστές συστολής. Τα μυοκύτταρα πλέον εμφανίζουν επιμήκη μορφολογία, πλήρως ανασυντεθειμένη συσκευή συστολής, αυξημένες πρωτεΐνες συστολής και εκ νέου σύζευξη στην κυτταρική μεμβράνη των μουσκαρινικών υποδοχέων M3 για την ακετυλοχολίνη (10, 11).



Εικόνα 2: Η λειτουργική πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών (προσαρμογή από (9)).

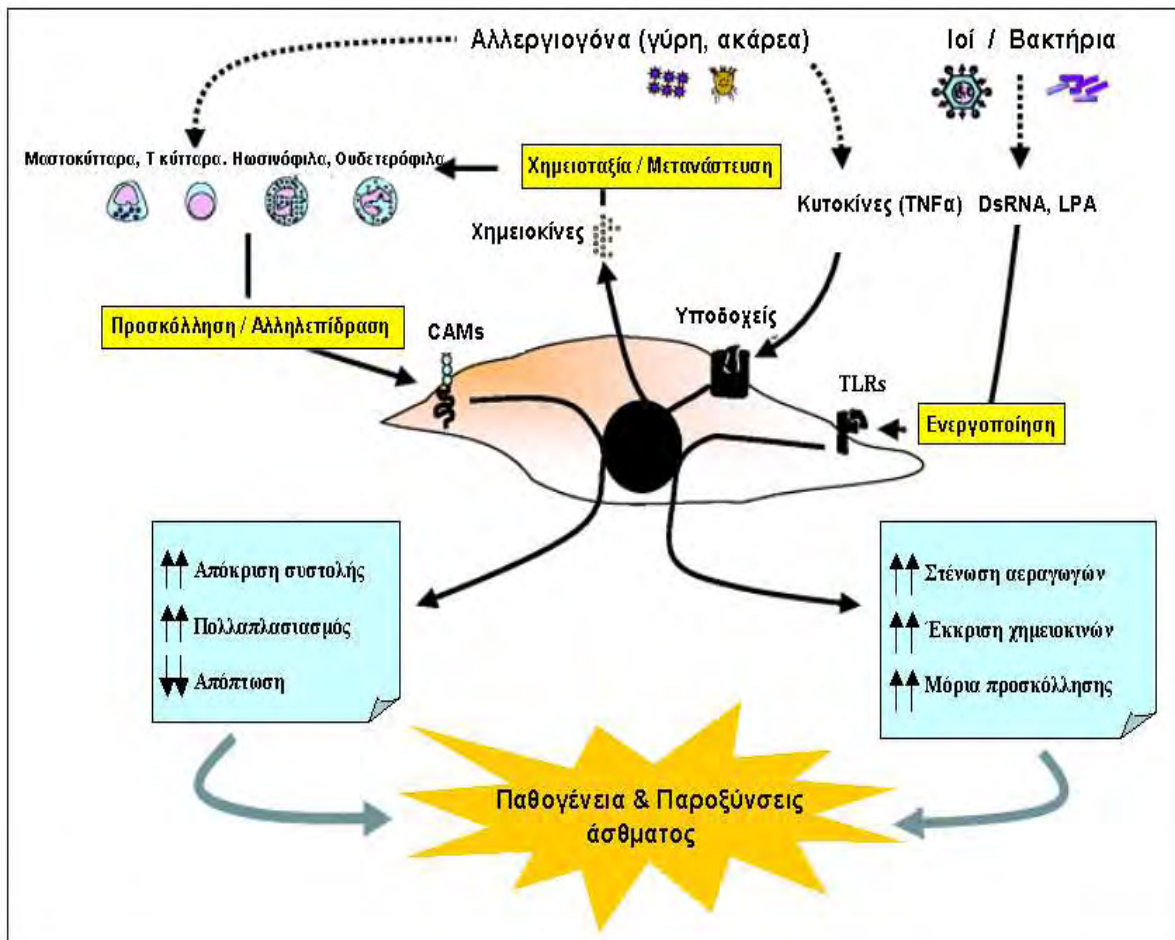
Κατά την ανάπτυξη φλεγμονής στους αεραγωγούς, τα ΛΜΚ αυξάνονται τόσο σε μέγεθος (υπερπλασία) όσο και σε αριθμό (υπερτροφία) συμβάλλοντας στην απόφραξη των αεραγωγών τόσο λόγω επίτασης της πάχυνσης του κυτταρικού τοιχώματος όσο και μέσω αύξησης του βρογχοκινητικού τόνου με τελικό αποτέλεσμα την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (12). Κατά την φλεγμονή των αεραγωγών, η αναδιαμόρφωση τους σχετίζεται με την εισροή φλεγμονωδών κυττάρων και μεσολαβητών τους, η οποία επάγει ένα κύκλο καταστροφής του τοιχώματος και την ακόλουθη αποκατάσταση της βλάβης με τελικό αποτέλεσμα την ανακατασκευή των τοιχωμάτων των αεραγωγών (13).

Η αύξηση της μάζας των ΛΜΚ στους αεραγωγούς των ασθενών με άσθμα προκαλείται από διαφόρους μιτογόνους παράγοντες που περιλαμβάνουν τους πολυπεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, τους μεσολαβητές φλεγμονής και τις κυτοκίνες. Ο πολλαπλασιασμός των ΛΜΚ συμβαίνει είτε με ενεργοποίηση των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης είτε με υποδοχείς συζευγμένους με ετεροδομερείς G-πρωτεΐνες (G proteins Coupled Receptors - GPCR). Η ενεργοποίηση αμφοτέρων των υποδοχέων οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Παράλληλα πυροδοτείται μια σειρά σηματοδοτικών γεγονότων μέσω ενεργοποίησης ενδοκυτταριων σηματοδοτικών μονοπατιών με κυρίαρχα τα μονοπάτια των PI3K και ERK κινασών που οδηγούν στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (5).

1.3.2. Ο ανοσορυθμιστικός ρόλος των λείων μυϊκών κυττάρων

Τα ΛΜΚ του αναπνευστικού παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού όπως το άσθμα όχι μόνο ως δομικά κύτταρα που ρυθμίζουν τον βρογχοκινητικό τόνο όπως περιγράφηκε παραπάνω αλλά κι ως ενορχηστρωτές στην ανάπτυξη της τοπικής φλεγμονής (Εικόνα 3). Η πληθώρα κυττάρων που διηθούν το τοίχωμα των αεραγωγών που φλεγμαίνει επάγουν διάφορες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Ηωσινόφιλα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα συγκεντρώνονται στους αεραγωγούς και μέσω της παραγωγής μεγάλου αριθμού προφλεγμονωδών παραγόντων κινητοποιούν και διαιωνίζουν την φλεγμονώδη διεργασία. Η έκθεση των ΛΜΚ στους φλεγμονώδεις αυτούς παράγοντες επηρεάζει την συστατική τους λειτουργία, την αύξηση του μεγέθους τους και παράλληλα επάγει τις συνθετικές τους λειτουργίες (12, 14).

Σε απόκριση σε κυτοκίνες όπως η IL-1β, ο TNFα, και η ιντερφερόνη γ (IFNγ), τα ΛΜΚ των αεραγωγών εκφράζουν μια σειρά από μόρια προσκόλησης που προωθούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΛΜΚ και των φλεγμονωδών κυττάρων. Παράλληλα οι κυτοκίνες φαίνεται ότι επάγουν την έκφραση των TLRs. Αυτοί οι υποδοχείς χρησιμεύουν ως μόρια αναγνώρισης που ρυθμίζουν την έμφυτη και επίκτητη ανοσιακή και την φλεγμονώδη απάντηση που ακολουθεί την μικροβιακή μόλυνση, την ιστική βλάβη και την φλεγμονή (13).



Εικόνα 3: Η ενεργοποίηση των ΛΜΚ των αεραγωγών από μεσολαβητές της φλεγμονής και διάφορα παθογόνα προκαλεί απελευθέρωση χημειοκινών και κυτοκινών καθώς και έκφραση μορίων προσκόλλησης με αποτέλεσμα τα ΛΜΚ να προσελκύουν και να αλληλεπιδρούν με διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα Τ κύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα. Η αλληλεπίδραση των ΛΜΚ με κύτταρα του ανοσοποιητικού έχει πολλαπλές συνέπειες για τις λειτουργίες τους που σχετίζονται με την παθογένεια και τις παροξύνσεις του άσθματος (προσαρμογή από (5)).

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών εκφράζουν αρκετούς επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς ικανούς για ενεργοποίηση και δέσμευση άλλων ανοσοκυττάρων. Το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (ICAM-1) και το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1 (VCAM-1) εκφράζονται ιδιοσυστατικά στην κυτταρική επιφάνεια των ΛΜΚ και επάγονται από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNFα. Τόσο το ICAM-1 όσο και το VCAM-1 διαμεσολαβούν την πρόσφυση των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων στα ΛΜΚ. Το VCAM-1 επάγει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ επηρεάζοντας θετικά

την ενεργοποίηση της PI3K και της ERK και ενισχύοντας την πολλαπλασιαστική δράση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (4, 15).

Πιο πρόσφατα έχειδειχθεί ότι συγκεκριμένα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs) εκφράζονται στα ΛΜΚ των αεραγωγών τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων, των μαστοκυττάρων και των ΛΜΚ. Μολονότι η λειτουργία των CAMs στα ΛΜΚ παραμένει ασαφής μελέτες κατέδειξαν ότι η επιφανειακή έκφραση τους σε ΛΜΚ του αναπνευστικού συστήματος μπορεί να είναι καθοριστική για τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων των μυοκυττάρων με μία ποικιλία φλεγμονωδών κυττάρων σχετικών με την παθογένεση του άσθματος. Από μελέτες έχει επίσηςδειχθεί ότι ενεργοποιημένα Τ κύτταρα προσκολλώνται σε ΛΜΚ σε καλλιέργεια ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα ICAM-1, τα VCAM-1, και τα κύτταρα CD44. Η προσέλκυση των Τ κυττάρων έχειδειχθεί ότι επιτείνει την αύξηση της μυϊκής μάζας μέσω του επαγόμενου από τα Τ κύτταρα πολλαπλασιασμού με παράλληλη μείωση της απόπτωσής τους. Επιπλέον η προσκόλληση και η αλληλεπίδραση με τα ΛΜΚ άλλων κυττάρων φλεγμονής, όπως τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα φαίνεται ότι μεσολαβείται από τα CAMs (16).

Αν και πολλά κύτταρα μπορούν να παράγουν χημειοκίνες, νέα δεδομένα δείχνουν ότι τα ΛΜΚ των αεραγωγών μπορεί να αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική πηγή τους. Ως απάντηση σε διαφόρους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, *in vitro* μελέτες έχουν αποδείξει ότι καλλιεργημένα ΛΜΚ εκφράζουν και εκκρίνουν μια ποικιλία από χημειοκίνες όπως η εοταξίνη, RANTES, CXCL8, MCP-1, MCP-2 και MCP-3. Πιστεύεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης χημειοκινών στο βρογχοκυψελιδικό υγρό σχετίζεται με την αυξημένη έκκριση τους από τα ΛΜΚ. Επίσης η μετανάστευση των μαστοκυττάρων και η διήθηση τους στο μυϊκό ιστό φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία χημειοκινών στον υποβλεννογόνιο. Ένας ακόμη λοιπόν ρόλος των ΛΜΚ των αεραγωγών στην φλεγμονώδη διαδικασία φαίνεται να διαδραματίζεται μέσω της παραγωγής κι έκκρισης των χαρακτηριστικών χημειοτακτικών αυτών μορίων (16).

Τα ΛΜΚ φαίνεται επίσης να παίζουν σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση και την επιβίωση των ηωσινοφίλων μέσω έκκρισης του παράγοντα GM-CSF και της IL-5. Άλλες κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα ΛΜΚ μετά από έκθεση τους σε παράγοντες

φλεγμονής ή ιικά σωματίδια περιλαμβάνουν την IL-1β, την IFNβ κι άλλες κυτοκίνες της οικογένειας της IL-6 όπως η IL-11.

Τα ΑΜΚ περιβάλλονται από εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix-ECM) η οποία αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I, II, IV και V, φιβρονεκτίνη, ντεκορίνη, θευική χονδροϊτίνη, ελαστίνη, περλακάνη, θρομβοσπονδίνη, τα αποικοδομητικά ένζυμα της εξωκυττάριας ουσίας μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP 1, 2 και 9, καθώς και ιστικούς αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP-1 και TIMP-2). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της ECM και των ΑΜΚ φαίνεται ότι επηρεάζει τόσο τη σύσταση της ECM όσο και τις λειτουργίες των ΑΜΚ. Η αποδόμηση της ECM απελευθερώνει μεσολαβητές φλεγμονής και αυξητικούς παράγοντες που μπορούν να ανατροφοδοτούν τα ΑΜΚ, που με τη σειρά τους αποκρίνονται στα συστατικά της ECM μέσω ιντεγκρινών (16).

1.4 Οι παράγοντες που συμμετέχουν στη φλεγμονή των αεραγωγών

1.4.1 Κυτοκίνες και χημειοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι πολυπεπτιδικά προϊόντα πολλών τύπων κυττάρων κυρίως όμως ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και μακροφάγων και διαμορφώνουν τη λειτουργία άλλων κυττάρων με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινική επίδραση. Οι χημειοκίνες αποτελούν χημειοτακτικά μόρια για κύτταρα φλεγμονής ενώ μπορούν να ασκούν και δράση κυτοκίνης (17).

Οι κυτοκίνες και οι χημειοκίνες παίζουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση τόσο της φλεγμονής όσο και των ανοσιακών απαντήσεων στις χρόνιες νόσους του αναπνευστικού όπως το άσθμα και η ΧΑΠ. Τα ΑΜΚ των αεραγωγών φαίνονται ότι αποτελούν στόχο κυρίως για τις κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα ανοσοκύτταρα. Στα ανθρώπινα ΑΜΚ οι κυτοκίνες φαίνεται ότι αλλάζουν την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων με έναν αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο και τα καθιστούν σημαντική πηγή μιας ποικιλίας κυτοκινών κι άλλων χημειοτακτικών μορίων (7).

Η IL-6 είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη που επάγει την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά επίσης ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των Β και Τ κυττάρων και την έκκριση ανοσοσφαιρινών. Η έκκριση IL-6 από τα ΑΜΚ των αεραγωγών επάγεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των IL-1β, TNFα και TGFβ. Ο ρόλος της IL-6 φαίνεται ότι είναι διττός καθώς σε πειράματα σε πνεύμονες ποντικών έχει

δειχθεί ότι η έκφραση της δημιουργεί ένα προστατευτικό περιβρογχιακό φλεγμονώδες διήθημα αλλά παράλληλα συμβάλλει στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Αυτή η ικανότητα της IL-6 να συμμετέχει στον έλεγχο της τοπικής φλεγμονής και ταυτόχρονα να ρυθμίζει την αντιδραστικότητα των αεραγωγών συνάδει με την ιδιότητα της να εμποδίζει την υπερέκκριση του TNFα και της IL-1β (5).

Οι χημειοκίνες παίζουν κεντρικό ρόλο στην συσσώρευση και την διακίνηση των διαφόρων φλεγμονωδών κυττάρων στα σημεία της φλεγμονής. Στους αεραγωγούς έχει δειχθεί ότι επάγουν και διατηρούν την τοπική φλεγμονή κυρίως κατά την έκθεση σε αλλεργιογόνα. Οι χημειοκίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την μοριακή τους κατασκευή και σε ένα βαθμό από την εκλεκτικότητά τους σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Έτσι η εοταξίνη, το RANTES και η IL-5 στρατολογούν ηωσινόφιλα, το CXCL8 ελκύει τα ουδετερόφιλα, οι χημειοτακτικές πρωτεΐνες των μονοκυττάρων (MCPs) τα μονοκύτταρα, η TARC ελκύει τα λεμφοκύτταρα κι ο παράγοντας των βλαστικών κυττάρων τα μαστοκύτταρα (16).

1.4.2 Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs)

Τα CAMs (cell adhesion molecules-CAMs) μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τις διαδικασίες επιστράτευσης των κυττάρων και παλιννόστησης. Η έκφραση και η ενεργοποίηση του καταρράκτη των CAMs που περιλαμβάνει σελεκτίνες, ιντεγκρίνες και μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, καθώς και η τοπική παραγωγή χημειοελκυστικών παραγόντων οδηγεί σε προσκόλληση των λευκοκυττάρων και μετανάστευση σε λεμφαδένες και θέσεις φλεγμονής όπου απουσιάζει ο λεμφικός ιστός (5).

Εκτός του ρόλου των CAMs ως μεσολαβητές στην εξαγγείωση των λευκοκυττάρων και την δια-ενδοθηλιακή μετανάστευση, φαίνεται ότι προωθούν την υποβλεννογόνια ή υποενδοθηλιακή επαφή με άλλα κυτταρικά στοιχεία και την ECM λειτουργώντας έτσι ως συνδιεγέρτες στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων. Νέα στοιχεία δείχνουν ότι τα CAMs μεσολαβούν στις φλεγμονωδών αλληλεπιδράσεις των τοιχωματικών κυττάρων συμβάλλοντας περαιτέρω στην φλεγμονή των αεραγωγών.

Τα ΑΜΚ των αεραγωγών εκφράζουν CAMs τόσο in vitro όσο και in vivo που μεσολαβούν τις διακυταρικές αλληλεπιδράσεις. Έχει δειχθεί ότι μετά από έκθεση σε LPS

των ΑΜΚ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων τόσο της πρωτεΐνης όσο και του RNA του ICAM-1. Επίσης, σε μελέτες έχειδειχθεί η επαγωγή της έκφρασης των μορίων ICAM-1 και VCAM-1 στα ΑΜΚ κατόπιν της έκθεσης τους σε διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNFα, η IL-1β και η INFγ. Αν και ο ακριβής ρόλος των CAMs στα ΑΜΚ των αεραγωγών παραμένει αδιευκρίνιστος, η έκφραση των μορίων αυτών στην επιφάνεια τους φαίνεται ότι παίζει καταλυτικό ρόλο στην ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των ΑΜΚ με μια ποικιλία κυττάρων φλεγμονής που εμπλέκονται στην παθογένεση του άσθματος (5).

Πιο πρόσφατα έχειδειχθεί ότι συγκεκριμένα CAMs εκφράζονται στα ΑΜΚ των αεραγωγών τόσο in vivo όσο και in vitro, και παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λευκοκυττάρων, των μαστοκυττάρων και των ΑΜΚ. Από μελέτες έχει επίσηςδειχθεί ότι ενεργοποιημένα Τ κύτταρα προσκολλώνται σε ΑΜΚ αναπνευστικού σε καλλιέργεια ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα ICAM-1, τα VCAM-1 και τα κύτταρα CD44. Η προσέλκυση των Τ κυττάρων έχειδειχθεί ότι επιτείνει την αύξηση της μυϊκής μάζας μέσω του επαγόμενου από τα Τ κύτταρα πολλαπλασιασμού των ΑΜΚ με παράλληλη μείωση της απόπτωσής τους. Επιπλέον η προσκόλληση και η αλληλεπίδραση με τα ΑΜΚ άλλων κυττάρων φλεγμονής, όπως τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα φαίνεται ότι μεσολαβείται από τα CAMs (16).

1.5 Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF)-α

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF)-α είναι το πιο ευρέως μελετημένο μέλος υπερ-οικογένειας κυτοκινών TNF και φέρει το όνομα του από το γεγονός ότι προκαλεί νέκρωση όγκων in vivo όταν εγχέεται σε ποντικούς. Ο TNFα είναι μια σημαντική κυτοκίνη για τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας, η οποία παρέχει άμεση άμυνα του ξενιστή κατά της εισβολής των οργανισμών πριν από την ενεργοποίηση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος (18).

Ο TNFα παράγεται από πολυάριθμα είδη κυττάρων πέραν των μακροφάγων. Οι πηγές του in vivo είναι τα διεγερμένα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα Τ-κύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα χονδροκύτταρα, οι οστεοβλάστες, τα ιστιοκύτταρα, τα νευρογλοιακά κύτταρα και τα κερατινοκύτταρα επίσης μπορούν να παράγουν TNFα μετά από διέγερση.

Τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος παράγουν επίσης TNFα και ο παράγοντας μπορεί να ανιχνευθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ και το ανθρώπινο γάλα περιέχει TNFα (19).

Τα φυσικά ερεθίσματα για τη σύνθεση του TNFα είναι η IL-1, οι βακτηριακές ενδοτοξίνες, ο προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (PDGF), και η ογκοστατίνη M, που ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών της IL-6. Ο TNFα μπορεί επίσης να διεγείρει ή να αναστείλει την δική του σύνθεση, αναλόγως του κυτταρικού τύπου. Στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και στους ινοβλάστες η έκκριση του TNFα επάγεται από την IL-17.

Ο TNFα παράγεται αρχικά ως μια βιολογικά δραστική μεμβρανική πρόδρομη πρωτεΐνη 26kDa, η οποία ακολούθως διασπάται, κυρίως από το TNFα μετατρεπτικό ένζυμο για να απελευθερώσει την ελεύθερη πρωτεΐνη 17kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες σχηματίζουν βιολογικά ενεργά ομοτριμερή που δρουν στους ευρέως εκφρασμένους υποδοχείς TNF- 1 και 2 (p55 και p75, ή TNFR1 και TNFR2). Αυτή η αλληλεπίδραση του συμπλόκου υποδοχέα-συνδέτη επάγει ενδοκυτταρική σηματοδότηση, και οδηγεί σε φωσφορυλίωση του NF-κΒ και εν συνεχεία της p50-p65 υπομονάδας, η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την χρωματίνη του DNA προς αύξηση της μεταγραφής προ-φλεγμονωδών γονιδίων όπως της IL-8, της IL-6 και του ίδιου του TNFα. Η αναστολή της δράσης γίνεται με την καταστροφή του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα (19).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι βιολογικές λειτουργίες της οικογένειας των κυτοκινών περιλαμβάνει ευεργετική και προστατευτική δράση στην φυσική ανοσία και αιμοποίηση, και έχει έναν κρίσιμο ρόλο στην οργανογένεση. Τα μέλη της υπερ-οικογένειας TNFα συμμετέχουν επίσης στη σηματοδότηση των μηχανισμών που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την απόπτωση.

Από *in vitro* και *in vivo* μελέτες παρατηρήθηκε ότι υψηλού επιπέδου παραγωγή TNFα οδηγεί στην επιδείνωση των φλεγμονωδών και προοξειδωτικών απαντήσεων που είναι σημαντικές στην παθογένεση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων πνευμονικών διαταραχών, της αθηροσκλήρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και της νόσου Alzheimer.

Ο TNFα έχει πολλές άλλες δράσεις που θα μπορούσαν να σχετίζονται με το άσθμα και στις οποίες περιλαμβάνονται ο χημειοτακτικός του ρόλος για τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα, η αύξηση της κυτταροτοξική δράσης των ηωσινοφίλων στα

ενδοθηλιακά κύτταρα, η επαγωγή της απελευθέρωσης κυτοκινών από τα T κύτταρα και η αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, ICAM-1 και VCAM-1, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση T κυττάρων στους αεραγωγούς που με τη σειρά τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη της υπεραντιδραστικότητας (17-19).

Κατά το σοβαρό και επίμονο άσθμα η διήθηση των αεραγωγών από φλεγμονώδη κύτταρα ακολουθείται από αυξημένη έκφραση μίας σειράς κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-4, IL-13, IL-1 β και TNF α (18). Τα ΛΜΚ του αναπνευστικού εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του TNF α κι έχειδειχθεί ότι ο TNF α ενισχύει την αντίδραση συστολής των ΛΜΚ στην ακετυλοχολίνη (20), ενώ ταυτόχρονα επάγει την έκκριση μιας ποικιλίας κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης (4).

1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B

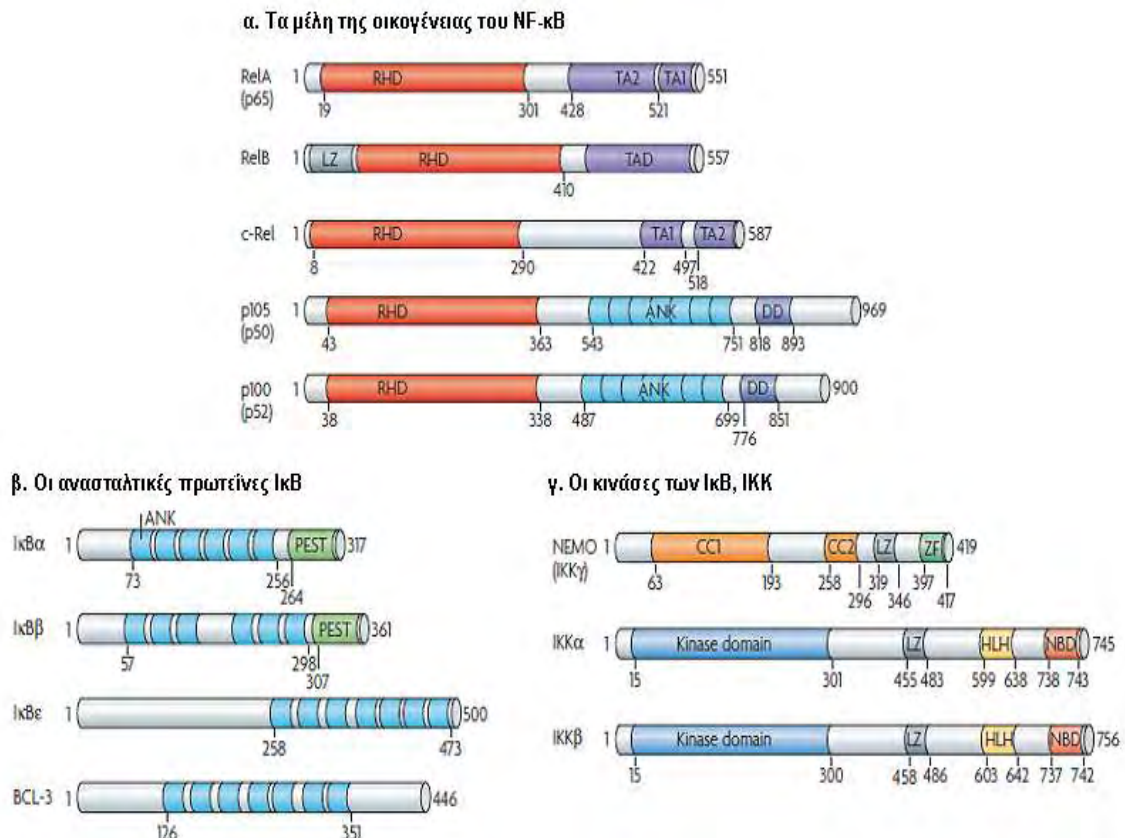
Ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B (πυρηνικός παράγοντας κάπα-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτή των ενεργοποιημένων B κυττάρων/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ρυθμίζει την έκφραση μιας ποικιλίας γονιδίων σε πολλά είδη κυττάρων. Τα γονίδια που επάγονται από τον NF- κ B έχουν διάφορες δράσεις στις οποίες περιλαμβάνονται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η κυτταρική προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός, οι έμφυτες και επίκτητες ανοσιακές απαντήσεις, η απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες stress και η αναδιαμόρφωση των ιστών. Παράλληλα έχειδειχθεί ότι ο NF- κ B παίζει κεντρικό ρόλο στις αποκρίσεις των κυττάρων κατά την εκδήλωση της οξείας και χρόνιας φλεγμονής. Ο NF- κ B ενεργοποιείται σε απόκριση από έναν αριθμό ερεθισμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται: το φυσικό και χημικό stress, οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), το δίκλωνο RNA, τα μιτογόνα των T-και B-κυττάρων και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης από τον NF- κ B είναι σύνθετη και ελέγχεται σε πολλαπλά επίπεδα (21). Επιπρόσθετα, το αποτέλεσμα της δράσης των ρυθμιζόμενων από τον NF- κ B γονιδίων εξαρτάται από τον βαθμό και τη διάρκεια της ενεργοποίησής του. Έτσι, ενώ μεσολαβεί την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην προστασία των ιστών στα πλαίσια της φλεγμονής ή της ανοσιακής απάντησης, σε περίπτωση υπερέκφρασής τους μπορεί να δράσει θετικά στην εξέλιξη της νόσου. Για παράδειγμα, ο NF- κ B ρυθμίζει τις ανοσολογικές απαντήσεις κατά

την είσοδο παθογόνων στον οργανισμό αλλά ταυτόχρονα σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής όπως στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου ή στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του NF-κΒ που συμβάλλει σε μεγαλύτερου βαθμού νοσηρότητα (22).

Ο NF-κΒ αποτελεί ένα έτεροδιμερές των μελών της οικογένειας των δεσμευτικών για το DNA Rel πρωτεϊνών (Εικόνα 4) η οποία περιέχει πέντε γνωστά μέλη: τον p50 (NFκΒ1, πρόδρομος του οποίου είναι ο p105), τον p65 (Rel A, NFκΒ3), τον p52 (NFκΒ2, του οποίου πρόδρομος είναι ο p100), τον c-Rel και τον Rel B. Όλα τα μέλη της οικογένειας των NF-κΒ διαθέτουν μια αμινοτελική περιοχή περίπου 300 αμινοξέων που ονομάζεται περιοχή ομόλογη των Rel (Rel-homology domain, RHD) που ρυθμίζει την δέσμευση στο DNA. Οι υπομονάδες p65 και p50 εκφράζονται σε όλους τους τύπους κυττάρων, ενώ οι υπομονάδες p52, c-Rel και Rel B εκφράζονται σε συγκεκριμένους τύπους διαφοροποιημένων κυττάρων. Σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας, οι υπομονάδες Rel ανευρίσκονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα συζευγμένες από ένα μέλος της οικογένειας των IκΒ ανασταλτικών πρωτεϊνών (Εικόνα 4). Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν τρεις κύριες IκΒs, οι IκΒα, IκΒβ και IκΒε που δρουν συγκαλύπτοντας μια διατηρημένη αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS-nuclear localization sequence) που βρίσκεται στην RHD του NF-κΒ (21). Μετά από την επίδραση κάποιου παράγοντα διέγερσης των κυττάρων, η φωσφορυλίωση των IκΒ πρωτεϊνών που ακολουθείται από την ουβικιτινίωση και την αποδόμηση τους, στο πρωτεάσωμα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NF-κΒ που μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (6, 23).

Η φωσφορυλίωση των IκΒs και η ακόλουθη ενεργοποίηση των Rel πρωτεϊνών μπορεί να συμβεί μέσω του κανονικού (canonical) ή του μη κανονικού (noncanonical) σηματοδοτικού μονοπατιού. Στην κανονική οδό (Εικόνα 5), η φωσφορυλίωση της IκΒα πρωτεΐνης εκτελείται από το σύμπλοκο των κινασών του IκΒ (IKK), το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον τρεις υπομονάδες (Εικόνα 4), και συγκεκριμένα δύο καταλυτικές υπομονάδες IKKα και β (επίσης γνωστές ως IKK-1 και -2), και μία ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ (επίσης γνωστή ως NEMO). Μεταξύ των δύο καταλυτικών υπομονάδων, η IKKβ είναι 20-φορές πιο δραστική από την IKKα στη φωσφορυλίωση των κινασών IκΒ, και θεωρείται ότι παίζει τον πρωταρχικό ρόλο για την ενεργοποίηση

του NF-κB. Το κλασικό μονοπάτι ενεργοποιείται κατόπιν διέγερσης των υποδοχέων της οικογένειας TLR/IL-1R, του υποδοχέα πρόσδεσης των T-κυττάρων (TCR), και του υποδοχέα TNFR του TNFα (6, 21).



Εικόνα 4: Τα μέλη της οικογένειας του NF-κB, των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB πρωτεϊνών και των κινασών IKK. (προσαρμογή από : (21)).

Εκτός από την κλασική οδό, μια μη κανονική οδός (Εικόνα 5) έχει περιγραφεί κυρίως στα B κύτταρα, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαφορετικά ερεθίσματα, όπως η λεμφοτοξίνη β, ο συνδέτης CD40 και ο υποδοχέας ενεργοποιητής του NF-κB συνδέτη (RANKL). Η εναλλακτική οδός του NF-κB χαρακτηρίζεται από την φωσφορύλωση και ενεργοποίηση των p100-p52, και την ακόλουθη πυρηνική

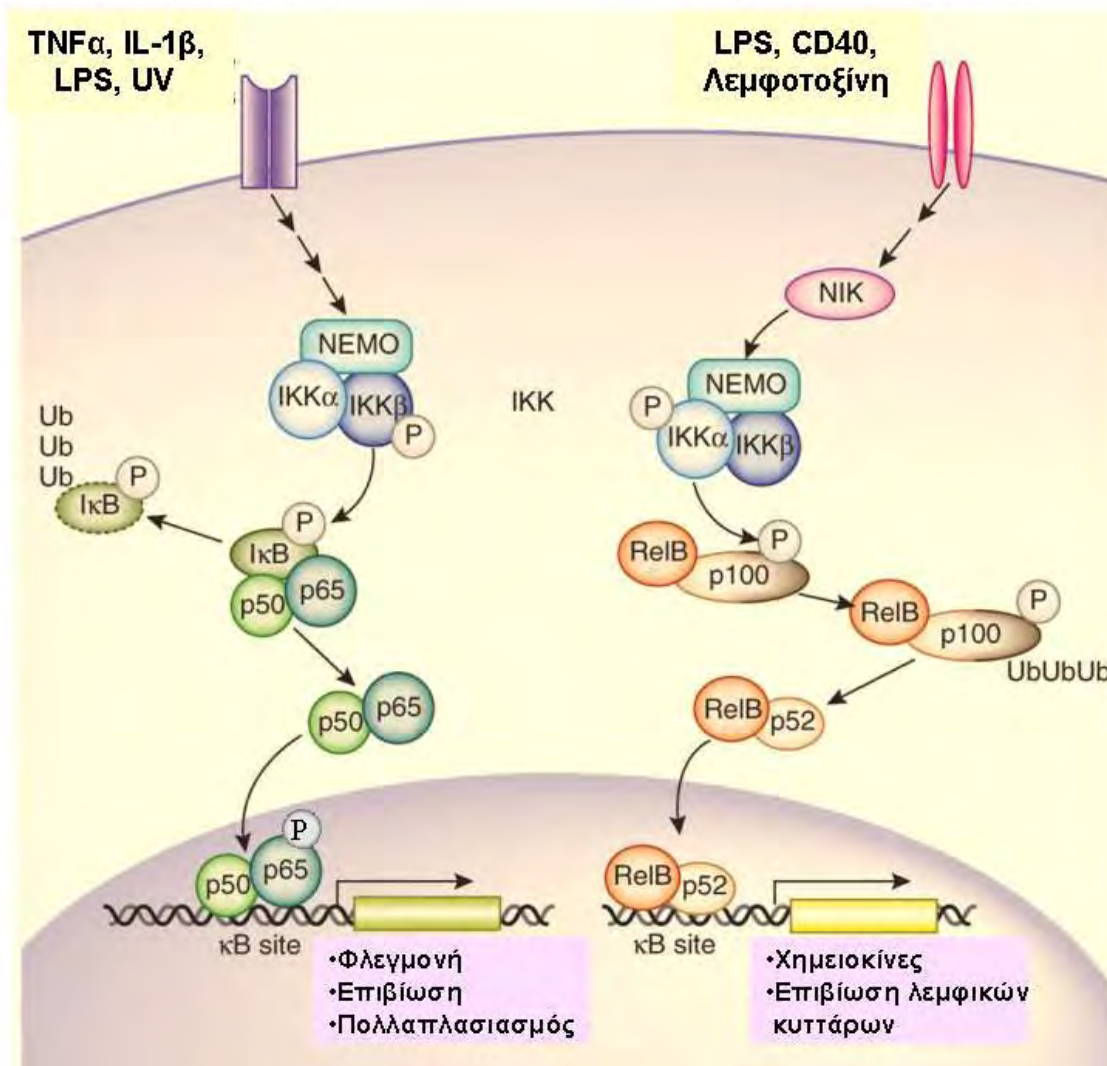
μετατόπιση του ετεροδιμερούς p53:Rel B, βήματα που είναι ανεξάρτητα από τις κινάσες IKK γ και IKK β και απαιτούν μόνον την υπομονάδα IKK α . Αυτή η οδός πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία (6).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF- κ B μπορεί να επηρεαστεί περαιτέρω από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Rel με άλλους παράγοντες που παίρνουν μέρος στην διαδικασία της μεταγραφής. Επιπλέον η ενεργοποίηση του NF- κ B σχετίζεται με την φωσφορυλίωση του. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του p65 ενισχύει τη μεταγραφή, αλλά η φωσφορυλίωση του p105 μπορεί να μειώσει την μετατροπή του σε p50 και ως εκ τούτου να μειώσει την μεταγραφική του ενεργότητα. Η ενεργότητα του NF- κ B επηρεάζεται επίσης από την ακετυλίωση των Rel πρωτεϊνών. Επιπροσθέτως, τροποποιήσεις της χρωματίνης που ρυθμίζουν την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στους εκκινητές των γονιδίων μπορεί να μεταβάλλουν την εξαρτώμενη από τον NF- κ B μεταγραφή. Η ενεργοποίηση του NF- κ B απαιτεί επίσης αρκετούς συμπαράγοντες, με κυριότερους τους CBP και p300 για να επιτευχθεί η πρόσδεση στο DNA και η μεταγραφή των γονιδίων (6, 21).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ενεργοποίηση του NF- κ B σε ιστούς ασθενών με άσθμα. Σε περιφερικά μονοκύτταρα αίματος ενηλίκων με σοβαρό και μέτριο άσθμα παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση πρωτεΐνης p65 του NF- κ B, της φωσφορυλίωσης της I κ B και των επιπέδων της πρωτεΐνης IKK β σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (24). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτες παιδιών με άσθμα. Επιπλέον, σε πυρηνικά εκχυλίσματα επιθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από διοψίες ασθενών με άσθμα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της πυρηνικής NF- κ B p65 πρωτεΐνης και της ενεργοποίησης του p50 (25). Παρατηρήθηκε μάλιστα ότι η ενεργοποίηση του NF- κ B σχετίζεται τόσο με την μικροβιακή ή ιική προέλευση της φλεγμονής όσο και με το αλλεργικό άσθμα (6).

Κανονικό μονοπάτι

Μη-κανονικό μονοπάτι



Εικόνα 5: Το κανονικό και μη κανονικό μονοπάτι του NF- κ B (προσαρμογή από: (23)).

Τα ΛΜΚ του αναπνευστικού υπόκεινται σε ρύθμιση από τον NF- κ B κατά τις φλεγμονώδεις διεργασίες. Υπό την επίδραση του $TNF\alpha$ η κινάση IKK β κι η p65 υπομονάδα φωσφορυλιώνονται στις θέσεις Ser276 και Ser536 αντίστοιχα και σε ΛΜΚ. Διάφορες μελέτες κάνουν λόγο για εμπλοκή του μονοπατιού του NF- κ B στην επαγόμενη από τον $TNF\alpha$ έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 από τα ΛΜΚ των αεραγωγών ενώ ταυτόχρονα η εξουδετέρωση της IKK β κινάσης επηρεάζει την έκφραση της IL-6, του RANTES και του ICAM-1. Τέλος, η ακετυλίωση των p300/CBP

απαιτείται επίσης για την μεσολαβούμενη από τον NF-kB έκφραση των VCAM-1 και ICAM-1 στα ΛΜΚ αναπνευστικού κατόπιν έκθεσης στον TNFα (26).

1.7 Υποξία και φλεγμονή

Η πορεία της εξέλιξης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τα περιβαλλοντικά επίπεδα του οξυγόνου από τη στιγμή της συσσώρευση του στη γήινη ατμόσφαιρα πριν 2,3 δισεκατομμύρια χρόνια. Πράγματι, η χημική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από τη μιτοχondριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η κύρια οδός μέσω της οποίας τα ευκαρυωτικά κύτταρα παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που είναι η κυριότερη πηγή ενέργειας για τις περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις. Γενικότερα είναι αποδεκτό ότι τα επίπεδα του οξυγόνου στα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται σε ορισμένες συγκεντρώσεις, κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως «νορμοξία» (21% O₂). Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία) ή η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υπεροξία) διαταράσσουν τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες κι απειλούν την επιβίωση των κυττάρων (22, 27).

Με τον όρο «υποξία» αναφερόμαστε στη χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (1% O₂) στα κύτταρα που απαντά κυρίως σε παθολογικές αλλά και σε ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις και εμφανίζεται όταν οι απαιτήσεις οξυγόνου για τη διατήρηση του κυτταρικού ATP σε κανονικά επίπεδα ξεπερνούν τον αγγειακό ανεφοδιασμό. In vivo, ως υποξία περιγράφεται η κατάσταση εκείνη που παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων οξυγόνου ενός ιστού σε σχέση με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται φυσιολογικά. Λόγω της απόλυτης εξάρτησης των κυττάρων από τα επίπεδα οξυγόνου προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία τους, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς σε κυτταρικό επίπεδο που τους επιτρέπουν να ανταποκρίνονται σε μειωμένα επίπεδα οξυγόνου με την ενεργοποίηση μεταγραφικών απαντήσεων, που ρυθμίζουν την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας προς αποφυγή του κυτταρικού θανάτου (22).

Η νόσος είναι μία λειτουργία αλληλεπίδρασης του μικροπεριβάλλοντος των ιστών με την έκφραση των γονιδίων. Κατά την φλεγμονή, οι ιστοί παρουσιάζουν δραστικές αλλαγές στον μεταβολισμό τους. Σε πρώτο χρόνο ενεργοποιούνται τα ουδετερόφιλα και ακολουθεί ταχεία παραγωγή της IL-1β και του TNFα. Παράλληλα, η

τοπική αγγειακή διαπερατότητα αυξάνεται με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται πολυάριθμα φλεγμονώδη κύτταρα στα οποία περιλαμβάνονται τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα. Αμφότερα τα ανοσιακά και μη κύτταρα μετατρέπονται σε πηγές έκκρισης διαφόρων ρυθμιστών που απαιτούνται ως μεσολαβητές της φλεγμονώδους απάντησης, στρατολόγησης και ενεργοποίησης περισσότερων ή και διαφορετικών κυττάρων φλεγμονής και αγγειογένεσης των ιστών. Οι περιοχές της φλεγμονής σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν μείωση της οξυγόνωσης τους όπως στις αθηρωματώδεις πλάκες, στους όγκους, στα μυοκαρδικά έμφρακτα, στην αρθρίτιδα, σε περιοχές βακτηριακής φλεγμονής καθώς και στα τραύματα κατά την επούλωση (27).

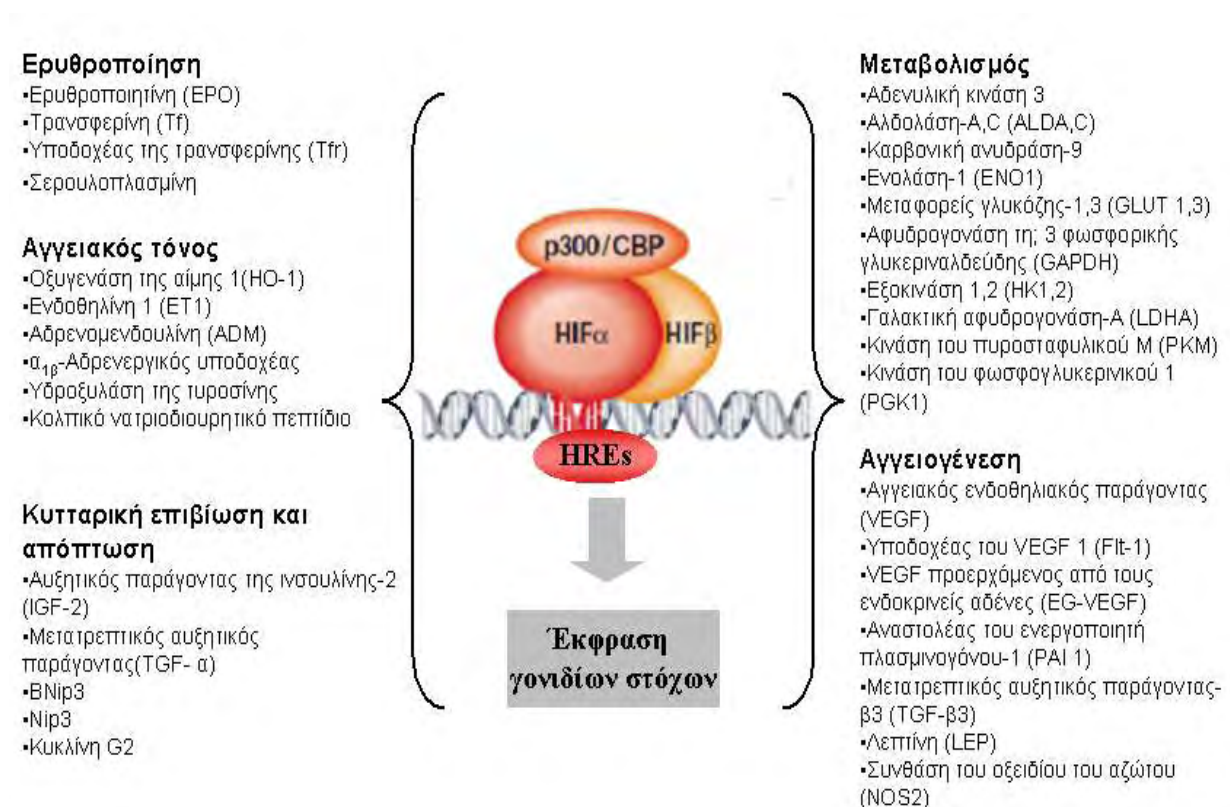
Η τοπική υποξία των ιστών με φλεγμονή προκαλείται λόγω της ανισορροπίας ανάμεσα στις αυξημένες ιστικές απαιτήσεις για οξυγόνο και στην ταυτόχρονη μειωμένη παροχή του. Η μειωμένη οξυγόνωση οφείλεται στην τοπική αγγειοπάθεια και συνδυαστικά με την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου λόγω αυξημένου μεταβολισμού τόσο του ιστού όσο και των πολυάριθμων κυττάρων ανοσίας που έχουν προσέλθει καθώς και των ίδιων των παθογόνων, οδηγεί στην τοπική εξάντληση του O_2 (27, 28).

Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου προκαλούν την άμεση απόκριση των κυττάρων που ενεργοποιούν διάφορους ενδοκυττάριους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που αλλάζουν την έκφραση γονιδίων για να εξασφαλιστεί η κυτταρική επιβίωση κι η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου. Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας (Hypoxia Inducible Factor, HIF), είναι ο πιο σημαντικός και καλά περιγραφόμενος παράγοντας μεταγραφής που ενεργοποιεί την υποξική έκφραση γονιδίων στόχων του που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στη μεταφορά οξυγόνου, στο μεταβολισμό του σιδήρου, στη γλυκόλυση, στην πρόσληψη γλυκόζης, στην σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα, στην απόπτωση και στην μετάσταση των κυττάρων στην υποξία. Ο HIF αποτελείται από δύο υπομονάδες την α και τη β . Η α υπομονάδα συναντάται σε τρεις ισομορφές: HIF-1 α , HIF-2 α και HIF-3 α , οι οποίες όταν ετεροδιμερίζονται με τον HIF-1 β ή ARNT σχηματίζουν τους παράγοντες HIF-1, HIF-2 και HIF-3 αντίστοιχα (29, 30).

1.8 Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF

1.8.1 HIF-1α

Ο HIF-1α αποτελεί μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων που ανακαλύφθηκε στα πλαίσια μελετών στο γονίδιο της ερυθροποιητίνης, όπου αναγνωρίστηκε μια αλληλουχία DNA (5'-RCGTG-3') που ρυθμίζεται μεταγραφικά από την υποξία και ονομάστηκε στοιχείο απόκρισης στην υποξία HRE (Hypoxia Response Element). Η πρωτεΐνη που προσδένεται στα HRE σε συνθήκες υποξίας είναι ο HIF-1. Έκτοτε έχει δειχθεί ότι ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων εκτός από την ερυθροποιητίνη που σχετίζονται με την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία (Εικόνα 6). Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη αποτελούμενη από μια α υπομονάδα, τον HIF-1α που ρυθμίζεται από την συγκέντρωση O_2 και μια συνεχώς εκφραζόμενη β υπομονάδα τον HIF-1β ή ARNT. Οι δύο υπομονάδες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών basic helix-loop-helix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) (29).



Εικόνα 6 : Γονίδια στόχοι του HIF-1α (προσαρμογή από : (31)).

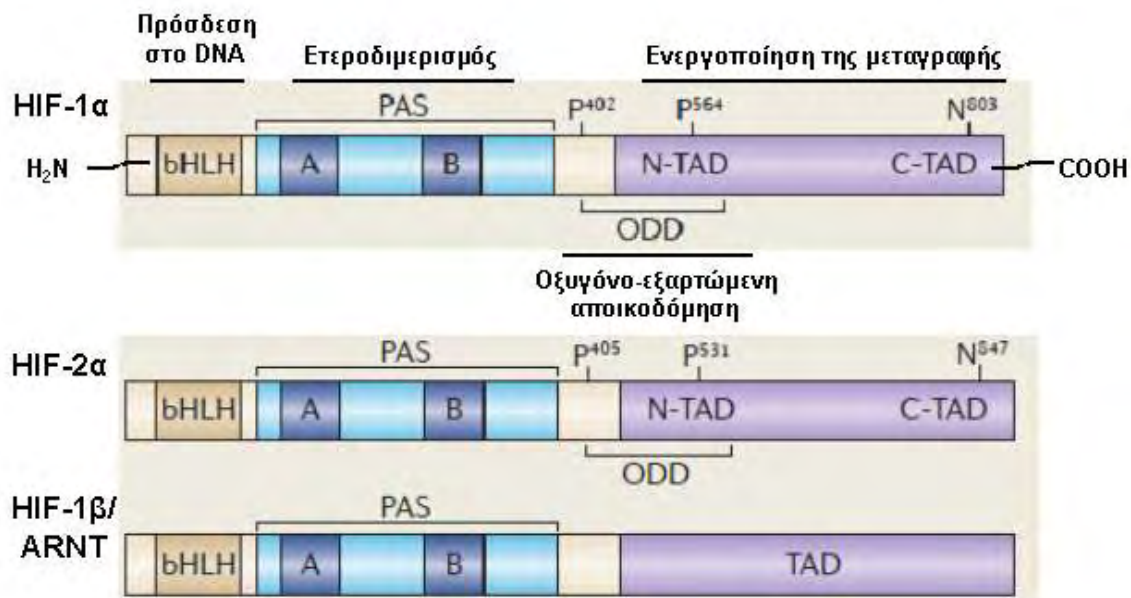
Το αμινοτελικό τμήμα περιέχει τα HLH και PAS μοτίβα που είναι απαραίτητα για τον διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs. Τα HLH και PAS διακρίνονται στην βασική περιοχή (αμινοξέα 17-30) την HLH περιοχή (αμινοξέα 31-71) και την PAS περιοχή (αμινοξέα 99-343) που διαιρείται σε Α (αα99-209) και Β (αα242-343) τμήματα. Το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α είναι ρυθμιστικό της μεταγραφής και περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), μια αμινοτελική, την N-TAD (αμινοξέα 531-575) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 831-826). Στη N-TAD περιοχή συνυπάρχει η ονομαζόμενη ODD (Oxygen Dependent Degradation) περιοχή (αμινοξέα 401-603) που ρυθμίζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης σε συνάρτηση με το οξυγόνο (Εικόνα 7). Η C-TAD περιοχή έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300, που απαιτούνται για την σύνδεση του συμπλόκου HIF-1α/HIF-1β στα HREs των γονιδίων στόχων τους (32).

Τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) εντοπίζονται τόσο αμινοτελικό N-NLS (αμινοξέα 17-74) όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο C-NLS (αμινοξέα 718-756) του HIF-1α. Η περιοχή C-NLS συνδέεται με τις ιμφορτίνες α ενώ η N-NLS με τις ιμφορτίνες 4 και 7 (33).

1.8.2 HIF-1β ή ARNT

Ο ARNT αποτελείται από 798 αμινοξέα. Δομικά (Εικόνα 7) στο αμινοτελικό του άκρο φέρει μια bHLH περιοχή που ρυθμίζει την πρόσδεση του στο DNA, μια PAS περιοχή που ρυθμίζει τον ετεροδιμερισμό του με τον HIF-1α και ένα NLS που ευθύνεται για τον πυρηνικό εντοπισμό του. Στο καρβοξυτελικό του άκρο φέρει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής που όμως δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου HIF-1α/ARNT (34).

Ο ARNT είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως ετεροδιμερής παράγοντας του ειδικού υποδοχέα Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) που επάγει την μεταγραφή ρυθμιστικών γονιδίων για ένζυμα μεταβολισμού όπως οι διοξίνες, κι έτσι ονομάστηκε AhR nuclear translocator-ARNT (35).



Εικόνα 7: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α, HIF-2α και ARNT. οι HIF-1α και HIF-2α περιέχουν από μια περιοχή bHLH που ρυθμίζει την πρόσδεσή τους στο DNA και δύο PAS περιοχές (A & B) υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό τους. Στο καρβοξυτελικό τους περιέχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής N-TAD και C-TAD και την περιοχή ODD που είναι υπεύθυνη για την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμησή τους. Ο HIF-1β περιέχει επίσης τις bHLH και PAS περιοχές ενώ περιέχει μια περιοχή TAD (προσαρμογή από: (36)).

1.8.3 HIF-2α

Ο HIF-2α (επίσης γνωστή ως ενδοθηλιακή PAS πρωτεΐνη-1, EPAS-1) ρυθμίζεται από την υποξία, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT για το σχηματισμό του HIF-2 συμπλόκου, το οποίο ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω σύνδεσης με τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) ομοίως με τον HIF-1α. Έκτοπη υπερέκφραση του HIF-2α επάγει την έκφραση των γονιδίων αναφοράς *in vitro* σε υποξικές συνθήκες, αλλά η επαγωγή είναι μικρότερη συγκριτικά με από εκείνη που παρατηρείται από το HIF-1α, κάτι που θα μπορούσε να εξαρτάται από τον τύπου κυττάρου που μελετάται (36). Οι HIF-1α και HIF-2α πρωτεΐνες είναι 48% ταυτόσημες (Εικόνα 7), με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αρκετές κοινές δομικές και βιοχημικές ιδιότητες. Ο HIF-1α, ο HIF-2α και ο HIF-3α που περιγράφεται στη συνέχεια είναι υποστρώματα της πρωτεΐνης von Hippel-

Lindau (pVHL). Ως εκ τούτου, η απώλεια της pVHL αποτελεί ένα ισχυρό μηχανισμό για την απορύθμιση της έκφρασης και των τριών πρωτεϊνών HIFα (32).

Ο HIF-2α εκφράζεται σε μια ποικιλία ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ των HIF-1α και HIF-2α απαντήσεων. Ωστόσο, ο HIF-1α είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη στα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ο HIF-2α βρίσκεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι HIF-1α και HIF-2α μπορεί να έχουν διαφορετικές λειτουργίες (36). Η ανάλυση των προτύπων έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α μετά από έκθεση σε υποξία ή σε μιμητικά υποξίας εμφανίζει διακριτές διαφορές στη συσσώρευση των δύο πρωτεϊνών σε σχέση με το ερέθισμα, τον κυτταρικό τύπο ακόμη και τους κυτταρικούς πληθυσμούς εντός διαφόρων οργάνων (32).

1.8.4 HIF-3α

Ο HIF-3α έχει μεγάλη ομοιότητα με τους HIF-1α και HIF-2α ως προς τις bHLH και PAS περιοχές, αλλά στερείται των περιοχών διενεργοποίησης που βρέθηκαν στο C-τελικό άκρο του HIF-1α και του HIF-2α. Τα επίπεδα του εξαρτώνται από τα επίπεδα οξυγόνου ομοίως με τους άλλους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες, σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου διμερίζεται με τον ARNT και συνδέεται με τον πυρηνική HRE αλληλουχία, αλλά ο HIF-3α φαίνεται να καταστέλλει την μεσολαβούμενη από τον HIF-1 γονιδιακή έκφραση στον ανθρώπινο νεφρό και ως εκ τούτου θα μπορούσε να είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής στην έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την υποξία.

Μελέτες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη πολλαπλών παραλλαγών ματίσματος του HIF-3α, μερικές εκ των οποίων περιέχουν την περιοχή στόχο του VHL, ODD που βρίσκεται επίσης στους HIF-1α και 2α. Η ανασταλτική πρωτεΐνη PAS (IPAS) είναι μία ακόμη από τις εναλλακτικές μορφές ματίσματος του HIF-3α και έχει κυρίαρχο-αρνητικό αποτέλεσμα στην HIF-1 μεσολαβούμενη γονιδιακή έκφραση, προκαλώντας την καθυστερημένη ανάπτυξη του όγκου και της αγγειακής πυκνότητας in vivo. Είναι ενδιαφέρον ότι οι παραλλαγές ματίσματος που αφορούν την μεταγραφή γονιδίων παρατηρήθηκαν μόνο υπό συνθήκες υποξίας (32).

Η ύπαρξη πολλαπλών υπομονάδων HIFα θα μπορούσε να αποτελεί την εναλλακτική οδό για να εξασφαλίζεται η ενεργοποίηση του HIF ακόμα και αν ο HIF-1α

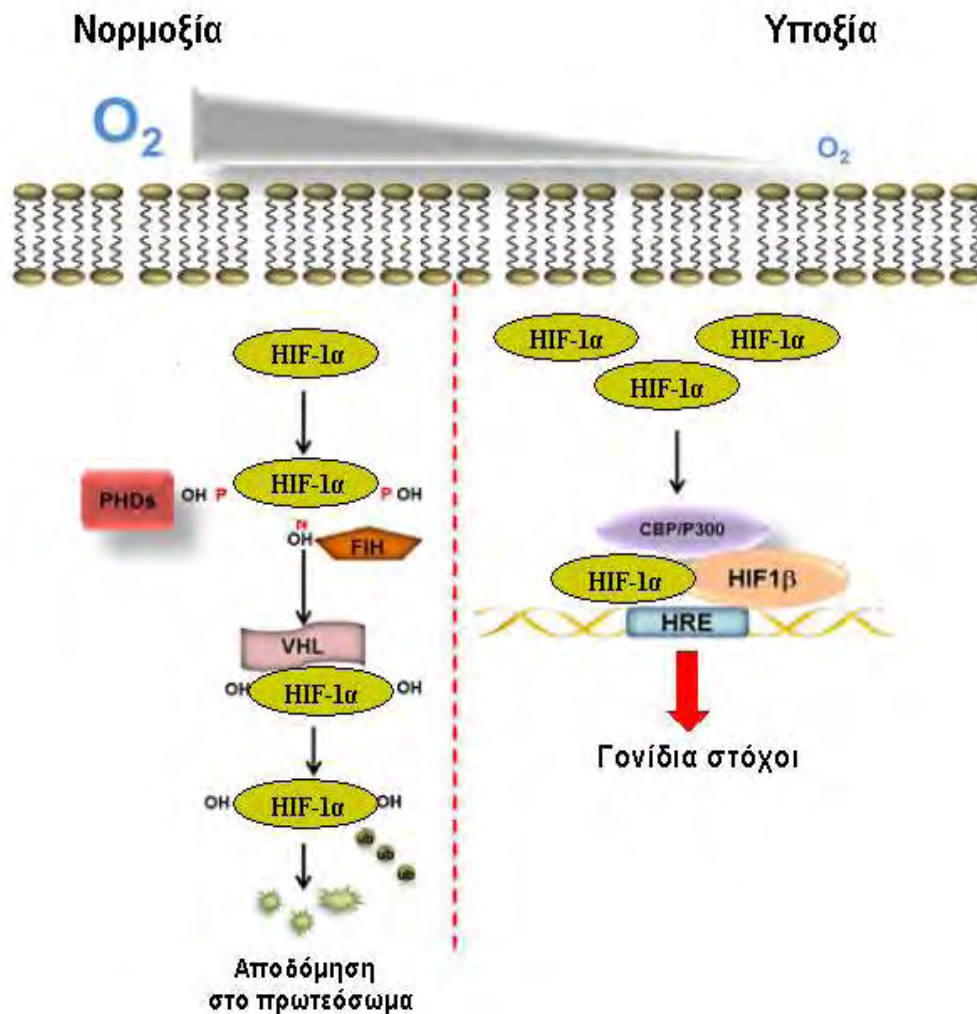
χαθεί ή αδρανοποιηθεί. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα διάφορα μέλη της οικογένειας HIFα έχουν επίσης ξεχωριστές λειτουργίες που δεν επικαλύπτονται.

1.9 Η ρύθμιση του του HIF-1α

1.9.1 Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο

Ο HIF-1 είναι μία ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μία μόνιμα εκφραζόμενη HIF-1β/ARNT υπομονάδα και μια οξυγονοεξαρτώμενη HIF-1α υπομονάδα. Τα mRNAs των HIF-1α και ARNT εκφράζονται ιδιοσυστατικά και παντού, ανεξάρτητα από το επίπεδο του οξυγόνου. Η ρύθμιση της πρωτεΐνης HIF-1α είναι μετα-μεταφραστική και εξαρτάται από την σταθεροποίησή της.

Στη νορμοξία, ο HIF-1α είναι μία πολύ ασταθής πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής μικρότερο από 5 λεπτά. Στις συνθήκες αυτές (Εικόνα 8), ο HIF-1α συντίθεται συνεχώς αλλά υδροξυλιώνεται άμεσα στα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564 εντός της ODD περιοχής από ένζυμα που ονομάζονται προλύν-υδροξυλάσες (Proline Hydroxylase Domain, PHD protein). Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν μοριακό O₂ και α-κετογλουταρικό ως υποστρώματα για να καταλύουν μία αντίδραση διοξυγενάσης, στην οποία ένα άτομο οξυγόνου ενώνεται με το κατάλοιπο προλίνης και ένα άλλο άτομο οξυγόνου αντιδρά με το α-κετογλουταρικό για να σχηματιστεί ηλεκτρικό οξύ και CO₂. Η πρωτεΐνη OS-9 συνδέεται προς αμφότερες τις PHDs και τον HIF-1α διευκολύνοντας έτσι την υδροξυλίωση. Η προλύν-υδροξυλίωση απαιτείται για τη σύνδεση της πρωτεΐνης VHL, η οποία αλληλεπιδρά με ελονγκίνη C και έτσι προσλαμβάνει ένα σύμπλοκο λιγάνης ουβικουϊτίνης. Η SSAT2 πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με τους HIF-1α, pVHL και ελονγκίνη C, σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της VHL με την ελονγκίνη C, διευκολύνοντας έτσι την ουβικουϊτίνωση του HIF-1α. Η ουβικουϊτίνωση αποτελεί το σήμα για την αποικοδόμηση HIF-1α από το πρωτεάσωμα. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται, η αναστολή της υδροξυλίωσης επιτρέπει την σταθεροποίηση και την συσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α (Εικόνα 8), που πλέον μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα, να ετεροδιμεριστεί με τον ARNT και να συνδεθεί με συμπαράγοντες όπως οι CBP και p300 ώστε να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του (37, 38).



Εικόνα 8: Ρύθμιση του HIF-1α από τις PHDs (προσαρμογή από : (37)).

Οι προλυλ-υδροξυλάσες αποτελούν ζωτικής σημασίας ένζυμα για ένα περίπλοκο και καλά συντονισμένο σύστημα ανίχνευσης οξυγόνου. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί τρία ένζυμα προλυλ-υδροξυλάσης που ονομάζονται PHD1, PHD2, και PHD3 ή EGLN2, EGLN1 και EGLN3 αντίστοιχα. Η δράση τους εξαρτάται από την διαθεσιμότητα οξυγόνου, απαιτούν ως υπόστρωμα το α-κετογλουταρικό και σαν συμπαραγόντες τον δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) και το ασκορβικό. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι τόσο το mRNA όσο και η πρωτεΐνη των PHD2 και PHD3 αυξάνονται από την υποξία σε έναν αριθμό κυτταρικών τύπων, υποδηλώνοντας έναν ανατροφοδοτικό

μηχανισμό τερματισμού της υποξικής απόκρισης ή έναν μηχανισμό άμεσης αντίδρασης των κυττάρων κατά την επανοξυγόνωση. Παράλληλα, από άλλες μελέτες έχει προκύψει ότι η αναστολή της δράσης της PHD2 είναι αρκετή για την ενεργοποίηση του HIF-1α, κάτι που δεν παρατηρήθηκε για τις άλλες PHDs. Εκτός από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου, άλλος μηχανισμός που εξασφαλίζει την αδρανοποίηση των PHD στην υποξία αποτελεί η δέσμευση τους από τις E3 λιγάσες Siah1a και Siah2 προς αποδόμηση στο πρωτεάσωμα, κάτι που ίσως αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό ρύθμισης του HIF-1α (29, 32).

Πέραν των επιπέδων οξυγόνου, η δράση των PHDs μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες που δεσμεύουν τους απαιτούμενους συμπαραγόντες τους. Έτσι, ενώσεις όπως είναι η διμεθυλοξαλυλο-γλυκίνη (DMOG), που είναι ανάλογο του α-κετογλουταρικού, η δεσφεριοξαμίνη (DFO), που δεσμεύει το Fe^{2+} , και δισθενή μέταλλα, όπως το κοβάλτιο ή το νικέλιο, αναστέλουν την δράση των PHDs επιτρέποντας την ενεργοποίηση του HIF-1α (29).

Πέραν της δράσης των PHDs, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε συνθήκες νορμοξίας και από μια άλλη οξυγονο-εξαρτώμενη υδροξυλάση τον παράγοντα αναστολής του HIF-1 (Factor Inhibiting HIF, FIH-1). Η FIH-1 είναι μία υδροξυλάση ασπαραγινικού που υδροξυλιώνει τον HIF-1α στο κατάλοιπο ασπαραγίνης Asn 803 στην C-TAD περιοχή, χρησιμοποιώντας το ενδοκυττάριο οξυγόνο, Fe^{2+} και ασκορβικό σαν συμπαραγόντες. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η κατάργηση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τους συν-ενεργοποιητές p300 και CBP, καθιστώντας έτσι τον HIF-1α μεταγραφικά ανενεργό. Επιπλέον, έχει πρόσφαταδειχθεί ότι η FIH-1 μπορεί να μειώσει την δραστικότητα του HIF-1, ακόμη και σε σοβαρή υποξία, παρέχοντας ένα δυναμικό μηχανισμό για την απενεργοποίηση του HIF-1 σε συνθήκες όπου οι PHDs είναι ανενεργές. Η FIH-1 επίσης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη VHL και διευκολύνει την πρόσληψη του HIF-1α για ουβικιτινίωση και επακόλουθη αποικοδόμηση. Τέλος, σε μελέτες έχειδειχθεί ότι η FIH-1 αλληλεπιδρά και με άλλα κυτταρικά στοιχεία που έχουν χαρακτηριστικές ARD (ankyrin repeat(AR) domain) περιοχές. Μεταξύ των πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκε ότι διαθέτουν ARD περιοχές ήταν οι p105 και IκBa που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του NFκB. Έχουν γίνει μάλιστα υποθέσεις ότι υπάρχει ανταγωνιστική δράση στην συγγένεια

πρόσδεσης μεταξύ αυτών και του HIF-1α που μπορεί να τροποποιούν την μεταγραφική δράση του δεύτερου (39).

Συνοψίζοντας λοιπόν θα λέγαμε ότι η ρύθμιση του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου υπόκειται σε πολύπλοκους μηχανισμούς. Σε πρώτο χρόνο, η μείωση ακόμα και σε μικρό βαθμό του ενδοκυττάριου οξυγόνου απενεργοποιεί τις περισσότερες ευαίσθητες PHDs, ενώ για την απενεργοποίηση της δράσης της FIH-1 απαιτούνται χαμηλότερα επίπεδα οξυγόνου έτσι ώστε ο HIF-1α να μεταφέρεται στον πυρήνα, να ετεροδιμερίζεται και να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.

1.9.2 Ρύθμιση του HIF-1 από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) σχηματίζονται στα κύτταρα των θηλαστικών σε απόκριση τοξικών αντιδραστηρίων ή ως υποπροϊόντα ενζύμων που χρησιμοποιούν O_2 , όπως τα ένζυμα που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, στο μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος, στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450, καθώς και η οξειδάση της γλυκόζης, οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της ξανθίνης, οι οξειδάσες του NADH / NADPH και η συνθετάση του NO. Η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O_2 οδηγεί στην δημιουργία των ROS στα οποία περιλαμβάνονται το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}), το υπεροξεινιτρικό ($ONOO^-$), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCL$) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο σχηματισμός των ROS αντισταθμίζεται από την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα και την παραγωγή ουσιών όπως η γλουταθειόνη, η ουβικινόνη, η καταλάση του υπεροξειδίου κι η δισμουτάση του υπεροξειδίου καθώς και από εξωγενώς προσλαμβανόμενα αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία. Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα προκαλείται βλάβη του DNA, των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών, υπεροξείδωση των λιπιδίων, ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός και τελικά απόπτωση των κυττάρων (40).

Τα μιτοχόνδρια παίζουν κυρίαρχο ρόλο στις μεταβολές του οξυγόνου σε κυτταρικό επίπεδο και σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιούν την παραγωγή των ROS τα οποία επηρεάζουν την επαγωγή του HIF-1α. Σε κύτταρα που στερούνται μιτοχονδριακό DNA και κατ'επέκταση δεν παράγουν ROS έχειδειχθεί ότι αναστέλλεται η επαγωγή του

HIF-1α στην υποξία. Επιπλέον, η παραγωγή ROS στο σύμπλεγμα III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων αυξάνεται κατά την υποξία και σχετίζεται με την σταθεροποίηση του HIF-1α. Ενώ υπό την επίδραση αναστολέων της μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων και συνακόλουθης ελάττωσης της παραγωγής των ROS, σημειώθηκε μείωση της σταθεροποίησης του HIF-1α κατά την υποξία (31).

Παράλληλα, η παραγωγή των ROS υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων, ενζύμων και φλεγμονωδών παραγόντων επηρεάζει την δράση του HIF-1α και σε συνθήκες νορμοξίας Ένας πιθανός μηχανισμός που συμβαίνει αυτό σχετίζεται με την καταστολή της δράσης των PHDs μέσω οξείδωσης του Fe στην καταλυτική τους περιοχή (40). Σε επιθηλιακά κύτταρα πνευμονικών κυψελίδων η επαγόμενη από τον TNFα αύξηση του mRNA και της πρωτεΐνης του HIF-1α συσχετίζονται με την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια μετά την έκθεση των κυττάρων στον TNFα σε συνθήκες νορμοξίας (41). Σε ΛΜΚ πνευμονικής αρτηρίας τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS είχαν ως αποτέλεσμα της αύξησης της πρωτεΐνης και του mRNA του HIF-1α μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ (42).

1.9.3 Ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το οξυγόνο

1.9.3.1 Ρύθμιση του HIF-1α στο επίπεδο της μεταγραφής

Η αρχική παραδοχή ότι η ρύθμιση του HIF-1α αφορά κατεξοχήν το μετα-μεταφραστικό επίπεδο αναιρείται τα τελευταία χρόνια καθώς ολοένα και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι επαγωγή του mRNA του HIF-1α εξαρτάται και από άλλους παράγοντες πέραν των επιπέδων οξυγόνου. Στα μονοκύτταρα η αύξηση του mRNA του HIF-1α υπό την επίδραση του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σε συνθήκες νορμοξίας φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς προετοιμάζει την επιβίωση και την δραστηριότητα των μονοκυττάρων στο υποξικό μικροπεριβάλλον που συναντούν όταν εξαγγειώνονται στους παθολογικούς ιστούς (43). Το LPS επάγει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων περιλαμβανομένων του NF-κΒ και της AP-1 (44). Αμφότεροι αυτοί οι παράγοντες παρουσιάζουν θέσεις δέσμησης στον υποκινητή του HIF-1α γονιδίου. Η επαγωγή του mRNA του HIF-1α μειώθηκε όταν αναστάλθηκε η δράση του NFκΒ σε καλλιέργειες ουδετερόφιλων (45). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο HIF-1α διαθέτει μία κλασσική κΒ θέση σύνδεσης στα ζεύγη βάσεων -197/ -188 που είναι

συντηρημένα μεταξύ ανθρώπων και ποντικών. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι η μεταλλάξη της προαναφερθείσας περιοχής ανέστειλε την επαγόμενη από τον NF-κΒ μεταγραφή του HIF-1α γονιδίου και ότι απαιτείται μια βασική ενεργοποίηση του NF-κΒ για την συσσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α κατά την υποξία σε πρωτογενείς καλλιέργειες μακροφάγων (46).

Η μεταγραφή του HIF-1α γονιδίου εξαρτάται κι από άλλους συμπαράγοντες που προάγουν ή αναστέλουν την ικανότητα σύνδεσης του στο DNA. Για παράδειγμα έχει ανευρεθεί μία αλληλουχία μεταξύ -41 και -31 υπεύθυνη για την αύξηση της μεταγραφής του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία εχινομυκίνης, που είναι ένα κυκλικό πεπτίδιο της οικογένειας των αντιβιοτικών της κιντοζαλίνης. Αυτή η περιοχή περιέχει μια θέση δέσμευσης για την Sp1 πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε ότι ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης Sp1 δεν επηρεάζονται από την παρουσία εχινομυκίνης σε καμία συνθήκη, η δραστηριότητα της αυξάνεται σε συνθήκες νορμοξίας και προκαλεί αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α, που με τη σειρά της έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης του καθώς και να επάγεται η έκφραση των γονιδίων στόχων του (47).

Η πρωτεΐνη Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) έχειδειχθεί ότι αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα ρύθμισης της έκφρασης του HIF-1 υπό την επίδραση αυξητικών ή ογκογόνων παραγόντων. Για παράδειγμα η αναστολή της δράσης της Stat3 σε κύτταρα ογκών με ενεργοποιημένη την κινάση Src μειώνει τα επίπεδα τόσο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA του HIF-1α κατά την υποξία. Η πρωτεΐνη Stat3 δεσμεύεται στον εκκινητή του HIF-1 στους αναπτυσσόμενους όγκους υποδηλώνοντας μια απευθείας μεσολάβηση της στην ρύθμιση της δράσης του εκκινητή του (48). Επιπλέον η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Stat3 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης του HIF-1α κατά την υποξία σε καρκινικά κύτταρα (49).

1.9.3.2 Ρύθμιση του HIF-1α στο επίπεδο της μετάφρασης

Οι μεσολαβητές φλεγμονής μπορούν να αυξήσουν την επαγόμενη από την υποξία δραστηριότητα του HIF-1α αυξάνοντας την μετάφραση του mRNA του, κάτι που παρατηρήθηκε στα νεφρικά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου (50), στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (51) και σε κύτταρα όγκων διαφόρων ιστών (52, 53). Τα περισσότερα από

αυτά τα κύτταρα εκφράζουν ‘ιδιοσυστατικά’ IL-1 β και TNF α δημιουργώντας έτσι ένα μικροπεριβάλλον όπου οι μεσολαβητές φλεγμονής μπορούν να επάγουν τον HIF-1 α με έναν παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο επιπρόσθετα της υποξικής επαγωγής. Ο TNF α μέσω της επαγωγής της μεταγραφής αύξησε τον πολλαπλασιασμό και την δράση του HIF-1 στα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα ήπατος. Επιπλέον, το μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR ενεργοποιείται υπό την επίδραση της θρομβίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (54).

Με σημείο αναφοράς τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας έχειδειχθεί ότι ο HIF-1 α επάγεται από ιογενή στοιχεία στα T-λεμφοκύτταρα σε συνθήκες υποξίας. Επίσης, η προσβολή από την τοξίνη φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) αύξησε την μετάφραση της πρωτεΐνης του HIF-1 α μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K-AKT-mTOR (55). Ωστόσο σε κύτταρα του λεμφικού ιστού καθώς και σε καρκινικά κύτταρα η προσβολή από τον ιό Epstein-Barr (EBV) ενεργοποίησε το μονοπάτι των MAPK κινασών με αποτέλεσμα την αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο με την σειρά του προκάλεσε αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης του HIF-1 α . Τα ανωτέρω υποδηλώνουν ότι η ρύθμιση του HIF-1 α εξαρτάται από τον κυταρικό τύπο και το ερέθισμα που την πυροδοτεί. Η αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης του HIF-1 α , συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχου του υπό συνθήκες φλεγμονής και υποξίας. Αρχικά, σε νορμοξικές συνθήκες, η αυξημένη σύνθεση του HIF-1 α επιτρέπει στα κύτταρα να ξεπεράσουν τη φυσιολογική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF-1 α , που είναι σε μία ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και καταστροφής από το πρωτεόσωμα. Έπειτα, σε συνθήκες υποξίας, η αυξημένη μετάφραση του mRNA του HIF-1 α φαίνεται να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο ώστε τα κύτταρα να προσαρμοστούν καλύτερα στις βραχυπρόθεσμες αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος (56).

1.9.3.3 Η ρύθμιση του HIF-1 α σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο

- **Φωσφορυλίωση**

Ο HIF-1 α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης κάτι που πρωτοδείχθηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων Hep3B με την τεχνική EMSA (57). Ο HIF-1 α έχειδειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται από την p42/44 MAPK στις σερίνες 641 και 643. Η φωσφορυλίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export

Signal, NES) που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1, τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο φωσφορυλιώμενος HIF-1α να παραμένει στον πυρήνα, να συνδέεται με τον ARNT και να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Η μετάλλαξη των θέσεων αυτών των σερινών σε αλανίνη είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης και την εξαγωγή του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα με τον ταυτόχρονο τερματισμό της μεταγραφικής του δράσης (58).

Τροποποιήσεις στην C-TAD περιοχή του HIF-1α διαμορφώνουν επίσης την δραστικότητα του. Η κινάση της καζείνης 2 (Casein Kinase 2-CK2) αποτελεί θετικό ρυθμιστή του HIF-1α καθώς σε πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της μειώθηκε η δράση του HIF-1α. Η CK2 φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην θρεονίνη 796 της C-TAD περιοχής κατά την υποξία και επάγει τη δράση του αναστέλλοντας την υδροξυλίωση του από την FIH ενώ δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση του με τον συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής p300 (59). Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση του HIF-1α στην σερίνη 247 στην PAS-B περιοχή από την CK1δ αποσταθεροποιεί τα σύμπλοκο HIF-1α-ARNT και μειώνει την μεταγραφική του ενεργότητα (60).

- **Ακετυλίωση**

Η ακετυλίωση ενός καταλοίπου λυσίνης στην θέση 531 της περιοχής ODD του HIF-1α από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (Arrest Defective protein-1) αποσταθεροποιεί περαιτέρω την πρωτεΐνη του HIF-1α μέσω ενίσχυσης της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη VHL (61). Σε αντίθεση με τις PHDs, η ενεργότητα της ARD1 δεν εξαρτάται από τα επίπεδα οξυγόνου. Κατά την υποξία το mRNA και η πρωτεΐνη της ARD1 μειώνονται με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ακετυλίωση του HIF-1α. Η μειωμένη ακετυλίωση του HIF-1α κατά την υποξία προωθεί περισσότερο την επαγωγή του (62).

- **S-Νιτροζυλίωση (S-Nitrosation)**

Η επίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην σταθεροποίηση και την δραστηριότητα του HIF-1 συσχετίζεται με τη συγκέντρωσή του και το είδος των κυττάρων. Ο HIF-1 αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στην κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του. Η τροποποίηση αυτή φαίνεται ότι αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α μέσω ενίσχυσης της αλληλεπίδρασής του με την p300 (62).

- **Σουμουλίωση**

Η σουμουλίωση αποτελεί άλλη μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται ο HIF-1α. Η σύνδεση ενός τροποποιητή τύπου ουμπικουϊτίνης (SUMO) στη β-υπομονάδα του HIF-1 μειώνει την ενεργοποίηση του μέσω αύξησης της ουβικιτινίωσης του μέσω του pVHL, ενώ υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο ότι δηλαδή αυξάνει την σταθερότητα και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (59).

1.9.3.4 Ρύθμιση της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα

Στο μόριο του HIF-1α έχουν αναγνωριστεί δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-74) και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756). Αρχικά είχεδειχθεί ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των α ιμπορτινών και ρυθμίζει την είσοδο του HIF-1α (63). Ωστόσο, σε μεταγενέστερη μελέτη έχειδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις σε σημαντικά αμινοξέα του καρβοξυτελικού NLS δεν απέκλεισαν την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα. Παράλληλα,δείχθηκε ότι οι ιμπορτίνες 4 και 7 αποτελούν πυρηνικούς υποδοχείς του HIF-1α και μάλιστα η ιμπορτίνη 7 να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του HIF-1α bHLH-PAS_A (33).

Εκτός από το σήμα εισόδου στον πυρήνα, ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι διαθέτει και ένα σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear export signal, NES) ανάμεσα στα αμινοξέα 632-639 το οποίο δεν είναι τυπικό αλλά έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από τα CRM1 (64).

1.10 Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

1.10.1 Ρύθμιση της σταθερότητας μέσω Hsp90/RACK11

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp90, που είναι πρωτεΐνη μοριακή συνοδός, συσχετίστηκε με την ρύθμιση του HIF-1 κατόπιν παρατήρησης της αλληλεπίδρασης της περιοχής PAS του HIF-1α με την Hsp90 in vitro σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Η αναστολή της Hsp90 μειώνει την συσσώρευση του HIF-1α, την δέσμευση του στο DNA και την ενεργότητα του σε συνθήκες υποξίας. Η ρύθμιση του HIF-1α από την Hsp90 φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από την ρύθμιση μέσω του pVHL καθώς σε κύτταρα όπου δεν εκφραζόταν η πρωτεΐνη VHL παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της Hsp90 συνοδεύτηκε

από ουβικιτινίωση και πρωτεασωμακή αποδόμηση του HIF-1α τόσο σε νορμοξία και σε υποξία (32). Αρκετοί μελετητές υποστηρίζουν ότι η Hsp90 αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό για την αναστολή της αποδόμησης του HIF-1α από παράγοντες ανεξάρτητους του pVHL. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί η συμμετοχή του μονοπατιού της PI3-K στη σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω επαγωγής της έκφρασης της Hsp90 (50).

Η πρωτεΐνη RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) μπορεί να δεσμευθεί στον HIF-1α να αλληλεπιδράσει με την ελονγκίνη C και να δημιουργήσει ένα σύμπλεγμα λιγάσης ουβικιτίνης το οποίο υποκαθιστά τον παράγοντα VHL και προωθεί έτσι την ουβικιτινίωση και αποδόμηση του HIF-1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου. Η RACK1 φαίνεται να ανταγωνίζεται με την Hsp90 για την πρόσδεση στον περιοχή PAS του HIF-1, καθώς η χρήση αναστολέων της Hsp90 είχε ως αποτέλεσμα την πρόσδεση αποκλειστικά της RACK1 στην PAS περιοχή HIF-1, ο οποίος παρουσίασε αυξημένη ουβικουτίνωση και αποδόμηση (65).

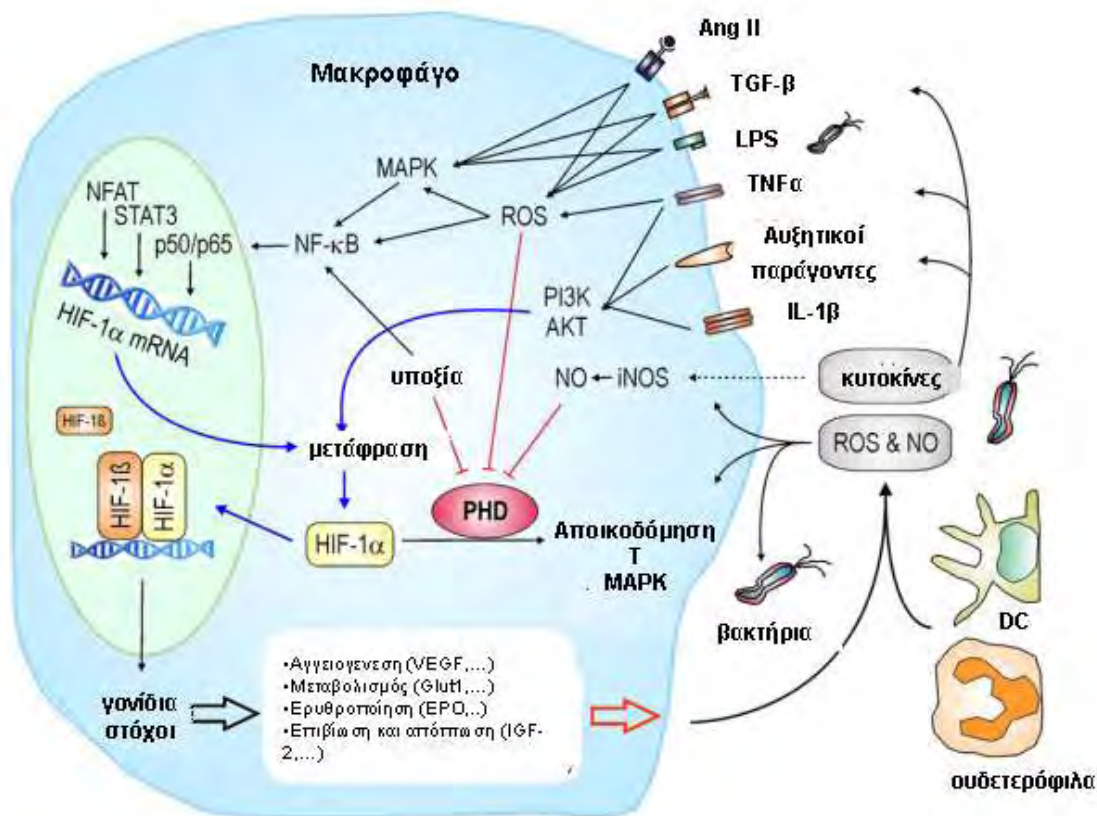
1.10.2 Η ρύθμιση του HIF-1α από την πρωτεΐνη p300

Η πρωτεΐνη συνενεργοποιητής p300 προσδιορίστηκε ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και προωθεί σημαντικά την HIF-1 μεταγραφική δραστηριότητα. Η αλληλεπίδραση απαιτεί την οξυγονο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του HIF-1α C-TAD, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με το p300. Οι αναστολείς υδροξυλάσης, η υποξία καθώς και η s-νιτροσιλίωση της Cys 800 του HIF-1α έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει σημαντικά την αλληλεπίδραση μεταξύ p300 και HIF-1α. Η σύνδεση των p300 και HIF-1α αναστέλλεται από την υδροξυλίωση του HIF-1α στην Asn 803 από την FIH-1 στη νορμοξία (66). Ο σχηματισμός του HIF-1-p300 συμπλόκου προωθείται από την σηματοδότηση των MAPK κινασών, που επηρεάζει την δραστηριότητα του HIF-1 ρυθμίζοντας την διενεργοποίηση του με την p300 (67). Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχει δείχθει ότι συνδέονται με αμφότερα τα p300 και HIF-1α όπως οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές SRC-1 και TIF2 που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και ενισχύουν το δυναμικό διενεργοποίησης του κατά συνεργικό τρόπο με το p300 (68). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από την οξειδοαναγωγική ρυθμιστική πρωτεΐνη Ref-1, που αλληλεπιδρά επίσης με τον HIF-1α (68). Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF-4 επίσης αλληλεπιδρά με τους p300 και HIF-1α και αυξάνει περαιτέρω την επαγωγή του HIF-1 στην υποξία ενώ

συμμετέχει και στην μεσολαβούμενη από την PI3-K επαγωγή του στην νορμοξία (69). Φαίνεται λοιπόν ότι η p300 είναι ένα κεντρικό μόριο σε ένα δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με την HIF-1-απόκριση.

1.15 Ρύθμιση του HIF-1α κατά την φλεγμονή

Στις θέσεις της φλεγμονής, ο HIF-1α μπορεί να ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες (Εικόνα 9) που είναι ανεξάρτητοι από την υποξία, όπως τα ROS, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και το μιτοχονδριακό στρες (70). Ο HIF-1α παρουσιάζει διαφορετικές δράσεις κατά την φλεγμονώδη διαδικασία σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα η έκφραση του σε κύτταρα φλεγμονής της μυελοειδούς σειράς έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης ενός γλυκολυτικού μηχανισμού που αποτρέπει την καταστροφή τους στο υποξικό περιβάλλον της φλεγμονής (71).



Εικόνα 9: Ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το οξυγόνο στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον, όπου πολλαπλά σήματα επηρεάζουν την μεταγραφή, την μετάφραση και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α (προσαρμογή από: (70)).

Σε αντίθεση με τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του HIF-1α στην υποξία, η ενεργοποίηση του από φλεγμονώδεις μεσολαβητές πραγματοποιείται κυρίως μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής του HIF-1α mRNA. Η ανάλυση του εκκινητή του HIF-1α προσδιόρισε μια πιθανή θέση δέσμευσης του NF-κB που βρίσκεται στις βάσεις -197/188 bp από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (72). Ο NF-κB έχειδειχθεί ότι συμμετέχει στην επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α mRNA κατόπιν έκθεσης στο βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και στις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1β και TNFα (43, 46, 72, 73). Έχειδειχθεί μάλιστα ότι η IL-1β και ο TNFα αποτελούν οι ίδιοι μεταγραφικούς στόχους του HIF-1, υποδεικνύοντας έναν μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης (74). Παράλληλα, η έκφραση του HIF-1α mRNA έχειδειχθεί ότι μεσολαβείται από τον NF-κB και σε συνθήκες υποξίας (46, 75). Μια άλλη προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη, ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης των μακροφάγων (macrophage migration inhibitory factor-MIF), εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του HIF-1, καταστέλλοντας την μεταγραφική δραστηριότητα του p53 (76).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενεργοποίηση του NF-κB ελέγχεται από τις IκB κινάσες (IKK). Συστατικά του συμπλόκου IKK έχει επίσηςδειχθεί να συμβάλλουν σημαντικά στην ενεργοποίηση του HIF-1. Ανεπάρκεια της IKKβ οδηγεί σε ελαττωματική έκφραση του HIF-1α τόσο σε ποντικούς κατά την υποξία όσο και στα μακροφάγα κατά τη διάρκεια της μικροβιακής μόλυνσης (46), ενώ μια ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της IKKγ και του HIF-2α ενισχύει τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-2 στη νορμοξία μέσω της σύζευξης των CBP / p300 (27).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων και In vitro διαφοροποίηση

Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων (cc-2576, Clonetics Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) και ΛΜΚ τραχείας κουνελιού (μέθοδος απομόνωσης ως περιγράφεται (77)). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 75cm², με θρεπτικό υλικό DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham/F12), στο οποίο προστέθηκε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen) και τα κύτταρα επώστηκαν σε υγραινόμενο κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C και περιβάλλον 5% CO₂. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί 3-6 ανακαλλιέργειες κι η αλλαγή του θρεπτικού μέσου επαναλαμβανόταν κάθε 48-72 ώρες.

Η in vitro διαφοροποίηση των ΛΜΚ πραγματοποιήθηκε μετά την πλήρωση των τρυβλίων, οπότε τα κύτταρα επωάζονταν για 3 ημέρες σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό, εμπλουτισμένο με ITS (ινσουλίνη 5μg/ml, τρανσφερίνη 5 μg/ml και σελήνιο 5 ng/ml, Sigma-Aldrich Chemie) και 100 U/ml πενικιλίνη, 100 g/ml στρεπτομυκίνη στους 37°C παρουσία 5% CO₂.

2.2 Κατεργασία των κυττάρων

Η επαγωγή του HIF-1α στις καλλιέργειες των λείων μυϊκών κυττάρων μελετήθηκε με επίδραση υποξίας (1% O₂, 95% N₂, 5% CO₂) με τη βοήθεια θαλάμου υποξίας (IN VIVO2 200 Hypoxia Workstation, Ruskinn Life Sciences) και με την προσθήκη TNFα (10ng/ml, Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Germany) για τον αναγκαίο χρόνο της πειραματικής διαδικασίας. Ο αναστολέας του NFκB RO106-9920 (10μM, Santa Cruz) και το αντιοξειδωτικό DPI (30μM, Sigma-Aldrich Chemie Steinheim, Germany) εφαρμόστηκαν 30 λεπτά και 2 ώρες αντιστοίχως πριν την κατεργασία των κυττάρων με TNFα ή υπό υποξία.

2.3 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών

Η διατήρηση των κυττάρων της πρωτογενούς καλλιέργειας έλαβε χώρα σε θερμοκρασία -80°C . Τα προς αποθήκευση κύτταρα, που βρίσκονταν προσκολλημένα ως μονοστιβάδα στην επιφάνεια φλάσκας, ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα PBS (Phosphate buffered saline). Κατόπιν, προστέθηκε 1 ml 0.2% θρυψίνης–0.05% EDTA σε PBS και η φλάσκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C για να γίνει εφικτή η αποκόλληση των κυττάρων. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 5ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 με 10% FBS και φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 rpm, για 3 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12, με 10% FBS, που περιείχε επιπλέον 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο, Sigma-Aldrich) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες ψύξης (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80°C .

Η επανέναρξη καλλιέργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα αποψύχθηκαν γρήγορα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C και εν συνεχεία προστέθηκαν στα κύτταρα στάγδην (για την αποφυγή πρόκλησης ωσμωτικού σοκ) 10ml θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1000rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO_2 .

2.4 Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΑΜΚ

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα λεία μυϊκά κύτταρα εφαρμόστηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά το τρυβλίο ξεπλύθηκε με PBS, το οποίο περιείχε 100 $\mu\text{g/ml}$ από τον αναστολέα πρωτεασών PMSF. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε 100 μl διαλύματος λύσης (25 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 1mM MgCl_2 , 0.2 mM PMSF, 0.5 mM) με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Το λύμα που παρελήφθη μεταβιβάστηκε σε σωλήνες τύπου eppendorff, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και τελικά φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για 30 λεπτά στους 4°C . Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών σε αυτό. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα επιφόρτωσης και ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 3 λεπτά.

2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετριέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

2.6 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

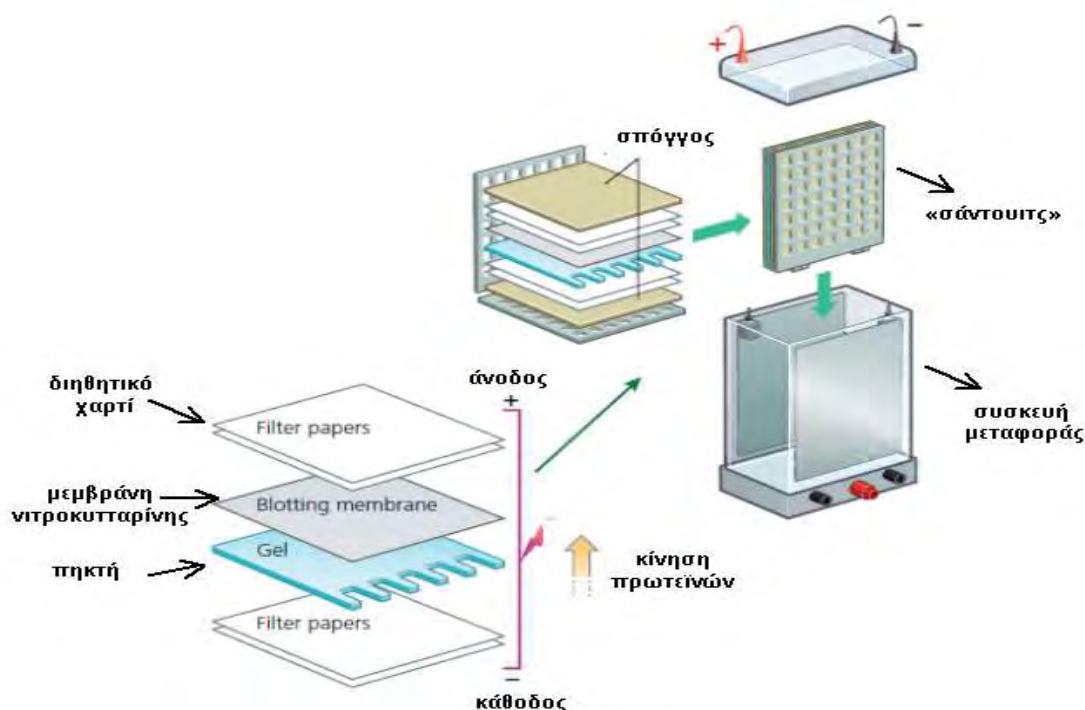
Η τεχνική που περιγράφεται στη συνέχεια ορίζει μία μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Πρόκειται για μία ηλεκτροφόρηση κατά την οποία χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το ιοντικό απορρυπαντικό SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Το SDS έχει την ιδιότητα να αποδιατάσει τις πρωτεΐνες καθώς επιπλέον μπορεί να δεσμεύεται σε αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξαρτήτου ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι συνάρτηση αποκλειστικά του μοριακού βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (40μg ολικής πρωτεΐνης) έγινε σε συσκευή της εταιρείας Biorad. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού (separating gel) 8%: Bis-ακρυλαμίδιο, 0.375 M Tris-Cl pH 8,8, 0,1% SDS, 2 μM EDTA 0,04% APS και 0,04% TEMED και πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% 30% ακρυλαμίδιο, 0.125M Tris-Cl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,08% APS, 0,04% TEMED. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης

περιείχε: 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 μ M EDTA, 0.1% SDS. Στα δείγματα, προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και έγινε αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 95°C για 5 min. Η ηλεκτροφόρηση των πηκτών έγινε στα 200V.

2.7 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε αφαίρεση της πηκτής από τη συσκευή και τοποθέτηση της μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη μεταφοράς (transfer) πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη (Εικόνα 10). Στη θήκη τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς). Αφού αφαιρέθηκαν τυχόν φυσαλίδες μεταξύ πηκτής και νιτροκυτταρίνης η ειδική θήκη τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς. Η μεταφορά έγινε στα 400 mA για 1 ώρα. Ο έλεγχος της μεταφοράς έγινε με χρώση της μεμβράνης με διάλυμα Ponceau S. Κατόπιν η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau.



Εικόνα 10: Διάταξη μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (προσαρμογή από www.abdserotec.com)

Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα με σκοπό τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος και την αποφυγή μη εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε πλύση 3 φορές με PBS- Tween 20 (10 min κάθε φορά), και επώαση καθόλη τη διάρκεια της νύχτας με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C.

Πρώτο αντίσωμα	Είδος	Αραίωση	Προέλευση
αντι-HIF-1α	ποντίκι	1/1000	BD Biosciences
αντι-HIF-1α	κουνέλι	1/1000	(78)
αντι-β-ακτίνη ΔΜ	ποντίκι	1/5000	Sigma
αντι-phosph-NFκB p65	ποντίκι	1/1000	Cell Signalling
αντι-NFκB p65	ποντίκι	1/1000	Cell Signalling

Δεύτερο αντίσωμα	Είδος	Αραίωση	Προέλευση
αντι-IgG ποντικού	κατσίκια	1/3000	Amersham
αντι-IgG κουνελιού	κατσίκια	1/3000	Cell Signalling

Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση στα διάφορα πειράματα. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν.

Στη συνέχεια έγινε πλύση 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (10 min κάθε φορά). Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, σε 3% γάλα σκόνη σε PBS-Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί πλύση 3 φορές σε PBS-Tween 20 (10 min κάθε φορά). Τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Εικόνα 11). Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μ l 3% H_2O_2 και 100 μ l κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ σχηματίζοντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, μια ουσία που εκπέμπει φως. Στη συνέχεια ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham), και εμφάνιση του φιλμ (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

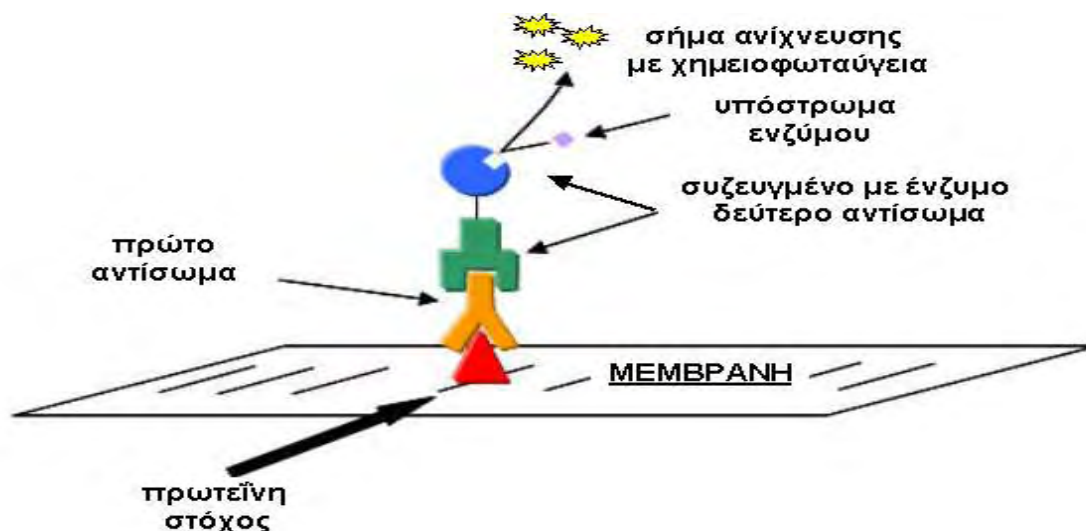
Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την παρακάτω σύσταση:

Διάλυμα μεταφοράς: 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% Methanol, 0,037% SDS, pH 9,2

Ponceau S 0.2%: 2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10

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

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



Εικόνα 11: Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου (προσαρμογή από: employees.csbj.edu)

2.8 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο Ανοσοφθορισμό

Η ενδοκυττάρια ανίχνευση πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω ειδικών αντισώματων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που εντοπίζονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με χρήση δεύτερα εξειδικευμένα αντισώματα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η παρατήρηση πραγματοποιείται με χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός. Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση HIF-1α και της p65 υπομονάδας του NF-κB σε ανθρώπινα βρογχικά λεία μυϊκά κύτταρα με την διαδικασία που ακολουθεί.

Τα ΛΜΚ αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Έγινε πλύση των καλυπτρίδων με PBS και μονιμοποίηση με διάλυμα PBS/3% φορμαλδεύδη. Στη συνέχεια ακολούθησε νέα πλύση με PBS και κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C, προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να γίνει διαπερατή στα αντισώματα. Συνακόλουθα, πραγματοποιήθηκε επώαση με διάλυμα κορεσμού PBS-0,1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 4°C. Οι καλυπτρίδες επωάστηκαν για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα

(μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-HIF-1α BD Transduction Laboratories, σε αραίωση 1/200 ή μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-NFκB p65 Santa Cruz σε αραίωση 1/100, σε PBS-0,1% Tween/1% BSA).

Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις με PBS 0,1% Tween/1% BSA. Την παραπάνω διαδικασία διαδέχθηκε επώαση με το 2ο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC σε αραίωση 1:50, Jackson ImmunoResearch) για 30 λεπτά στους 4°C. Η απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος έλαβε χώρα σύμφωνα το πρωτόλλο που εφαρμόστηκε για το πρώτο αντίσωμα. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν με 2 μl vectashield (Vector laboratories) σε αντικειμενοφόρους πλάκες και έγινε παρατήρηση με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού Axioscope 40 Zeiss. Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε με χρήση μιας φωτογραφικής μηχανής Leica DFC480 (LAS software version V2.3.1R1).

2.9 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με το αντιδραστήριο Purezol(Bio-Rad) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα για την απομόνωση του ολικού RNA ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου των τρυβλίων, προσθήκη στα κύτταρα 1 ml Purezol ανά τρυβλίο, αποκόλληση των κυττάρων με χρήση ειδικής σπάτουλας και μεταφορά του διαλυμάτος κυττάρων- Purezol σε σωλήνα τύπου eppendorff ελεύθερου ριβονουκλεασών (RNase-free).
- Ανάδευση των κυττάρων με χρήση σύριγγας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 1200xg στους 4°C για 10 λεπτά.
- Συλλογή του υπερκείμενου, προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιο ανά 1ml Purezol, δυνατή ανάδευση δια χειρός για 15 δευτερόλεπτα κι επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 1200xg στους 4°C προκειμένου να γίνει διαχωρισμός της υδατικής φάσης από την φάση φαινόλης.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες, προσθήκη 0,5ml ισοπροπανόλης κι επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

- Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 1200xg στους 4⁰C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 1ml αιθανόλης 75%, ανάδευση των σωλήνων και κατόπιν φυγοκέντρωση στις 7500xg στους 4⁰C για 5 λεπτά.
- Αφαίρεση της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 20μl νερό RNase-free και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80⁰C.

2.10 Μέθοδος φωτομετρικού προσδιορισμού συγκέντρωσης RNA

Η αρχή του φωτομετρικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης RNA σε υδατικά διαλύματα στηρίζεται στην ιδιότητα των βάσεων πουρίνης και πυριμιδίνης να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος με μέγιστο στα 260nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων RNA, ποσότητα δείγματος 2μl αραιώνεται σε 100 μl αποστειρωμένου νερού και στη συνέχεια μετράται σε φωτόμετρο η απορρόφηση του διαλύματος στα 260nm.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του RNA του δείγματος υπολογίζεται με βάση το δεδομένο ότι μια μονάδα οπτικής πυκνότητας στα 260nm (OD₂₆₀) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA 40 μg/ml. Ο βαθμός καθαρότητας των δειγμάτων προσδιορίζεται από το λόγο OD₂₆₀/ OD₂₈₀.

2.11 Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε το cDNA reverse transcriptional kit της εταιρείας Applied Biosystems.

Σε κάθε αντίδραση 20μl χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο 1μg RNA και προστέθηκαν

10x ρυθμιστικό διάλυμα (RT buffer)	2 μl
25x δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP Mix, 100mM)	0.8 μl
10x εκκινητές (RT Random Primers)	2 μl
Ανάστροφη μεταγραφάση (MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 IU/μl)	1 μl
H ₂ O	Σε τελικό όγκο 20 μl

Επίσης πραγματοποιήθηκε αντίδραση ελέγχου, στην οποία το ενζύμο ανάστροφη μεταγραφάση αντικαταστάθηκε με H₂O.

- Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή και επώαστηκαν ως εξής: 10 λεπτά στους 4°C, 120 λεπτά στους 37°C, 5 λεπτά στους 85°C για την αδρανοποίηση των ενζύμων και μετά ο θερμοκυκλοποιητής διατηρεί θερμοκρασία 4°C μέχρι να απομακρυνθούν τα δείγματα.
- Στα νεοσυντιθέντα δείγματα cDNA προστέθηκαν 80μl ddH₂O, φέρνοντας τον τελικό όγκο στα 100μl.
- Τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.12 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time-PCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) πραγματοποιήθηκε σε κυκλοποιητή MiniOpticon RT-PCR system (Biorad) με χρήση του αντιδραστηρίου KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa biosystems) και εκκινητές για τα γονίδια των HIF-1α, VEGF, LOX, IL-6, RANTES, ICAM-1, VCAM-1. Τα μετρούμενα επίπεδα mRNA των γονιδίων ομαλοποιήθηκαν ως προς τις μετρήσεις mRNA ανθρώπινης β-actin, που έχει σταθερή έκφραση. Στον πίνακα 2 αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Κάθε τελικό δείγμα που τοποθετήθηκε στον κυκλοποιητή είχε όγκο 20 μl και περιείχε 5 μl cDNA και 15 μl από το μείγμα των αντιδραστηρίων που περιέχει τους εκκινητές των γονιδίων (Primer F , Primer R), το SYBR Green Mix και νερό. Οι αντιδράσεις qRT-PCR επώαστηκαν στις παρακάτω συνθήκες: 50°C για 2 min, 95°C για 10 min προς αρχική αποδιάταξη ακολουθούμενη από 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους των 95°C για 15 s και 60°C για 1 min. Ακολούθησε αντίδραση καμπύλης τήξης. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος $\Delta\Delta C_t$ και τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε σχετικές μονάδες (mean±SEM).

Name	Sequence (5'-3')
HsHIF-1 α F	TTTTTCAAGCAGTAGGAATTGGA
HsHIF-1 α R	GTGATGTAGTAGCTGCATGATCG
HsVEGF sense EX3 F	CCCACTGAGGAGTCCAACATC
HsVEGF sense EX4 R	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC
HsLOX F	GGGAATGGCACAGTTGTCA
HsLOX R	ACTTGCTTTGTGGCCTTCAG
HsIL-6 F	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
HsIL-6 R	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
HsRANTES F	CCTCATTGCTACTGCCCTCT
HsRANTES R	GGTGTGGTGTCCGAGGAATA
HsICAM-1 F	CCTTCCTCACCGTGTACTGG
HsICAM-1 R	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
HsVCAM-1 F	TGGACATAAGAACTGGAAAAGG
HsVCAM-1 R	CCACTCATCTCGATTTCTGGA
HS Actin F	CCAACCGCGAGAAGATGA
HS Actin R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Πίνακας 2. Οι εκκινητές DNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα qRT-PCR

2.13 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 α με δοκιμασία λουσιφεράσης

Το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) λειτουργεί ως καταλύτης στην αντίδραση οξείδωσης της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg²⁺. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται φως η ένταση του οποίου μπορεί να μετρηθεί μέσω λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή που παρουσιάζει η λουσιφεράση την κατέστησε ιδιαίτερα διαδεδομένη τη χρήση της ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 α σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF-5HRE το οποίο περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου του VEGF στην 5' περιοχή του

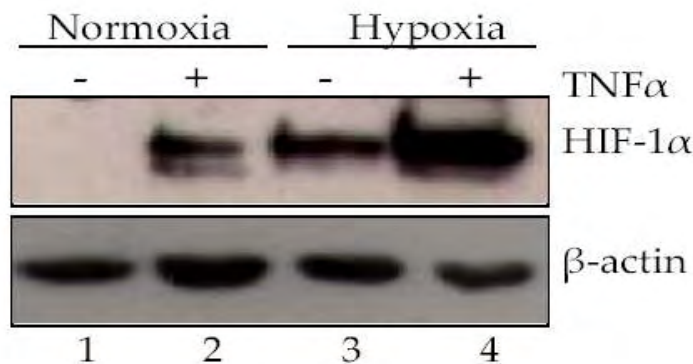
υποκινητή που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla (Promega) το οποίο όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla και χρησιμοποιείται σαν πλασμίδιο αναφοράς για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Για την επιμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Fugene 6 transfection reagent (Roche) και για τη μέτρηση λουσιφεράσης το αντιδραστήριο Dual luciferase assay system (Promega). 1μg DNA, αποτελούμενο από 0,9μg του πλασμιδίου pGL3-VEGF-5HRE και 0,1μg του πλασμιδίου pCI-Renilla, αναμείχθηκε με το αντιδραστήριο Fugene σε αναλογία Fugene:DNA 3:2 σε θρεπτικό μέσο DMEM απουσία ορού και αντιβιοτικών. Μετά από επώαση 20 λεπτών, το μείγμα προστέθηκε σε κύτταρα τραχείας κουνελιού που καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 2 ημέρες σε τρυβλίο 12 θέσεων (12-well plate) και ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια στα ΛΜΚ προστέθηκε TNFα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 18 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας ή/και υποξίας. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με 100-150 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο dual luciferase assay system kit της Promega), επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση, στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμείχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (luciferase assay reagent, Promega) και ακολούθησε μέτρηση του παραγώμενου φωτός σε λουμινόμετρο. Η ενεργότητα του γονιδίου μάρτυρα μετρήθηκε προσθέτοντας στο ίδιο σωληνάκι 20 μl από το διάλυμα stop & glow (του luciferase assay reagent, Promega) με επακόλουθη μέτρηση του φως που παρήχθη στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glow έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου λουσιφεράσης της πυγολαμίδας ενώ ταυτόχρονα επάγει τη δράση της Renilla λουσιφεράσης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η έκθεση των ανθρώπινων βρογχικών ΛΜΚ στον TNFα αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του mRNA του HIF-1α

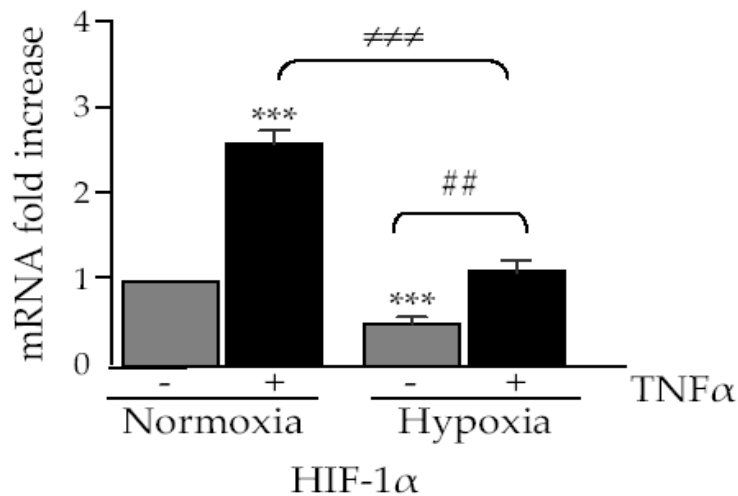
Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό παράγοντα των κυττάρων στην υποξία αλλά ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί ότι επάγεται και σε συνθήκες νορμοξίας υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων φλεγμονής (79). Θελήσαμε λοιπόν αρχικά να δούμε αν ο HIF-1α επάγεται στα ανθρώπινα βρογχικά ΛΜΚ κατά την φλεγμονώδη απόκριση χρησιμοποιώντας την προφλεγμονώδη κυτοκίνη TNFα.



Εικόνα 12. Ανάλυση κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α σε ολικά εκχυλίσματα ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων, που επωάστηκαν για 4 ώρες με τον TNFα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, με χρήση αντισωμάτων κατά του HIF-1α και της β-ακτίνης ως μάρτυρα ίσης φόρτωσης των δειγμάτων.

Αρχικά οι καλλιέργειες των βρογχικών ανθρώπινων ΛΜΚ υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για τρεις ημέρες προκειμένου να διαφοροποιηθούν *in vitro* και να ενεργοποιηθεί ο φυσιολογικός τους φαινότυπος όπως παρατηρείται στους αεραγωγούς *in vivo* (80). Στη συνέχεια τα διαφοροποιημένα ανθρώπινα βρογχικά ΛΜΚ επωάστηκαν παρουσία του TNFα (10ng/ml) σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂) για διάστημα 4 ωρών και τα επίπεδα της πρωτεΐνης μετρήθηκαν με ανασοαποτύπωση κατά Western.

Παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης HIF-1α κατά την υποξία (Εικόνα 12, σύγκριση διαδρομών 1 & 3). Παράλληλα, η επεξεργασία των ΛΜΚ με TNFα αύξησε το επίπεδο της πρωτεΐνης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 12, σύγκριση διαδρομών 3 & 4) ενώ ταυτόχρονα επέτεινε την επαγωγή της πρωτεΐνης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 12, σύγκριση διαδρομών 3 & 4).



Εικόνα 13: Προσδιορισμός των επιπέδων του HIF-1α mRNA ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων με ποσοτική real-time PCR μετά από επώαση των κυττάρων με TNFα για 4 ώρες σε υποξία και νορμοξία. Η β-ακτινή χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

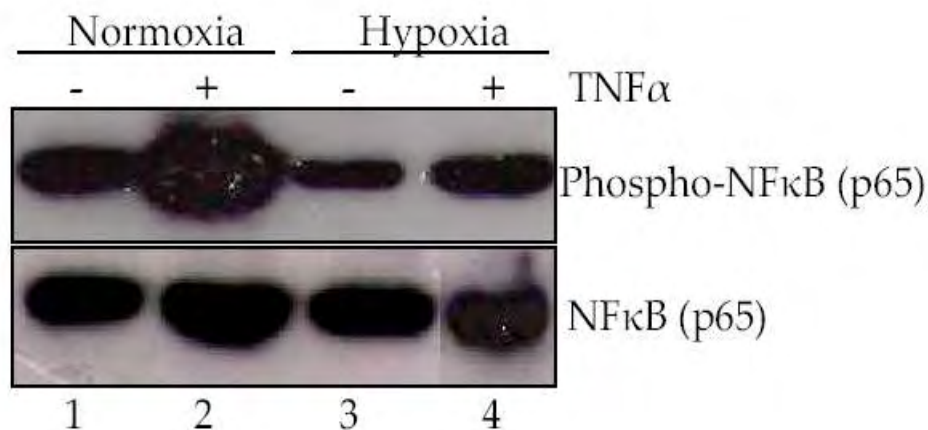
Στη συνέχεια θέλοντας να προσδιορίσουμε την μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου του HIF-1α στα ΛΜΚ του αναπνευστικού μελετήσαμε τα επίπεδα του HIF-1α mRNA με ποσοτική RT-PCR. Ο TNFα αύξησε σημαντικά το mRNA του HIF-1α διπλασιάζοντας το τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα που δεν είχε γίνει προσθήκη TNFα (Εικόνα 13). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τα δεδομένα της πρωτεϊνικής έκφρασης όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 12 και υποδεικνύει ότι το TNFα επάγει τον HIF-1α ρυθμίζοντας θετικά τη μεταγραφή του γονιδίου του. Είναι ενδιαφέρον το ότι η συνολική

σύνθεση του HIF-1α mRNA μειώθηκε σε συνθήκες υποξίας (4 ώρες) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης O₂.

3.2 Ο TNFα επάγει την φωσφορυλίωση και την μετακίνηση στον πυρήνα της p65 υπομονάδας του NF-κB στα βρογχικά ΑΜΚ

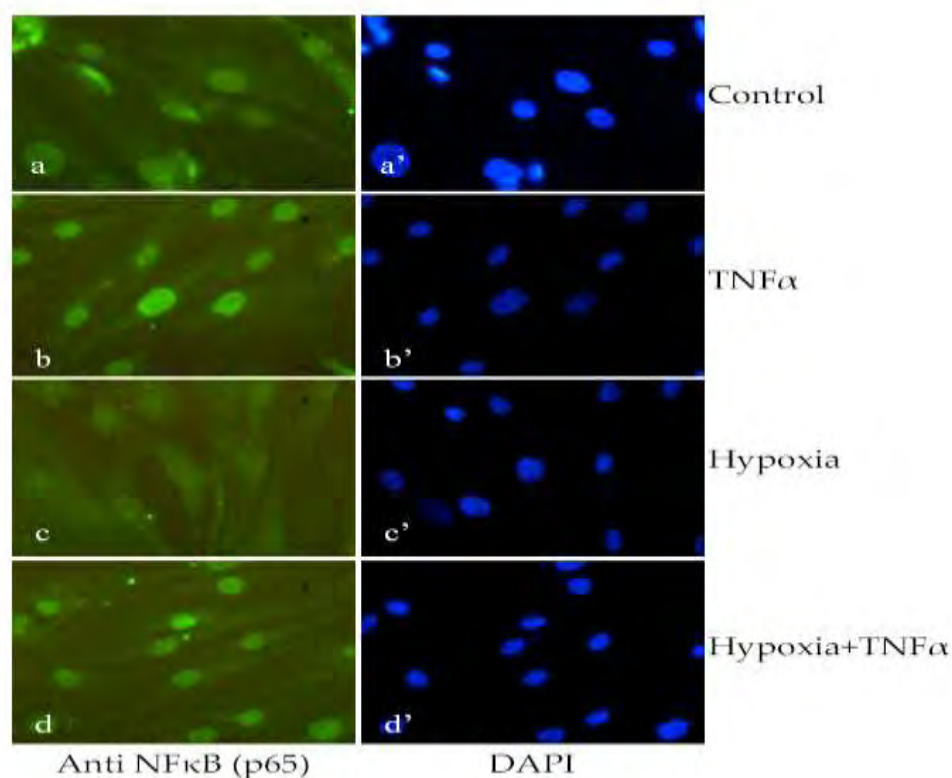
Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι γνωστό ότι επάγεται και ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων κατά την φλεγμονώδη απόκριση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, καθώς επίσης ότι ενεργοποιείται από τον TNFα, του οποίου η πρόσδεση στον υποδοχέα του επάγει την φωσφορυλίωση και την πυρηνική του μετακίνηση (81).

Ως εκ τούτου, θελήσαμε αρχικά να εξετάσουμε αν το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB ενεργοποιείται από τον TNFα στα βρογχικά ΑΜΚ, δεδομένου ότι φέρουν τον υποδοχέα TNFR1. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την φωσφορυλίωση του p65 στη θέση Ser-536 όπως και την πυρηνική μετατόπισή του σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας σε ανθρώπινα βρογχικά ΑΜΚ που είχαν υποστεί διαφορόποίηση όπως αναφέρθηκε παραπάνω και στη συνέχεια έγινε προσθήκη TNFα για διάστημα τεσσάρων ωρών.



Εικόνα 14: Ανάλυση κατά Western με χρήση αντισωμάτων anti-phospho-NF-κB(Ser 536) και anti-NF-κB σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων ανθρώπινων ΑΜΚ βρόγχων κατόπιν επώασης με TNFα για 4 ώρες σε νορμοξία κι υποξία.

Σε συνθήκες νορμοξίας, η κατεργασία με τον TNF α αύξησε τόσο την φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας όπως προέκυψε κατόπιν ανάλυσης κατά western και χρήση φωσφοειδικών αντισωμάτων (Εικόνα 14 σύγκριση διαδρομών 1 και 2), όσο και την πυρηνική εντόπιση του p65 όπως προέκυψε με χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού (Εικόνα 15 σύγκριση εικόνων a και b), υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση του NF- κ B από τον TNF α . Κατά την υποξία, ο TNF α επίσης προκάλεσε ενεργοποίηση του NF- κ B (Εικόνα 14, σύγκριση διαδρομών 3 και 4; Εικόνα 15, εικόνες c και d) η οποία όμως ήταν σαφώς ασθενέστερη (Εικόνα 14, σύγκριση διαδρομών 2 και 4; Εικόνα 15, εικόνες c και d), ενώ στα κύτταρα που επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας απουσία TNF α παρατηρήθηκε μείωση της φωσφορυλίωσης του p65 (Εικόνα 14, σύγκριση διαδρομών 1 και 3) καθώς και της πυρηνικής του εντόπισης (Εικόνα 15, εικόνες a και c).

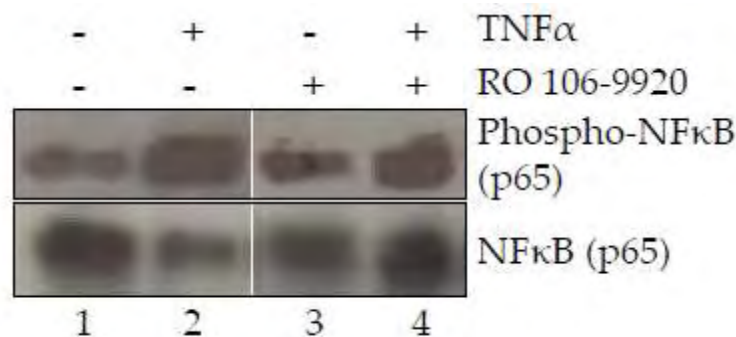


Εικόνα 15: Έλεγχος της πυρηνικής εντόπισης του p65 NF- κ B σε ανθρώπινα ΛΜΚ κατόπιν επώασης για 4 ώρες με TNF α σε υποξία ή νορμοξία, με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά του p65 NF- κ B. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

3.3 Ο TNF α αυξάνει το mRNA του HIF-1 α μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από τον NF- κ B.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επαγωγή του NF- κ B παρουσιάζει αντιστοιχία με την διακύμανση των επιπέδων του mRNA του HIF-1 α (Εικόνα 13), γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του στην μεταγραφή του HIF-1 α γονιδίου στα ΛΜΚ του αναπνευστικού, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλους τύπους κυττάρων (46, 75).

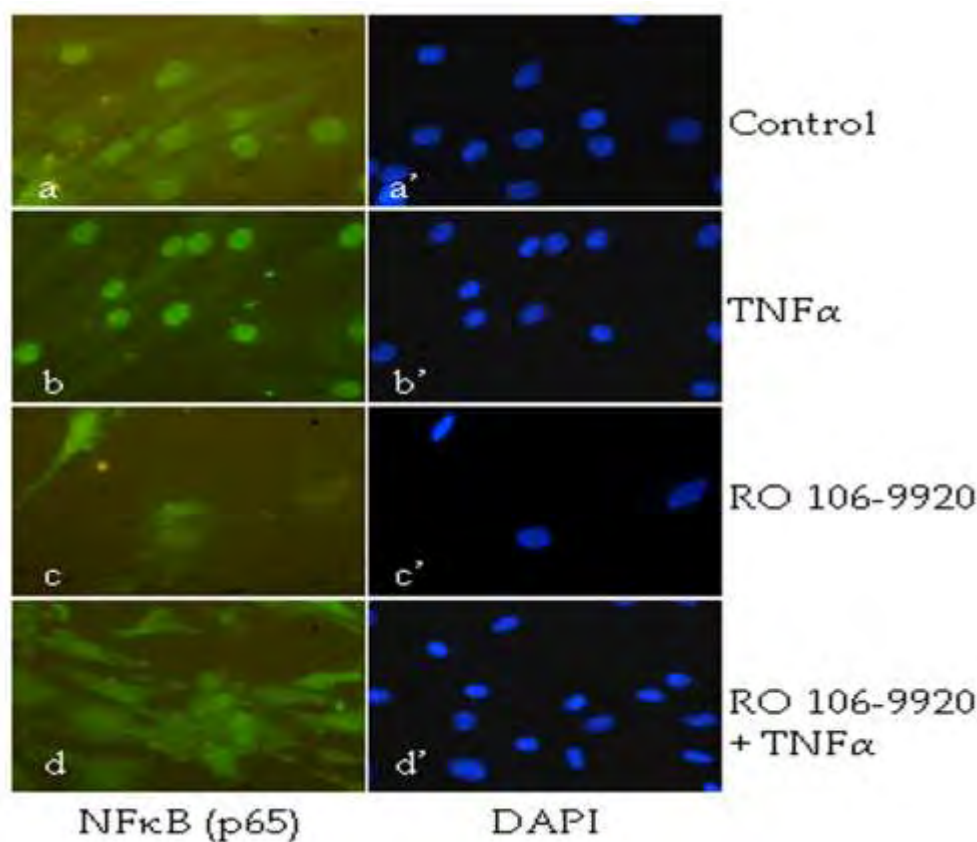
Θέλοντας να μελετήσουμε το αν υπάρχει πραγματική συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF- κ B και της αντίστοιχης διακύμανσης των επιπέδων του mRNA του HIF-1 α υπό την επίδραση του TNF α , προκαλέσαμε αναστολή της έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF κ B στα βρογχικά ΛΜΚ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας RO 106-9920, ο οποίος παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF- κ B αποτρέποντας την ουμπικιτινίωση της πρωτεΐνης I κ B α , η οποία είναι αναστολέας του NF κ B.



Εικόνα 16: Μείωση της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser 536 του NF- κ B p65 σε βρογχικά ΛΜΚ που επωάστηκαν με TNF α , μετά από προσθήκη RO 106-9920. Ανάλυση κατά Western με χρήση αντισωμάτων anti-phospho-NF- κ B p65(Ser 536) και anti-NF- κ B p65σε ολική πρωτεΐνη ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων κατόπιν επίδρασης για 4 ώρες του TNF α , παρουσία ή απουσία RO 106-9920, σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

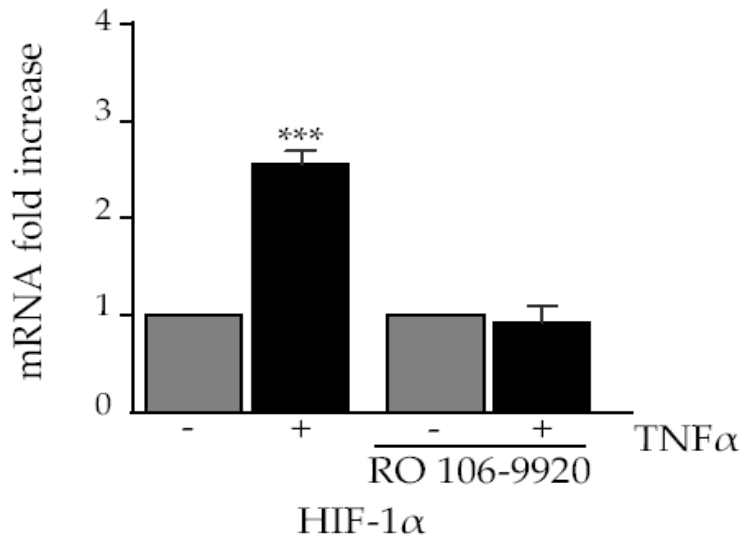
Αρχικά ελέγξαμε την δράση του αναστολέα RO 106-9920 στο μεταγραφικό μονοπάτι του NF- κ B. Ο RO 106-9920 προστέθηκε στα διαφοροποιημένα ανθρώπινα

ΛΜΚ βρόγχων 30 λεπτά πριν την εισαγωγή του TNF α και στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η μετακίνηση στον πυρήνα του NF- κ B με χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού και η φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας με ανάλυση κατά western και χρήση ειδικών αντισωμάτων. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο RO 106-9920 εμπόδισε την πυρηνική μετακίνηση (Εικόνα 17, σύγκριση εικόνων a και b με τις εικόνες c και d) και την φωσφορυλίωση του p65 (Εικόνα 16, σύγκριση διαδρομών 1 και 2 με 3 και 4) που είχαν πυροδοτηθεί από τον TNF α σε συνθήκες νορμοξίας. Ωστόσο ο RO 106-9920 φαίνεται ότι είχε μία τοξική επίδραση στα κύτταρα που επώαστηκαν απουσία TNF α (Εικόνα 17, εικόνες c/c' και d/d'), πιθανόν διότι απαιτούνται τα βασικά επίπεδα της μεταγραφικής δράσης του NF- κ B για την επιβίωση των κυττάρων στις συνθήκες των καλλιεργειών ελέγχου.



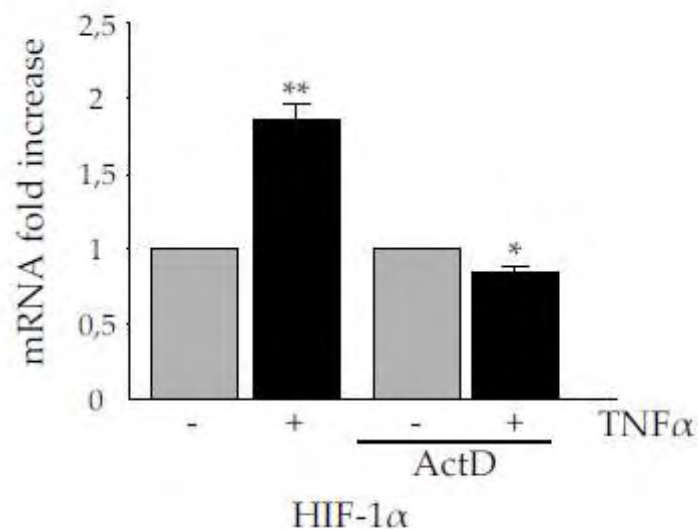
Εικόνα 17: Αναστολή της επαγόμενης από τον TNF α πυρηνικής μετατόπισης του NF- κ B σε ανθρώπινα βρογχικά ΛΜΚ που προ-επώαστηκαν με RO 106-9920. Η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με χρήση αντισώματος κατά NF- κ B p65. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

Στη συνέχεια θέλοντας να πιστοποιήσουμε την σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης του NFκB και της επαγωγής του HIF-1α από τον TNFα, μετρήσαμε με qRT-PCR τα επίπεδα του mRNA του HIF-1α σε βρογχικά ΛΜΚ που επώαστηκαν υπό την επίδραση του αναστολέα RO 106-9920. Σε συμφωνία με την αρχική παρατήρηση, η επαγωγή του mRNA του HIF-1α από τον TNFα παρεμποδίστηκε κατόπιν προσθήκης του RO 106-9920 όπως φαίνεται στην Εικόνα 18 τόσο κατά την υποξία όσο και κατά την νορμοξία, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της μεσολάβησης του NFκB στον μηχανισμό δράσης του TNFα στα ΛΜΚ των αεραγωγών.



Εικόνα 18: Προσδιορισμός των επιπέδων του HIF-1α mRNA ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων με ποσοτική real-time PCR μετά από επώαση των κυττάρων με TNFα για 4 ώρες σε νορμοξία, υπό την επίδραση του αναστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κB, RO 106-9920. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

Η αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α από τον TNFα θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε αυξημένη σύνθεση ή σε αυξημένη σταθερότητα του mRNA του. Θέλοντας λοιπόν να διευκρινίσουμε ποιος από τους δύο μηχανισμούς ισχύει στα βρογχικά ΛΜΚ, μελετήσαμε την επίδραση του TNFα στα επίπεδα του mRNA του HIF-1α παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής, ακτινομυκίνη D. Η προσθήκη της ακτινομυκίνης D στις καλλιέργειες των βρογχικών ΛΜΚ απέτρεψε την αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α από τον TNFα (Εικόνα 19), επιβεβαιώνοντας ότι ο TNFα πυροδοτεί την επαγωγή της μεταγραφής του mRNA του HIF-1α με τη μεσολάβηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB.

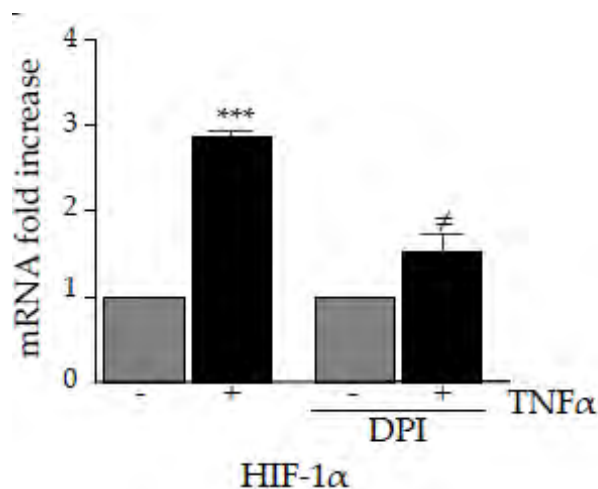


Εικόνα 19: Επώαση των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων με ακτινομυκίνη D (ActD) αναστέλλει την επαγωγή του mRNA του HIF-1α από τον TNFα. Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA του HIF-1α σε ΛΜΚ βρόγχων που επωάστηκαν με ActD και/ή TNFα για 4 ώρες, με ποσοτική real-time PCR. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

3.4. Η συμμετοχή των ROS στην μεσολαβούμενη από τον NFκB επαγωγή του HIF-1α.

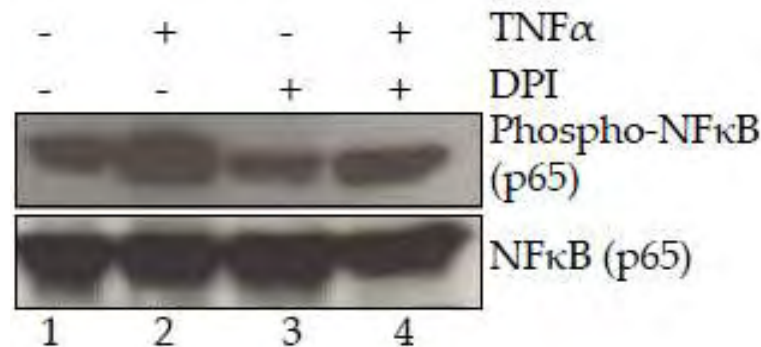
Η ενεργοποίηση τόσο του HIF-1α όσο και του NF-κB επηρεάζεται από τα ROS κατά την φλεγμονή (42). Θελήσαμε ως εκ τούτου να εξετάσουμε την πιθανότητα μεσολάβησης του μηχανισμού των ROS στην ρυθμιζόμενη από τον NF-κB επαγωγή της σύνθεσης HIF-1α υπό την επίδραση του TNFα.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας των ROS, DPI (diphenyleneiodonium) που προστέθηκε σε διαφοροποιημένα ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων 2 ώρες πριν την επώαση με TNFα για 4 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας. Ακολούθησε μέτρηση των επιπέδων του HIF-1α mRNA με ποσοτική RT-PCR. Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 20, η προσθήκη του DPI μείωσε τα επαγόμενα από τον TNFα επίπεδα του mRNA του HIF-1α.

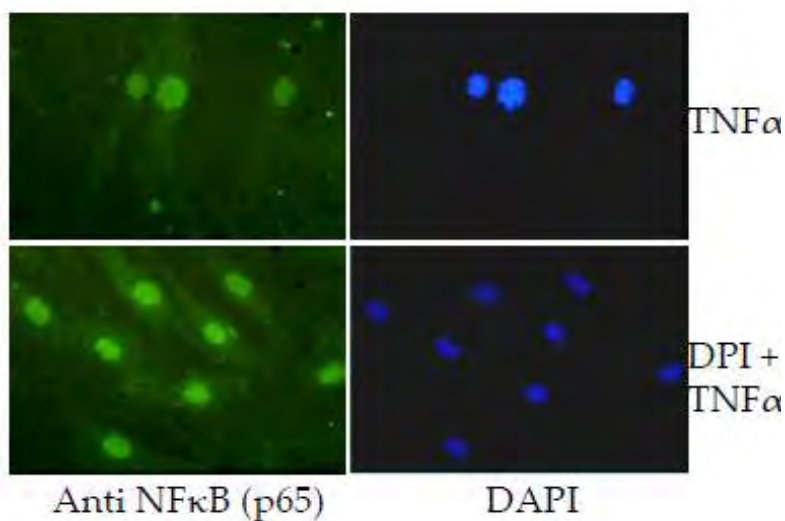


Εικόνα 20: Επώαση των ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων με DPI αναστέλλει την επαγωγή του mRNA του HIF-1α από τον TNFα. Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA του HIF-1α σε ΛΜΚ βρόγχων που επώαστηκαν με DPI και/ή TNFα για 4 ώρες, με ποσοτική RT-PCR. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

Στη συνέχεια προκειμένου να εξετάσουμε αν η αναστολή της αύξησης των επιπέδων του HIF-1α υπό την επίδραση του TNFα από το DPI οφείλεται σε αναστολή του μεταγραφικού μονοπατιού του NF-κB, μελετήσαμε την επίδραση του αναστολέα DPI στην φωσφορυλίωση και πυρηνική μετατόπιση της p65 NF-κB υπομονάδας υπό την επίδραση του TNFα. Μετά την κατεργασία των κυττάρων στις ίδιες συνθήκες με ανωτέρω παρατηρήσαμε με ανοσοαποτύπωση κατά Western ότι η προσθήκη του DPI συνοδεύτηκε από μείωση της φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB, (σύγκριση διαδρομών 2 και 4, Εικόνα 21) υπό την επίδραση του TNFα στη νορμοξία. Ωστόσο, σε ΛΜΚ που καλλιεργήθηκαν κι επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες παρατηρήσαμε αύξηση της πυρηνικής μετατόπισης της p65 υπομονάδας με έμμεσο ανοσοφθορισμό (Εικόνα 22).



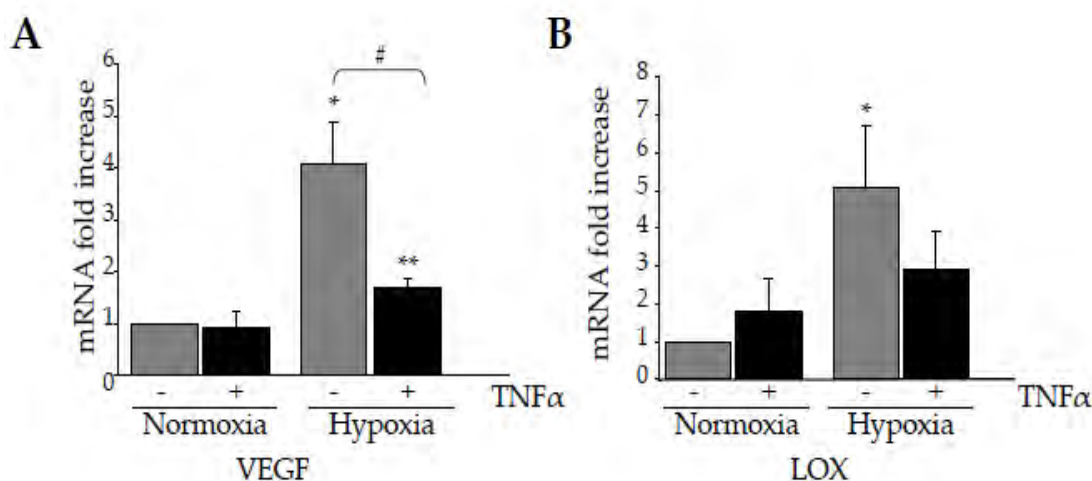
Εικόνα 21: Ανάλυση κατά Western με χρήση αντισωμάτων anti-phospho-NF-κB p65(Ser 536) και anti-NFκB σε ολική πρωτεΐνη εκχυλισμάτων ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων μετά από επώαση των κυττάρων με TNFα για 4 ώρες σε νορμοξία, υπό την επίδραση του αναστολέα των ROS DPI.



Εικόνα 22: Έλεγχος της πυρηνικής εντόπισης του p65 NF-κB σε ανθρώπινα ΛΜΚ μετά από επώαση των κυττάρων με TNFα για 4 ώρες σε νορμοξία, υπό την επίδραση του αναστολέα των ROS DPI, με έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα κατά του p65 NF-κB. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

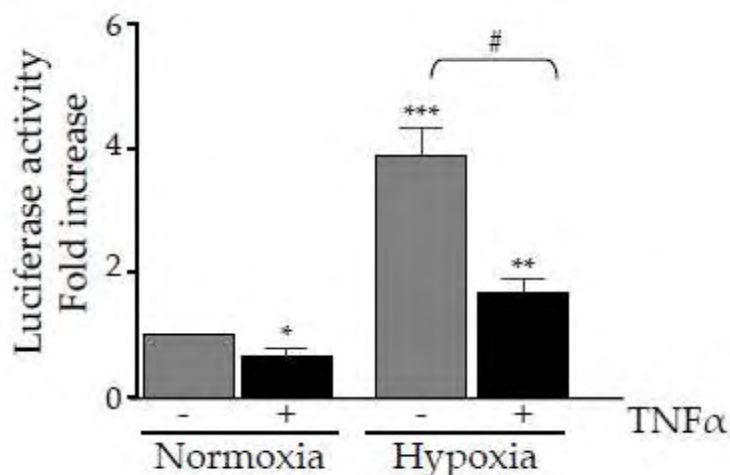
3.5 Ο TNFα καταστέλλει την επαγωγή της εξαρτώμενης από τα HRE μεταγραφικής δράσης του HIF-1α στην υποξία

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του HIF-1α ακολουθείται από την αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, η έκφραση των οποίων σχετίζεται με την απόκριση των κυττάρων στις διάφορες παθολογικές συνθήκες. Θελήσαμε να δούμε κατά πόσο η ενεργοποίηση του HIF-1α από τον TNFα στα ΛΜΚ ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων γνωστών γονιδίων στόχων του. Μελετήσαμε λοιπόν την έκφραση των VEGF και LOX γονιδίων μέσω μέτρησης των επιπέδων mRNA τους με ποσοτική RT-PCR. Σε διαφοροποιημένα ανθρώπινα βρογχικά ΛΜΚ προστέθηκε TNFα και κατόπιν επώασης 24 ωρών, απομονώθηκε το ολικό RNA και στη συνέχεια μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων με ποσοτική RT-PCR. Όπως ήταν αναμενόμενο κατά την υποξία αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα του mRNA αμφοτέρων των γονιδίων (Εικόνα 23). Ωστόσο υπό την επίδραση του TNFα δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων του mRNA στη νορμοξία, ενώ στην υποξία η προσθήκη του TNFα μείωσε την μεταγραφή των δύο γονιδίων.



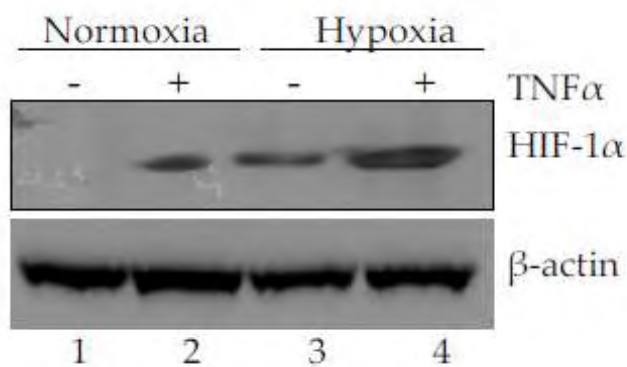
Εικόνα 23: Ανθρώπινα ΛΜΚ καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με $TNF\alpha$ σε νορμοξία και υποξία. Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA των γονιδίων VEGF(A) και LOX(B) με ποσοτική RT-PCR. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των επιπέδων του HIF-1α. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

Κατόπιν, για να επιβεβαιωθεί η επίδραση του $TNF\alpha$ στην μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράση σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση. Μετά την διαμόλυνση με πλασμίδιο το οποίο κωδικοποιεί την έκφραση της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει 5 αλληλουχίες HRE, τα κύτταρα επώαστηκαν με/ή χωρίς την προσθήκη $TNF\alpha$ σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας για 24 ώρες. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων και μέτρηση λουσιφεράσης. Η παρουσία του $TNF\alpha$ μείωσε την εξαρτώμενη από τα HRE μεταγραφική δραστηριότητα στη νορμοξία και ταυτόχρονα προκάλεσε καταστολή της επαγωγής της εξαρτώμενης από τα HRE μεταγραφής στην υποξία (Εικόνα 24), παρατηρήσεις που συμφωνούν με τις αντίστοιχες για τα επίπεδα του mRNA των ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-1, VEGF και LOX, στις ίδιες συνθήκες.



Εικόνα 24: Προσδιορισμός της δράσης λουσιφεράσης σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού που είχαν παροδικά διαμολυνθεί με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και επώαστηκαν για 18 ώρες με TNFα σε νορμοξία και υποξία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως σχετική αύξηση του μέσου όρου 3 ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Έπειτα για να αποκλειστεί η πιθανότητα να οφείλεται η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1 σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης των κυττάρων στον TNFα, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και επεξεργασίας με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Όπως παρατηρούμε και σχηματικά, η παρουσία του TNFα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-1 τόσο στην νορμοξία (Εικόνα 25 σύγκριση διαδρομών 1 και 2) όσο και στην υποξία (Εικόνα 25 σύγκριση διαδρομών 3 και 4) μετά από 24 ώρες.

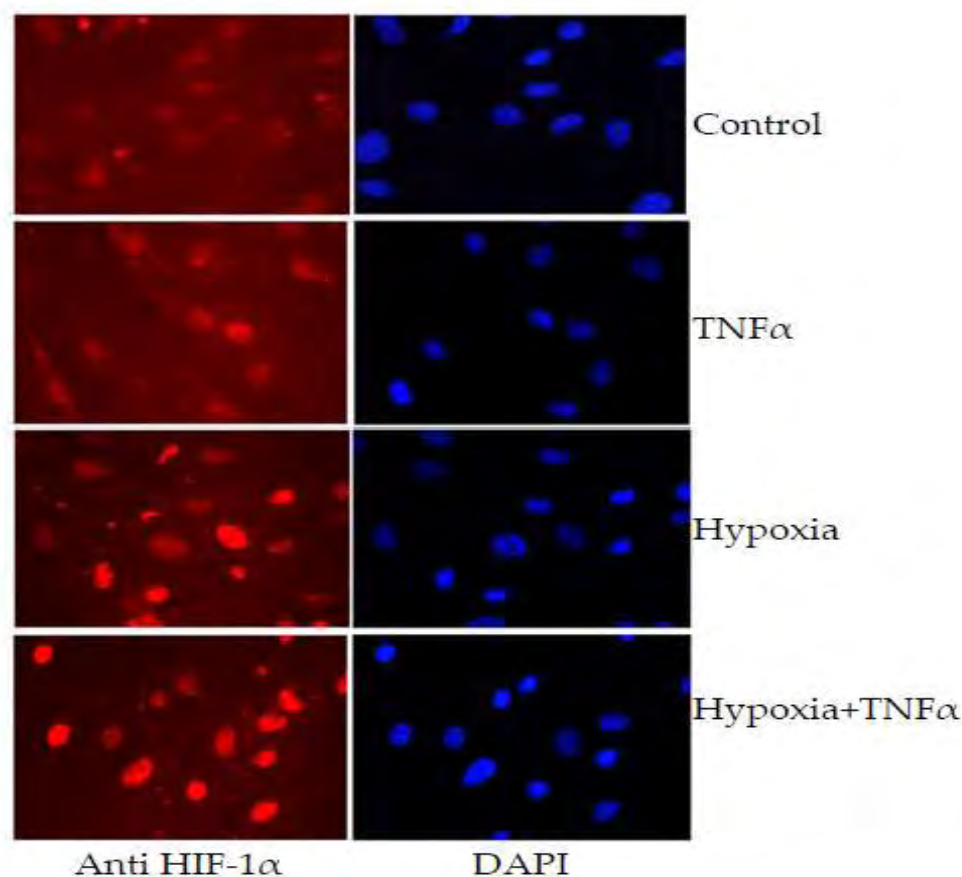


Εικόνα 25: Διαφοροποιημένα ανθρώπινα ΛΜΚ βρόγχων επωάστηκαν παρουσία κι απουσία TNFα σε υποξία και νορμοξία για 24 ώρες. Τα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης εξετάστηκαν με ανάλυση κατά Western με χρήση anti-HIF-1α αντισώματος και anti-β-ακτίνης αντισώματος ως μάρτυρα ίσης φόρτωσης των δειγμάτων.

3.6 Η επαγωγή του HIF-1α από τον TNFα συνοδεύεται από την πυρηνική μετατόπιση του

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α, όπως έχει αναφερθεί, προκειμένου να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του θα πρέπει να μετακινηθεί στον πυρήνα, να ετεροδιμεριστεί με τον συμπαράγοντά του ARNT και στη συνέχεια να προσδεθεί σε κατάλληλες HRE αλληλουχίες και να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η υπό την επίδραση του TNFα επαγωγή του HIF-1α σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA, δεν ακολουθήθηκε από αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Για να εξηγήσουμε το γεγονός αυτό ελέγξαμε την πυρηνική μετατόπιση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας κι υποξίας.

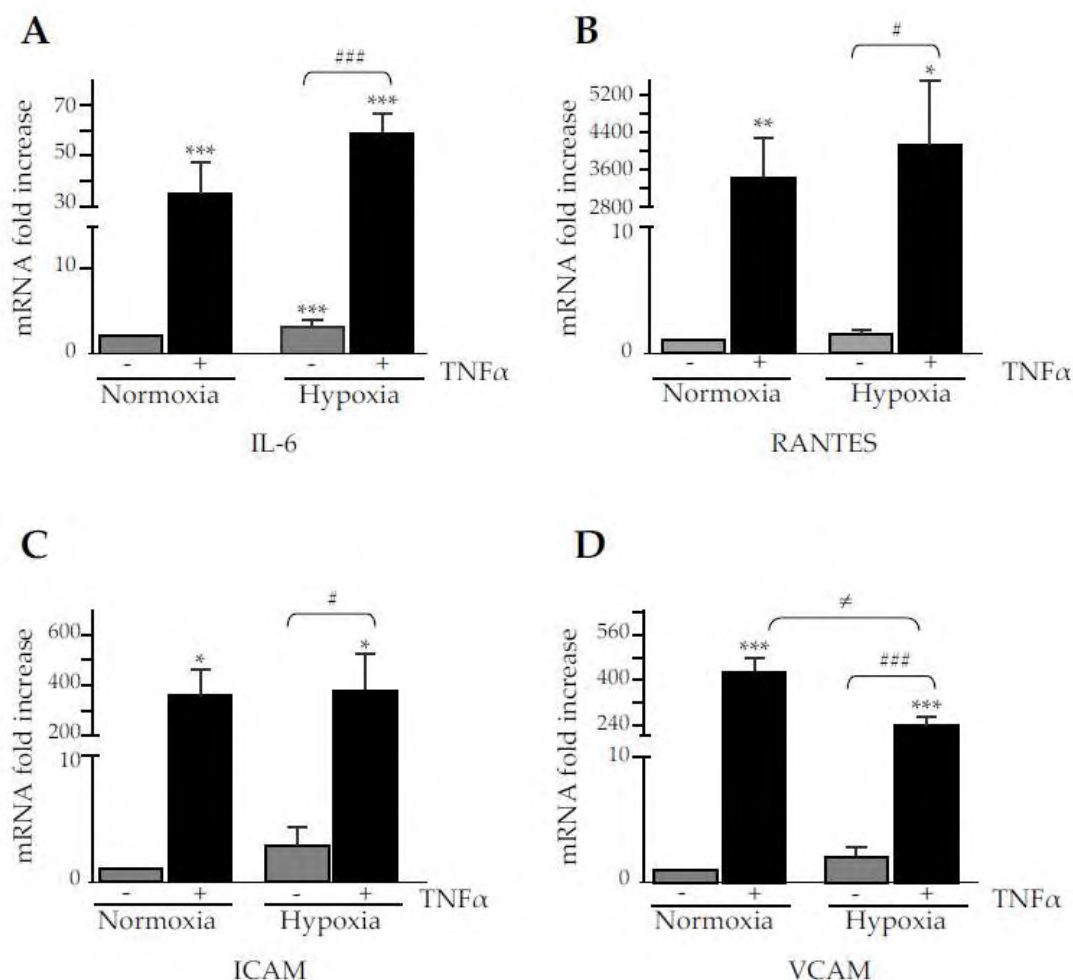
Χρησιμοποιώντας ΛΜΚ που καλλιιεργήθηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται ανωτέρω κι εφαρμόζοντας την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού παρατηρήσαμε ότι ο HIF-1α που επάγεται υπό την επίδραση του TNFα τόσο στην υποξία όσο και στην νορμοξία, εντοπίζεται στον πυρήνα (Εικόνα 26). Επομένως η αναστολή της μεταγραφικής δράσης του HIF-1 υπό την επίδραση του TNFα πιθανώς οφείλεται σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT. Συνεπώς, η μειωμένη μεταγραφική δράση του HIF-1 σε αυτές τις συνθήκες δεν προκαλείται από την αναστολή της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα.



Εικόνα 26: Έλεγχος της ενδοκυτταρικής εντόπισης του HIF-1α σε ανθρώπινα ΛΜΚ κατόπιν επώασης για 4 ώρες με TNFα σε υποξία ή νορμοξία , με έμμεσο ανοσοφθορισμό με ειδικό αντίσωμα κατά του HIF-1α. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

3.7 Η έκφραση γονιδίων της φλεγμονής επάγεται από τον TNFα αλλά όχι από την υποξία στα ανθρώπινα ΛΜΚ των βρόγχων

Τα ΛΜΚ του αναπνευστικού πέραν του δομικού τους ρόλου κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, δρουν επίσης κι ως ανοσορυθμιστικά κύτταρα μέσω της ικανότητας τους να εκκρίνουν κυτοκίνες, χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης. Δεδομένου ότι η υποξία κι η φλεγμονή συνήθως συνυπάρχουν, μελετήσαμε την επίδραση του TNFα και της υποξίας στην έκφραση της κυτοκίνης IL-6, της χημειοκίνης RANTES και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM, που δεν αποτελούν γνωστούς άμεσους στόχους του HIF-1.



Εικόνα 27: Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA της κυτοκίνης IL-6 (A), της χημειοκίνης RANTES (B) και των μορίων προσκόλλησης ICAM (C) και VCAM (D) με ποσοτική RT-PCR. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν σχετική αύξηση ως προς το δείγμα της νορμοξίας και αποτελούν το μέσο όρο \pm S.E.M. τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA με RT-PCR έδειξε σημαντική αύξηση στην έκφραση και των τεσσάρων ανωτέρω γονιδίων υπό την επίδραση του TNFα σε υποξία και νορμοξία (Εικόνα 27). Εν αντιθέσει, η υποξία προκάλεσε αύξηση της έκφρασης μόνο της IL-6 (Εικόνα 27A), ενώ δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση των γονιδίων RANTES (Εικόνα 26B), ICAM (Εικόνα 27C) και VCAM (Εικόνα 27D).

Επιπρόσθετα, στα κύτταρα που επώστηκαν σε υποξία παρουσία TNFα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA του VCAM (Εικόνα 27D). Τα ανωτέρω υποδεικνύουν ότι η απόκριση των ΛΜΚ αεραγωγών στον TNFα είναι ανεξάρτητη με την επαγωγή του HIF-1α.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι του αναπνευστικού συστήματος όπως το άσθμα και η ΧΑΠ χαρακτηρίζονται από απόφραξη των αεραγωγών και διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας. Στους αεραγωγούς συγκεντρώνεται μια πληθώρα κυττάρων φλεγμονής που ενορχηστρώνουν την φλεγμονώδη απόκριση. Παράλληλα στους αεραγωγούς, στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις παρατηρείται τοπική υποξία τόσο λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου όσο και της υπερκατανάλωσης αυτού από τα πολυάριθμα κύτταρα που συρρέουν στα τοιχώματα του βρογχικού δένδρου.

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ως κύτταρα με αποκλειστικά δομικό ρόλο και πιστευόταν ότι συμμετείχαν στις διάφορες φλεγμονώδεις νόσους αποκλειστικά ως ρυθμιστές του βρογχοκινητικού τόνου. Ωστόσο, σε πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι τα ΛΜΚ έχουν μια ευρεία γκάμα ιδιοτήτων που τα καθιστά ενεργούς ρυθμιστές στη φλεγμονώδη διεργασία. Η έκθεση τους στα ανοσιακά κύτταρα που συσσωρεύονται στους αεραγωγούς ασθενών με άσθμα επάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευσή τους με αποτέλεσμα την αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων των αεραγωγών ενώ παράλληλα μέσω της δυνατότητας τους να εκκρίνουν μια ποικιλία κυτοκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης δρουν ως ανοσορυθμιστικά κύτταρα συμβάλλοντας τόσο στην παθογένεια όσο και στην εξέλιξη της φλεγμονώδους εξεργασίας (4).

Ο HIF-1 πέραν της επαγωγής του μέσω μετα-μεταφραστικής σταθεροποίησης της πρωτεΐνης του σε συνθήκες υποξίας έχειδειχθεί ότι επάγεται επίσης σε συνθήκες νορμοξίας υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων με κυριότερα τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος (62) μέσω ρύθμισης στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης (56). Στο αναπνευστικό σύστημα, ο HIF-1 έχειδειχθεί ότι αυξάνεται στα λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας από την θρομβίνη και τα ROS (42), στα επιθηλιακά κύτταρα των βρόγχων από τον συνδυασμό του TNFα με την IL-4 (82), ενώ η έκθεση in vitro διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού σε FBS αυξάνει την σύνθεση και την ενεργότητα του HIF-1 (80). Σε ΛΜΚ καρωτίδας η επαγωγή του HIF-1 υπό την επίδραση του TNFα έχειδειχθεί ότι αύξησε των πολλαπλασιασμό και την αντοχή στην απόπτωση των κυττάρων (83).

Στην ρύθμιση του HIF-1 από μη υποξικά ερεθίσματα έχει δειχθεί από διάφορες μελέτες ότι εμπλέκεται το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB. Για παράδειγμα η επαγωγή του HIF-1α mRNA σε ΛΜΚ πνευμονικής αρτηρίας στη νορμοξία συσχετίστηκε με την υπερέκφραση των υπομονάδων p50 και p65 του NF-κB (75). Επίσης, σε μονοκύτταρα και μακροφάγα που κατεργάστηκαν σε συνθήκες υποξίας έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του NF-κB αύξησε την μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α (43). Σε ηπατοκύτταρα που επώαστηκαν με TNFα παρατηρήθηκε αύξηση τόσο των επιπέδων του HIF-1α mRNA όσο και της μεταγραφικής του ενεργότητας όπως επιβεβαιώθηκε με μέτρηση των επιπέδων του γονιδίου GLUT 3, με τρόπο εξαρτώμενο από την ενεργοποίηση του NF-κB (72). Σε άλλη μελέτη έχει δειχθεί ότι ο NF-κB είναι σημαντικός ενεργοποιητής της μεταγραφής του HIF-1α γονιδίου κι ότι απαιτείται μια βασική ενεργοποίηση του NF-κB ακόμα και κατά την υποξία για την συσσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α σε πρωτογενείς καλλιέργειες μακροφάγων (46).

Στη παρούσα μελέτη θέλοντας να ερευνήσουμε την λειτουργική σχέση μεταξύ φλεγμονής κι υποξίας στους αεραγωγούς χρησιμοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες *in vitro* διαφοροποιημένων ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων και καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Τα κύτταρα των καλλιιεργειών επώαστηκαν με TNFα σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας και στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση του HIF-1α. Προέκυψε λοιπόν ότι η προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη TNFα προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-1α, κάτι που αποδόθηκε σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του καθώς στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του HIF-1α mRNA όπως προέκυψε από μετρήσεις με ποσοτική RT-PCR.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB έχει δειχθεί ότι ενεργοποιείται από τον TNFα μέσω του κανονικού του μονοπατιού. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται η πρόσδεση του του TNFα στον υποδοχέα του (TNFR1) που ακολουθείται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης IKKβ και την φωσφορυλίωση της IκBα. Η επακόλουθη αποδόμηση της IκBα από το πρωτεόσωμα απελευθερώνει το σύμπλοκο του NF-κB p65-p50, το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή. Ταυτόχρονα η ενεργοποίηση του IKKβ από τον TNFα επάγει την φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 αυξάνοντας περαιτέρω την μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB. Τα ανθρώπινα ΛΜΚ εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του TNFα, TNFR1 και TNFR2, και κατ'

επέκταση είναι δυνατή η ενεργοποίηση του NF-κB, η οποία ωστόσο πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης στον TNFR1 (84).

Παρατηρήσαμε ότι η επαγωγή του HIF-1α μεσολαβείται από το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB στα ΛΜΚ ανθρώπινων βρόγχων καθώς υπό τη επίδραση του TNFα προέκυψε μια ανάλογη αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης και του πυρηνικού πολλαπλασιασμού της υπομονάδας p65 του NF-κB με τα επίπεδα mRNA του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Το εύρημα μας αυτό ισχυροποιήθηκε περαιτέρω με τη χρήση του αναστολέα της ουβικιτινίωσης της IκBa, RO 106-9920 σε καλλιέργειες ΛΜΚ. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η αναστολή της μετακίνησης στον πυρήνα και της φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB από τον RO 106-9920, είχε ως επακόλουθο την αναστολή της επαγωγής της σύνθεσης του HIF-1α mRNA σε συνθήκες νορμοξίας. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από την κατεργασία των κυττάρων με τον αναστολέα των ROS, DPI και συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι υπό την επίδραση του DPI μειώθηκε η φωσφορυλίωση του p65 χωρίς όμως να επηρεάζεται η πυρηνική του μετατόπιση.

Η ρύθμιση του HIF-1α mRNA από τον NF-κB θα μπορούσε να οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή ή αυξημένη σταθεροποίηση. Προκειμένου να αποσαφηνίσουμε τον μηχανισμό χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα της μεταγραφής Actin D και παρατηρήσαμε ότι η μείωση της μεταγραφής παρουσιάζει αντιστοιχία με την ρύθμιση από τον NF-κB. Καταλήξαμε λοιπόν ότι η αύξηση των επιπέδων του mRNA του HIF-1α μεσολαβείται από την επίδραση του NF-κB στη μεταγραφή του HIF-1α mRNA.

Σε αντίθεση με την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία επαγωγή της φωσφορυλίωσης και της πυρηνικής μετατόπισης της p65 υπομονάδας σε συνθήκες υποξίας (85), στα ΛΜΚ των αεραγωγών παρατηρήσαμε μείωση τόσο της φωσφορυλίωσης όσο και της πυρηνικής μετατόπισης της p65 υπομονάδας συγκριτικά με τις αντίστοιχες συνθήκες νορμοξίας. Παράλληλα παρατηρήσαμε αντίστοιχη μείωση των επιπέδων του mRNA του HIF-1α. Τα ευρήματά μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με ανάλογες παρατηρήσεις στα ΛΜΚ της πνευμονικής αρτηρίας, όπου η επαγωγή του NF-κB και η αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α είναι ταχεία (εμφάνιση σε 30 λεπτά) και παροδική (ανάκτηση των βασικών επιπέδων σε 4 ώρες) (75). Επιπλέον, και σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, σε πρωτογενή λιποκύτταρα κατά την υποξία μειώνονται

τα επίπεδα του mRNA του HIF-1α σε αντιστοιχία με την αναστολή της φωσφορυλίωσης του NF-κΒ τόσο παρουσία όσο και απουσία του TNFα, γεγονός που αποδόθηκε στην μείωση της έκφρασης του υποδοχέα TNFR1 στα ΛΜΚ σε συνθήκες υποξίας (86).

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών υπό την αντίδραση των κυττάρων που συγκεντρώνονται στο αναπνευστικό κατά την φλεγμονή συμμετέχουν ενεργά στην φλεγμονώδη διαδικασία και την ακόλουθη αναδιαμόρφωση των αεραγωγών μέσω της ανοσορυθμιστικής τους ικανότητας να εκκρίνουν κυτοκίνες, χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης (5). Την ικανότητα αυτή των ΛΜΚ την επιβεβαιώσαμε καθώς στα κύτταρα των πρωτογενών καλλιέργειών ανθρώπινων βρογχικών ΛΜΚ παρατηρήσαμε αύξηση των επιπέδων mRNA της κυτοκίνης IL-6, της χημειοκίνης RANTES και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM υπό την επίδραση του TNFα. Σε συνθήκες υποξίας μόνο τα επίπεδα της IL-6 παρουσίασαν αύξηση που ήταν όμως συγκριτικά πολύ υποδεέστερη της αντίστοιχης υπό την επίδραση του TNFα, ενώ οι υπόλοιποι φλεγμονώδεις παράγοντες δεν παρουσίασαν μεταβολή, ενώ σε συνθήκες υποξίας μειώθηκαν τα επαγόμενα από τον TNFα επίπεδα του mRNA του VCAM. Αντίστοιχη παρατήρηση έχει περιγραφεί στα αθανатоποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου η υποξία και οι μιμητικοί της παράγοντες ελάττωσαν τα επίπεδα του VCAM μέσω αναστολής της δράσης του TNFα χωρίς όμως να επηρεάσουν την πυρηνική μετατόπιση του NF-κΒ (87). Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και στα λιποκύτταρα όπου κατά την υποξία μειώθηκε η έκκριση χημειοκινών που πυροδοτούνταν από τον TNFα μέσω του NF-κΒ (86). Παρατηρούμε λοιπόν ότι η υποξία παρόλο που αποτελεί αλληλένδετο στοιχείο της τοπικής φλεγμονής δεν επάγει την εκκριτική λειτουργία των ΛΜΚ ούτε επιτείνει την δράση του TNFα στα ΛΜΚ.

Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι η υποξία και ο TNFα έχουν αντιφατικές δράσεις στα ΛΜΚ κατά την φλεγμονώδη απόκριση. Ενώ ο TNFα επάγει τους μηχανισμούς εκείνους που μετατρέπουν τα ΛΜΚ σε ενεργούς ενορχηστρωτές της φλεγμονώδους διεργασίας, η υποξία φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά σε αυτές τις δράσεις των ΛΜΚ των αεραγωγών. Ίσως λοιπόν η υποξία να αποτελεί έναν παράγοντα που ισοσταθμίζει την απόκριση των ΛΜΚ των αεραγωγών στη φλεγμονή στα πλαίσια των παλίνδρομων μηχανισμών που διαθέτουν τα κύτταρα προκειμένου να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν σε συνθήκες stress.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων φλεγμονής όπως ο TNFα, η IL-6 και η INF, η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης και του mRNA του HIF-1α συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας δηλαδή με αύξηση της έκφρασης γονιδίων στόχων του μέσω των HREs. Κάτι τέτοιο όμως έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα καθώς η κατεργασία των ανθρώπινων βρογχικών ΛΜΚ με TNFα αφενός δεν επηρέασε τα επίπεδα mRNA του VEGF και της LOX κατά την νορμοξία και μάλιστα προκάλεσε μείωση στην επαγόμενη από την υποξία εκφράσής τους. Αντίστοιχες παρατηρήσεις υπήρξαν σε *in vitro* καλλιέργειες ημικρικών τραχείας κουνελιών όπου η έκθεση σε TNFα προκαλεί μείωση την έκφρασης των VEGF και CA-IX, στόχων του HIF-1, κατά την υποξία, αντίστοιχη της μείωσης που παρατηρείται σε πρωτογενείς καλλιέργειες βρογχικών ΛΜΚ σε παρόμοιες συνθήκες (88).

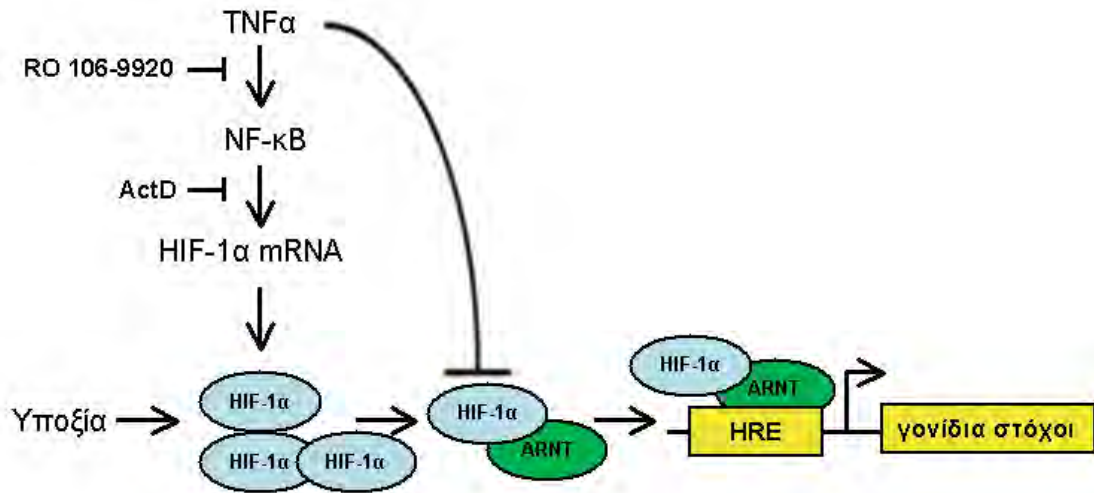
Συνοψίζοντας λοιπόν θα λέγαμε ότι η επαγωγή του HIF-1α από τον TNFα, ενώ προκαλεί αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου και της HIF-1α πρωτεΐνης στον πυρήνα, παρεμποδίζει την μεταγραφική του δράση υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση του HIF-1α από τον TNFα μέσω του NF-κΒ σχετίζεται με μηχανισμούς ανεξάρτητους από τα HREs. Πράγματι, πειράματα όπου κυτταρικά εκχυλίσματα ανθρώπινων ΛΜΚ βρόγχων που επώαστηκαν με TNFα σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνισμα ένα ειδικό αντίσωμα anti-HIF, έδειξαν ότι ενώ σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α συνδέεται με τον ARNT, η προσθήκη του TNFα αναστέλλει την αλληλεπίδραση τους και τη δημιουργία ενός λειτουργικού συμπλόκου HIF-1α/ARNT που στη συνέχεια συνδεόμενο στα HRE του γονιδιώματος μπορεί να επάγει την μεταγραφή γονιδίων (88). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και χρήση εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων ενάντια στην περιέχουσα HRE περιοχή του υποκινητή του ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-1 *Lpin 1* (89). Η παρουσία του TNFα στα κύτταρα σε συνθήκες υποξίας μείωσε σημαντικά το ποσό του κατακρημνισθέντος HRE. Προκύπτει ότι η επώαση των κυττάρων με TNFα προκαλεί μείωση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1 που περιέχουν HRE, μέσω ανασταλτικού ρόλου στο σχηματισμό ενός ενεργού ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT (88).

Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για την εξήγηση των πολύπλοκων μηχανισμών που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των HIF-1α και ARNT. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την CK1δ που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του συμπλόκου HIF-1α/ARNT και μείωση της μεταγραφικής του δράσης σε διαφόρους τύπους καρκινικών κυττάρων (60), επιτρέποντας πιθανόν την αλληλεπίδραση των HIF-1α και ARNT με άλλους παραγόντες με δράσεις ανεξάρτητες από τα HREs. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες όπως η COMMD1, που αποτελεί έναν πλειοτροπικό παράγοντα που συμμετέχει στο μεταβολισμό του χαλκού, την απέκκριση νατρίου, τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και την προσαρμογή στην υποξία, έχειδειχθεί ότι ανταγωνίζεται με τον ARNT για την σύνδεση στον HIF-1α (90). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν κατά την αγωγή με αντικαρκινικά φάρμακα όπως η ακτιβοφλαβίνη, όπου επίσης παρατηρήθηκε αναστολή του διμερισμού του HIF-1α με τον ARNT (91).

Η υπερ-έκφραση της ανασταλτικής πρωτεΐνης PAS (Inhibitory PAS-domain protein), ενός αρνητικού ρυθμιστή του HIF-1 που δημιουργεί σύμπλοκο μαζί του εμποδίζοντας την πρόσδεση στα HREs (92), μπορεί επίσης να ανταγωνίζεται την πρόσδεση του HIF-1α στον ARNT κατά τη φλεγμονή. Η εξαρτώμενη από τον TNFα και τον NF-κΒ έκφραση της IPAS έχειδειχθεί ότι αναστέλλει την δράση HIF-1 σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου PC12, αν και η αναστολή αυτή αφορούσε τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο καθώς δεν παρατηρήθηκαν κάτι αντίστοιχα σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος Hep3B (93).

Ποια είναι η λειτουργική σχέση της επαγωγής του HIF-1α από τον TNFα στη νορμοξία αν δεν αυξάνεται η μεταγραφική του δραστηριότητα; Είναι πιθανό ότι σε αυτήν την περίπτωση ο HIF-1α υπόκειται σε αλληλεπιδράσεις ανεξάρτητες από τα HRE. Ο HIF-1α είναι γνωστό ότι καταστέλλει την δράση του MYC με αναστολή της αλληλεπίδρασης του με τους συμπαραγόντες SP1 ή MAX με έναν τρόπο ανεξάρτητο από τα HRE (36, 94). Κατά την φλεγμονή και την ακόλουθη σε αυτή αντίδραση των ΛΜΚ των αεραγωγών, είναι πιθανό ο HIF-1α να ρυθμίζεται από αντίστοιχους μηχανισμούς που δεν προϋποθέτουν την γονιδιακή μεταγραφή μέσω των HREs. Ίσως δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι στις λειτουργίες του HIF-1α που δεν εμπλέκονται τα HRE απαιτείται ο

διαχωρισμός του από τον ARNT, κάτι που συνάδει με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά την επώαση των ΛΜΚ με τον TNFα.



Εικόνα 28: Μοντέλο που περιγράφει την επίδραση του TNFα στην έκφραση και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (προσαρμογή από (88)).

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες διαφοροποιημένων ανθρώπινων βρογχικών ΛΜΚ δείξαμε αρχικά ότι η έκθεση των μυοκυτάρων σε παράγοντες φλεγμονής και συγκεκριμένα στον TNFα είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της του HIF-1α μέσω αύξησης της μεταγραφής του και όχι μέσω σταθεροποίησης της πρωτεΐνης του όπως κατά την υποξία. Η επαγωγή του HIF-1α mRNA μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB. Ωστόσο, ο επαγόμενος HIF-1 δεν είναι μεταγραφικά ενεργός κατά την νορμοξία και μάλιστα η προσθήκη TNFα είχε αρνητική δράση στην μεταγραφική του δράση κατά την υποξία. Τα παραπάνω είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η επαγωγή του HIF-1 σε αυτές τις συνθήκες προκαλεί ταυτόχρονα αναστολή του διμερισμού του με τον ARNT και την ακόλουθη σύνδεση τους με τα HREs και τελικά την μεταγραφή των γονιδίων του (Εικόνα 28). Φαίνεται

λοιπόν ότι ο TNFα και η υποξία έχουν ανταγωνιστικές δράσεις στην επαγόμενη από την υποξία και την φλεγμονή έκφραση γονιδίων στα ΛΜΚ αεραγωγών, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό πιθανώς ανεξάρτητα από τα HRE ρόλο του HIF-1α στην απόκριση των ΛΜΚ στη φλεγμονή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John BF, David MC, John WD. Morgan & Mikhail's CLINICAL ANESTHESIOLOGY. 5th ed 2013.
2. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008;118(11):3546-56.
3. Borger P, Tamm M, Black JL, Roth M. Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(4):367-72.
4. Halayko AJ, Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;137(2-3):209-22.
5. Tliba O, Panettieri RA, Jr. Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma. *Annu Rev Physiol* 2009;71:509-35.
6. Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, Birrell M, Belvisi M, Johnston SL. Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* 2009;121(1):1-13.
7. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):183-92.
8. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J*. 2000;15(3):600-16.
9. Halayko AJ, Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001;90(1):358-68.
10. Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5(1):80-8.
11. Hirst SJ, Walker TR, Chilvers ER. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. *Eur Respir J* 2000;16(1):159-77.
12. Lazaar AL, Panettieri RA, Jr. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell: a new target for pharmacotherapy? *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(3):259-64.
13. Hershenov MB, Brown M, Camoretti-Mercado B, Solway J. Airway smooth muscle in asthma. *Annu Rev Pathol* 2008;3:523-55.

14. Panettieri RA, Jr. Airway smooth muscle: immunomodulatory cells that modulate airway remodeling? *Respir Physiol Neurobiol* 2003;137(2-3):277-93.
15. Oliver BG, Black JL. Airway smooth muscle and asthma. *Allergol Int* 2006;55(3):215-23.
16. Tliba O, Amrani Y, Panettieri RA, Jr. Is airway smooth muscle the "missing link" modulating airway inflammation in asthma? *Chest* 2008;133(1):236-42.
17. Damera G, Panettieri RA, Jr. Does airway smooth muscle express an inflammatory phenotype in asthma? *Br J Pharmacol* 2011;163(1):68-80.
18. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006;7:125.
19. Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(3):279-82.
20. Sukkar MB, Hughes JM, Armour CL, Johnson PR. Tumour necrosis factor-alpha potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* 2001;6(3):199-203.
21. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):49-62.
22. Taylor CT, Cummins EP. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1177:178-84.
23. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF-kappaB control of T cell development. *Nat Immunol.* 2014;15(1):15-25.
24. Gagliardo R, Chanez P, Mathieu M, Bruno A, Costanzo G, Gougat C, et al. Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(10):1190-8.
25. Zhao S, Qi Y, Liu X, Jiang Q, Liu S, Jiang Y, et al. Activation of NF-kappa B in bronchial epithelial cells from children with asthma. *Chinese medical journal.* 2001;114(9):909-11.
26. Clarke D, Damera G, Sukkar MB, Tliba O. Transcriptional regulation of cytokine function in airway smooth muscle cells. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;22(5):436-45.
27. Safronova O, Morita I. Transcriptome remodeling in hypoxic inflammation. *J Dent Res.* 2010;89(5):430-44.

28. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
29. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*.2009;24:97-106.
30. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(3):336-61.
31. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):343-54.
32. Bardos JJ, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755(2):107-20.
33. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):235-40.
34. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):535-40.
35. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.2002;16(10):1151-62.
36. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer*.2012;12(1):9-22.
37. Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(18):3569-82.
38. Semenza GL, Prabhakar NR. The role of hypoxia-inducible factors in oxygen sensing by the carotid body. *Adv Exp Med Biol*. 2012;758:1-5.
39. Cockman ME, Webb JD, Ratcliffe PJ. FIH-dependent asparaginyl hydroxylation of ankyrin repeat domain-containing proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1177:9-18.
40. Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(4-5):474-86.
41. Haddad JJ, Land SC. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett* 2001;505(2):269-74.

42. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(4):755-61.
43. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochem J* 2006;396(3):517-27.
44. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.
45. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(1):105-15.
46. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* 2008;453(7196):807-11.
47. Vlaminc B, Toffoli S, Ghislain B, Demazy C, Raes M, Michiels C. Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS J*. 2007;274(21):5533-42.
48. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(7):1099-105.
49. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2{ α } Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{ α }. *Cancer Res*. 2010;70(20):7820-9.
50. Zhou J, Schmid T, Brune B. Tumor necrosis factor- α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 α through a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2003;14(6):2216-25.
51. BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Flugel D, Hess J, Kietzmann T, et al. Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells. *Biological chemistry*. 2004;385(3-4):249-57.

52. Bert AG, Grepin R, Vadas MA, Goodall GJ. Assessing IRES activity in the HIF-1 α and other cellular 5' UTRs. *RNA*. 2006;12(6):1074-83.
53. Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1 β and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 2005;65(11):4690-7.
54. 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(1):47-54.
55. Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, et al. TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *Journal of immunology*. 2005;174(12):7592-9.
56. Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol* 2007;435:405-19.
57. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270(3):1230-7.
58. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 2006;281(44):33095-106.
59. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):642-9.
60. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 17):2976-86.
61. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002;111(5):709-20.
62. Kuschel A, Simon P, Tug S. Functional regulation of HIF-1 α under normoxia-- is there more than post-translational regulation? *J Cell Physiol*. 2012;227(2):514-24.

63. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(3):394-404.
64. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem* 2008;283(41):27620-7.
65. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Molecular cell*. 2007;25(2):207-17.
66. 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*. 2002;16(12):1466-71.
67. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(16):14013-9.
68. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):402-15.
69. Roth U, Curth K, Unterman TG, Kietzmann T. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(4):2623-31.
70. Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res*. 2009;315(11):1791-7.
71. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112(5):645-57.
72. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 2008;412(3):477-84.
73. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between

inflammation and oncogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(14):2115-7.

74. Zhang W, Petrovic JM, Callaghan D, Jones A, Cui H, Howlett C, et al. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *Journal of neuroimmunology*. 2006;174(1-2):63-73.
75. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007;18(12):4691-7.
76. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PloS one*. 2008;3(5):e2215.
77. Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(5):544-51.
78. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem* 2007;20(6):995-1006.
79. Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. *Eur J Biochem*. 2003;270(5):791-8.
80. Chachami G, Hatziefthimiou A, Liakos P, Ioannou MG, Koukoulis GK, Bonanou S, et al. Exposure of differentiated airway smooth muscle cells to serum stimulates both induction of hypoxia-inducible factor-1{alpha} and airway responsiveness to ACh. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(4):L913-22.
81. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25(51):6717-30.
82. Jiang H, Zhu YS, Xu H, Sun Y, Li QF. Inflammatory stimulation and hypoxia cooperatively activate HIF-1{alpha} in bronchial epithelial cells: involvement of PI3K and NF-{kappa}B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(5):L660-9.

83. Lambert CM, Roy M, Meloche J, Robitaille GA, Agharazii M, Richard DE, et al. Tumor necrosis factor inhibitors as novel therapeutic tools for vascular remodeling diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299(4):H995-1001.
84. Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA, Jr. Activation of p55 tumor necrosis factor- α receptor-1 coupled to tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 stimulates intercellular adhesion molecule-1 expression by modulating a thapsigargin-sensitive pathway in human tracheal smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2000;58(1):237-45.
85. Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation. *The Journal of physiology*. 2008;586(Pt 17):4055-9.
86. Famulla S, Horrichs A, Cramer A, Sell H, Eckel J. Hypoxia reduces the response of human adipocytes towards TNF[α] resulting in reduced NF-[κ]B signaling and MCP-1 secretion. *Int J Obes*. 2011.
87. Cartee TV, White KJ, Newton-West M, Swerlick RA. Hypoxia and hypoxia mimetics inhibit TNF-dependent VCAM1 induction in the 5A32 endothelial cell line via a hypoxia inducible factor dependent mechanism. *J Dermatol Sci*. 2011.
88. Tsapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R, Koukoulis GK, et al. TNF α induces expression of HIF-1 α mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2013;228(8):1745-53.
89. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 14):3485-93.
90. van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, et al. COMMD1 disrupts HIF-1 α /beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2119-30.
91. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(42):17910-5.

92. Jang MS, Park JE, Lee JA, Park SG, Myung PK, Lee DH, et al. Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;337(1):209-15.
93. Goryo K, Torii S, Yasumoto K, Sogawa K. Tumour necrosis factor- α suppresses the hypoxic response by NF- κ B-dependent induction of inhibitory PAS domain protein in PC12 cells. *J Biochem* 2011;150(3):311-8.
94. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(1):51-6.