



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος



Διδακτορική Διατριβή

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2α ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ»**

υπό

ΕΥΑΝΘΙΑΣ Γ. ΠΑΓΓΟΥ

Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Ευανθία Πάγγου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (14^η 20-07-2016 ΓΣΕΣ):

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

Στον παππού μου Βαγγέλη,
τον σημαντικότερο άνθρωπο στη ζωή μου
και το μεγαλύτερο στήριγμα σε κάθε μου βήμα

Στον αγαπημένο μου δάσκαλο
Γιώργο Ράγκο
που με έμαθε να αγαπάω την επιστήμη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Π. Λιάκο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος για την ανάθεση της διατριβής, για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της διατριβής αλλά και για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και επιμονή του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Γ. Σίμο, για τις καίριες συμβουλές και επισημάνσεις σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, το τελικό αποτέλεσμα της οποίας δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς τη δική του συμβολή.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Η. Μυλωνή, που στάθηκε δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια ως πραγματικός φίλος και μου προσέφερε απεριόριστη ψυχολογική υποστήριξη και ουσιαστική βοήθεια κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητές κ. Α. Γερμενή και κ. Ν. Σακελλαρίδη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ε. Γεωργιάτσου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Α. Τσακάλωφ για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας κ. Γ. Χαχάμη, για τις πολύτιμες συμβουλές της και την αμέριστη στήριξη που μου προσέφερε ως φίλη. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την άπογη συνεργασία και παρέα όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα μέσα από την καρδιά μου να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους λατρεμένους μου παππούδες και γιαγιάδες, στους γονείς μου, στον αδερφό μου, στον σύντροφό μου και στους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας και με βοήθησαν να ξεπεράσω κάθε ψυχολογικό εμπόδιο και δυσκολία, ενθαρρύνοντάς με σε κάθε μου βήμα.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο : **Πάγγου Ευανθία**
Ημερομηνία γέννησης : 14-07-1988
Τόπος γέννησης : Λάρισα
Τηλέφωνο επικοινωνίας : 2410-685583 ή 6979363716
e-mail: evapaggou@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ιούνιος 2012-σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Π. Λιάκου, Επίκουρου Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, με θέμα «Ο ρόλος του επαγόμενου από υποξία μεταγραφικού παράγοντα (HIF-2α) στην κυτταρική λειτουργία».

Σεπτέμβριος 2006-Ιούλιος 2011: Πτυχίο Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. (Πενταετούς φοίτησης) Βαθμός «Λίαν καλώς».

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ/ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Μάρτιος 2014- Μάρτιος 2015 : Απασχόληση ως Υποψήφια Διδάκτωρ με σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» με τίτλο «Στόχευση των επαγόμενων από υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF στη φλεγμονή και τον καρκίνο» (HYPOXYTARGET 3129), με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γ. Σίμο.

Δεκέμβριος 2012-Δεκέμβριος 2013: Απασχόληση ως Βιολόγος με σύμβαση έργου στο Εργαστήριο Βιοχημικών Αναλύσεων του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας, με αντικείμενο την παραλαβή και την προκαταρκτική επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων για βιοχημικές-μοριακές αναλύσεις, με επιστημονικό υπεύθυνο τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Π. Λιάκο.

Σεπτέμβριος 2010 – Ιούνιος 2011: Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας του εργαστηρίου «Βιοαναλυτική Γενότυπος» στην Αθήνα υπό την επίβλεψη της κ. Θ. Τράγκα, Καθηγήτριας Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με θέμα «Μελέτη της επίδρασης του γονιδίου της λιποπρωτεϊνικήςλιπάσης(LPL) σε ασθενείς μεκαρκίνο του παχέος εντέρου με την μέθοδο MLPA».

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Pangou E**, Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G and Liakos P, HIF-2α phosphorylation by CK1δ promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia, **Journal of Cell Science**, 2016, Sep 29. pii: jcs.191395. [Epub ahead of print].
2. Vaiou M, **Pangou E**, Liakos P, Sakellaridis N, Vassilopoulos G, Dimas K, Papandreou C, Endothelin-1 (ET-1) induces resistance to bortezomib in human multiple myeloma cells via a pathway involving the ETB receptor and upregulation of proteasomal activity, **J Cancer Res Clin Oncol.**, 2016, Oct;142(10):2141-58. doi: 10.1007/s00432-016-2216-2. Epub 2016 Aug 16.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Pangou E.** Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, SimosG & Liakos P “Direct phosphorylation of Hypoxia Inducible Factor 2 α by Casein Kinase 1 δ supports HIF-2 transcriptional activity and erythropoietin secretion in hepatoma cell lines” Proceedings of the 66th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (EEBMB). Newsletter 11-13 Dec 2015 Athens (P159) and oral presentation in the 3rd Young Scientist Forum.
2. **Pangou E.** Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, SimosG & Liakos P “Casein kinase 1 δ regulates Hypoxia Inducible Factor-2 α by direct phosphorylation” Proceedings of the 40th FEBS Meeting. Newsletter 4-9 Jul 2015 Berlin (P03-027).
3. **Pangou E.** Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, SimosG & Liakos P “CK1 δ directly targets distinct sites in HIF-2 α .” Proceedings of the 65th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (EEBMB).Newsletter 28-30 Nov 2014 Thessaloniki (P96) and oral presentation in the 2nd Young Scientist Forum.
4. Befani C, **Pangou E.** Mylonis I, SimosG & Liakos P “ERK1/2 phosphorylates HIF-2 α and promotes its transcriptional activity.” Proceedings of the 65th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (EEBMB). Newsletter 28-30 Nov 2014 Thessaloniki (P142).
5. **Pangou E.** Simos G & Liakos P “Pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β exhibit differential effects on the expression and transcriptional activity of HIFs in human liver cancer cells.” Proceedings of the FEBS-EMBO Meeting. Newsletter 30/08 - 04/09 2014 Paris (1532).
6. **Pangou E.** Simos G & Liakos P. “Differential effect of the inflammatory mediators TNF- α , IL-6, IL-1 β on the expression and transcriptional activity of Hypoxia Inducible Factors HIF-1 and HIF-2 in human hepatoma cells.” Proceedings of the 64th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (EEBMB). Newsletter 6-8 Dec 2013 Athens (P187).

ΒΡΑΒΕΙΑ

Δεκέμβριος 2015: Βραβείο «Ανδρέας Αρματάς» για την καλύτερη προφορική παρουσίαση στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νέων Επιστημόνων στα πλαίσια του 66^{ου} Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB).

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ: **Άριστο επίπεδο**, Certificate of Proficiency in English (Cambridge)

ΓΑΛΛΙΚΑ: **Πολύ καλό επίπεδο**, Diplome d'études en langue française DELF 2nd Degree

ΙΤΑΛΙΚΑ : **Πολύ καλό επίπεδο**, Certificato di conoscenza della lingua italiana Livello B2 CELI3

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ: **Πολύ καλό επίπεδο**, Κάτοχος πιστοποιητικού γνώσης χειρισμού Ηλεκτρονικών Υπολογιστών του University Of Cambridge -IT Skills Standard.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Αρωγό μέλος της της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB).

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2α ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ»**

υπό

ΕΥΑΝΘΙΑΣ Γ. ΠΑΓΓΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων και είναι ένας από τους βασικούς ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Εμπλέκεται σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος και η φλεγμονή. Δρα ως ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από μια επαγόμενη από την υποξία υπομονάδα (HIF-2α) και μια συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β ή ARNT. Η HIF-2α υπομονάδα ρυθμίζεται από οξυγόνο-ανεξάρτητους μηχανισμούς καθώς και από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίοι δεν έχουν επαρκώς διαλευκανθεί.

Το πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής επικεντρώθηκε στη μελέτη της ρύθμισης του HIF-2 μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση της καζεΐνης CK1δ. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η CK1δ φωσφορυλιώνει τον HIF-2α στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser383 και Thr528 *in vitro*. Η κατάργηση της φωσφορυλίωσης στις παραπάνω θέσεις μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσής τους σε Ala, καθώς και η αποσιώπηση ή η αναστολή της κινάσης, μείωσαν τη μεταγραφική δράση του HIF-2 και την εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση ερυθροποιητίνης (EPO) στις δύο ηπατοκαρκινικές σειρές που εξετάστηκαν, Huh7 και HepG2. Η φωσφορυλίωση των Ser383 και Thr528 δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζει την πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α ή την αλληλεπίδρασή του με τον εξειδικευμένο μεταγραφικό συμπάραγοντα USF2. Ωστόσο, έπειτα από πειράματα ανοσοφθορισμού και υποκυτταρικής κλασμάτωσης, παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την CK1δ οδήγησε ένα σημαντικό ποσοστό της HIF-2α υπομονάδας στο κυτταρόπλασμα. Το φαινόμενο αυτό αντιστράφηκε παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της εξαπορτίνης CRM1, λεπτομυκίνης β (LMB), υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση από την CK1δ είναι απαραίτητη προκειμένου ο HIF-2α να διατηρείται μέσα στον πυρήνα και να έχει πρόσβαση στα γονίδια-στόχους του. Συμπερασματικά, προτείνεται ότι η CK1δ ενισχύει την έκκριση της EPO σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος, μετά από άμεση φωσφορυλίωση του HIF-2α και συσσώρευσή του στον πυρήνα. Η ταυτοποίηση αυτού του νέου μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο σε παθολογικές καταστάσεις όπου εμπλέκεται η υποξία και ο HIF-2.

Δεδομένης της πολύπλοκης σχέσης που υπάρχει μεταξύ υποξίας και χρόνιας φλεγμονής στη εξέλιξη του ηπατοκαρκινώματος (HCC), στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής, μελετήθηκε η ρύθμιση του HIF-2 υπό την επίδραση των προφλεγμονωδών παραγόντων TNF- α , IL-6 και IL-1 β και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ρύθμιση του HIF-1 α σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η IL-1 β αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1 α και ότι η IL-6 προκαλεί αύξηση τόσο της πρωτεΐνης όσο και της δράσης του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα καμία από τις παραπάνω κυτταροκίνες δεν επηρεάζει τον HIF-2 σε κανένα επίπεδο. Ενώ, ο TNF- α διαφαίνεται να δρα ως διακριτός ρυθμιστής των ισομορφών HIF καθώς επάγει ειδικούς μεταγραφικούς στόχους του HIF-1 όπως η PGK1, ενώ αναστέλλει την επαγωγή ειδικών μεταγραφικών στόχων του HIF-2 όπως η SOD2 και η EPO, αναστέλλοντας παράλληλα και την έκκριση της EPO. Πειράματα ανοσοφθορισμού υπέδειξαν ότι ο HIF-2 α , παρουσία του TNF- α , εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό στο κυτταρόπλασμα, με το φαινόμενο αυτό να αντιστρέφεται μερικώς όταν στα κύτταρα προστίθεται λεπτομυκίνη β (LMB). Συμπερασματικά, στο δεύτερο αυτό μέρος της διατριβής, προτείνεται ότι η μερική απενεργοποίηση του HIF-2 παρουσία του TNF- α σε συνθήκες υποξίας στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, είναι η ενισχυμένη έξοδος του από τον πυρήνα μέσω της εξπορτίνης CRM1 χωρίς να αποκλείεται η συμμετοχή και άλλων μοριακών συντελεστών, η διερεύνηση των οποίων θα μπορούσε να συμβάλλει στη δημιουργία νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων όσον αφορά στην σχετιζόμενη με τη φλεγμονή καρκινογένεση στο ήπαρ.

ABSTRACT

Hypoxia inducible factor HIF-2 is a transcriptional activator that mediates the cellular response to hypoxia. It is involved in physiological processes like development and differentiation, but also in pathological situations like cancer and inflammation. It acts as a heterodimer complex that consists of a hypoxia inducible subunit (HIF-2 α) and a constitutively expressed subunit HIF-1 β or ARNT. Regulation of HIF-2 α involves oxygen-independent mechanisms, including post-translational modifications.

In the first part of this thesis, we investigated the phosphorylation of HIF-2 α by the casein kinase 1 δ (CK1 δ). We demonstrate that CK1 δ phosphorylates HIF-2 α at Ser383 and Thr528 *in vitro*. Disruption of these phosphorylation sites and silencing or chemical inhibition of CK1 δ reduced the transcriptional activity of HIF-2 and the secretion of erythropoietin (EPO) in the two hepatic cancer cell lines tested, Huh7 and HepG2. Phosphorylation of Ser383 and Thr528 did not affect the protein stability of HIF-2 α or its interaction with the specific co-activator USF2. However, immunofluorescence and subcellular localization assays showed that when CK1 δ -dependent phosphorylation of HIF-2 α was inhibited, we observed significant cytoplasmic mislocalization of HIF-2 α . More strikingly, nuclear accumulation was re-established when nuclear protein export was inhibited upon addition of the CRM1 inhibitor Leptomycin B (LMB), suggesting that phosphorylation by CK1 δ is required to maintain HIF-2 α inside the nucleus where it gains access to its target genes, through inhibition of its CRM1 dependent nuclear export. Taken together these data suggest that CK1 δ enhances EPO secretion from liver cancer cells under hypoxia by modifying HIF-2 α and promoting its nuclear accumulation. The identification of this new oxygen-independent regulatory mechanism of HIF-2 α could represent a potent therapeutic target in pathological situations that involve hypoxia and HIF-2.

Considering the complicated relationship that exists between chronic inflammation and cancer in the development of hepatocellular carcinoma (HCC), in the second part of this thesis, we analyzed the effect of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β on HIF-2 α , in comparison to the corresponding effect on HIF-1 α in liver cancer cells. Our results showed that HIF-1 α protein levels were increased in response to IL-1 β and that its protein levels as well as its transcriptional activity were also augmented by IL-6 under hypoxia. However, HIF-2 α was not influenced by the above

cytokines at any level. TNF- α was found to act as a discriminating factor of the two HIF isoforms, since it activated the transcription of specific HIF-1 target genes like PGK, whereas it deactivated the transcription of specific HIF-2 target genes like SOD2 and EPO. Immunofluorescence assays indicated that HIF-2 α was significantly mislocalized to the cytoplasm in response to TNF- α and that this phenomenon was partially reversed upon Leptomycin B (LMB) treatment. Overall these data suggest that enhanced CRM1-mediated nuclear export is one of the reasons that could explain the observed HIF-2 partial inactivation under combined conditions of hypoxia and TNF- α in the Huh7 hepatocellular cancer cell line. However, we cannot exclude the possibility of other molecular mechanisms playing a role in this regulation, the clarification of which would contribute to better therapeutic strategies regarding the inflammation driven liver carcinogenesis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	11
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
A.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....	19
A.1.1 HIF-1α.....	19
A.1.2 HIF-2α	19
A.1.3 HIF-3α.....	22
A.1.4 HIF-1β ή ARNT.....	22
A.2 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α	22
A.2.1 Ρύθμιση μέσω υδροξυλίωσης.....	22
A.2.2 Ρύθμιση από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS).....	25
A.2.3 Ρύθμιση από την διακοπτόμενη υποξία.....	27
A.3 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α	28
A.3.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	28
A.3.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης.....	29
A.3.3 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας.....	31
A.3.4 Ρύθμιση από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	31
A.3.4.1 Ακετυλίωση.....	32
A.3.4.2 Σουμοϋλίωση.....	33
A.3.4.3 Φωσφορυλίωση.....	34
A.3.4.4 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1)	35
A.3.5 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες.....	37
A.3.5.1 ETS-1.....	37
A.3.5.2 ELK-1.....	38
A.3.5.3 NEMO.....	38
A.3.5.4 USF2.....	39
A.3.5.5. HAF.....	39
A.3.5.6 c-MYC.....	40
A.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.....	41
A.4.1 Εμβρυογένεση.....	41
A.4.2 Ανάπτυξη.....	42
A.4.3 Διαφοροποίηση.....	43

A.4.4 Αντιοξειδωτική Άμυνα και Ομοιοστασία.....	44
A.4.5. Παραγωγή Ερυθροποιητίνης (EPO).....	46
A.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....	48
A.5.1 Ερυθροκυττάρωση.....	48
A.5.2 Φλεγμονή.....	50
A.5.2.1 Ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) στο ηπατοκαρκίνωμα.....	52
A.5.2.2 Η IL-1β (Interleukin 1 beta) στο ηπατοκαρκίνωμα.....	54
A.5.2.3 Η IL-6 (Interleukin 6) στο ηπατοκαρκίνωμα.....	54
A.5.3 Καρκίνος.....	55
A.5.3.1 Πολλαπλασιασμός	56
A.5.3.2 Μεταβολικός Επαναπρογραμματισμός.....	58
A.5.3.3 Αγγειογένεση.....	58
A.5.3.4 Μετάσταση.....	59
A.5.3.5 Αντοχή στη χημειοθεραπεία-ραδιοθεραπεία.....	59
A.5.3.6 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις.....	61
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	63
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
B.1ΥΛΙΚΑ.....	65
B.1.1Κυτταρικές σειρές.....	65
B.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	65
B.1.3 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	65
B.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA).....	68
B.1.5 Αλληλούχιση (Sequencing).....	69
B.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια.....	69
B.1.7Υλικά Μοριακής Βιολογίας.....	70
B.1.8 Αντισώματα.....	70
B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
B.2.1 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	70
B.2.2 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	71
B.2.3 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA	71
B.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	71
B.2.5 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	72
B.2.6 Αντίδραση λιγάσης	72

B.2.7 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασηματισμό (competent) και μετασηματισμός E.coli Top10 και E.coli BL21RIL.....	73
B.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation...)	74
B.2.9 Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-2α με PCR.....	74
B.2.10 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση (Site-directed mutagenesis).....	75
B.2.11 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG.....	77
B.2.12 Λύση των κυττάρων E.coli με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος	78
B.2.13 Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνη.	78
B.2.14 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	79
B.2.15 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.....	79
B.2.16 Βαφή της πηκτής πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue.....	80
B.2.17 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	80
B.2.18 Ανοσοκατακρήμνιση.....	81
B.2.19 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών in vitro	82
B.2.20 Αυτοραδιογραφία	82
B.2.21 Ανάλυση φωσφοαμινοξέων.....	83
B.2.22 Κυτταροκαλλιέργειες.....	84
B.2.23 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	84
B.2.24 Επίδραση ουσιών και μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α...	85
B.2.25 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	85
B.2.26 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	85
B.2.27 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	86
B.2.28 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	87
B.2.29 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA.....	88
B.2.30 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2.....	89
B.2.31 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων ερυθροποιητίνης σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών.....	89
B.2.32 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής το...	90
B.2.33 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR).....	91
B.2.34 Στατιστική ανάλυση.....	93

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	94
Γ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΣΩ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ.....	94
Γ.1.1. Μελέτη της επίδρασης της κινάσης CK1δ στη ρύθμιση του HIF-2α..	94
Γ.1.1.1 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στην έκφραση του HIF-2α	94
Γ.1.1.2 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.....	95
Γ.1.1.3 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στην έκκριση ερυθροποιητίνης (EPO).....	97
Γ.1.2. Μελέτη της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την CK1δ.....	99
Γ.1.2.1 Μελέτη της <i>in vitro</i> φωσφορυλίωσης του ανασυνδυασμένου HIF-2α πλήρους μεγέθους και μικρότερων τμημάτων του από την CK1δ.....	99
Γ.1.2.2 Ταυτοποίηση υποψήφιων θέσεων φωσφορυλίωσης από την CK1δ εντός της περιοχής 366-542.....	101
Γ.1.2.3 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α (S383A, S386A, T528A).....	104
Γ.1.2.4 Μελέτη της <i>in vitro</i> φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α S383A, S386A και T528A από την CK1δ και από ολικά εκχυλίσματα Huh7...	107
Γ.1.3. Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης (Ser383, T528) από την CK1δ στη ρύθμιση του HIF-2α.....	109
Γ.1.3.1 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στην έκφρασή του.....	111
Γ.1.3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στη μεταγραφική του ενεργότητα.....	111
Γ.1.3.3 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα D4476 στη μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α.....	112
Γ.1.3.4 Μελέτη της επίδρασης των ανενεργών μορφών του HIF-2α στην έκφραση ενδογενών γονιδίων-στόχων του.....	114
Γ.1.3.5 Μελέτη της επίδρασης των ανενεργών μορφών του HIF-2α στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της EPO.....	115
Γ.1.4. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.....	116

Γ.1.4.1 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α.	117
Γ.1.4.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό συμπράγοντα USF2.....	118
Γ.1.4.3 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α.....	119
Γ.1.4.4 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην εξαρτώμενη από τη CRM1 έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα.....	120
Γ.1.4.5 Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών του HIF-2α παρουσία LMB.	124
Γ.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ HIF-1α.....	125
Γ.2.1 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των α υπομονάδων των HIF.....	125
Γ.2.2 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF.....	126
Γ.2.3 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων-στόχων των HIF.....	128
Γ.2.4 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της EPO.....	130
Γ.2.5 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2α υπό την επίδραση του TNF-α	130
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	133
Δ.1 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.....	135
Δ.2 Ρύθμιση του HIF-2α από παράγοντες φλεγμονής.....	141
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	161

A.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF, αποτελείται από τους HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Οι HIF δρουν ως ετεροδιμερή και αποτελούνται από μια ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο άλφα υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη βήτα υπομονάδα γνωστή και ως ARNT (**Wang et al., 1995**). Όλες οι α υπομονάδες των HIF όπως και ο ARNT, ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/PER-ARNT- SIM, bHLH/PAS) (**Wang and Semenza, 1995**). Τα μοτίβα bHLH-PAS είναι απαραίτητα για το σχηματισμό ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των α και β υπομονάδων, καθώς και για την πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs) στις αλληλουχίες DNA των γονιδίων στόχων.

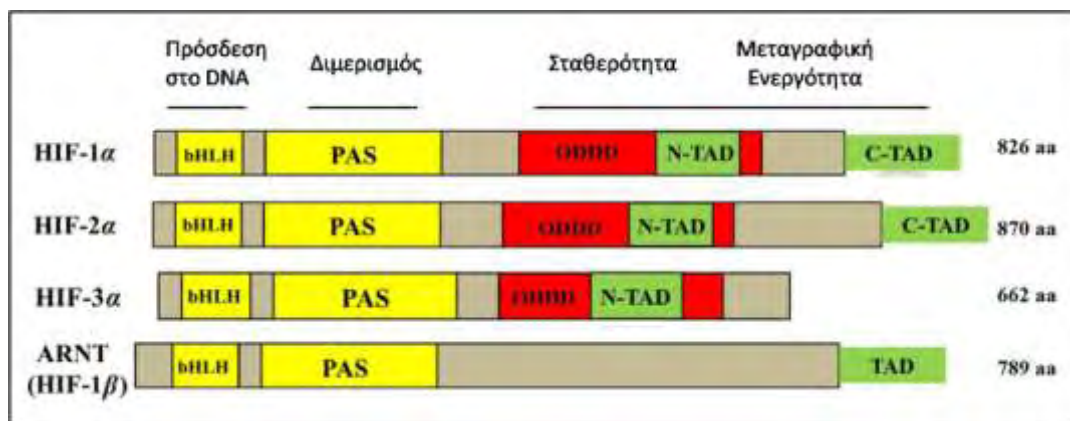
A.1.1 HIF-1α

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων και η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη καθώς εμφανίζει περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Στην αμινοτελική του περιοχή βρίσκονται τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για τον διμερισμό με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs. Ο HIF-1α διαθέτει δυο 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). Η N-TAD περιοχή αλληλοεπικαλύπτεται με την ODDD περιοχή (Oxygen- dependent Degradation Domain, ODDD), (αμινοξέα 401-603) και παίζει ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη σταθερότητα της πρωτεΐνης (**Dery et al., 2005**). Εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και επάγεται σε υποξικές συνθήκες (0,1-2% O₂). Στους εξειδικευμένους μεταγραφικούς στόχους του περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης (PGK1, LDHA), στην απόπτωση (BNIP3) και στη ρύθμιση του pH (CAIX).

A.1.2 HIF-2α

Ο HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη 870 αμινοξέων, επίσης γνωστή στη βιβλιογραφία ως endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) (**Tian et al., 1997**) ή HIF-related factor (HRF) (**Flamme et al., 1997**) ή HIF-like factor (HLF) (**Ema et al., 1997**) ή MOP2 (member of PAS family 2) (**Hogenesch et al., 1997**). Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει την επικράτεια HLH (αμινοξέα 28-64) και την επικράτεια PAS στην οποία

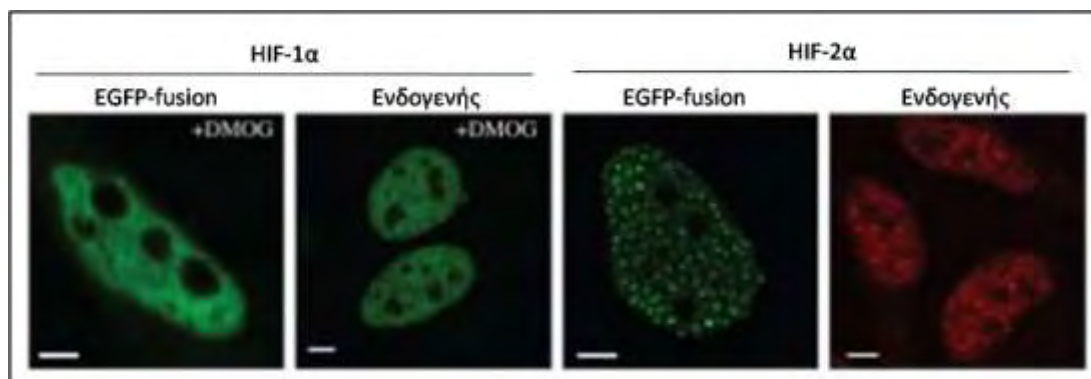
περιλαμβάνονται οι υποεπικράτειες Α (αμινοξέα 84-154) και Β (αμινοξέα 230-350). Διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, μια αμινοτελική την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και μια καρβοξυτελική την C-TAD (αμινοξέα 830-870), οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές όπως οι CBP/p300 και είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική του δράση (Li et al., 1996). Η επικράτεια N-TAD καθορίζει επιπλέον και την εξειδίκευσή του HIF-2α ως προς τα γονίδια στόχους του μέσω αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται εκεί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Hu et al., 2007). Ανάμεσα στις N-TAD και C-TAD επικράτειες παρεμβάλλεται και η ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (Inhibitory Domain, ID). Επιπλέον, φέρει μια οξυγόνο-εξαρτώμενη επικράτεια (ODDD) η οποία αλληλεπικαλύπτεται με την N-TAD και είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του σε συνθήκες νορμοξίας (Ema et al., 1997). Εμφανίζει αξιοσημείωτη ομολογία με τον HIF-1α σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας (48%), και ο υψηλότερος βαθμός ομολογίας εντοπίζεται στις περιοχή bHLH με ποσοστό 85%, και στις περιοχές PAS-A και PAS-B με 68% και 73% αντίστοιχα (Tian et al., 1997). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals), τα N-NLS (αμινοξέα 14-50) και C-NLS (αμινοξέα 705-742) (Luo and Shibuya, 2001) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Οι λειτουργικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF. Οι HIF αποτελούνται από συντηρημένες επικράτειες οι οποίες εμπλέκονται στην πρόσδεσή τους στο DNA (bHLH), στον ετεροδιμερισμό τους (PAS), στην οξυγόνο-εξαρτώμενη αποδόμησή τους (ODDD), και στη μεταγραφική τους ενεργότητα (N-TAD, C-TAD). Ο ARNT έχει μια περιοχή TAD (Masoud and Li, 2015).

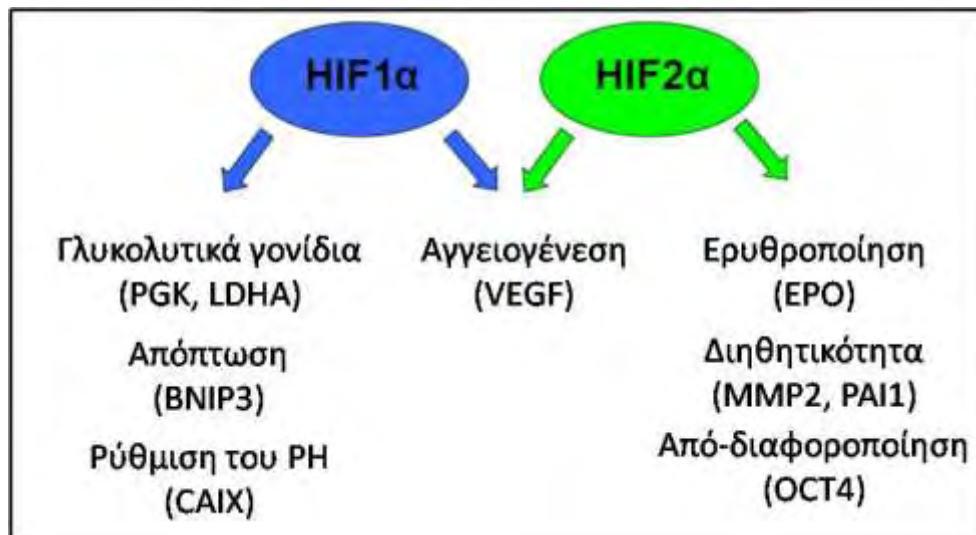
Η έκφραση του HIF-2α είναι ιστοειδική και περιορίζεται κυρίως στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο επιθήλιο του παχέος εντέρου (Wiesener et al., 2003). Στον πυρήνα ο HIF-2α συγκεντρώνεται σε συγκεκριμένες δομές (speckles) κοντά στην ενεργή RNA πολυμεράση, γεγονός που

του προσδίδει καλύτερη πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του, σε αντίθεση με τον HIF-1α που κατανέμεται ομοιογενώς μέσα στον πυρήνα (Taylor et al., 2016) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Υποκυτταρικός εντοπισμός των HIF-1α και HIF-2α. Κύτταρα HeLa που εκφράζουν τους HIF-1α και HIF-2α ενδογενώς ή σε σύντηξη με την GFP. Διακρίνεται το διάχυτο πυρηνικό σήμα του HIF-1α (αριστερά) και η συσσώρευση του HIF-2α σε συγκεκριμένες πυρηνικές δομές (δεξιά) (Taylor et al., 2016).

Στους εξειδικευμένους στόχους του περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση (EPO), στην αντιοξειδωτική άμυνα (SOD2), στη διαφοροποίηση (OCT4), στον πολλαπλασιασμό (TGF-α, Cyclin D1) και στην διηθητικότητα (MMP2, PAI-1) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Οι HIF-1 και HIF-2 ενεργοποιούν τη μεταγραφή κοινών και διακριτών γονιδίων. Οι HIF-1 και HIF-2 ενεργοποιούν από κοινού γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Ο HIF-1 εξειδικευμένα ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στη γλυκόλυση, στην απόπτωση και στη ρύθμιση του pH, ενώ ο HIF-2 εξειδικευμένα επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην από-διαφοροποίηση και στη μετάσταση (Pawlus et al., 2013).

A.1.3 HIF-3α

Ο HIF-3α είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει 6 ισομορφές και διαφέρει από τους HIF-1α και HIF-2α ως προς τη δομή, με βασικό χαρακτηριστικό της ότι δεν φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD (Maynard et al., 2005). Η έκφρασή του περιορίζεται σε ιστούς όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και οι νεφροί (Yang et al., 2015). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το βιολογικό ρόλο του HIF-3α στην υποξία είναι αντικρουόμενα. Έχει προταθεί ότι ανταγωνίζεται τους HIF-1α και HIF-2α για τη πρόσδεση στον ARNT, αναστέλλει την έκφρασή τους και τελικά τους απενεργοποιεί (Hara et al., 2001). Πρόσφατα, σε μελέτες με οργανισμό μοντέλο το zebrafish δείχθηκε ότι δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ταυτοποιήθηκαν γονίδια στόχοι του, στα οποία προσδένεται σε άτυπα HRE (Zhang et al., 2014).

A.1.4 HIF-1β ή ARNT

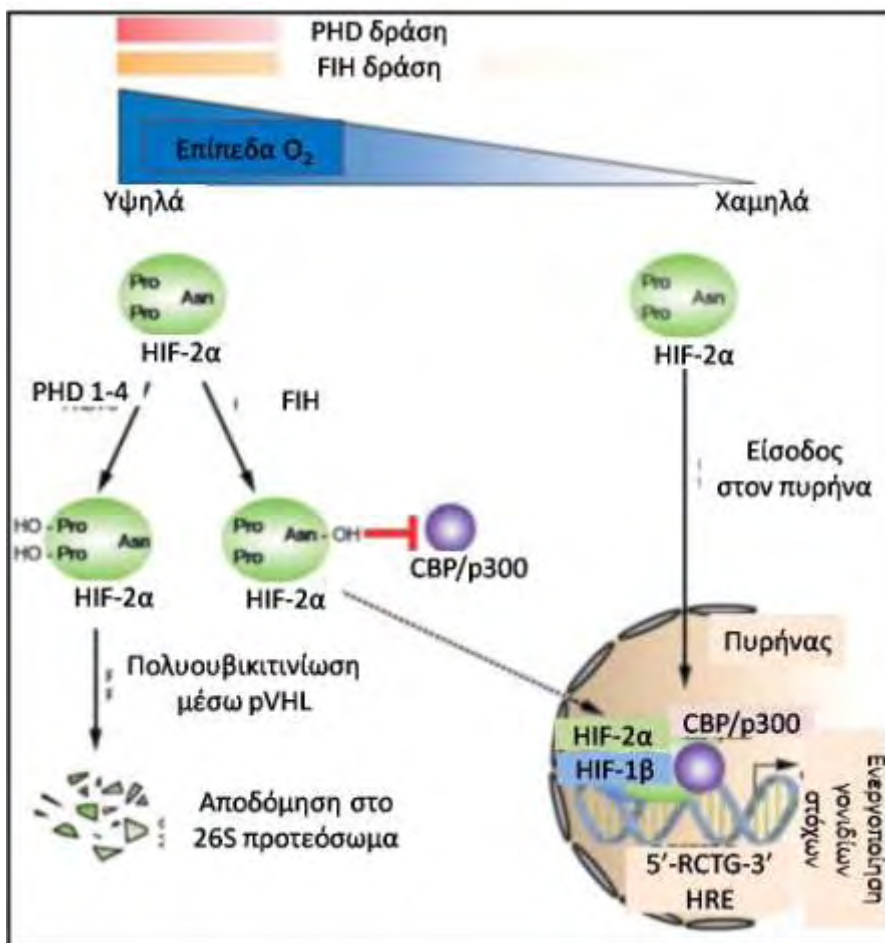
Ο HIF-1β είναι μια πρωτεΐνη 789 αμινοξέων που αποτελείται από δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2) (Hankinson, 2008). Περιέχει μια επικράτεια bHLH απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA, από δύο επικράτειες PAS υπεύθυνες για τον διμερισμό του και από μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Rankin and Giaccia, 2008). Διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που ρυθμίζει την είσοδό του στον πυρήνα μέσω του εξαρτώμενου από τις ιμπορτίνες α/β μονοπατιού (Depping et al., 2008). Ο ARNT συμμετέχει σε δύο διακριτές σηματοδοτικές οδούς ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες: στην οδό του υποδοχέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) σε συνθήκες έκθεσης σε διοξίνες και στην οδό των HIF σε συνθήκες υποξίας (Mandl and Depping, 2014). Μέχρι πρόσφατα η βιβλιογραφία υποστήριζε ότι δεν επηρεάζεται από την υποξία και ότι η έκφρασή του είναι συνεχής και σταθερή ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις του O₂. Ωστόσο, ολοένα και αυξάνονται οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο ARNT ρυθμίζεται από την υποξία σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, υποδεικνύοντας ένα καινούριο ρόλο του ARNT στην ογκογένεση (Mandl et al., 2013, Wolff et al., 2013).

A.2 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α

A.2.1 Ρύθμιση μέσω υδροξυλίωσης

Ο σημαντικότερος και πιο καλά μελετημένος μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης και μεταγραφικής ενεργότητας, είναι η οξυγόνο-εξαρτώμενη υδροξυλίωσή του σε κατάλοιπα προλίνης (Pro) και ασπαραγίνης (Asp) αντίστοιχα. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-2α υδροξυλιώνεται σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης (Pro-405, Pro-531) που εντοπίζονται στο γενικό μοτίβο LXXLAP στην επικράτεια ODDD από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD, Prolyl, Hydroxylase Domain). Η τροποποίηση αυτή προωθεί την πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης Von Hippel Lindau (pVHL), η οποία μαζί με τους παράγοντες Cullin2, elongin C και Ring Box1 ανήκει στο σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικιτίνης E3. Η πρόσδεση της pVHL στις υδροξυλιωμένες προλίνες ενεργοποιεί την ουβικιτινίωση του HIF-2α και την ταχεία αποδόμησή του στο 26S πρωτεόσωμα με χρόνο ημιζωής περίπου 5 λεπτών (Shen and Kaelin, 2013). Επιπλέον, ο HIF-2α υδροξυλιώνεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn-847) στην επικράτεια C-TAD από το ένζυμο που είναι γνωστό ως ανασταλτικός παράγοντας του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH). Η τροποποίηση αυτή παρεμποδίζει την προσάραξη του μεταγραφικού συμπαραγόντα CBP/p300, με αποτέλεσμα να εξασθενεί η μεταγραφική δράση του HIF-2 και η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του (Masson et al., 2012). Σε συνθήκες υποξίας ωστόσο, τα προαναφερθέντα συμβάντα υδροξυλίωσης αναστέλλονται λόγω της απενεργοποίησης των PHDs και του FIH, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-2α και την ανάκτηση της πλήρους ενεργούς δράσης του ως μεταγραφικού παράγοντα (Εικόνα 5). Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών, για την καταλυτική δράση των οποίων απαιτούνται οξυγόνο, σίδηρος και α-κετογλουταρικό. Έχουν βρεθεί 4 ισομορφές τους (PHD1, PHD2, PHD3, PHD4) οι οποίες έχουν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό και στοχεύουν εξειδικευμένα υποστρώματα (Kim and Yang, 2015). Ενδεικτικά έχει αναφερθεί ότι η PHD1 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα και ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών όπως ο NF-κB (Oliver et al., 2009), ενώ η PHD2 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών όπως η NDRG3 (Lee et al., 2015). Η PHD3 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζει πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη νευρωνική ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Place and Domann, 2013). Τέλος, η PHD4 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει συσχετιστεί με την διέγερση της αγγειογένεσης μέσω του TGF-α (Klotzsche-von Ameln et al., 2013). Οι ισομορφές που φαίνεται να είναι πιο δραστικές έναντι του HIF-2α σε

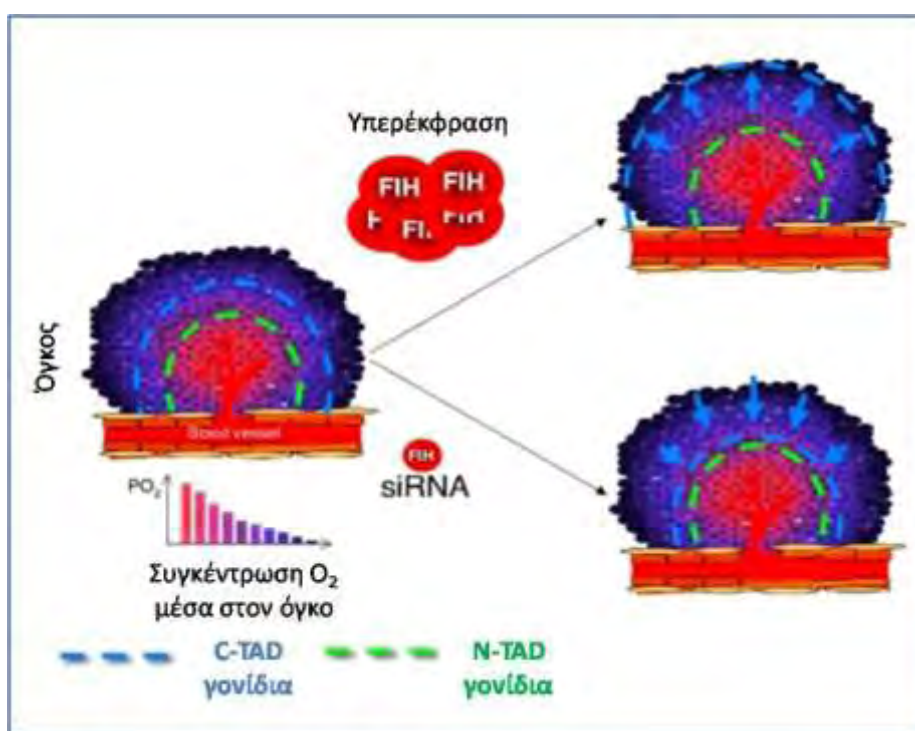
σύγκριση με τον HIF-1α, είναι η PHD1 και η PHD3 (Appelhoff et al., 2004) ενώ το σηματοδοτικό μονοπάτι pVHL-PHD2-HIF-2α φαίνεται να έχει κυρίαρχο ρόλο στην διατήρηση της ομοιοστασίας της παραγωγής ερυθροκυττάρων και αναλύεται λεπτομερώς στην ενότητα 4.1 (Franke et al., 2013).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Σε νορμοξία, η υδροξυλίωση του HIF-2α από τις υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) οδηγεί στην αποδόμησή του από το 26S πρωτεόσωμα. Η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης από τον παράγοντα που αναστέλλει τον HIF (FIH-1), εμποδίζει την πρόσδεση των συνενεργοποιητών CBP/p300. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ωστόσο, απενεργοποιούν τόσο τις PHDs, όσο και τον FIH-1, επιτρέποντας την είσοδο του HIF-2α στον πυρήνα, το σχηματισμό του συμπλόκου HIF-2α/HIF-β και την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-2 (Chan et al., 2016).

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι PHD2 και PHD3 φέρουν HRE στον υποκινητή τους και ότι η έκφραση των πρωτεϊνών τους επάγεται από την υποξία, γεγονός που υποδεικνύει ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης των HIF έπειτα από παρατεταμένη υποξία (Minamishima et al., 2009). Πιθανόν η επαγωγή των PHDs από την υποξία να έχει σχέση με διαφορετική ρύθμιση των HIF σε σύντομη και παρατεταμένη υποξία, μια ρύθμιση που εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η ρύθμιση του HIF-2α μέσω της δράσης διακριτών υδροξυλασών αντιπροσωπεύει ένα αυστηρό σύστημα ελέγχου. Σε νορμοξία, εξασφαλίζεται ότι ακόμα και αν μια ποσότητα HIF-2α ξεφύγει από τη δράση των PHDs και δεν αποδομηθεί, η μεταγραφική του δράση θα εξακολουθήσει να επηρεάζεται λόγω της δράσης του FIH. Μελέτες της ενζυμικής δράσης έδειξαν ότι οι PHDs και ο FIH έχουν πολύ διαφορετικές σταθερές συγγένειας για το O₂, με την K_m του FIH για το οξυγόνο είναι 3 φορές χαμηλότερη από αυτήν των PHDs (Koivunen et al., 2004), υποδεικνύοντας ότι μια μικρή πτώση στη συγκέντρωση οξυγόνου πρώτα θα απενεργοποιήσει τις PHDs και ότι μια μεγαλύτερη μείωση απαιτείται για να επηρεάσει την ενεργότητα του FIH. Ο παράγοντας FIH λοιπόν, εκτός από αναστολέας του HIF-2α, διαχωρίζει και τα γονίδια στόχους του HIF-2 που επάγονται από την επικράτεια N-TAD από τα γονίδια που επάγονται από την C-TAD (Dayan et al., 2008) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Επιλογή των γονιδίων στόχων του HIF-2 από τον FIH. Η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την C-TAD (μπλε) μετατοπίζεται σε έντονα υποξικές περιοχές όταν ο FIH υπερκφράζεται και σε μέτρια έντονα υποξικές περιοχές κοντά στα αιμοφόρα αγγεία όταν ο FIH αποσιωπάται. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την N-TAD (πράσινο) δεν εξαρτάται από τη ρύθμιση της δράσης του FIH (Dayan et al., 2008).

A.2.2 Ρύθμιση από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS)

Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι ROS δημιουργούνται φυσιολογικά ως παραπροϊόντα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούν O₂, του κυτοχρώματος P450, των οξειδωσών NADH/NADPH και των

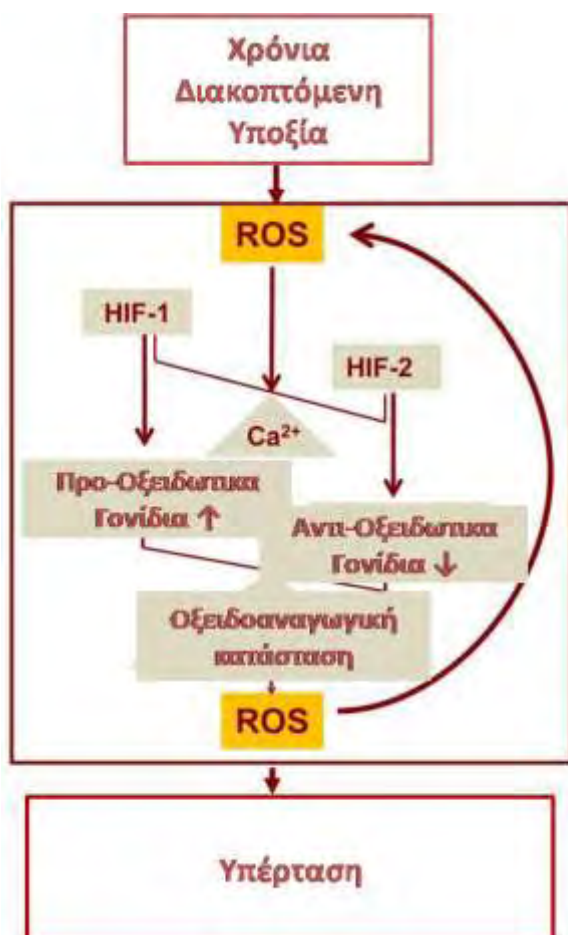
κυκλοξυγενασών. Το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2\bullet$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου ($HO\bullet$) και το μονοξειδίο του αζώτου ($NO\bullet$) είναι από τις σημαντικότερες ενώσεις ROS. Τα κύτταρα αμύνονται στην παραγωγή ROS με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση (CAT) (Movafagh et al., 2015). Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου προκαλείται οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί βλάβες στο DNA και απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού ή απόπτωση. Εναλλακτικά, οι ROS δρούν ως σήματα για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών, ιδιαίτερα σε στρεσογόνες καταστάσεις που προκαλούν την επαγωγή τους, με αποτέλεσμα την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης, το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου ή την επιβίωση (Murphy, 2009).

Έχει προταθεί ότι οι ROS σταθεροποιούν τον HIF-2α, και ότι η ρύθμιση αυτή εξαρτάται από την λειτουργικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου και συγκεκριμένα από την έκφραση στοιχείων του συμπλέγματος III, όπως το κυτόχρωμα C (Guzy et al., 2005, Mansfield et al., 2005). Αντίθετα έχει βρεθεί ότι η λειτουργικότητα του συμπλέγματος IV της αναπνευστικής αλυσίδας δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα (Brunelle et al., 2005), γεγονός που υποδεικνύει ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων στο κυτόχρωμα C, διαδικασία που περιλαμβάνει την παραγωγή ROS και όχι την οξειδωτική φωσφορυλίωση, είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του HIF-2α. Ωστόσο, σε χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων βρέθηκε ότι για την επαγωγή του HIF-2α κατά την διάρκεια της υποξίας είναι απαραίτητα λειτουργικά μιτοχόνδρια, χωρίς να εμπλέκονται τα αυξημένα επίπεδα των ROS σε αυτή την επαγωγή (Brown and Nurse, 2008). Συνεπώς, η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι τα αυξημένα επίπεδα των ROS είναι απαραίτητα για την έκφραση του HIF-2α σε κάποια κύτταρα, ενώ σε άλλα κύτταρα κυριαρχούν εναλλακτικοί μηχανισμοί. Περαιτέρω δεδομένα προήλθαν από μελέτες σε ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου junD, τα οποία επιδεικνύουν αυξημένη παραγωγή ROS, οδηγώντας σε μη φυσιολογική έκφραση του HIF-2α σε νορμοξία. Σε αυτή την περίπτωση τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα H_2O_2 ανέστειλαν τη δράση των PHDs λόγω της οξείδωσης του Fe^{2+} , το οποίο είναι απαραίτητο για την αντίδραση της υδροξυλίωσης, οδηγώντας σε αυξημένη σταθεροποίηση του HIF-2α (Gerald et al., 2004, Gordan and Simon, 2007). Επίσης σε κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η pVHL, παρουσιάζεται αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα της οξειδάσης του NADPH, με αποτέλεσμα οι

ROS που παράγονται μέσω αυτής να διατηρούν σε υψηλά επίπεδα την έκφραση του HIF-2α και να συμβάλλουν στην νεφρική καρκινογένεση (Block et al., 2007).

A.2.3 Ρύθμιση από την διακοπτόμενη υποξία

Η διακοπτόμενη υποξία συμβαίνει όταν η συγκέντρωση του O₂ στους ιστούς εναλλάσσεται μεταξύ φυσιολογικών και υποξικών επιπέδων. Αυτή η κατάσταση της απουσίας O₂ σχετίζεται με την επαναλαμβανόμενη υπνική άπνοια, στην οποία παροδικές παύσεις της αναπνοής οδηγούν σε χρόνια διακοπτόμενη υποξία κατά τη διάρκεια του ύπνου. Κατά την διακοπτόμενη υποξία, η έκφραση του HIF-2α καταστέλλεται μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις καλπαίνες, πρωτεάσες που ενεργοποιούνται από το ιόντα Ca²⁺. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκφραση του αντιοξειδωτικού γονιδίου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD2), συνεισφέροντας στην αύξηση των ROS κατά την διακοπτόμενη υποξία και σε καρδιαγγειακές αντιδράσεις in vivo (Nanduri et al., 2015) (Εικόνα 7).

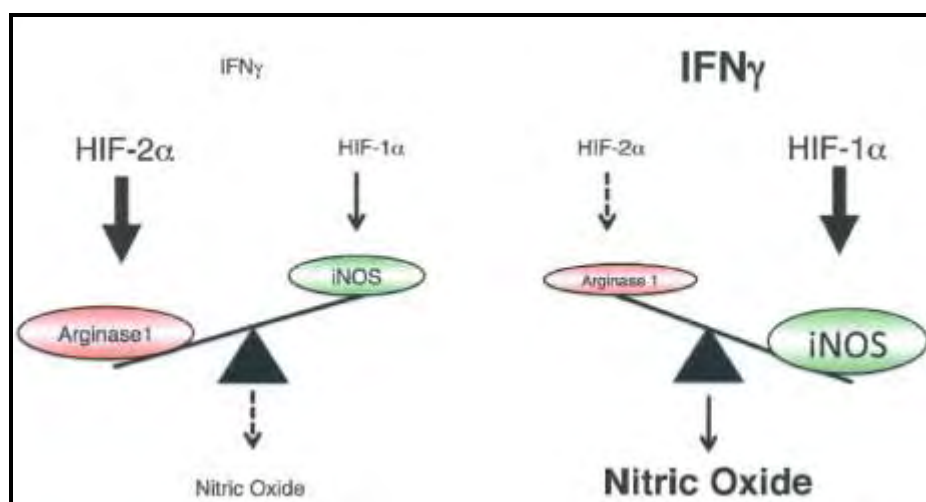


Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της απορρύθμισης των HIF-1 και HIF-2 κατά την χρόνια διακοπτόμενη υποξία (CIH) ως αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενης άπνοιας. Η απορρύθμιση των HIF επάγει την παραγωγή των ROS στο αντανακλαστικό μονοπάτι του καρωτιδικού σώματος (Nanduri et al., 2015).

A.3 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α

A.3.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν για το πώς ρυθμίζεται ο HIF-2α σε μεταγραφικό επίπεδο. Μια μελέτη υποστηρίζει ότι στα μακροφάγα, υπάρχει διαφορετική ενεργοποίηση και ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ισομορφών HIF, με τελικό αποτέλεσμα να διατηρείται η ομοιοστασία του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Takeda et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M2 επάγεται το mRNA του HIF-2α από τις ιντερλευκίνες IL-4 και IL-10 της οικογένειας Th2, οδηγώντας σε επαγωγή της αργινάσης 1 και καταστολή της σύνθεσης του NO. Αντίθετα, στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M1 επάγεται το mRNA του HIF-1α από την ιντερφερόνη γ (IFNγ) της οικογένειας Th1, οδηγώντας σε επαγωγή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) και της σύνθεσης του NO (Εικόνα 8).

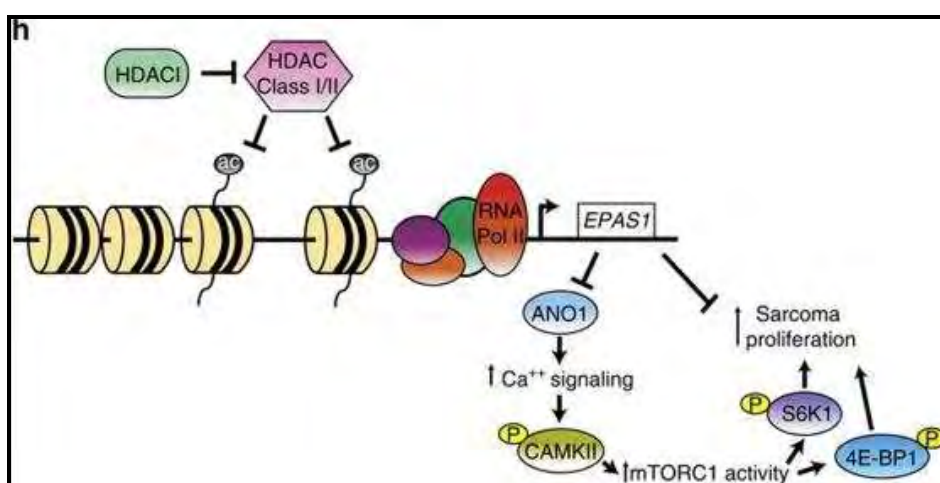


Εικόνα 8: Οι HIF-1α και HIF-2α ανταγωνίζονται για την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις IFNγ, επικρατεί ο HIF-2α και επάγει την έκφραση της αργινάσης 1, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή NO. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις IFNγ, επικρατεί ο HIF-1α και επάγει την έκφραση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), η οποία χρησιμοποιεί την αργινίνη1 για την παραγωγή NO. Αυτές οι φυσιολογικά ανταγωνιστικές λειτουργίες, επιτρέπουν στις HIFα υπομονάδες να ρυθμίζουν συντονισμένα την παραγωγή NO κατά έναν μεταγραφικά εξαρτώμενο τρόπο, επαγόμενο από τις κυτταροκίνες (Keith et al., 2012).

Επιπλέον, σύμφωνα με τα δεδομένα μια πρόσφατης μελέτης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού MDA-MB-468, η μεταγραφή του HIF-2α υπόκειται σε επιγενετική ρύθμιση από την πρωτεΐνη MBD3 (Methylated CpG binding protein 3) (Cui et al., 2016). Η MBD3 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου EPAS1 και ενισχύει τη

μεταγραφή του απομεθυλιώνοντας περιοχές CpG που εδράζονται γύρω από την θέση έναρξης της μεταγραφής. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα mRNA του HIF-2α αυξάνονται σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ανθεκτικά σε αντι-οιστρογόνα, μέσω ενός μηχανισμού που συνδέει τον HIF-2α και τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Alam et al., 2016).

Τέλος, σε μια πολύ πρόσφατη ερευνητική μελέτη σε ποντίκια με σάρκωμα, βρέθηκε ότι απουσία του HIF-2α επάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός λόγω αυξημένης σηματοδότησης μέσω ασβεστίου και mTORC1. Η απουσία του HIF-2α σε ιστούς σαρκώματος οφείλεται σε επιγενετική καταστολή του γονιδίου του λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του από τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDAC) (Nakazawa et al., 2016) (Εικόνα 9).

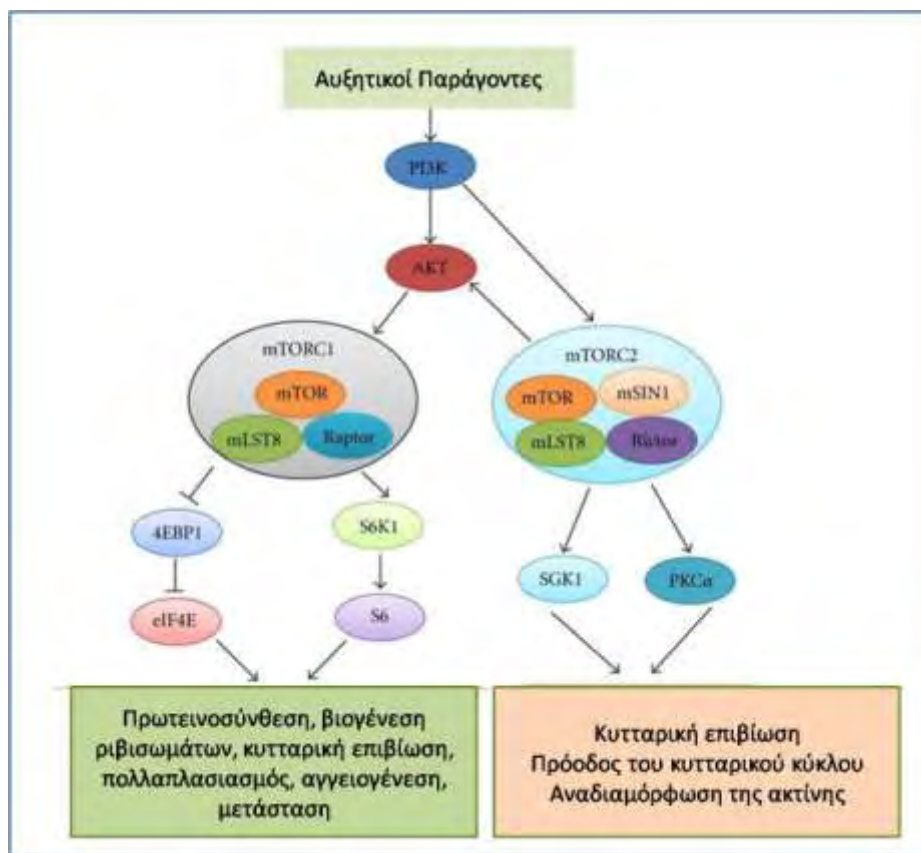


Εικόνα 9: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-2α μέσω επιγενετικής τροποποίησης. Η έκφραση του γονιδίου *EPAS1* καταστέλλεται επιγενετικά από τις τάξεις I και II των αποακετυλασών των ιστονών (HDACs). Η απώλεια του HIF-2α ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω ασβεστίου, οδηγώντας σε αυξημένη δράση του συμπλόκου mTORC1 και επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ποντίκια με σάρκωμα (Nakazawa et al., 2016).

A.3.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού PI3K1AKT/mTOR, έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-2α. Στη ρύθμιση αυτή συμμετέχει μια ποικιλία μορίων που διεγείρουν τη μετάφραση του mRNA του HIF-2α με ιστοειδικό τρόπο (Keith et al., 2012). Υπάρχουν δύο διακριτά σύμπλοκα mTOR που ονομάζονται mTORC1 και mTORC2. Το σύμπλοκο mTORC1 είναι ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη και αποτελείται από το mTOR και την πρωτεΐνη Raptor (regulatory-associated protein of mTOR). Το mTORC1 ενεργοποιείται από την AKT και στη συνέχεια επάγει την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης της p70 S6 κινάσης και της 4E-BP1. Αντίθετα, το mTORC2 δεν αναστέλλεται από την

ραπαμυκίνη, αποτελείται από το mTOR και την πρωτεΐνη Raptor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) και αντίθετα από το mTORC1, ενεργοποιεί την AKT μέσω φωσφορυλίωσης (Gao et al., 2012) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR (Gao et al., 2012).

Η βιβλιογραφία περιγράφει ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από το mTORC2 και όχι από το mTORC1 πιθανόν μέσω οξειδοαναγωγικής ρύθμισης του mTORC2, ενώ η έκφραση του HIF-1α εξαρτάται και από τα δύο σύμπλοκα σε κύτταρα νεφρικού καρκίνου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από την ισομορφή AKT2 ενώ η έκφραση του HIF-1α από την ισομορφή AKT3 (Toschi et al., 2008, Nayak et al., 2013). Μια πρόσφατη μελέτη, επιβεβαίωσε την εξάρτηση του HIF-2α από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-mTORC2, το οποίο φαίνεται επίσης να ελέγχει τη μεταγραφή του HIF-2α και να καθορίζει το βαθμό αγγείωσης σε όγκους νευροβλαστώματος (Mohlin et al., 2015).

Ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α σε μεταφραστικό επίπεδο, προτείνει ότι ο HIF-2α περιέχει ένα συντηρημένο και λειτουργικό στοιχείο απόκρισης στο σίδηρο (iron-responsive element, IRE) στη 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) του mRNA του και μέσω αυτού του IRE, η σιδηρορυθμιζόμενη πρωτεΐνη που συνδέεται

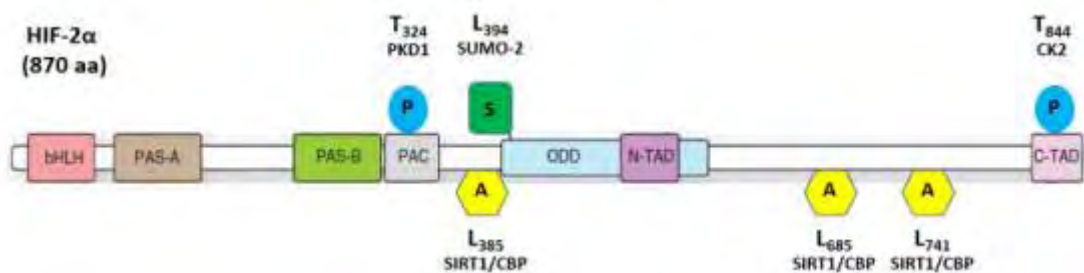
στο IRE (IRE binding protein1, IREBP1) ρυθμίζει την μετάφραση του mRNA του *EPAS1* ανάλογα με την διαθεσιμότητα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Σε συνθήκες υποξίας όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι ανεπαρκή η IREBP1 συνδέεται στο IRE στο 5'UTR του mRNA του *EPAS1* και αναστέλλει την μετάφραση του HIF-2α (Sanchez et al., 2007). Αυτή η ρύθμιση είναι ειδική για τον HIF-2α επειδή η IREBP1 δεν μπορεί να συνδεθεί στο mRNA του *HIF-1A* ή να ρυθμίσει την μετάφρασή του (Zimmer et al., 2008). Πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι στον παραπάνω μηχανισμό εμπλέκεται η κυκλοπεντόνη της προσταγλανδίνης (15d-PGJ2), μια αντι-φλεγμονώδης προσταγλανδίνη η οποία ενισχύει άμεσα την ενεργότητα και την πρόσδεση της IREBP1 στο IRE του HIF-2α τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας (Zimmer et al., 2010).

A.3.3 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας

Οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν περιγραφεί σχετικά με την ρύθμιση της πρωτεϊνικής σταθερότητας του HIF-2α είναι ελάχιστοι. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, η σταθερότητα του HIF-2α ελέγχεται από μια επικρατή ισομορφή της PI3K στα μακροφάγα μέσω της σηματοδοτικής οδού PTEN/PI3K/AKT (Joshi et al., 2014). Συγκεκριμένα, σε ποντίκια στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN* και επομένως η οδός PI3K/AKT είναι ενεργοποιημένη, παρατηρήθηκε αναστολή της αποδόμησης του HIF-2α μέσω του 26S προτεασώματος και η p110 ταυτοποιήθηκε ως η κυρίαρχη ισομορφή της PI3K που είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση αυτή. Αντιθέτως όταν η οδός PI3K/AKT μπλοκάρεται είτε μέσω του PTEN είτε με χρήση αναστολέων, παρεμποδίζεται η φωσφορυλίωση μιας E3 λιγάσης, οδηγώντας στον κυτταροπλασματικό της εντοπισμό και τελικά στην αποδόμηση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας.

A.3.4 Ρύθμιση από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Ο HIF-2α υπόκειται σε πληθώρα μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων ανεξάρτητων του οξυγόνου, οι οποίες ρυθμίζουν την πρωτεϊνική του σταθερότητα, τη μεταγραφική του ενεργότητα και την αλληλεπίδρασή του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 11).

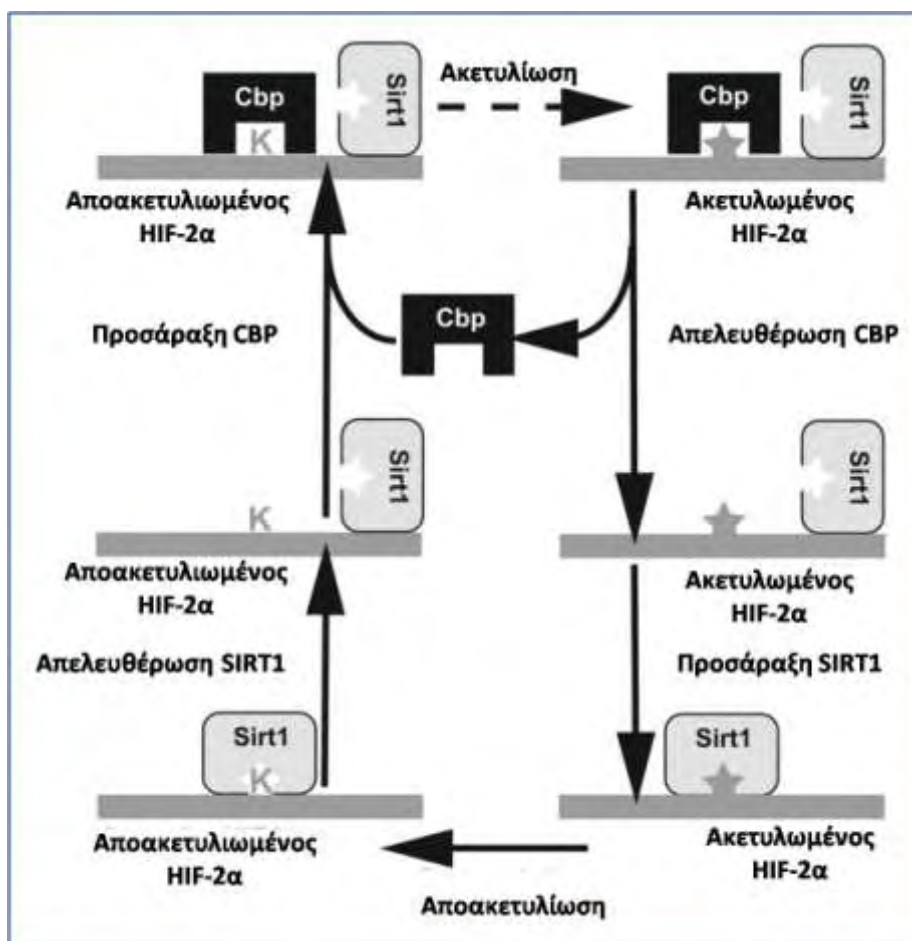


Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων του HIF-2α. Η πρωτεϊνική σταθερότητα και η μεταγραφική ενεργότητα των HIF-2α ρυθμίζεται από πολλές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στην εικόνα αναφέρονται ενδεικτικά τα ένζυμα που ευθύνονται για αυτές τις τροποποιήσεις.

A.3.4.1 Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση είναι μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία μια ακετυλομάδα προστίθεται σε κατάλοιπα λυσίνης (K) μέσω των ακυλοτρανσφερασών. Η αντίστροφη διεργασία ονομάζεται αποακετυλίωση, όπου τα ένζυμα αποακετυλάσες αφαιρούν την ακετυλομάδα. Ο HIF-2α ρυθμίζεται από μια οικογένεια αποακετυλασών ευαίσθητων στο οξειδοαναγωγικό στρες και εξαρτώμενων από το NAD⁺, που ονομάζονται σιρτουίνες. Στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζονται 7 ισομορφές τους (SIRT1-7), οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, του μεταβολισμού και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Keith et al., 2012). Έχει αναφερθεί ότι ο HIF-2α ακετυλιώνεται σε κατάλοιπα λυσίνης από τον παράγοντα CBP και αποακετυλιώνεται από την SIRT1 με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα αναφορικά με το ρόλο αυτών των τροποποιήσεων (Εικόνα 12). Αρχικά, είχε προταθεί ότι η SIRT1 σχηματίζει σε υποξία σύμπλοκο με τον HIF-2α και τον αποακετυλιώνει άμεσα στα κατάλοιπα λυσίνης Lys-385, Lys-685 και Lys-741 (Dioum et al., 2009). Ως αποτέλεσμα, ενισχύεται η πρόσδεση του HIF-2α στον υποκινητή της EPO, και κατ' επέκταση η δράση του *in vitro* σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B. Επιπλέον στην ίδια μελέτη, το σύστημα SIRT1/HIF-2α βρέθηκε να ρυθμίζει και *in vivo* σε ποντίκια, την νεφρική και ηπατική έκφραση της EPO. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι η SIRT1 επάγεται από την υποξία κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον HIF-2, καθώς ανακαλύφθηκε ότι φέρει στον υποκινητή της HRE, στο οποίο προσδένεται ο HIF-2, υποδεικνύοντας έτσι ένα σύστημα ανατροφοδότησης μεταξύ SIRT1/HIF-2α (Chen et al., 2011). Η ίδια ερευνητική ομάδα σε επομένη μελέτη, ταυτοποίησε τον παράγοντα CBP, ως την ακετυλάση που είναι υπεύθυνη για την παραπάνω σηματοδοτική ρύθμιση, υποδεικνύοντας παράλληλα μια νέα σχέση αλληλεπίδρασης ενζύμου-υποστρώματος

μεταξύ CBP/HIF-2α, εκτός της καλά χαρακτηρισμένης ρύθμισης στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α (Chen et al., 2012).



Εικόνα 12: Ρύθμιση του HIF-2α μέσω Sirt1/CBP. Όταν ο HIF-2α υδροξυλιώνεται από τον FIH-1, δε μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον CBP στην επικράτεια C-TAD, αλλά αλληλεπιδρά μαζί του μέσω ενός άλλου μηχανισμού που περιλαμβάνει τον σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και την ακετυλίωσή του από τον CBP. Μετά την ακετυλίωση, ο CBP δε μπορεί να παραμείνει προσδεμένος στον HIF-2α και αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο. Στη συνέχεια, ο ακετυλιωμένος HIF-2α αποακετυλιώνεται από την Sirt1, η οποία μπορεί να προσδένεται στον HIF-2α ανεξάρτητα από το εάν είναι ακετυλιωμένος ή όχι. Ο αποακετυλιωμένος HIF-2α είναι σε θέση να δεσμεύσει ξανά τον CBP για να ξαναρχίσει η παραπάνω κυκλική διαδικασία (Chen et al., 2012).

A.3.4.2 Σουμοϋλίωση

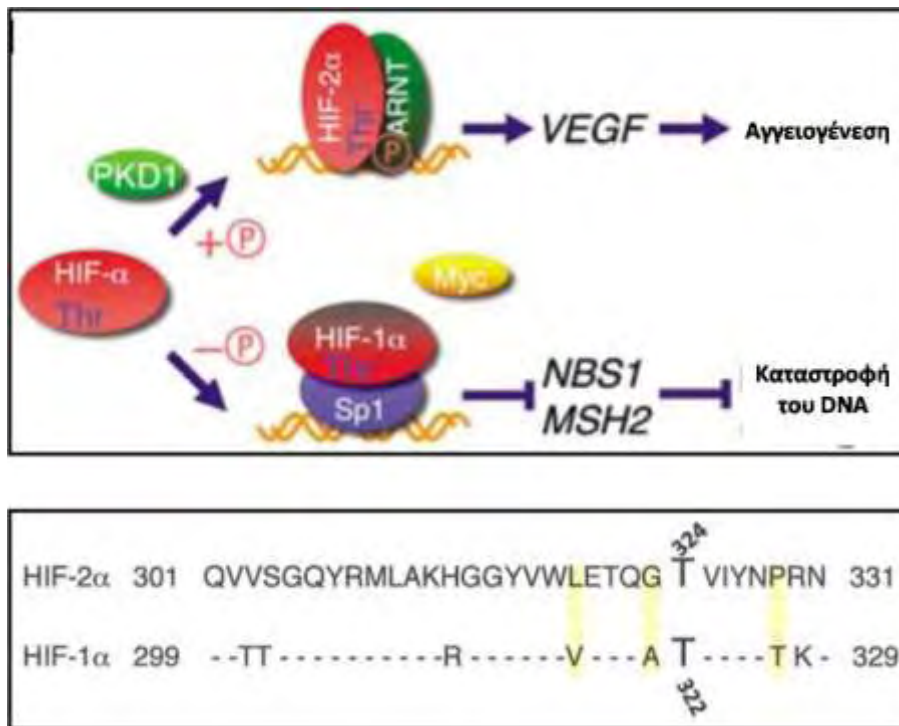
Η SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier) είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικουιτίνη στη δομή και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με ένα παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό. Η σουμοϋλίωση είναι μια διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες δεν οδηγούνται απαραίτητα για αποικοδόμηση όπως στην ουβικιτινίωση, αλλά έχει συνδεθεί με διάφορα μονοπάτια όπως η ενδοκυτταρική μεταφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η DNA αντιγραφή και επιδιόρθωση, ο RNA μεταβολισμός και η κυτταρική σηματοδότηση (Muller et al., 2001).

Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α είναι πρωτεΐνη στόχος για σουμοϋλίωση και ότι περιέχει δύο αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, LK₃₉₄EE και LK₄₉₇IE. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στην λυσίνη 394 του HIF-2α με αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Ο σουμοϋλιωμένος HIF-2α ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες RNF4 λιγάση, SENP1 πρωτεάση και τον VHL και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (**van Hagen et al., 2010**).

A.3.4.3 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση είναι μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία μια φωσφορική ομάδα προστίθεται σε κατάλοιπα θρεονίνης, σερίνης ή τυροσίνης (T, S, Y) από ένζυμα που ονομάζονται κινάσες. Η αντίστροφη διεργασία ονομάζεται αποφωσφορυλίωση, όπου τα ένζυμα φωσφατάσες αφαιρούν τη φωσφορική ομάδα. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-324 από την κινάση της πρωτεΐνης DI (PKD1) με αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασής του με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1 (Specificity Protein 1) και την επαγωγή της έκφρασης του απαραίτητου για την επιδιόρθωση του DNA παράγοντα νιμπρίνη (NSBS1) (**To et al., 2006**). Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από ένα γειτονικό κατάλοιπο προλίνης το οποίο είναι μοναδικό στον HIF-2α, με αποτέλεσμα ο HIF-1α να μη φωσφορυλιώνεται στην αντίστοιχη θρεονίνη Thr-322, και έτσι να καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA λόγω μη σύνδεσης με τον MYC αλλά με τον SP1. Τα παραπάνω, αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των υπομονάδων HIFα, μπορεί να επηρεάσει διακριτά την αλληλεπίδρασή τους με συμπαραγοντες, οδηγώντας σε διαφορετικές λειτουργίες και διαφορετικούς φαινοτύπους (**Εικόνα 13**).

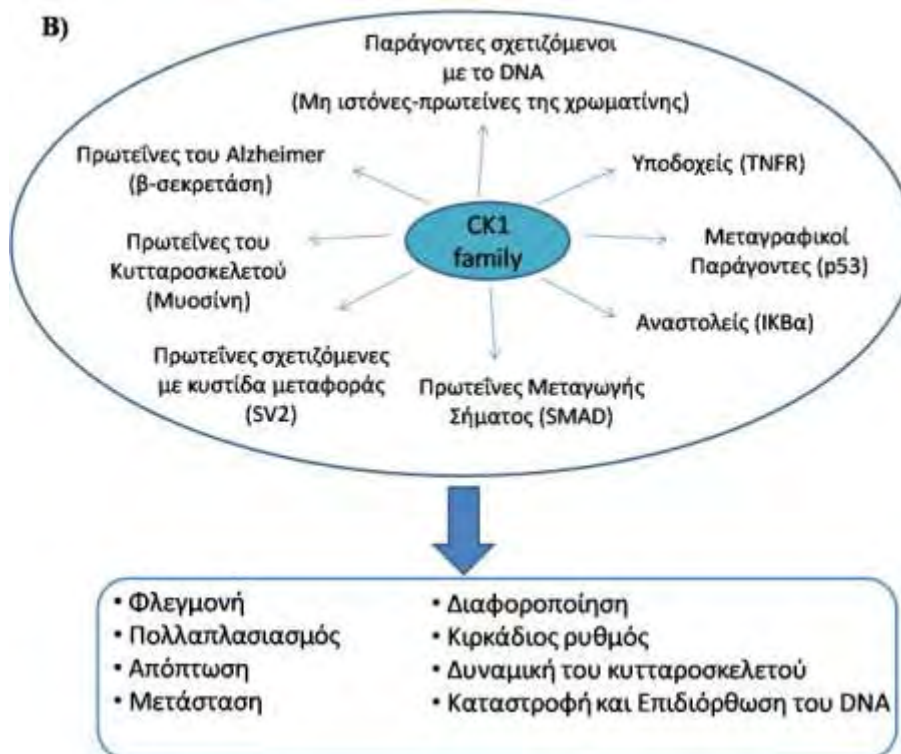
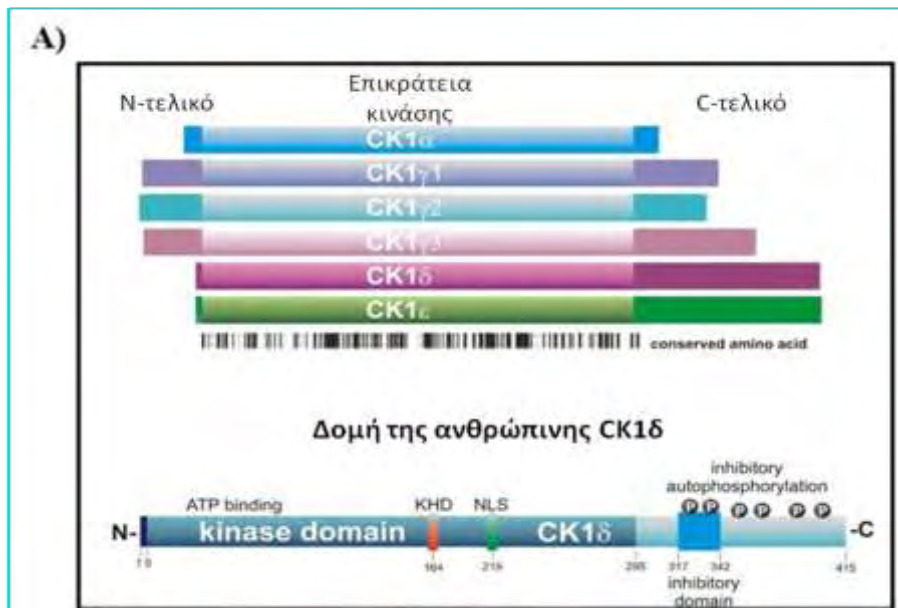
Επίσης, ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεινης 2 (CK2) στο συντηρημένο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-844 της επικράτειας C-TAD, γεγονός που φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας (**Gradin et al., 2002**). Η αύξηση αυτή, μάλλον οφείλεται στο ότι η φωσφορυλίωση μειώνει την συγγένεια του HIF-2α με τον ανασταλτικό παράγοντα FIH (**Lancaster et al., 2004**).



Εικόνα 13: Δομικό και λειτουργικό μοντέλο της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την PDK1. Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την PDK1 στην θρεονίνη 324. Η αντίστοιχη θρεονίνη (T322) του HIF-1α δεν φωσφορυλιώνεται από την PDK1 με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA λόγω μη σύνδεσης με τον MYC αλλά με τον SP1 (Keith et al., 2012, To et al., 2006).

A.3.4.4 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1)

Οι κινάσες της καζεΐνης 1 (CK1) ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης. Στα θηλαστικά εκφράζονται 7 ισομορφές τους (α,β,γ1,γ2,γ3,δ και ε), όπου σε όλες η επικράτεια που είναι υπεύθυνη για τη δράση της κινάσης είναι εξελικτικά συντηρημένη, με τις ισομορφές δ και ε να εμφανίζουν τη μέγιστη ομολογία. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 140 υποστρώματά τους *in vivo* και *in vitro* (Εικόνα 14). Ο χαρακτηρισμός της εξειδίκευσης στην αναγνώριση του υποστρώματος από τις ισομορφές της CK1 αρχικά οδήγησε στην ταυτοποίηση της ομόφωνης αλληλουχίας S/T(P)-X1-2-S/T, υποδεικνύοντας ότι η τροποποίηση των καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης από τη CK1 απαιτεί προηγούμενη φωσφορυλίωση άλλου καταλοίπου που βρίσκεται αμινοτελικά του καταλοίπου στόχου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μια ομάδα όξινων αμινοξέων που προηγούνται της σερίνης/θρεονίνης ή ένα όξινο αμινοξύ στη θέση N-3 μπορεί να υποκαταστήσει ικανοποιητικά το απαιτούμενο 'φωσφο-αμινοξύ'.



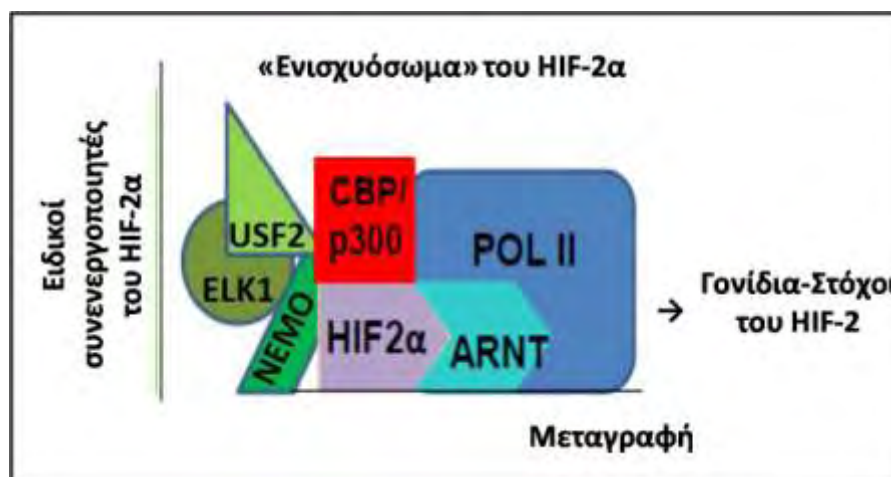
Εικόνα 14: (A) Σχηματική απεικόνιση των ισομορφών των κινασών CK1 που εκφράζονται στα θηλαστικά και της δομής της ισομορφής CK1 δ . (B) Σχηματική απεικόνιση των υποστρωμάτων που φωσφορυλιώνουν οι κινάσες της οικογένειας CK1 και οι κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται.

Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση ενός υποστρώματος από την CK1 δεν φαίνεται να εξαρτάται αυστηρά από την ομόφωνη αλληλουχία επειδή πολλές φορές παίζει πολύ πιο σημαντικό ρόλο η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης υποστρώματος (Knippschild et al., 2014). Στα υποστρώματα των κινασών CK1

ανήκουν μια μεγάλη ποικιλία από ενδοκυττάρια πρωτεΐνες όπως ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες, ογκογονίδια ιικής προέλευσης, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού μέχρι μεμβρανοσύνδετες πρωτεΐνες και υποδοχείς. Φαίνεται λοιπόν ότι έχουν κύριους ρυθμιστικούς ρόλους σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο κικλάδιος ρυθμός, η επιδιόρθωση του DNA, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Έχει αναφερθεί ότι απορρύθμιση ή δυσλειτουργία τους στα μονοπάτια όπου εμπλέκονται οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ογκογένεση. Η δράση τους ρυθμίζεται από πολλούς μηχανισμούς. Ενδεικτικά αναφέρονται: ανασταλτική αυτοφωσφορυλίωση, φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες, αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και υποκυτταρική διαμερισματοποίηση (Schitteck and Sinnberg, 2014).

A.3.5 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες.

Ο HIF-2α, συνεργάζεται με πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων, ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές στοχεύουν στην αυστηρή ρύθμισή του σε επίπεδο σταθερότητας και δράσης, στην εξειδίκευσή του ως προς τα γονίδια-στόχους του και στην διαφοροποίησή του από τον HIF-1α (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Ο HIF-2α δρα ως μέρος μεταγραφικών συμπλόκων που ονομάζονται ενισχυόσωμα.

Ο HIF-2α πετυχαίνει την εξειδίκευση ως προς τα γονίδια στόχους του, αλληλοεπιδρώντας εξειδικευμένα με μεταγραφικούς συμπαραγόντες όπως οι USF2, ELK1 και NEMO, πάνω στους υποκινητές των γονιδίων του (Pawlus et al., 2013).

A.3.5.1 ETS-1

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας ETS-1 συμμετέχουν στον έλεγχο κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η μετάσταση.

Έχει δειχθεί πως υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση της επικράτειας N-TAD του HIF-2α με την επικράτεια που φέρει το εξώνιο VII του ETS-1, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *FLK1*, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου 2 του VEGF (Elvert et al., 2003). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη ταυτοποιήθηκε ακόμη ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση σε υποξία, εξαρτάται από τη συνεργασία μεταξύ HIF-2 και ETS-1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου 1 του ιού της λευχαιμίας Feline (*Flycr1*) και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ως γονίδιο υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του HIF-2 (Fiorito et al., 2014).

A.3.5.2 ELK-1

Ο ELK-1 είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS-1 που περιγράφεται παραπάνω. Έχει αναφερθεί πως η δράση του αυξάνει μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση MAPK ως απόκριση στην υποξία (Muller et al., 1997). Σε κύτταρα MCF-7 έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-2α και ELK-1 απαιτείται για την βέλτιστη επαγωγή σε υποξικές συνθήκες, γονιδίων στόχων του HIF-2 που στον υποκινητή τους φέρουν κοντά στα HREs και στοιχεία πρόσδεσης για τον ELK-1 (*CITED2*, *WISP2*) (Aprelikova et al., 2006). Σε μια επόμενη μελέτη επιβεβαιώθηκε η σημασία της αλληλεπίδρασης των HIF-2/ ELK-1 για την επαγωγή επιπλέον γονιδίων στόχων του HIF-2 (*EPO*, *PAI-1*) σε κύτταρα Hep3B. Ωστόσο το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση αυτή δεν είχε καμία επίδραση στην επαγωγή της έκφρασης μιας άλλης ομάδας γονιδίων στόχων του HIF-2 (*IGFBP-1*, *ADM*, *NDRG-1*), προτείνει ότι ο ELK-1 δε δρα ως γενικός ενεργοποιητής των γονιδίων του HIF-2, αλλά ότι η δράση του εξαρτάται από την αλληλουχία του εκάστοτε υποκινητή (Hu et al., 2007).

A.3.5.3 NEMO

Ο ειδικός ρυθμιστής του NF-κB (NEMO) έχει βρεθεί να αλληλοεπιδρά ειδικά με την επικράτεια C-TAD του HIF-2α και να προωθεί την προσάραξη του συνενεργοποιητή p300 σε αυτή, ενισχύοντας τελικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2. Η ιδιαιτερότητα αυτής της αλληλεπίδρασης έγκειται στο γεγονός ότι οδηγεί σε ενεργοποίηση του HIF-2 σε συνθήκες νορμοξίας (Bracken et al., 2005).

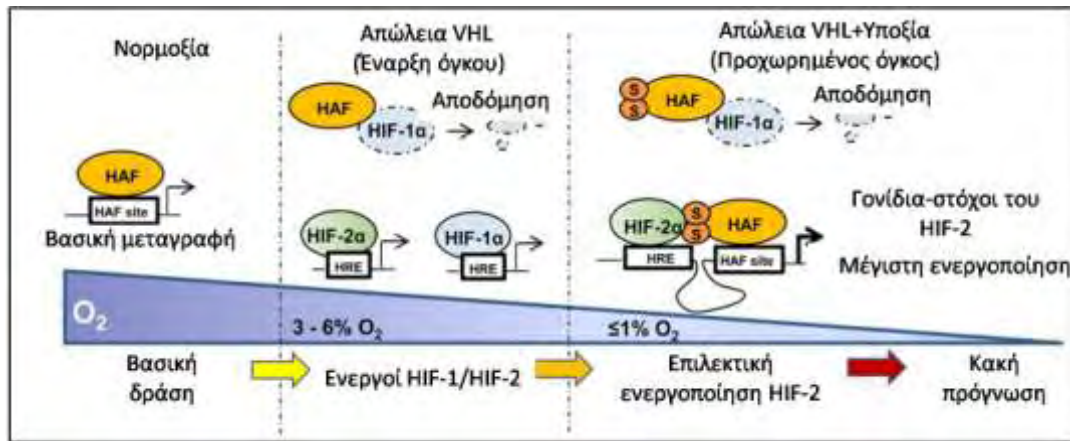
A.3.5.4 USF2

Ο Upstream Stimulatory Factor (USF2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται ευρέως και δρα ως διμερές. Έχει αναφερθεί ότι αποτελεί απαραίτητο συστατικό ενός μεταγραφικού συμπλόκου που ενεργοποιεί καθολικά τα γονίδια στόχους του HIF-2 σε υποξία, και το οποίο επίσης περιλαμβάνει τους HIF-2, p300 και την RNA πολυμεράση II. Η παρουσία του USF2 στο παραπάνω σύμπλοκο είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-2 σε υποξία, καθώς ο ρόλος του USF2 είναι να στρατολογήσει τους CBP και p300 πάνω στους υποκινητές των εξαρτώμενων από τον HIF-2 γονιδίων (**Pawlus et al., 2012**). Επιπλέον, έχει δείχθει ότι τα εξειδικευμένα γονίδια στόχοι του HIF-2, *EPO* και *PAI-1*, φέρουν στους υποκινητές τους στοιχεία πρόσδεσης για τον USF2, ο οποίος μπορεί να προσδένεται και να επάγει τη μεταγραφή τους ανεξάρτητα από την πρόσδεση του HIF-2α. Ωστόσο, απαιτείται η στρατολόγηση και των δύο παραγόντων στους παραπάνω υποκινητές, προκειμένου να έχουμε τη βέλτιστη ενεργοποίηση της μεταγραφής (**Pawlus et al., 2013**).

A.3.5.5. HAF

Ο παράγοντας που επάγεται από την υποξία (HAF), έχει σημαντικό ρόλο στην συγκρότηση των ώριμων σωματίων ματίσματος (spliceosomes). Έχει δείχθει πως υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση της επικράτειας C-TAD του HIF-2α (αμινοξέα 604-750) με την επικράτεια 300-500 του HAF, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 (**Koh et al., 2011**). Προτείνεται ότι η έκφραση του HAF σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος μετατοπίζει την ισορροπία της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία προς τη μεταγραφή γονιδίων που εξαρτώνται από τον HIF-2 και όχι από τον HIF-1, όπως το *OCT4* και το *MMP9*, προωθώντας τελικά έναν επιθετικό καρκινικό φαινότυπο. Πρόσφατα, η ίδια ομάδα διαλεύκανε το μηχανισμό μέσω του οποίου η αλληλεπίδραση HIF-2/HAF οδηγεί στην βέλτιστη ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-2. Βρέθηκε ότι σε υποξία, ο HAF σουμουλιώνεται σε δύο κατάλοιπα λυσίνης (K94, K141). Η τροποποίηση αυτή είναι απαραίτητη ώστε να καταφέρει ο HAF να προσδεθεί στον HIF-2α και να σχηματιστεί ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο, το οποίο με τη σειρά του θα προσδεθεί τόσο σε HREs, όσο και σε κοντινά στοιχεία απόκρισης στον HAF πάνω στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του HIF-2. Επιπλέον, ο HAF λειτουργεί ως E3 λιγάση για τον HIF-

1α στον οποίο προσδένεται οδηγώντας τον σε αποδόμηση, προωθώντας την μέγιστη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2 (Koh et al., 2015) (Εικόνα 16).

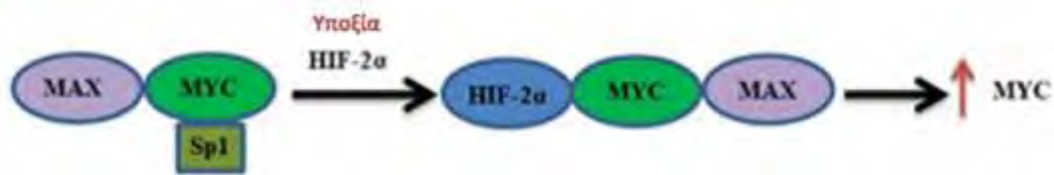


Εικόνα 16: Προτεινόμενο μοντέλο για τη ρύθμιση των ισομορφών HIF-α από τον παράγοντα HAF. Σε συνθήκες νορμοξίας όπου οι HIF απουσιάζουν, ο παράγοντας HAF είναι αποσυμυλιωμένος και επάγει τη βασική μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Κατά την έναρξη του όγκου, η απώλεια της VHL οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση των HIF, ενώ ο HAF λειτουργεί ως E3 λιγάση για τον HIF-1α. Όσο εξελίσσεται ο όγκος, επικρατούν συνθήκες υποξίας που οδηγούν στη συμυλίωση του HAF. Η συμυλίωση επιτρέπει στον HAF να προσδεθεί στον HIF-2α και οδηγεί σε μέγιστη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2. Ταυτόχρονα, ο HAF εξακολουθεί να προσδένεται και να αποδομεί και να αναστέλλει τον HIF-1α ανεξαρτήτως της συμυλίωσης, προωθώντας την περαιτέρω ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2 στο νεφρικό καρκίνωμα (cRCC) (Koh et al., 2015).

A.3.5.6 c-MYC

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-MYC κωδικοποιεί έναν μεταγραφικός παράγοντας που υπερεκφράζεται στο 40% των ανθρώπινων καρκίνων. Ελέγχει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη MAX και επάγοντας την έκφραση γονιδίων όπως η κυκλίνη D2 (*CCND2*) και ο *E2F1*. Καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27, απομακρύνοντας τον παράγοντας SP1 από τον παράγοντα MIZ1 (Dang et al., 2008).

Ο HIF-2α σε υποξία, σχηματίζει σύμπλοκο με το MYC, προκαλώντας τη σταθεροποίηση των συμπλόκων MYC-MAX και MYC-MAX-SP1, την αυξημένη πρόσδεση των παραπάνω στους υποκινητές των γονιδίων *CCND2*, *E2F1*, *p21*, και *p27*, οδηγώντας τελικά σε ταχύτατη είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και σε ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Gordan and Simon, 2007) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Ρύθμιση του MYC από τον HIF-2α ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ (Zhao et al., 2015b).

Αντίθετα, έχει προταθεί ότι η ρύθμιση του c-MYC από τον HIF-2α, μπορεί να προωθή τη γενωμική ακεραιότητα και την αντίσταση στο στρες της αντιγραφής. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα νεφρικού καρκίνου (RCC) τα οποία εκφράζουν αποκλειστικά HIF-2α, παρατηρήθηκε μειωμένη γενωμική αστάθεια, η οποία συσχετίστηκε με την αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA (BRCA 1, BARD1, XRCC2, BUB1, CENPE) και των οποίων η έκφραση εξαρτάται από τη δράση του c-MYC (Gordan et al., 2008). Σε μια πρόσφατη μελέτη ωστόσο, βρέθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας, η πρωτεΐνη του c-MYC είναι ασταθής λόγω αυξημένης αποδόμησης τόσο από το πρωτεάσωμα, όσο και από τον μονοπάτι των καθεσπινών, και ότι η ρύθμιση αυτή εξαρτάται από την ενορχηστρωμένη έκφραση και δράση των HIF-1α και HIF-2α. Επιπλέον η καταστολή του c-MYC από την υποξία, εμποδίζει την έκφραση γονιδίων του με προ-αποπτωτικές λειτουργίες (NOXA) και συμβάλλει στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κάτω από υποξικό στρες (Wong et al., 2013). Το εύρημα αυτό, αντικρούει τα προηγούμενα δεδομένα περί θετικής ρύθμισης του c-MYC από τον HIF-2α, με μια πιθανή εξήγηση να είναι ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των ισομορφών HIF-α, ενδεχομένως καθορίζουν το εάν η υποξία θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση ή αναστολή του c-MYC.

A.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

A.4.1 Εμβρυογένεση

Η ανάπτυξη των συστημάτων μεταφοράς οξυγόνου κατά την εμβρυογένεση, είναι μια διαδικασία συντηρημένη στα μετόζωα, και εξαρτάται άμεσα από τις μεταβολές των επιπέδων οξυγόνου στους υπό διαφοροποίηση ιστούς. Έχει παρατηρηθεί ότι το υποξικό περιβάλλον (1%-5% O₂) κατά την εμβρυογένεση, υποβοηθά τη μορφογένεση του καρδιαγγειακού, του αναπνευστικού και του νευρικού συστήματος, καθώς και την ανάπτυξη του πλακούντα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις προήλθαν από πειράματα που έγιναν σε έμβρυα ποντικών, στα οποία έγινε απαλοιφή γονιδίων που σχετίζονται

με το μονοπάτι της υποξίας και ειδικότερα των γονιδίων του HIF-1α, HIF-2α και ARNT.

Η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α (HIF-2α^{-/-}) σε ποντίκια επιχειρήθηκε από αρκετές ερευνητικές ομάδες και παρουσίασε διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τη σειρά πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκε λόγω του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου. Η πρώτη ερευνητική ομάδα που δημιούργησε HIF-2α^{-/-} ποντίκια ανέφερε ότι η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α οδήγησε σε θάνατο στο μέσο της κύησης λόγω βραδυκαρδίας προκαλούμενη από ανεπαρκή παραγωγή κατεχολαμινών, και πρότειναν ότι ο HIF-2α ρυθμίζει την εμβρυική σύνθεση των κατεχολαμινών σε συνθήκες υποξίας. Επίσης, τα ομόζυγα νεογνά πέθαναν σύντομα μετά από τη γέννηση τους λόγω της ατελούς εμβρυϊκής ωρίμανσης των πνευμόνων (**Tian et al., 1998**).

Μια άλλη ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α οδήγησε σε θάνατο κατά τις εμβρυονικές ημέρες 9,5-13,5 λόγω ανεπαρκούς συγχώνευσης αγγείων και αναδιαμόρφωσής τους (**Peng et al., 2000**). Μία τρίτη ομάδα ανέφερε ότι τα μισά HIF-2α^{-/-} ποντίκια πέθαναν μετά την εμβρυονική ημέρα 13,5, ενώ αυτά που επέζησαν πέθαναν 2-3 ημέρες μετά τη γέννηση λόγω συνδρόμου αναπνευστικής δυσφορίας (**Compernelle et al., 2002**). Συμπερασματικά, η φυσιολογική υποξία που παρουσιάζεται *in utero* είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του καρδιαγγειακού-αναπνευστικού συστήματος (**Doedens and Johnson, 2007, Simon and Keith, 2008**).

A.4.2 Ανάπτυξη

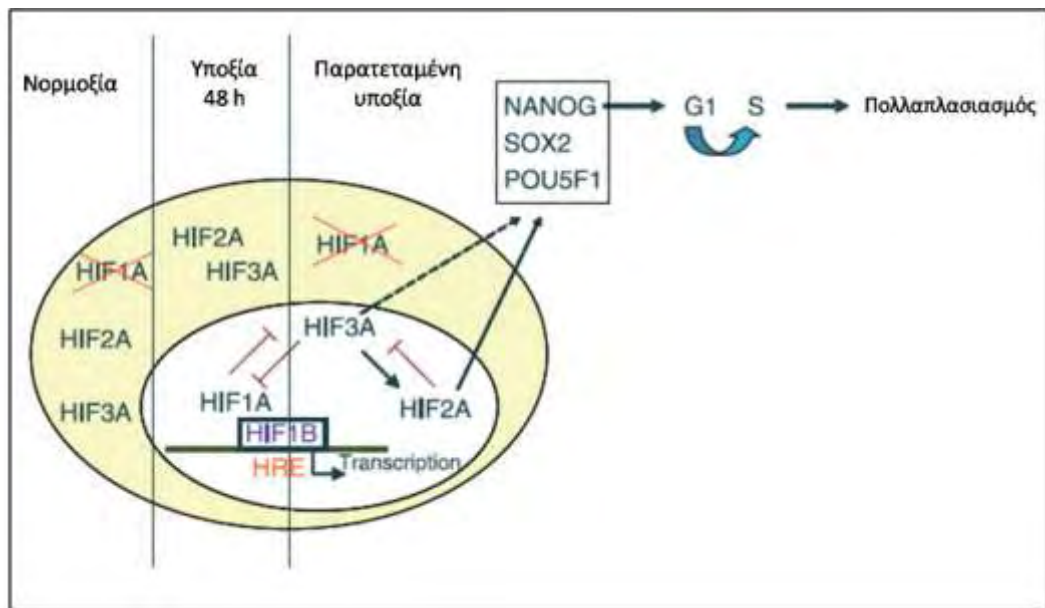
Σημαντικός ρόλος έχει αποδοθεί στον HIF-2 επίσης για την ανάπτυξη του ήπατος. Το ήπαρ είναι ένα όργανο με σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, στην αποτοξίνωση και στη διατήρηση της ομοιόστασης. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, το εμβρυικό ήπαρ των σπονδυλωτών, υφίσταται μια σειρά από μορφογενετικές διεργασίες που είναι γνωστές ως ηπατογένεση. Η ηπατογένεση χωρίζεται σε τρεις διαδικασίες: τον προσδιορισμό του ενδοδέρματος, τη διαφοροποίηση των ηπατοβλαστών και τον σχηματισμό της ηπατικής απόφυσης. Σε μια πρόσφατη μελέτη, δείχθηκε ότι HIF-2α^{-/-} έμβρυα zebrafish αδυνατούσαν να σχηματίσουν ηπατική απόφυση. Ο HIF-2 δεν φάνηκε να εμπλέκεται σε κανένα από τα δύο πρώτα στάδια της ηπατογένεσης, ωστόσο είχε κύριο ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων κατά τη διάρκεια σχηματισμού της ηπατικής απόφυσης. Στον

ρυθμιστικό αυτό μηχανισμό, εμπλέκεται το γονίδιο *leg1* (liverenriched gene 1) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη έκκρισης απαραίτητη για τον σχηματισμό της ηπατικής απόφυσης, και το οποίο βρίσκεται υπό τον άμεσο μεταγραφικό έλεγχο του HIF-2 (Lin et al., 2014).

Επίσης σημαντικό ρόλο φαίνεται να κατέχει ο HIF-2 και στη σπερματογένεση, μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των σπερματογόνων βλαστικών κυττάρων σε ώριμα σπερματοζώα. Απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α σε ποντίκια μετά τη γέννησή τους, οδηγεί σε στειρότητα συνοδευόμενη από μειωμένο μέγεθος όρχεων και βάρους. Τα κύτταρα Sertoli που δεν εκφράζουν HIF-2α, εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού στεγανών συνδέσεων, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο φραγμός μεταξύ αίματος και όρχεων που είναι απαραίτητος για τη σπερματογένεση. Επιπλέον, σε όρχεις από HIF-2α ^{-/-} ποντίκια, παρατηρείται πρόωρη απελευθέρωση ατελώς διαφοροποιημένων σπερματικών κυττάρων, λόγω διατάραξης της βασικής μεμβράνης που περιβάλλει τα σπερματικά σωληνάρια (Gruber et al., 2010). Στην κατεύθυνση αυτή κινείται και μια πρόσφατη μελέτη μεταγραφικής ανάλυσης (transcriptome analysis), η οποία ταυτοποίησε τους HIF-2α και ARNT ως τους βασικούς ρυθμιστές του μεταγραφικού προγράμματος των κυττάρων Sertoli (Zimmermann et al., 2015).

A.4.3 Διαφοροποίηση

Η διαίρεση, διαφοροποίηση και λειτουργία των βλαστοκυττάρων, των γεννητικών κυττάρων και άλλων πολυδύναμων προγονικών κυττάρων, βρίσκεται υπό την επίδραση πολύπλοκων σημάτων από το μικροπεριβάλλον τους, στα οποία περιλαμβάνεται και η υποξία. Είναι γνωστό ότι ένα από τα εξειδικευμένα γονίδια στόχους του HIF-2, είναι ο παράγοντας Oct-4, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των εμβρυονικών κυττάρων (ES) (Covello et al., 2006). Σε μια επόμενη μελέτη όπου εξετάστηκαν οι ιδιότητες των ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων (hES) ύστερα από καλλιέργεια σε υποξικές συνθήκες, ο HIF-2 φάνηκε να έχει τον κυρίαρχο ρόλο μεταξύ των ισομορφών HIF στη διατήρηση της πολυδυναμίας και στον πολλαπλασιασμό των hES. Επιπλέον, για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει και άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην αποδιαφοροποίηση, όπως τα *SOX2* και *NANOG* (Forristal et al., 2010) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Επίδραση του HIF-2α στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων εμβρυικών βλαστοκυττάρων (hES) σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας, μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην αποδιαφοροποίηση (Forristal et al., 2010).

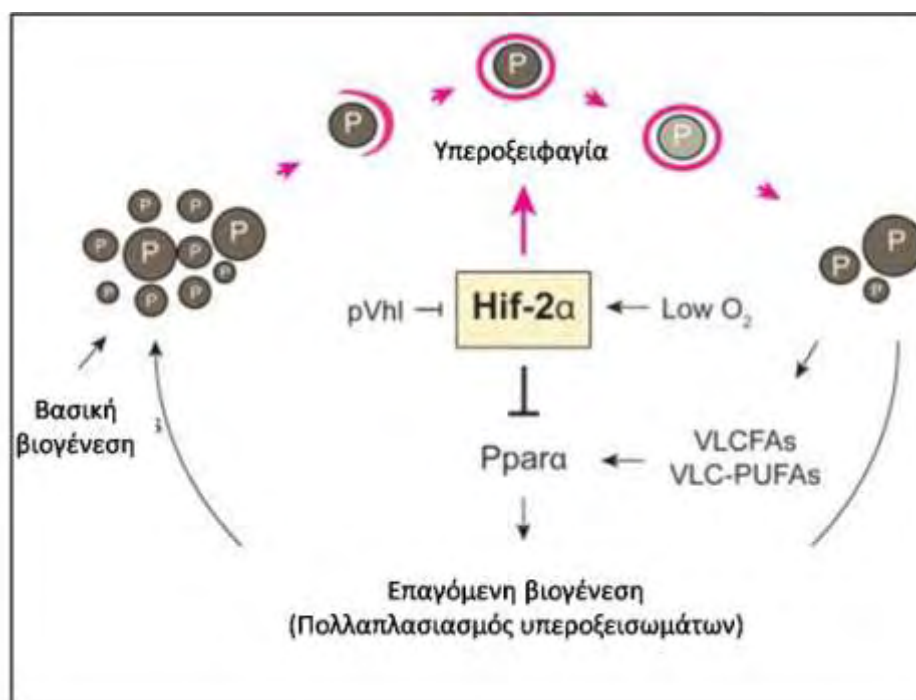
Πρόσφατα δείχθηκε ότι ο HIF-2 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού προς χονδροκύτταρα μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει την επαγωγή της έκφρασής του ύστερα από αναστολή του mTORC1 και ενεργοποίηση της AKT. Προτείνεται λοιπόν ένας επιπλέον ευεργετικός ρόλος για τον HIF-2, όσον αφορά στην επιδιόρθωση ελαττωμάτων στους χόνδρους των αρθρώσεων (Preitschopf et al., 2016).

A.4.4 Αντιοξειδωτική Άμυνα και Ομοιοστασία

Διασταυρώνοντας ποντίκια με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, μια άλλη ερευνητική ομάδα κατάφερε να αποκτήσει έναν μικρό αριθμό βιώσιμων ενήλικων HIF-2α^{-/-} ποντικών. Αυτά τα ποντίκια παρουσίασαν δυσλειτουργίες σε πολλά ζωτικά όργανα όπως πανκυτταροπενία (απουσία κυττάρων ερυθράς και λευκής σειράς), ηπατική στεάτωση, καρδιακή υπερτροφία, σκελετική μυοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια η οποία σχετιζόταν με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Τα HIF-2α^{-/-} ποντίκια είχαν αυξημένα επίπεδα ROS στο ήπαρ λόγω της μειωμένης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα (AOEs) όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, προσδίδοντας στον HIF-2α ένα νέο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Scortegagna et al., 2003). Επιπλέον, η απαλοιφή του HIF-2α στο εντερικό επιθήλιο οδήγησε σε μειωμένη απορρόφηση του σιδήρου υπογραμμίζοντας τον ρόλο του HIF-

2α στην ομοιοστασία του σιδήρου λόγω της επαγωγής της έκφρασης του μεταφορέα σιδήρου DMT1 (Mastrogiannaki et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί στη βιβλιογραφία μια καινούρια φυσιολογική λειτουργία στην οποία φαίνεται να εμπλέκεται ο HIF-2α, και η οποία αφορά την ομοιοστασία των υπεροξεισωμάτων. Τα υπεροξεισώματα είναι δυναμικά κυτταρικά οργανίδια, με ρόλο-κλειδί στην αποδόμηση των λιπαρών οξέων και στον μεταβολισμό των ROS (Schonenberger and Kovacs, 2015). Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο ήπαρ ποντικών με απαλοιφή των γονιδίων VHL, HIF-1α και HIF-2α, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του HIF-2α προωθεί την αποδόμηση των υπεροξεισωμάτων μέσω επιλεκτικής αυτοφαγίας που λέγεται υπεροξειφαγία. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα νεφρικού καρκίνου με ανεπάρκεια της VHL πρωτεΐνης, όπου ο HIF-2α έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης, ο αριθμός των υπεροξεισωμάτων ήταν πολύ μειωμένος. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο HIF-2α είναι αρνητικός ρυθμιστής της βιογένεσης και της μεταβολικής δράσης των υπεροξεισωμάτων στο ήπαρ (Walter et al., 2014) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ο HIF-2α ρυθμίζει αρνητικά τη διαθεσιμότητα και τη μεταβολική δράση των υπεροξεισωμάτων. Η υποξία ή η απώλεια της pVHL οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-2α. Η σηματοδότηση μέσω του HIF-2α προωθεί την υπεροξειφαγία, χωρίς να επηρεάζει τα βασικά επίπεδα βιογένεσης των υπεροξεισωμάτων. Ο μειωμένος αριθμός τους και η μειωμένη μεταβολική τους δράση, οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων, όπως η αύξηση των VLCFAs και VLC-PUFAs. Τα λιπίδια αυτά είναι πιθανοί ενεργοποιητές ενός πυρηνικού υποδοχέα που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (Ppara). Η σηματοδότηση μέσω του HIF-2α καταστέλλει την ενεργοποίηση του Ppara, εμποδίζοντας την αποκατάσταση της ομοιοστασίας των υπεροξεισωμάτων (Walter et al., 2014).

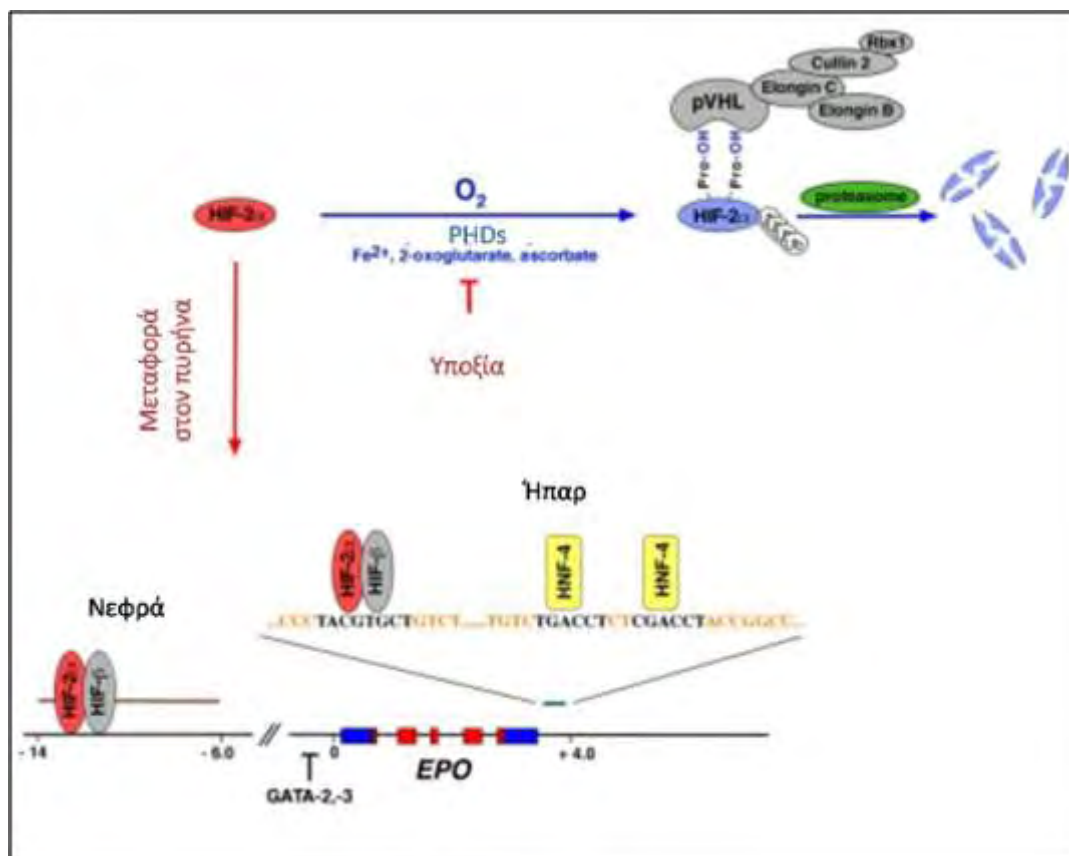
A.4.5. Παραγωγή Ερυθροποιητίνης (EPO)

Παρόλο που ο HIF-1 ανακαλύφθηκε έπειτα από αναλύσεις του μοριακού μηχανισμού επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας και απομονώθηκε από στήλη αγκιστείας που περιείχε ακινητοποιημένη την DNA αλληλουχία του 3' ενισχυτή της EPO, στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι ο HIF-2 είναι ο ρυθμιστής της επαγωγής της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας στα νεφρά και στο ήπαρ με *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Αυτή η άποψη επιβεβαιώθηκε με ιστολογικές μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι τα σημεία έκφρασης του HIF-2α στα νεφρικά κύτταρα συμπίπτουν με τα σημεία παραγωγής της ερυθροποιητίνης (**Haase, 2010**). Οι πρώτες παρατηρήσεις προήλθαν από απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α σε έμβρυα ποντικών τα οποία όμως κατάφεραν να επιζήσουν μετά τη γέννα λόγω διασταύρωσης ποντικών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Τα βιώσιμα ενήλικα HIF-2α^{-/-} ποντίκια παρουσίαζαν, εκτός των άλλων, αναιμία και εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα νεφρικής ερυθροποιητίνης, ενώ η χορήγηση ανασυνδυασμένης EPO αποκατέστησε την αιμοποίηση, αποδεικνύοντας ότι η αναιμία ήταν αποτέλεσμα της μειωμένης παραγωγής της EPO στα νεφρά και όχι άλλης δυσλειτουργίας στην διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (**Scortegagna et al., 2003, Scortegagna et al., 2005**). Μια άλλη ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε ένα ρυθμιζόμενο σύστημα αποσιώπησης των HIF μετά τη γέννηση των ποντικών, και μελέτησε την επίδραση της ολικής απαλοιφής του HIF-2α ανεξάρτητα από τις απαιτήσεις κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ολική αποσιώπηση του HIF-2α οδηγεί σε αναιμία που συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα της EPO, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο HIF-2α είναι ο κύριος ρυθμιστής της παραγωγής EPO στα ενήλικα ποντίκια τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε καταστάσεις στρες (**Gruber et al., 2007**). Επίσης, σε ηπατικά κύτταρα ποντικού έπειτα από απαλοιφή του HIF-2α, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ηπατικής ερυθροποιητίνης και επιπλέον δείχθηκε ότι για την έκφραση της είναι απαραίτητος ο HIF-2α και όχι ο HIF-1α (**Rankin et al., 2007**). Επιπλέον, με *in vitro* μελέτες, έπειτα από πειράματα αποσιώπησης του HIF-1α ή του HIF-2α σε διάφορες κυτταρικές σειρές βρέθηκε ότι η επαγωγή της EPO σε συνθήκες υποξίας εξαρτάται από τον HIF-2α και όχι από τον HIF-1 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B, κύτταρα νευροβλαστώματος Kelly και σε αστροκύτταρα (**Rankin et al., 2007, Warnecke et al., 2004, Chavez et al., 2006**).

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής το κύριο όργανο παραγωγής της EPO είναι το ήπαρ, ενώ στους ενήλικες οι νεφροί, με το ήπαρ να αποτελεί τη δευτερεύουσα πηγή.

Η υποξία αποτελεί το κυρίαρχο φυσιολογικό ερέθισμα για την παραγωγή της ερυθροποιητίνης και ανάλογα με τις συνθήκες της υποξίας τα επίπεδα της EPO μπορούν να αυξηθούν πολλές εκατοντάδες φορές. Η παραγωγή της ερυθροποιητίνης ως απάντηση στην υποξία εξαρτάται από το όργανο παραγωγής και το στάδιο της ανάπτυξης. Ειδικότερα, υπάρχει διαφορά στο ερέθισμα της υποξίας για την παραγωγή ερυθροποιητίνης μεταξύ νεφρού και ήπατος. Η ποσότητα της EPO που παράγεται από τα ηπατικά κύτταρα, είναι μόλις το 10% αυτής που παράγεται από τα νεφρικά κύτταρα σε υποξία, ενώ απαιτείται μεγαλύτερη διάρκεια υποξίας στο ήπαρ από ότι στο νεφρό. Η ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής της EPO μπορεί να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός της υποξίας, όπως ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) και ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) (**Haase, 2010, Jelkmann, 2011**). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η επαγωγή της νεφρικής EPO στην υποξία εξαρτάται αποκλειστικά από τον HIF-2 και όταν η απαλοιφή του HIF-2 γίνεται στα νεφρά, ο ηπατικός HIF-2 αναλαμβάνει τον ρόλο του κύριου ρυθμιστή της EPO στον ορό. Ακόμη έδειξε ότι ο HIF-2 των ηπατοκυττάρων ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων που συμβάλλουν στο μεταβολισμό του σιδήρου, αποδίδοντας έναν νέο ρόλο στον HIF-2 στο συντονισμό της σύνθεσης της EPO περιλαμβάνοντας την ομοιόσταση του σιδήρου (**Kapitsinou et al., 2010**). Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός της εξαρτώμενης από τον HIF-2 επαγωγής της EPO δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος βρέθηκε ότι ο HIF-2 και όχι ο HIF-1 συνδέεται με τα HRE της ενδογενούς EPO, ενώ ο HIF-1 δεσμεύεται στα HRE μόνο της ανασυνδυασμένης EPO *in vitro*. Επίσης, βρέθηκε ότι για την επαγωγή της μεταγραφής του ενισχυτή της EPO από τον HIF-2 απαιτείται η παρουσία μίας πρόσθετης αλληλουχίας του ενισχυτή που βρίσκεται δίπλα στα HRE η οποία περιέχει θέσεις δέσμωσης μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 20**). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο HIF-2 συνεργάζεται και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την επαγωγή της μεταγραφής της EPO, μεταξύ των οποίων ο USF2, όπως χαρακτηριστικά αναφέρθηκε στην ενότητα **A.3.4.5 (Pawlus et al.2013.PLOS)**. Ακόμη, στον ενισχυτή της EPO περιλαμβάνονται τα στοιχεία DR2 τα οποία είναι θέσεις δέσμωσης για τα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών ορμονών. Ο HNF-4 (Hepacyte Nuclear Factor-4) αποτελεί ένα πιθανό υποψήφιο παράγοντα που μπορεί ειδικά να συνεργάζεται με τον HIF-2 διότι συνδέεται στα DR-2. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο HNF-4, όπως και ο HIF-2α, εντοπίζεται σε θέσεις όπου πραγματοποιείται η

σύνθεση της EPO στο ήπαρ και στους νεφρούς ,ενώ φαίνεται να είναι απαραίτητος για την επαγωγή του γονιδίου της EPO στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Haase, 2010, Jelkmann, 2011).

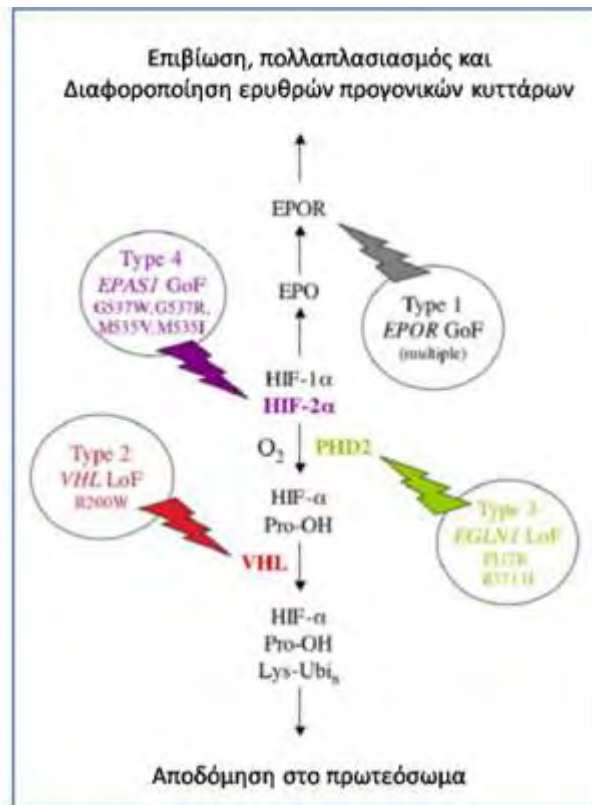


Εικόνα 20: Η ρύθμιση της EPO από τον HIF-2 σε συνθήκες υποξίας. Στο ήπαρ, η υποξική επαγωγή της EPO γίνεται μέσω των στοιχείων απόκρισης που βρίσκονται στο 3' άκρο του γονιδίου της EPO, ενώ στους νεφρούς βρίσκεται στη περιοχή 6-14 kb πριν το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής (Haase, 2010).

A.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

A.5.1 Ερυθροκυττάρωση

Πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι μια σειρά από μεταλλάξεις στο γονίδιο του HIF-2α, το *EPAS1*, προκαλούν αύξηση της παραγωγής της EPO που προκαλεί αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα, μια ασθένεια η οποία ονομάζεται ερυθροκυττάρωση. Η ερυθροκυττάρωση είναι κληρονομική ασθένεια και διακρίνεται σε πρωτοπαθή ή συγγενή και δευτεροπαθή ή επίκτητη. Οι μεταλλάξεις στο *EPAS1* προκαλούν συγγενή ερυθροκυττάρωση τύπου 4 με αυτοσωματική κυρίαρχη κληρονομικότητα. (Εικόνα 21).



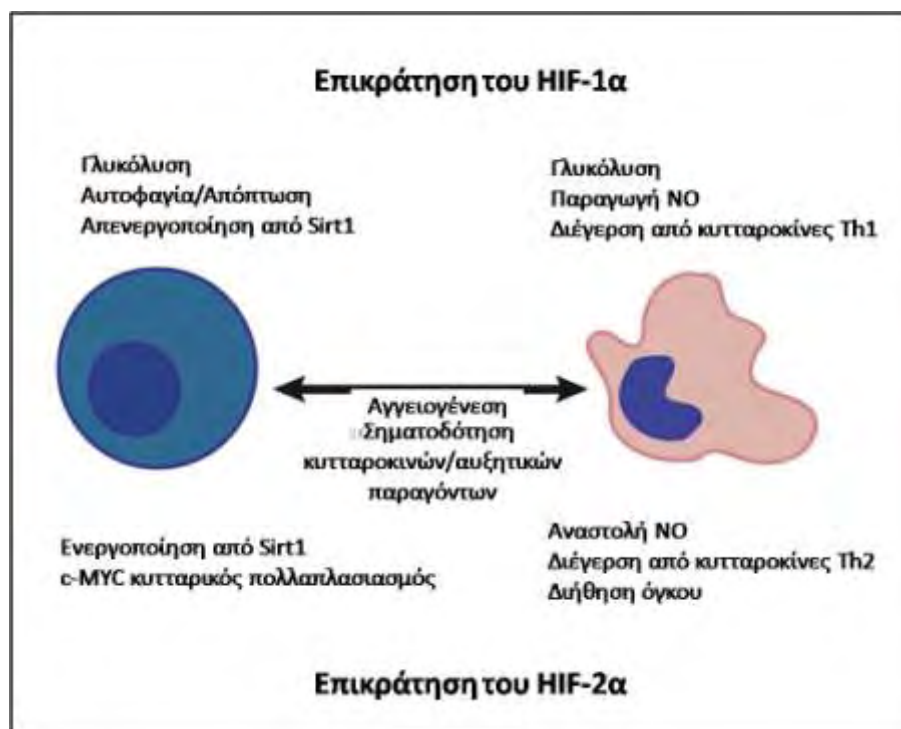
Εικόνα 21: Μοριακή βάση της οικογενούς ερυθροκυττάρωσης. Στο σχήμα διακρίνονται 4 τύποι της ασθένειας, που προκύπτουν από μεταλλάξεις απώλειας ή κέρδους λειτουργίας στα γονίδια που κωδικοποιούν τους EPOR, VHL, PHD2 (*EGLN1*) και HIF-2α (*EPAS1*) αντίστοιχα. Η ερυθροκυττάρωση κληρονομείται με τρόπο αυτοσωμικά επικρατή, με εξαίρεση την ερυθροκυττάρωση τύπου 2 (Chuvash polycythemia) η οποία κληρονομείται με τρόπο αυτοσωμικά υπολειπόμενο (Semenza, 2009).

Έχουν βρεθεί πάνω από μία μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν αλλαγές στη λειτουργία της πρωτεΐνης του HIF-2α όπως μετάλλαξη της γλυκίνης-537, η οποία είναι συντηρημένη σε άνθρωπο, ποντικό, πτηνά, βάτραχο και ψάρι, σε τρυπτοφάνη (G537W). Η γλυκίνη-537 εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο δίπλα στη προλίνη-531, η οποία υδροξυλιώνεται από τις PHDs, με αποτέλεσμα η μετάλλαξη να εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με την PHD2 και να μειώνεται η υδροξυλίωση του HIF-2α (Percy, 2008). Επίσης έχουν βρεθεί και άλλες περιπτώσεις συγγενούς ερυθροκυττάρωσης οι οποίες είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του *EPAS1* και προκαλούν αλλαγές όπως μετατροπή της γλυκίνης-537 σε αργινίνη (G537R), της μεθειονίνης-535 σε βαλίνη (M535V) (Percy, 2008) και μεθειονίνης-535 σε ισολευκίνη (M535I) (Martini et al., 2008). Επιπλέον μία πολύ πρόσφατη μελέτη αναφέρει άλλες δύο μεταλλάξεις που οδηγούν σε ερυθροκυττάρωση (M535T και F540L) (Percy et al., 2012). Όπως φαίνεται από τα παραπάνω όλες οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α στην περιοχή που βρίσκεται η

προλίνη που υδροξυλιώνεται από τις PHDs και έχουν ως αποτέλεσμα να εμποδίζεται η υδροξυλίωση του HIF-2α και η σύνδεση με τον VHL και να μειώνεται η αποικοδόμηση του. Έτσι, η αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης του HIF-2α προκαλεί την αυξημένη παραγωγή της EPO.

A.5.2 Φλεγμονή

Τα περιβάλλοντα εκτεταμένης φλεγμονής όπως για παράδειγμα οι ρευματικές παθήσεις, οι αθηροσκληρωτικές πλάκες και οι συμπαγείς όγκοι, χαρακτηρίζονται συχνά από υποξικές συνθήκες. Οι HIF επάγονται από την υποξία, αλλά υποστηρίζεται ότι επάγονται και από ένα μεγάλο αριθμό μεσολαβητών της φλεγμονής, και κατ'επέκταση η ενεργοποίηση των παραγόντων HIF στα περιβάλλοντα αυτά θεωρείται ο συνδετικός κρίκος μεταξύ υποξίας και χρόνιας φλεγμονής (Frede et al., 2007, Shay and Celeste Simon, 2012) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Προτεινόμενο μοντέλο της σηματοδότησης των HIF σε κύτταρα του όγκου και σε μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (TAMs). Οι HIF-1α και HIF-2α έχουν αντίθετους και συχνά αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους στους παραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Shay and Celeste Simon, 2012).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την εμπλοκή του HIF-2α στη φλεγμονή έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου έχει αρχίσει να διαφαίνεται ο σημαντικός του ρόλος στον έλεγχο της ανοσοαπάντησης (Palazon et al., 2014). Ως απόκριση στην υποξία ο HIF-2α εκφράζεται σε μακροφάγα που

σχετίζονται με τον όγκο (Tumor Associated Macrophages, TAMs) και σε T κύτταρα CD8+, όπου η έκφρασή του επηρεάζεται από την παρουσία κυτταροκινών (Talks et al., 2000, Doedens et al., 2013). Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α ρυθμίζει απαραίτητες φλεγμονώδεις δράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α στο μυελό απέτυχαν να επάγουν φλεγμονώδη απάντηση μετά από χορήγηση LPS λόγω μειωμένης παραγωγής των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IFN-γ, IL-12, και IL-1β, υποδεικνύοντας ότι στα TAMs η έκφραση των παραπάνω παραγόντων βρίσκεται υπό τον έλεγχο του HIF-2α (Imtiyaz et al., 2010) (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ο ρόλος του HIF-2α στα μακροφάγα. Ο HIF-2α ρυθμίζει τη λειτουργία των μακροφάγων κατά την οξεία φάση της φλεγμονής, τη μετανάστευση και διηθητικότητά τους. Επιπλέον, ο HIF-2α ελέγχει τη φλεγμονή του όγκου και έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή κυτταροκινών. Ωστόσο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν ο HIF-2α απαιτείται για τη βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων (Imtiyaz et al., 2010).

Μια πρόσφατη μελέτη επίσης σε ποντίκια και zebrafish που δεν εκφράζουν HIF-2α στο μυελό, έδειξε αυξημένη απόπτωση των ουδετερόφιλων και μειωμένη διέγερση της φλεγμονής στα κύτταρα αυτά, προτείνοντας για πρώτη φορά ένα σημαντικό ρόλο του HIF-2α και στα ουδετερόφιλα (Thompson et al., 2014). Ο ρόλος του HIF-2α έχει επίσης μελετηθεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), ένα αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του αρθρικού υμένα, προοδευτική καταστροφή του χόνδρου των αρθρώσεων και τελικά διάβρωση των οστών (Hua and Dias, 2016). Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α αποτελεί απαραίτητο καταβολικό ρυθμιστή της

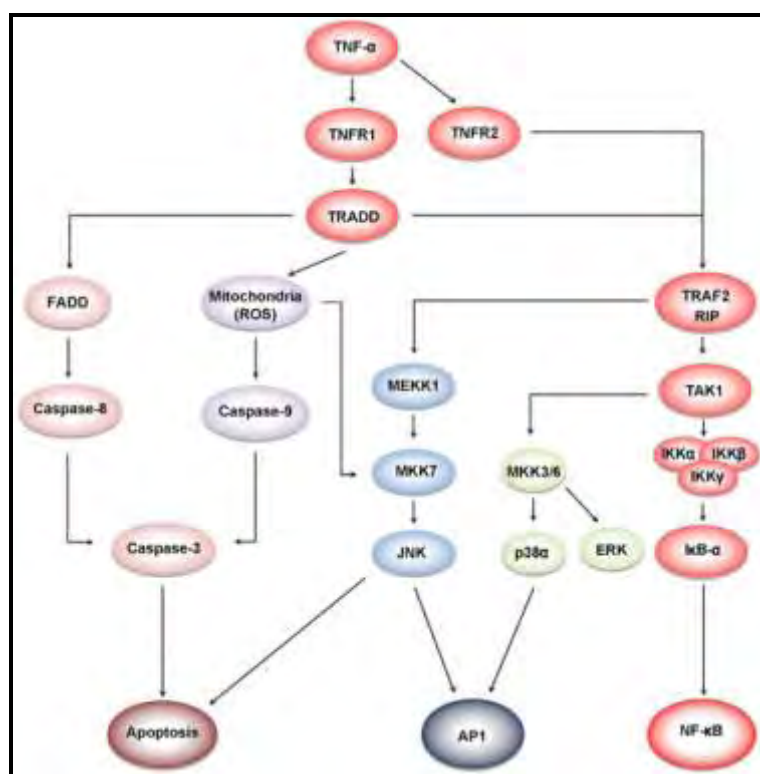
παθογένεσης της RA, με το να ελέγχει λειτουργίες κυττάρων ομοίων με ινοβλάστες του αρθρικού θύλακα (fibroblast-like synoviocytes, FLS) οι οποίες σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα ο HIF-2α υπερεκφράζεται στα FLS, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό τους και επάγει σε αυτά την έκφραση της IL-6 και του TNF-α. Επιπλέον, σε ποντίκια με δυσλειτουργικό HIF-2α παρατηρήθηκε ότι αμβλύνεται η ανάπτυξη της νόσου RA (**Ryu et al., 2014**).

Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το εάν και σε ποιο επίπεδο ο HIF-2α ρυθμίζει και ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ελάχιστα, ενώ αντίθετα, υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τη ρύθμιση της ισομορφής HIF-1α. Όσον αφορά τη ρύθμιση του HIF-2α από παράγοντες φλεγμονής, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι σε συνθήκες νορμοξίας και ταυτόχρονης αναστολής των PHDs η IL-1β αυξάνει την έκφραση του HIF-2α και τον εντοπισμό του στους αναπτυσσόμενους κροσσούς χονδροκυττάρων, επηρεάζοντας αρνητικά τη μεταγραφική του δράση (**Wann et al., 2013**). Επίσης έχει βρεθεί ότι η IL-1β αναστέλλει την επαγόμενη από υποξία έκφραση της ερυθροποιητίνης μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την ενίσχυση της αποδόμησης του πυρηνικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων HNF-4, χωρίς ωστόσο να έχει μελετηθεί η επίδραση του HIF-2α (**Krajewski et al., 2007**).

A.5.2.1 Ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) στο ηπατοκαρκίνωμα.

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) είναι μια κυτταροκίνη που συμμετέχει στην οξεία φάση της φλεγμονής. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα αλλά και από άλλους κυτταρικούς τύπους όπως ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα. Ο TNF-α προσδέεται σε δύο τύπους υποδοχέων, τους TNFR1 και TNFR2. Η πρόσδεση στον TNFR1 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό των AP1, MAPK και NF-κB και οδηγεί στη διέγερση φλεγμονώδους απόκρισης, ενώ η πρόσδεση στον TNFR2 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό των κασπασών και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (**Aggarwal et al., 2012**) (**Εικόνα 24**). Στο ήπαρ ο TNF-α παράγεται από τα κύτταρα Kupffer και εμπλέκεται στην ανάπτυξη ηπατοκαρκινώματος ρυθμίζοντας τα μονοπάτια των NF-κB και Akt (**Leonardi et al., 2012**). Επιπλέον ο TNF-α επάγει οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, καθώς έχει βρεθεί ότι προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω του σχηματισμού της 8-οξοδεοξυγουανοσίνης (8-oxodG) σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα ποντικών (**Wheelhouse et al., 2003**). Ο ρόλος του TNF-α σε ασθενείς με HCC παραμένει αμφιλεγόμενος, καθώς τόσο υψηλά όσο και χαμηλά επίπεδα έκφρασής του έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς (**Leonardi et al., 2012, Nakazaki,**

1992), ωστόσο μελέτες μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) του γονιδίου του TNF-α (-308 G/A) από διάφορες ερευνητικές ομάδες προτείνουν ότι άτομα που φέρουν αυτούς τους πολυμορφισμούς εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν HCC (Saxena et al., 2014, Tavakolpour and Sali, 2016, Lee et al., 2013). Τέλος, μια πιο ενδιαφέρουσα πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι ο TNF-α και ο υποδοχέας του TNFR1 έχουν αποκλίνοντες ρόλους όσον αφορά στην καρκινογένεση στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, σε μοντέλο ποντικών με HCC, δείχθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου του TNF-α ενίσχυσε την εξέλιξη του όγκου σε αντίθεση με τον υποδοχέα TNFR1, η έκφραση του οποίου προώθησε την ανάπτυξη του όγκου μέσω του μονοπατιού των ERK, υποδεικνύοντας ότι η ογκογόνος δράση του υποδοχέα TNFR1 στο HCC δεν οφείλεται στην ενεργοποίησή του από τον TNF-α, αλλά σε άλλους προσδέτες (Ji et al., 2016).



Εικόνα 24: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον TNF-α (Aggarwal et al., 2012).

A.5.2.2 Η IL-1β (Interleukin 1 beta) στο ηπατοκαρκίνωμα.

Η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) είναι μια κυτταροκίνη που συμμετέχει στην οξεία φάση της φλεγμονής. Παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα ως πρόδρομη ανενεργή πρωτεΐνη και αποκτά τη δραστική της μορφή ύστερα από πρωτεολυτική διάσπαση από την κασπάση 1. Αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της φλεγμονώδους απόκρισης και εμπλέκεται σε λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση

και η απόπτωση. Η αυξημένη παραγωγή της συνδέεται με την ανάπτυξη πολλών αυτοάνοσων συνδρόμων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Schett et al., 2016). Στο ήπαρ η IL-1β προωθεί τον εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη MyD88 πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων καθώς και τον πολλαπλασιασμό, την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση αστεροειδών ηπατικών κυττάρων (hepatic stellate cells, HSC) προς τον μωινοβλαστικό φαινότυπο (Akira et al., 2006, Han et al., 2004). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η IL-1β επάγει την έκφραση του παράγοντα TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) στις σειρές ηπατοκαρκινώματος HepG2, Hep3B, Huh7 (Shiraki et al., 2005). Ο ρόλος της IL-1β στο HCC δεν έχει αποσαφηνιστεί, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι πολυμορφισμοί της αποτελούν γενετικό δείκτη για την ανάπτυξη HCC σχετιζόμενου με ηπατίτιδα (Hirankarn et al., 2006), αλλά και μελέτες όπου τα επίπεδά της IL-1β ανιχνεύθηκαν μειωμένα μέσα στον όγκο σε σύγκριση με το μικροπεριβάλλον του ιστού (Bortolami et al., 2002).

A.5.2.3 Η IL-6 (Interleukin 6) στο ηπατοκαρκίνωμα.

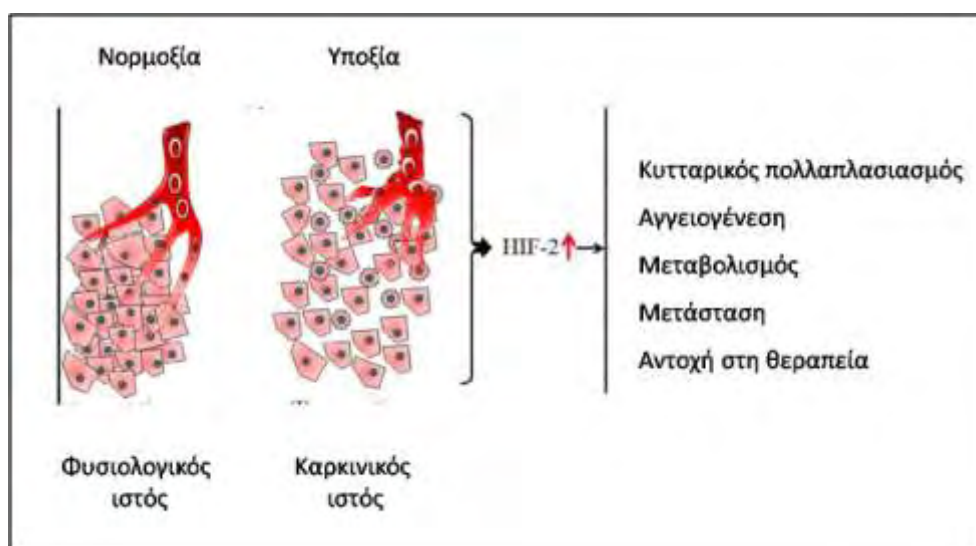
Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι μια ιντερλευκίνη που έχει βρεθεί ότι δρα τόσο ως προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη όσο και ως αντι-φλεγμονώδης μυοκίνη. Εκκρίνεται από T κύτταρα και μακροφάγα και διεγείρει την ανοσοπάντηση, οδηγώντας τελικά σε φλεγμονή. Επιπλέον εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες για να διεγείρει το σχηματισμό των οστεοκλαστών. Κατόπιν πρόσδεσης στον υποδοχέα της η IL-6 ενεργοποιεί τους σηματοδοτικούς καταρράκτες των κινασών JAK (Janus Kinases) και μεταγραφικών παραγόντων STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Scheller et al., 2011).

Στο ήπαρ η IL-6 παράγεται από τα κύτταρα Kupffer ως απόκριση στο θάνατο των ηπατοκυττάρων και συμβάλλει στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους (Gressman et al.1996.Science). Σε πολλές μελέτες έχει διερευνηθεί η σχέση μεταξύ IL-6 και ηπατίτιδας Β (HBV). Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Β (HBx) επάγει την ενεργοποίηση της IL-6 ή την απελευθέρωσή της σε ασθενείς με HBV, οδηγώντας σε ηπατική φλεγμονή, κίρρωση και τελικά HCC (Lee et al., 1998). Υψηλά επίπεδα IL-6 στον ορό του αίματος έχουν σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης HCC και κακή πρόγνωση (Wong et al., 2009), ενώ έχει επίσης δειχθεί ότι η IL-6 αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ παχυσαρκίας και HCC, καθώς η αυξημένη έκφρασή της σε παχύσαρκα ποντίκια οδηγεί σε ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών STAT3 και ERK, προωθώντας την ογκογένεση στο ήπαρ (Park

et al., 2010). Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη προτείνει για πρώτη φορά έναν ευεργετικό ρόλο για την IL-6 στο HCC. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου της IL-6 σε ποντίκια ενίσχυσε την ανάπτυξη του HCC και το φορτίο του όγκου. Στους όγκους αυτούς ο αριθμός των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (NK) ήταν σημαντικά μειωμένος, γεγονός που υποδεικνύει ότι η IL-6 εμποδίζει την εξέλιξη του HCC μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει καταστολή της σχετιζόμενης με τον όγκο φλεγμονής μέσω ενεργοποίησης των κύτταρα NK (Ji et al., 2016).

A.5.3 Καρκίνος

Η υποξία αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά-ορόσημα του μικροπεριβάλλοντος των όγκων. Η πλειοψηφία των συμπαγών όγκων περιέχει υποξικές περιοχές ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ της διανομής και της κατανάλωσης οξυγόνου. (Εικόνα 25).

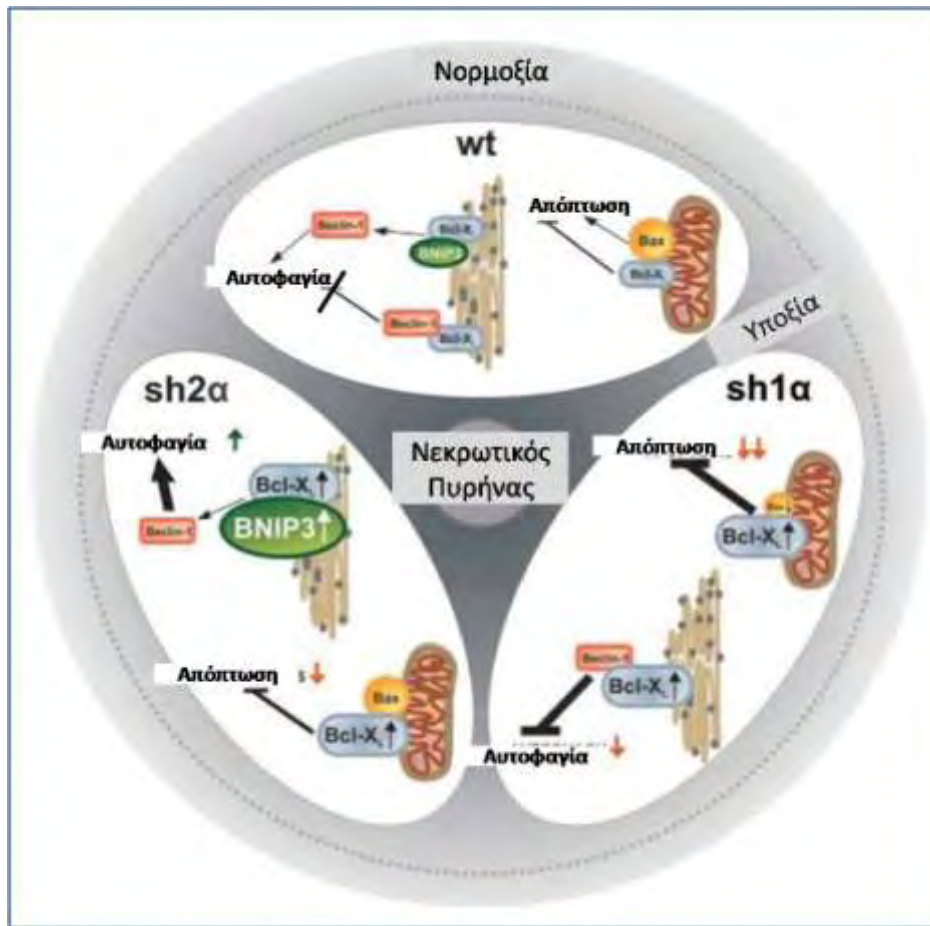


Εικόνα 25: Η υποξία των όγκων και οι ρόλοι του HIF-2 στην ογκογένεση. Η διαταραγμένη δομή των αιμοφόρων αγγείων, οι μεγάλες αποστάσεις στις οποίες πρέπει να διαχυθεί το οξυγόνο, και η αναμία οδηγούν σε υποξία στους περισσότερους συμπαγείς όγκους. Ο HIF-2 ενεργοποιείται σε υποξικές συνθήκες και εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αγγειογένεση, στο μεταβολισμό, στη μετάσταση και στην αντοχή στη χημειο-ραδιοθεραπεία των όγκων (Zhao et al., 2015a).

Κλινικά η υποξία συνδέεται με την ενεργοποίηση και την υπερέκφραση των παραγόντων HIF στους περισσότερους όγκους, με την αγγειοβρίθεια του όγκου, τη μετάσταση, την αντοχή στη χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία, την εξέλιξη του όγκου και την κακή πρόγνωση (Rankin and Giaccia, 2016)

A.5.3.1 Πολλαπλασιασμός

Βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η απορρύθμιση της αποπτωτικής οδού που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Μελέτες σε νεφρικό καρκίνο με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης VHL (RCC) έχουν δείξει ότι ο HIF-2α προάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν την κυκλίνη D1, τον παράγοντα μετασχηματισμού α (TGF- α) και τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και καταστέλλοντας παράλληλα τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BNip3 (Raval et al., 2005). Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο ο HIF-2α ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε καρκίνους του πεπτικού συστήματος όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και το ηπατοκαρκίνωμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, με τα βιβλιογραφικά δεδομένα να είναι αντικρουόμενα (Zhao et al., 2015b). Μια ερευνητική ομάδα που δημιούργησε σφαιροειδή σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 προκειμένου να μιμηθεί τον ηπατικό όγκο, υποστηρίζει ότι η υπερέκφραση του HIF-2α μετατοπίζει τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 προς το αντι-αποπτωτικό προφίλ έκφρασης με συνέπεια να επάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αντίστοιχα, η αποσιώπηση του HIF-2α προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης αυξάνοντας την έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και ενισχύοντας την αυτοφαγία (Menrad et al., 2010) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Προτεινόμενο μοντέλο της ρύθμισης της επιβίωσης σφαιροειδών ηπατικού όγκου από τον HIF-2α. Σε συνθήκες υποξίας, η αποσιώπηση του HIF-2α ενισχύει τη δημιουργία του συμπλόκου BNIP3-Bcl-XL, οδηγώντας σε αυτοφαγία και μείωση της απόπτωσης. Αντίθετα, η υπερέκφραση του HIF-2α (όταν αποσιωπάται ο HIF-1α) αναστέλλει την έκφραση της BNIP3 και αυξάνει την έκφραση της Bcl-XL, οδηγώντας σε καταστολή της αυτοφαγίας και της απόπτωσης και προάγοντας τελικά τον πολλαπλασιασμό (Menrad et al., 2010).

Αντίθετα, μια άλλη ερευνητική ομάδα πρόσφατα πρότεινε ότι ο HIF-2α προάγει την απόπτωση στο ηπατοκαρκίνωμα μέσω ενός καινούριου μηχανισμού στον οποίο μάλιστα για πρώτη φορά ο HIF-2 φαίνεται να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας ενός γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα TFDP3. Η επαγωγή της απόπτωσης από τον HIF-2α περιλαμβάνει καταστολή του παράγοντα E2F1 και μονοπάτια που μπορεί να εξαρτώνται ή όχι από την p53 (Sun et al., 2013).

Το εάν ο HIF-2α αποτελεί θετικό ή αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι αμφιλεγόμενο και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του HIF-2α *in vivo* προάγει την ογκογένεση είτε μέσω μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι EGFR, IGF1R και ERK/Akt, είτε μέσω της σηματοδότησης COX2/mPGES-1/PGE2 (Franovic et al.,

2009, Xue and Shah, 2013), ενώ άλλες μελέτες προτείνουν ότι ο HIF-2α αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Imamura et al., 2009).

A.5.3.2 Μεταβολικός Επαναπρογραμματισμός

Στα καρκινικά κύτταρα ο μεταβολισμός μετοπίζεται από την οδό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης προς τη γλυκολυτική οδό, κάτι που είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg (Palsson-McDermott and O'Neill, 2013). Στη διαδικασία του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού στον καρκίνο, κυρίαρχο ρόλο έχει ο HIF-1α ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν γλυκολυτικά ένζυμα, ενώ η συμμετοχή του HIF-2α στη διαδικασία αυτή είναι λιγότερο μελετημένη. Μια μελέτη σε νεφρικό καρκίνο RCC έχει δείξει ότι η αναστολή του HIF-2α προωθεί την ενεργοποίηση της p53 ενισχύοντας την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την καταστολή της έκφρασης γονιδίων της οξυγενάσης της αίμης (*HMOX1*) τα οποία ελέγχονται από τον HIF-2 και κατ' επέκταση τη διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας, τη συσσώρευση των ROS και τελικά την καταστροφή του DNA (Bertout et al., 2009).

Επιπλέον, μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αποκάλυψαν ότι η απουσία των HIF-2α, HIF-1α και του ογκογονιδίου KRAS, μειώνει την έκφραση ενζύμων που ρυθμίζουν σημαντικά στάδια της σύνθεσης μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων όπως τα ACSL5, PCK2, και AGPAT7, με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα καρδιολιπίνης και ανεπαρκή μιτοχονδριακή αναπνοή. Ο μηχανισμός αυτός προτείνει ότι η έκφραση των HIF-2α, HIF-1α και KRAS στα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η μέγιστη παραγωγή ATP και η ελάχιστη παραγωγή ROS (Chun et al., 2010).

A.5.3.3 Αγγειογένεση

Η υποξία αποτελεί την πρωταρχική κινητήρια δύναμη για την αγγειογένεση των όγκων, με τους παράγοντες HIF να έχουν ρόλο κλειδί σε αυτή τη διαδικασία. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου συσχέτισε την έκφραση του HIF-2α με κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά της αγγειογένεσης στον όγκο, όπως η αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα και η έκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 (*COX-2*) (Yoshimura et al., 2004). Ο HIF-2α φαίνεται να έχει μεγαλύτερη επίδραση από τον HIF-1α στον έλεγχο της αγγειογένεσης στον παραπάνω τύπο καρκίνου, καθώς μελέτες ξеноμοσχευμάτων έδειξαν μεγαλύτερη

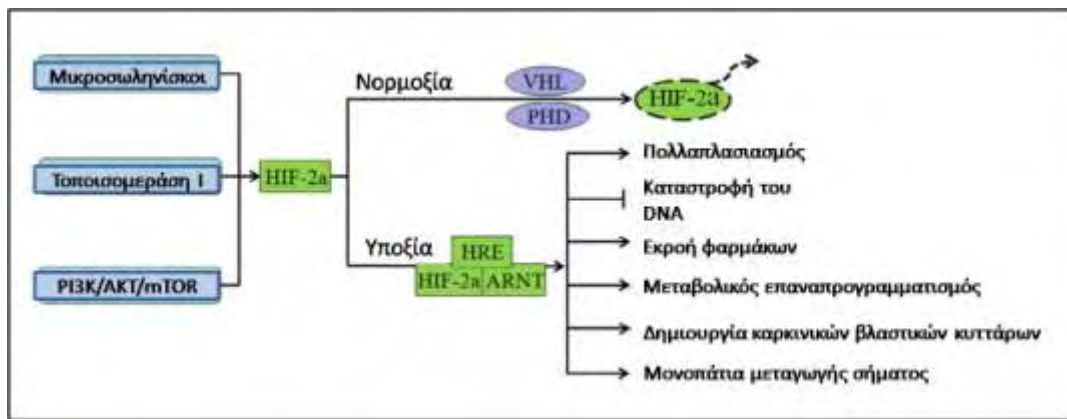
αναστολή του VEGF κατά την επιλεκτική αποσιώπηση του HIF-2α. Επίσης η ίδια μελέτη υποστηρίζει ότι ο HIF-2 ελέγχει τα γονίδια κυκλίνη G2 (*CCNG2*) και αγγειοποιητίνη like 4 (*ANGPTL4*), που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική μετανάστευση αντίστοιχα και συμβάλλουν στην ογκοκατασταλτική του δράση στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Imamura et al., 2009).

A.5.3.4 Μετάσταση

Η ενεργοποίηση των HIF παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της διηθητικότητας και της μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων. Ο HIF-2 επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας (*MMP-2*), στη μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγγυμα (EMT) (E-Cadherin) και στη μετάσταση (*TWIST*). Έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του HIF-2α σε πρωτοπαθείς όγκους σχετίζονται με την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων (Luan et al., 2013, Wang et al., 2014). Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ο HIF-2α συμβάλλει στην προώθηση της μετάστασης έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε πολλούς τύπους καρκίνου τα τελευταία χρόνια. Σε ποντίκια με μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων (NSCLC) έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α συνεργάζεται με το ογκογονίδιο Kras, και οδηγεί σε αυξημένη διηθητικότητα, έκφραση δεικτών EMT και αγγειογένεση (Kim et al., 2009). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με μελάνωμα βρέθηκε ότι ενώ και οι δύο ισομορφές των HIF απαιτούνται για την προώθηση της μετάστασης μέσω ενεργοποίησης της κινάσης SRC και αποδόμησης της ECM, εντούτοις ενεργοποιούν διακριτά μεταγραφικά προγράμματα. Ο HIF-1α δρα μέσω της οδού PDGFRα/MT1-MMP ενώ ο HIF-2α μέσω της οδού FAK/MMP2 (Hanna et al., 2013).

A.5.3.5 Αντοχή στη χημειοθεραπεία-ραδιοθεραπεία

Τα τελευταία χρόνια, πληθαίνουν οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο HIF-2α έχει κεντρικό ρόλο στην ενίσχυση της αντοχής στη θεραπεία πολλών συμπαγών όγκων μέσω ποικίλων μηχανισμών (Zhao et al., 2015a) (Εικόνα 27).

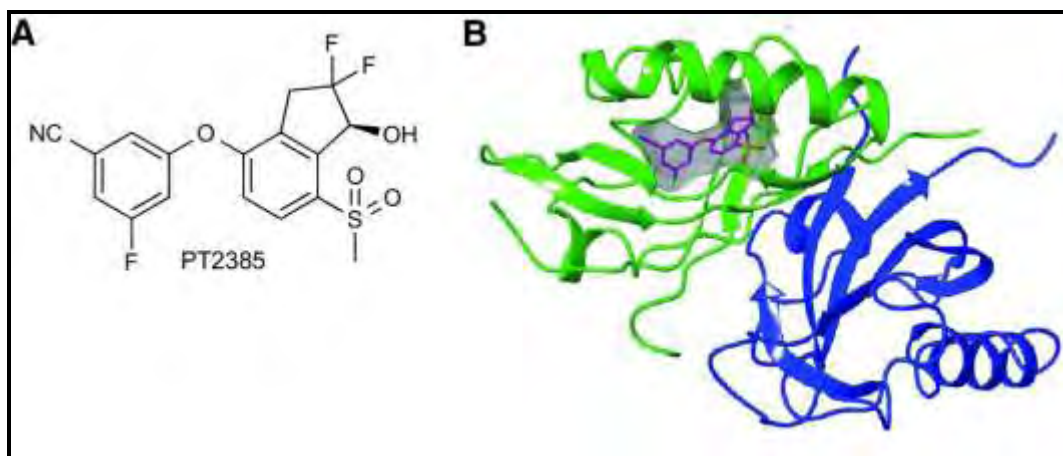


Εικόνα 27: Ρόλος του HIF-2α στην ανοχή στη θεραπεία. Ο HIF-2α ρυθμίζει θετικά διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιδιόρθωση του DNA, η αυξημένη εκροή φαρμάκων, ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός και η δημιουργία καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs). Η έκφραση και η δράση του HIF-2α ελέγχεται έμμεσα από αναστολείς που στοχεύουν σε ρυθμιστικά του μόρια, όπως οι μικροσωληνίσκοι, η τοποισομεράση I και η σηματοδοτική οδός PI3K/AKT/mTOR (Zhao et al., 2015a).

Η απορρύθμιση της απόπτωσης αντιπροσωπεύει μια από τις σημαντικότερες αιτίες για αντίσταση στα αντικαρκινικά φάρμακα. Έχει βρεθεί ότι σε νεφρικό καρκίνο RCC ο HIF-2α εμποδίζει την απόπτωση που επάγει ο αναστολέας της τοποισομεράσης I, καμπτοθεσίνη (CPT), σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (Selvarajah et al., 2013). Επιπλέον, ο HIF-2α προωθεί την ανοχή καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στο φάρμακο οξαλιπλατίνη επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα των χημειοκινών τύπου 4 CXCR4 (Jin et al., 2012), ενώ προσδίδει ανθεκτικότητα στα φάρμακα τρεμοζολαμίδη και σισπλατίνη σε κύτταρα μελανώματος επάγοντας την έκφραση του Snail1 (Liu et al., 2011). Ένας από τους στόχους της δράσης των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία είναι η καταστροφή του DNA. Έχει αναφερθεί ότι ο HIF-2α παρεμποδίζει αυτή τη διαδικασία σε πολλές καρκινικές σειρές και σε ινοβλάστες ποντικού, ενισχύοντας τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX και οδηγώντας σε εκτεταμένη επιδιόρθωση της γενετικής βλάβης και ανοχή στη θεραπεία (Wrann et al., 2013). Ο HIF-2α έχει βρεθεί ότι συμμετέχει και σε μηχανισμούς που αυξάνουν την αποβολή των φαρμάκων. Σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και υποξίας η έκφραση του HIF-2α συνδέεται με την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ABCG2 (ATP binding cassette subfamily G member 2) της οικογένειας των διαμεμβρανικών μεταφορέων ABC, οι οποίες εμπλέκονται στην πρόκληση ανοχής σε πολλαπλά φάρμακα (MDR, multi-drug resistance) (Nakanishi and Ross, 2012) Zhang et al.2013.World Chin J Digestol).

A.5.3.6 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο του HIF-2α στην ογκογένεση, η εύρεση επιλεκτικών αναστολέων του θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό κλινικό πλεονέκτημα. Μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί αρκετές ενώσεις που αναστέλλουν άμεσα ή έμμεσα τον HIF-2α σε διάφορα στάδια. Ένα από αυτά τα στάδια, είναι η αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης του HIF-2α, με αναστολείς που στοχεύουν σε μόρια ή σηματοδοτικά μονοπάτια που τη διεγείρουν. Οι αναστολείς 2-ME2 και ELR510444 μειώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α καταστρέφοντας τη δομή των μικροσωληνίσκων (Mabjeesh et al., 2003, Carew et al., 2012). Σε κύτταρα νευροβλαστώματος, έχει αναφερθεί ότι η τοποτεκάνη (topotecan) και ο αναστολέας των υποδοχέων κινασών τυροσίνης sunitinib, μειώνουν την πρωτεϊνική σταθερότητα και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 (Puppo et al., 2008, Nilsson et al., 2010). Η μετάφραση του HIF-2α ελέγχεται επίσης από την οδό του mTOR, στην οποία στοχεύει ο αναστολέας PP242 (Selvarajah et al., 2013). Μια άλλη κατηγορία αναστολέων του HIF-2α, στοχεύει άμεσα τον ίδιο προσδεδεμένοι στο μόριό του, και μπλοκάροντας τη μεταγραφική του δράση ή τη σταθερότητά του. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο τεχνητός προσδέτης THS-044, ο μηχανισμός δράσης του οποίου περιλαμβάνει την πρόσδεση στην επικράτεια PAS-B του HIF-2α και την κατ' επέκταση παρεμπόδιση του διμερισμού του με τον ARNT και πρόσδεσή του στο DNA (Scheuermann et al., 2013, Scheuermann et al., 2015, Scheuermann et al., 2009). Πολλοί αναστολείς του HIF-2α δρουν ενισχύοντας την αποδόμησή του από το 26S πρωτεάσωμα, όπως ο αναστολέας της πρωτεϊνσύνθεσης εμετίνη, τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια JC243, JC244 και ο αναστολέας SF1126 της οδού PI3K (Guan et al., 2010, Kong et al., 2010, Joshi et al., 2015). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί αναστολείς που μειώνουν τη δράση του HIF-2 παρεμποδίζοντας είτε την αλληλεπίδρασή του με τους συνενεργοποιητές CBP/p300, όπως οι FM19G11 και η τριχοστατίνη A (TSA), είτε την πρόσδεση του παράγοντα PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase-1) στον υποκινητή του, όπως ο PJ34 (Fath et al., 2006, Neelam et al., 2013, Gonzalez-Flores et al., 2014). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι ο αναστολέας PT2385 που έχει δειχθεί ότι δρα ως εξειδικευμένος ανταγωνιστής του HIF-2α και συμβάλλει στην αναστολή της αγγειογένεσης, βρίσκεται σε φάση I κλινικής δοκιμής σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο ccRCC (Wallace et al., 2016, Chen et al., 2016) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Η πρόσδεση του PT2385 στην επικράτεια PAS-B του HIF-2α διασπά το ετεροδιμερές σύμπλοκο HIF-2α/ARNT. (A) Χημική δομή του αναστολέα PT2385. (B) Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής της επικράτειας HIF-2α PAS-B* (πράσινο), της επικράτειας ARNT PAS-B* (μπλε) και του PT2385 (μωβ) (Wallace et al., 2016).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή και ο καρκίνος. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία για τον ακριβή ρόλο του HIF-2 σε αυτές τις καταστάσεις είναι περιορισμένη και αμφιλεγόμενη, καθώς οι περισσότερες μελέτες αφορούν την ισομορφή HIF-1. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι HIF-1 και HIF-2 έχουν διακριτούς και συχνά αντίθετους ρόλους στις παραπάνω διαδικασίες, υπογραμμίζει τη σημασία του να διαλευκανθούν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-2 που διαχωρίζουν τις λειτουργίες του από εκείνες του HIF-1.

Οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-2, επηρεάζοντας την πρωτεϊνική του σταθερότητα, τη μεταγραφική του ενεργότητα και την αλληλεπίδρασή του με άλλους παράγοντες. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο εάν ο HIF-2α ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες που γνωρίζουμε ότι δρουν ως ρυθμιστές του HIF-1. Σκοπός της πρώτης ενότητας της διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζείνης 1δ (CK1δ). Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να διερευνηθεί εάν ο HIF-2α αποτελεί υπόστρωμα της CK1δ και να προσδιοριστούν οι ακριβείς θέσεις της φωσφορυλίωσης. Απώτερος στόχος των παραπάνω, ήταν η διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου που παίζει αυτή η φωσφορυλίωση στα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχει ο HIF-2 σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος.

Ο HIF-2 έχει ενεργό ρόλο στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, ρυθμίζοντας την παραγωγή κυτταροκινών, κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, οι βιβλιογραφικές αναφορές για το εάν ο ίδιος ο HIF-2 υπόκειται σε ρύθμιση από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ελάχιστες. Σκοπός της δεύτερης ενότητας της διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της ρύθμισης του HIF-2α από τους προφλεγμονώδεις παράγοντες TNF-α, IL-6 και IL-1β σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των παραπάνω κυτταροκινών στην πρωτεϊνική έκφραση και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και να συγκριθεί με την αντίστοιχη επίδρασή τους στον HIF-1. Απώτερος στόχος των παραπάνω, ήταν η διαλεύκανση των διακριτών ρόλων των HIF-1 και HIF-2, στην σχετιζόμενη με τη φλεγμονή, καρκινογένεση στο ήπαρ.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΥΛΙΚΑ

B.1.1 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ✓ Huh7, κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- ✓ HepG2, κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- ✓ HeLa, ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας

B.1.2 Βακτηριακά στελέχη

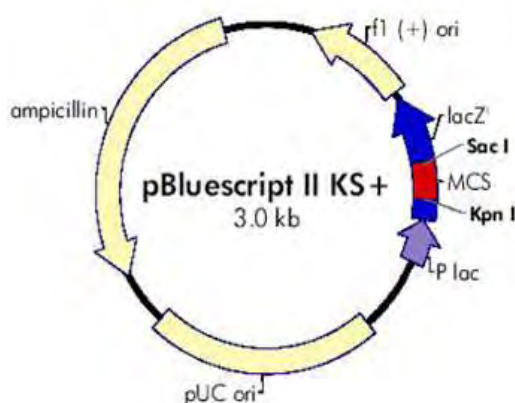
Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ✓ TOP10 (Invitrogen). Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης.
- ✓ BL21 RIL (Stratagene). Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη. Επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αργινίνης, λευκίνης και ισολευκίνης) μέσω του πλασμιδίου RIL. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

B.1.3 Πλασμιδιακοί Φορείς

- ✓ pBlueScript II KS+ (Agilent)

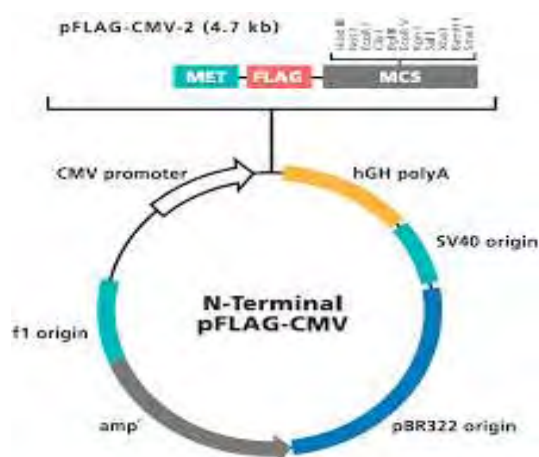
Πλασμιδιακός φορέας που φέρει τον υποκινητή lacZ ο οποίος έχει σχεδιαστεί ώστε να δίνει μπλε χρωματισμό όταν εκφράζεται σε βακτήρια. Φέρει περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS) και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στον φορέα αυτό πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της *in vitro* στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης του HIF-2α (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pBlueScript II KS+

✓ pFLAG-CMVTM-2 (Sigma)

Πλασμιδιακός φορέας που φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV, παρέχοντας τη δυνατότητα να υπερεκφραστούν κλωνοποιημένες πρωτεΐνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Περιέχει μια αλληλουχία 8 αμινοξέων που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG στην 5' πλευρά της MCS και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του HIF-2α πλήρους μήκους (WT, S383A, S383D, S386A, T528A, T528E, DMSA/TA, DMSD/TE) στη θέση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI, που βρίσκεται εντός της MCS και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τον FLAG (**Εικόνα 30**).



Εικόνα 30: Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pFLAG-CMVTM-2

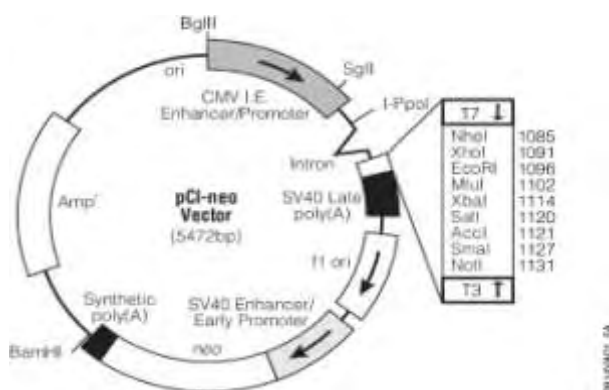
✓ pGEX-4T1 (Amersham)

Πλασμιδιακός φορέας που φέρει τον υποκινητή PTac και το γονίδιο lacI για τον έλεγχο της έκφρασης του καταστολέα του lac οπερονίου. Περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της MCS, παρέχοντας τη δυνατότητα να υπερεκφραστούν κλωνοποιημένες πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST σε προκαρυωτικά κύτταρα. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του HIF-2α πλήρους μήκους και των μικρότερων τμημάτων του (1-497, 1-542, 1-679, 1-820, 366-497, 366-542, 366-679, 366-820, 366-870, 542-820, 542-870),

Εικόνα 32: Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGL3-Basic

✓ pCI-Renilla (Promega)

Όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο της διαμόλυνσης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (**Εικόνα 33**).



Εικόνα 33: Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pCI

✓ pGL2-SOD2-Luc

Φέρει τον υποκινητή του ιού SV40 και περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου δισμουτάση του υπεροξειδίου 2 (-1452bp - +46bp) (SOD2) ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 και αποτελεί ευγενική χορηγία του Dr. Garcia (Department of Medicine, University of Texas) (**Εικόνα 34**).



Εικόνα 34: Ο υποκινητής του SOD2

✓ pGL3-PGK-Luc

Φέρει τον ευκαρυωτικό υποκινητή SV40 και περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου κινάση του φωσφογλυκερινικού (-678bp - +1bp) (PGK) , ο οποίος ελέγχει την

έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και αποτελεί ευγενική χορηγία της Dr. Simon (Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania) (**Εικόνα 35**).



Εικόνα 35: Ο υποκινητής του *PGK*

B.1.4 Εκκινήτες, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA)

Οι εκκινήτες και τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την εταιρία VBC-Biotech.

- ✓ Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για Real Time PCR:

EPO F: 5' - AGG CCG AGA ATA TCA GAC G - 3'

EPO R: 5' - CCA TCC TCT TCC AGG CAT AGA AA -3'

PGK F: 5' - CTG TGG CTT CTG GCA TAC CT - 3'

PGK R: 5' - CGA GTG ACA GCC TCA GTA TA - 3'

ACTB F: 5' - CCA ACC GCG AGA AGA TGA - 3'

ACTB R: 5' - CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG - 3'

PAI-1 F: 5' - CAG CTG ACA GGA GGA GA - 3'

PAI-1 R: 5' - CCC ATG AGC TCC TTG TAC AGA T - 3'

HPRT1 F: 5' - TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC -3'

HPRT1 R: 5' - CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT -3'

- ✓ Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του HIF-2α.

S383A F: 5'-GGC AAG GGG GCT GTG GCT GAG AAG AGT AAC TTC-3'

S383A R: 5'-GAA GTT ACT CTT CTC AGC CAC AGC CCC CTT GCC-3'

S383D F: 5'- GT GGC AAG GGG GCT GTG GAT GAG AAG AGT AAC TTC C-3'

S383D R: 5'- G GAA GTT ACT CTT CTC ATC CAC AGC CCC CTT GCC AC-3'

S386A F: 5'-G GGG GCT GTG TCT GAG AAG GCT AAC TTC CTA TTC ACC-3'

S386A R: 5'-GGT GAA TAG GAA GTT AGC CTT CTC AGA CAC AGC CCC C-3'

T528A F: 5'-G GAC TTG GAG GCA CTG GCA CCC-3'

T528A R: 5'-GGG TGC CAG TGC CTC CAA GTC C -3'

T528E F: 5'- CTG GAC TTG GAG GAA CTG GCA CCC-3'

T528E R: 5'- GGG TGC CAG TTC CTC CAA GTC CAG-3'

Με έντονα γράμματα επισημαίνονται τα νουκλεοτίδια όπου πραγματοποιήθηκε η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, ώστε κατά τη μετάφραση τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στις σερίνες 383 και 386 και στη θρεονίνη 528, να μεταφραστούν σε αλανίνες.

Για την αποσιώπηση της έκφρασης της κινάσης της καζείνης 1δ (CK1δ) χρησιμοποιήθηκαν τα Hs-CSNK1D5 HP (CCGGTCTAGGATCGAAATGTT) and Hs-CSNK1D6 HP (CTCCCTGACGATTCCACTGTA και ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου το Allstars siRNA (Qiagen).

B.1.5 Αλληλούχιση (Sequencing)

Η αλληλούχιση των πλασμιδιακών κατασκευών στις οποίες εμπεριέχονται οι μεταλλάξεις στο cDNA του HIF-2α πραγματοποιήθηκε από την εταιρία VBC-Biotech DNA Sequencing.

B.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma (St.Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).

B.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας

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

B.1.8 Αντισώματα

- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα (Novus Biologicals) σε αραίωση 1:750.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα (*Lyberopoulou et al., 2007*) σε αραίωση 1:1000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-ARNT αντίσωμα (BD Biosciences) σε αραίωση 1:500.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-CK1δ αντίσωμα (Santa Cruz) σε αραίωση 1:250.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-Actin αντίσωμα (Cell Signalling) σε αραίωση 1:5000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-GST αντίσωμα (Amersham Biosciences) σε αραίωση 1:15000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-tubulin αντίσωμα (Cell Signalling) σε αραίωση 1:10000.
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-FLAG M5 αντίσωμα (Sigma) σε αραίωση 1:10000.
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-USF2 αντίσωμα (Santa Cruz) σε αραίωση 1:250.
- ✓ Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz) ή με Cy3(για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι, ποντικό ή κατσίκα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα πλασμίδια είναι δίκλιωνα, κυκλικά μόρια DNA που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται ημιαυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Με τη βοήθεια ενός ειδικού ενζύμου, της DNA λιγάσης, τα δύο είδη DNA ενώνονται. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να

εισαχθεί σε βακτηριακά κύτταρα με μια διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός. Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων έναντι των κυττάρων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο βασίζεται στην παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο των ανασυνδυασμένων κλώνων.

B.2.2 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οποιοδήποτε τμήμα DNA μπορεί να κοπεί σε μικρότερα τμήματα με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητα του (Unit/μl). 1 unit ενζύμου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1 μg DNA σε μια ώρα. Η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε είτε για τον έλεγχο παρουσίας ενθέματος DNA και προσανατολισμού του ή για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων που προορίζονται για κλωνοποίηση. Η αντίδραση πέψης έγινε σε 20 μl τελικού όγκου και περιείχε 1 μg πλασμιδιακού DNA, 1 Unit του αντίστοιχου ενζύμου (New England Biolabs) και 1x κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρία παρασκευής. Ακολούθησε επώαση για 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

B.2.3 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλιωνα ή δίκλιωνα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια) μετά από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση, εμποδίζοντας την επανασύνδεσή τους. Η αποφωσφορυλίωση έγινε με τη χρήση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (New England BioLabs). Η αντίδραση περιείχε 1 μg DNA που είχε κοπεί με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, 20 Units CIP (10.000 Unit/ml, New England Biolabs) και H₂O έως τα 30μl. Ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για 1 ώρα.

B.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αгарόζης και η απομόνωση τους από αυτές αποτελεί έναν τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αгарόζης με προσθήκη αгарόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό

διάλυμα και θέρμανση έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από: το μέγεθος των τμημάτων του DNA, τη συγκέντρωση της αгарόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση 1% αгарόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα (590 nm) χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή. Το διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων αποτελείται από 5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% κυανού του ξυλενίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 V για 30 λεπτά έως 1 ώρα.

B.2.5 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA από πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που προτείνεται από την εταιρία, με διαλύματα που παρέχονται από το συγκεκριμένο kit και έχει ως εξής: Αρχικά το κομμάτι αгарόζης που περιείχε το προς απομόνωση DNA αφαιρέθηκε από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Το κομμάτι θερμάνθηκε με διάλυμα QG στους 50⁰C για 10 λεπτά για τον αποπολυμερισμό της αгарόζης και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Προστέθηκε στη συνέχεια ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύτηκε κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Ακολούθησε απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών με πλύση με διάλυμα PE. Η έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA έγινε με 30 μl δις απεσταγμένου H₂O σε pH 8.

B.2.6 Αντίδραση λιγάσης

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο

είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων DNA (π.χ. ενός ενθέματος και ενός πλασμιδίου) με συμπληρωματικά 3' και 5' άκρα. Για την αντίδραση της λιγάσης πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε αναλογία 1/4 προστέθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης, 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/μl, New England Biolabs) και H₂O. Το μίγμα επώαστηκε ολονύχτια στους 16 °C.

B.2.7 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός E.coli Top10 και E.coli BL21RIL

Σε στελέχη E.coli Top10 και BL21RIL έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων ή των αντιδράσεων λιγάσης. Πρώτα παρασκευάστηκαν κύτταρα E.coli Top10 και E.coli BL21RIL δεκτικά για μετασχηματισμό (competent). Εμβολιάστηκαν καλλιέργειες 3 ml θρεπτικού TYM (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl και 10 mM MgSO₄) με αποικίες από πιάτο με stock καλλιέργειες Top10 και BL21RIL αντίστοιχα και έγινε ολονύχτια επώαση στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραιώση των καλλιεργειών 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml και επώασή τους στους 37°C μέχρι OD_{600nm}=0,350-0,400. Τότε οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 4000xg για 5 λεπτά στους 4 °C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη) και επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 4000xg για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl και 20% γλυκερόλη) και επώαστηκε για 1 ώρα στον πάγο. Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 100 ng/μl πλασμιδίου ή 20 μl από αντίδραση λιγάσης σε κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min. Μετά από θερμικό σοκ στους 42°C για 2 λεπτά, προστέθηκαν 700 μl θρεπτικού LB (Luria Broth) χωρίς αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 4000xg, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl κυττάρων τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάστηκε ως εξής: Για 1 lt προστέθηκαν 10 g τρυπτόνης, 5 g εκχυλίσματος ζύμης και 5 g NaCl. Στην περίπτωση παρασκευής στερεού θρεπτικού μέσου LB-άγαρ ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστέθηκαν επιπλέον 20 g άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώθηκε ενώ

λίγο πριν την πήξη του διαλύματος έγινε προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού και επίστρωση σε τρυβλία.

B.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες 3 ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής εμβολιάστηκαν αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα TOP10 και επώαστηκαν O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Την άλλη μέρα συλλέχθηκε η καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε στα 6000xg για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 300 µl διαλύματος TENS (0,1N NaOH, 0,5% SDS σε TE) και έγινε έντονη ανάδευση. Κατόπιν προστέθηκαν 150 µl διαλύματος οξικού νατρίου 3 M pH 5,2 έγινε έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 11000xg και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι. Το DNA κατακρημνίστηκε μέσω προσθήκης 100% ισοπροπανόλης και ψύξης στους -20°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, ξέπλυμα με 500 µl 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στα 11000xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να επαναδιαλυθεί τελικά σε 30 µl αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH₂O).

B.2.9 Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-2α με PCR

Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται παρακάτω στην ενότητα B.2.33. Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν για το τμήμα του HIF-2α 366-497 που φέρει τη μετάλλαξη S383A και για τα τμήματα του HIF-2α 366-542 που φέρουν τις μεταλλάξεις S383A, S386A και T528A. Πρώτα ενισχύθηκαν τα τμήματα του HIF-2α με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράσης για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της PCR και έπειτα χρησιμοποιήθηκε Vent πολυμεράση λόγω της μεγαλύτερης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στις ίδιες συνθήκες.

Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

- 200 ng εκμαγείο DNA (pFlag-CMV2-HIF-2α 366-497 ή pFlag-CMV2-HIF-2α 366-542)
- 1x Thermopol Buffer
- 2 mM από κάθε dNTP
- 1 unit Vent πολυμεράση

- 20 pmoles/μl πρόσθιου εκκινητή
- 20 pmoles/μl οπίσθιου εκκινητή
- H₂O έως όγκο 100 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 5 min → 94 °C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1 min → 94 °C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1 min → 50 °C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση
- 30 sec → 72 °C Επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 30

- 5 min → 72 °C Τελική επιμήκυνση

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (T_m) Oligo Calculator. Στο τέλος 2 μl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5 %. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του PCR clean kit της εταιρείας Qiagen και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

B.2.10 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση (Site-directed mutagenesis)

Η τεχνική της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιεί τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μαζί με ειδικούς εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια για να εισάγει σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA με σκοπό την αλλαγή ή την απαλοιφή ενός ή περισσότερων κωδικονίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) το οποίο χρησιμοποιεί την DNA πολυμεράση PfuUltra για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA από ολόκληρους πλασμιδιακούς φορείς με μεγάλη ακρίβεια χρησιμοποιώντας παράλληλα χωρίς πρόβλημα τα μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια για την στοχευμένη αλληλουχία του DNA. Απαραίτητα υλικά για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι ένας υπερελικωμένος πλασμιδιακός φορέας με το προς μελέτη ένθεμα και δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Τα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι συμπληρωματικά για τις δύο αλυσίδες του πλασμιδιακού φορέα επιμηκύνονται κατά την αντίδραση της PCR από την πολυμεράση PfuUltra δημιουργώντας ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο. Μετά την PCR, ακολουθεί πέψη με το ένζυμο DpnI το οποίο αναγνωρίζει

μεθυλιωμένες περιοχές στο DNA, με αποτέλεσμα να προκαλεί την πέψη του μητρικού πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε σαν καλούπι αλλά να αφήνει ανέπαφα τα μεταλλαγμένα πλασμίδια που δημιουργήθηκαν κατά την PCR και δεν είναι μεθυλιωμένα. Ακολουθεί μετασχηματισμός σε επιλεκτικά σε μετασχηματισμό βακτήρια TOP10 και επιλογή των κλώνων που περιέχουν τη μετάλλαξη με αλληλούχηση. Πιο συγκεκριμένα η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής :

Σχεδιάστηκαν ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για τις αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν τις: σερίνη 383, σερίνη 386 και θρεονίνη 528 του HIF-2α με τις αντίστοιχες επιθυμητές μεταλλάξεις (βλ. Υλικά-Εκκινητές) και κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων υπολογίστηκε από τον τύπο: $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% mismatch$, όπου N είναι το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου σε βάσεις (ενδείκνυται να είναι ανάμεσα στις 25 με 45 βάσεις με την περιοχή προς μετάλλαξη να βρίσκεται στο κέντρο του ολιγονουκλεοτιδίου), %GC είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων G και C στο σύνολο των νουκλεοτιδίων (ενδείκνυται το ποσοστό να είναι τουλάχιστον 40%) και % mismatch είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων που είναι διαφορετικά σε σχέση με την αλληλουχία αργίου τύπου.

Ακολούθησε PCR με το εξής μίγμα:

- 20 ng pBlueScript - HIF-2α WT (εκμαγείο)
- 1x Buffer
- 125 ng πρόσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 125 ng οπίσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 1 μl από μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs
- 2,5 units PfuUltra HF DNA pol
- H₂O ως 50 μl

Οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες:

- 30 sec 95°C
- 30 min 95°C
- 1 min 55°C
- 6 min 68°C

Τα στάδια 2,3 και 4 επαναλήφθηκαν για 18 κύκλους.

Μετά το τέλος κρατήθηκαν από 2 μl από την κάθε αντίδραση σαν δείγμα ελέγχου για τον μετέπειτα μετασχηματισμό. Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR με το

ένζυμο *DpnI* για 1 ώρα στους 37°C. Το προϊόν πέψης υπέστη καθαρισμό με τη μέθοδο της κατακρήμνισης του DNA με 100% αιθανόλη (προσθήκη 3 όγκων αιθανόλης, επώαση στους -20°C για 30 λεπτά, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά και επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 μl H₂O). Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός σε κύτταρα TOP10 και επίστρωση σε τρυβλία LBamp. Την επόμενη μέρα επιλέχθηκαν αποικίες, εμβολιάστηκαν μικρές καλλιέργειες, από τις οποίες έγινε απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA απεστάλη στην εταιρία VBC-Biotech DNA Sequencing για αλληλούχιση και ανίχνευση της ύπαρξης ή όχι της επιθυμητής μετάλλαξης.

B.2.11 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής: Μια αποικία από τρυβλίο που περιείχε κύτταρα με τα μετασχηματισμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντιβιοτικά αμικιλίνη και χλωραμφαινικόλη και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C. Με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάστηκαν 400 ml LB (με αντιβιοτικά) και επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε στα 0.4 (μέτρηση στα 600 nm). Στην καλλιέργεια προστέθηκε 0,5 mM IPTG και η επώαση συνεχίστηκε στους 18°C. Μετά την πάροδο 3 ωρών έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 4000xg. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με H₂O και αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

B.2.12 Λύση των κυττάρων E.coli με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (8 ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 400 ml αρχικής καλλιέργειας). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (6 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 50 δευτερολέπτων) και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10000xg για 30 λεπτά για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C. Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιείχε 20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5% γλυκερόλη, 1 % Triton X-100, και 5 mM DTT.

B.2.13 Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) . Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στα σφαιρίδια είναι το τριπεπτιδίο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη. Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χμαιρικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν από τις υπόλοιπες με τον παραπάνω τρόπο. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια καθαρής γλουταθειόνης η οποία στην ανηγμένη μορφή της ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των σφαιριδίων της στήλης για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον συγκεκριμένο τρόπο απομόνωσης ήταν η εξής: Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εξέφραζαν τις χμαιρικές GST-πρωτεΐνες επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (~250 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 400 ml καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα μεταφέρθηκε σε

κατάλληλες στήλες των 8 ml όπου κατακρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 8 ml διαλύματος λύσης. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με επώαση των σφαιριδίων με 1 ml διαλύματος 10 mM γλουταθειόνης, 25 mM Tris pH 9 για 5 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του κλάσματος.

B.2.14 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο Bradford. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 470 nm στα 595 nm. Το αντιδραστήριο αποτελείται από την παραπάνω χρωστική σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Το αντιδραστήριο αναμιγνύεται με H₂O σε αναλογία 1/4 σε τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρείται στα 595 nm. Η απορρόφηση αυτή ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).

B.2.15 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα βασικά υλικά της μεθόδου είναι μια ασυνεχής πηκτή πολυακρυλαμίδιου και το άλας νατρίου του θειϊκού δωδεκυλίου (SDS) που δρα ως αποδιατακτικό μέσο. Το SDS είναι ένα ανιονικό αντιδραστήριο που εφόσον δεσμευτεί στις πρωτεΐνες και τις αποδιατάξει, τους προσθέτει καθαρό αρνητικό φορτίο. Η πρόσδεση του SDS στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του φορτίου ανά μονάδα μάζας, έχοντας ως αποτέλεσμα η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών να είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad. Η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 8-12% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O. Η πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) αποτελείται από 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04%

TEMED σε H₂O. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0.1% SDS και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150V.

B.2.16 Βαφή της πηκτής πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή βάφεται με διάλυμα Coomassie 0.1%, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η πηκτή αποχρωματίζεται με επώαση σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 20% μεθανόλης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος γίνεται ενυδάτωση της πηκτής με αφαίρεση του διαλύματος αποχρωματισμού και επώαση σε νερό υπό συνεχή ανάδευση.

B.2.17 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Αφού ολοκληρωθεί η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, η πηκτή που περιέχει τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες τοποθετείται μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8,5 (125 mM Tris, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας βορικού οξέος) για 10 λεπτά και μετά στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) ώστε να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη με βάση υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί μέσα στη συσκευή, το οποίο είχε επίσης εμβαπτιστεί στο διάλυμα μεταφοράς και αφού αφαιρέθηκαν τυχόν φυσαλίδες, η μεταφορά έγινε στα 10V για 70 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ) και ξεπλύθηκε με H₂O μέχρις ότου εμφανιστήκαν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γαλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 λεπτά). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 λεπτά). Ακολούθως έγινε 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, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και ξέπλυμα σε PBS- 0,1 % Tween 20 (3x 5 λεπτά). Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 30 μ l 3% H₂O₂ και 100 μ l κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3 αμινο-φθαλικό, αντίδραση η οποία εκπέμπει φως. Η λήψη εικόνων έγινε στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software.

B.2.18 Ανοσοκατακρήμνιση

Με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης είναι δυνατή η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από εκχυλίσματα κυττάρων με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της εν λόγω πρωτεΐνης. Το αντίσωμα που έχει δεσμεύσει την πρωτεΐνη μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί με τη χρήση σφαιριδίων Σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (Protein A-Sepharose), λόγω της ικανότητας της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στην σταθερή περιοχή των IgG αντισωμάτων. Έτσι με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνουμε τον εξειδικευμένο διαχωρισμό/καθαρισμό μιας πρωτεΐνης μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Επίσης είναι δυνατόν κάτω από κατάλληλα διαμορφωμένες συνθήκες εφαρμογής της τεχνικής, να συγκαθαριστούν και πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται ισχυρά πάνω στην πρωτεΐνη-στόχο (υποστρώματα, ρυθμιστές, κ.α.), προσφέροντας μια γενική εικόνα των αλληλεπιδράσεων στο φυσιολογικό περιβάλλον της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα σφαιρίδια εξισορροπούνται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμία, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 1% Triton X-100, 0,15 M NaCl και 2 μ M MgCl₂ και παραλαμβάνονται μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, με απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος. Παράλληλα κατάλληλος όγκος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα (ανάλογα με το πείραμα)

επώζονται με 1.5 μg αντισώματος, υπό ανακίνηση για χρονικό διάστημα 2 ωρών στους 4° C ώστε να αλληλεπιδράσουν τα αντισώματα με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν. Μετά το πέρας της διαδικασίας στα σωληνάκια προστίθενται τα εξισορροπημένα σφαιρίδια Protein A-Sepharose. Η δέσμευση του αντισώματος στα σφαιρίδια διαρκεί 4 ή 16 ώρες και ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να αποφευχθούν οι τυχόν ασθενείς αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλύονται σε διάλυμα φόρτωσης και αναλύονται με SDS PAGE και ανοσοαποτύπωση.

B.2.19 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών in vitro

Οι απομονωμένες GST-πρωτεΐνες δοκιμάστηκαν σε πειράματα φωσφορυλίωσης είτε με εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 είτε με ανασυνδυασμένη κινάση καζεΐνης 1δ (CK1δ). Σε κάθε αντίδραση επώαστηκαν 1 μg από κάθε μία από τις πρωτεΐνες με περίπου 1 μg εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 ή 5 μονάδες ενζύμου CK1δ. Το μίγμα επώασης επίσης περιλαμβάνει 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 80 mM NaCl, 20 mM γλυκερινοφωσφορικό (αναστολέας φωσφατασών), 0.6 μCi [γ-³²P] ATP και 25 μM ATP. Ο τελικός όγκος επώασης είναι 25 μl και ρυθμίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας H₂O. Τα δείγματα επώάζονται για 30 λεπτά στους 30° C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 50 mM DTT και διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων που χρησιμοποιείται στην SDS ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και ηλεκτροφορούνται. Ακολουθεί βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue και αποχρωματισμός της. Στη συνέχεια γίνεται ξήρανση της πηκτής και αυτοραδιογραφία. Μετά από την οπτική σύγκριση των ραδιενεργών ζωνών που προκύπτουν, γίνεται κοπή των τμημάτων της πηκτής που αντιστοιχούν στις ραδιενεργές ζώνες και μέτρηση των κρούσεων τους κατά Cherenkov στον μετρητή ραδιενέργειας Wallac 1409. Βάση της μέτρησης γίνεται η ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του HIF-2α.

B.2.20 Αυτοραδιογραφία

Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του ακτινογραφικού film, να προσβάλλεται από την εκπεμπόμενη β-ακτινοβολία του ισότοπου ³²P που χρησιμοποιείται για την επισήμανση διάφορων πρωτεϊνικών μορίων. Στην περίπτωση των πηκτωμάτων που έχουν στερεωθεί, το πήκτωμα ανακινείται για 20 λεπτά σε νερό ώστε να ξεπλυθεί και εν συνεχεία ξηραίνεται πάνω σε χαρτί ανοσοαποτύπωσης για 1 ώρα υπό την

παρουσία κενού σε ειδική συσκευή. Η έκθεση του film γίνεται σε φωτοπολλαπλασιαστικούς θαλάμους. Μία πρώτη εκτίμηση του χρόνου έκθεσης που απαιτείται μας δίνει η μέτρηση των κρούσεων της πηκτής σε συσκευή Geiger. Η εμφάνιση και στερέωση του film γίνεται με εμβάπτιση υπό ανακίνηση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak) και στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak).

B.2.21 Ανάλυση φωσφοαμινοξέων

Η ταυτοποίηση του αμινοξέος μιας πρωτεΐνης που φωσφορυλιώνεται είναι δυνατή μετά από όξινη υδρόλυση σε υψηλή θερμοκρασία της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης, η οποία βρίσκεται καθηλωμένη σε μεμβράνη PVDF. Τα φωσφοαμινοξέα που προκύπτουν αναλύονται με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε δύο διαστάσεις σε πλάκες κυτταρίνης, είτε υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, είτε χρησιμοποιώντας κατάλληλο διάλυμα οργανικών διαλυτών συγκεκριμένου pH (**Grangeasse et al., 1999**). Με βάση τη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν τα φωσφοαμινοξέα (P-Ser, P-Thr, P-Tyr) γίνεται ο διαχωρισμός τους. Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η ακόλουθη: Μετά από τη φωσφορυλίωση του GST-HIF-2α από την CK1δ γίνεται αρχικά διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS ηλεκτροφόρηση). Ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη PVDF για 1 ώρα με σταθερή ένταση ρεύματος 45 mA. Έπειτα από την ταυτοποίηση πάνω στη μεμβράνη, της ραδιενεργής ζώνης που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη στόχο μετά από χρώση της μεμβράνης σε διάλυμα Ponseau, το τμήμα αυτό της μεμβράνης τεμαχίζεται και εμβάπτιζεται σε διάλυμα HCl 5,7 N σε θερμοκρασία 110° C για 60 λεπτά. Η υδρόλυση διακόπτεται με την άμεση προσθήκη 500 μl κρύου ddH₂O ώστε να παρεμποδιστεί η περαιτέρω υδρόλυση προς ελεύθερα φωσφορικά και το δείγμα τοποθετείται στους -20° C. Αφού ακολουθήσουν δύο λυοφιλήσεις με ενδιάμεση επαναιώρηση του στερεού υπολείμματος σε 500 μl ddH₂O γίνεται μια τελευταία λυοφίληση αφού το στερεό υπόλειμμα έχει αιωρηθεί σε 100 μl ddH₂O. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 10 μl του πρώτου διαλύτη ανάπτυξης και γίνεται προσθήκη μη ραδιενεργών φωσφοαμινοξέων τελικής συγκέντρωσης 140 μg/ml το καθένα. Ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες κυτταρίνης. Ένας μικρός όγκος του δείγματος <5 μl ενσταλάσσεται πολύ προσεκτικά πάνω στην πλάκα κυτταρίνης και ξηραίνεται με ρεύμα αέρα. Μετά την ενστάλαξη του δείγματος, η πλάκα τοποθετείται μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης ο οποίος περιέχει το πρώτο διάλυμα ανάπτυξης ισοροπανόλη :

νερό, σε αναλογία 70 : 30 και ο διαχωρισμός κατά την πρώτη διάσταση διαρκεί 3-4 ώρες. Η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαχωρισμός κατά τη δεύτερη διάσταση γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο μόνο που στην περίπτωση αυτή το διάλυμα ανάπτυξης περιέχει ισοβουτυλική αλκοόλη : οξικό οξύ : νερό, σε αναλογία 80 : 30 : 40). Αφού η πλάκα κυτταρίνης ξηραθεί, ακολουθεί ψεκασμός με 0.5% w/v νινυδρίνης σε ακετόνη και ξήρανση στους 65° C για 5 λεπτά, ώστε να γίνει η εμφάνιση των κηλίδων των τριών φωσφοαμινοξέων αναφοράς που προσθέσαμε στο αρχικό μας δείγμα. Οι πλάκες εκτίθενται σε X-Omat S film (Kodak), για δύο ημέρες έως μία εβδομάδα στους -20° C. Με την εμφάνιση των ραδιενεργών κηλίδων του δείγματος και την άμεση σύγκριση τους με τις αντίστοιχες των φωσφοαμινοξέων αναφοράς της πλάκας κυτταρίνης, γίνεται η ταυτοποίηση του αμινοξέος που φωσφορυλιώνεται.

B.2.22 Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Biosera το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βωός (FBS) και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

B.2.23 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών

Η διαδικασία για το πάγωμα κυττάρων ύστερα από καλλιέργεια ήταν η εξής: Τα προσκολλημένα σε τρυβλίο κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS (Phosphate buffered saline) (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4), προστέθηκε 1 ml 0,2% τρυψίνης και το τρυβλίο επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 2500xg, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml θρεπτικού μέσου ψύξης που περιείχε 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε FBS. Ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους με τελική αποθήκευση σε υγρό άζωτο (-196 °C).

Η ανάστροφη διαδικασία για την επανέναρξη καλλιιεργειών από παγωμένα κύτταρα ήταν η εξής: Τα κύτταρα ξεπάγωσαν άμεσα με θέρμανση στους 37°C, μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο που περιείχε 7ml θρεπτικού μέσου DMEM και 10% FBS και επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂.

B.2.24 Επίδραση ουσιών και μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α

Η επαγωγή των HIF στις διάφορες κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) οι οποίες αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO₂ (Baker Ruskinn) Για την περαιτέρω μελέτη της επαγωγής των HIF, τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας υπό την ταυτόχρονη επίδραση παραγόντων φλεγμονής (TNF-α, IL-1β, IL-6 10 ng/μl) σε συγκεντρώσεις και χρόνους που αναφέρονται στα αποτελέσματα. Για την αναστολή της δράσης της κινάσης της καζείνης 1δ (CK1δ), τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της D4476 (10μM) (Cayman Chemical) για 16 ώρες. Τέλος, για την αναστολή της δράσης της εξπορτίνης CRM1, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της λεπτομυκίνης (LMB 10 ng/μl).

B.2.25 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1x και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με χρήση διαλύματος λύσης (25mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 2 mM PMSF.) Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών και προστίθεται ακριβώς πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 12000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που αποτελεί και το πρωτεϊνικό δείγμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και πριν την ανάλυσή του με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, προστέθηκε 1 mM DTT και διάλυμα Laemli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και ακολούθησε θέρμανση του στους 95 °C για 5 λεπτά και φύλαξη στους -20 °C.

B.2.26 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1x και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με χρήση διαλύματος 0.2% τρυψίνης. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml και φυγοκεντρήθηκε στα 3000xg για 1 λεπτό στους 4°C. Μετά από απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400 μl υποτονικού διαλύματος A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM Digitonin, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF). Ακολουθεί ανάδευση για 1 λεπτό σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 7000xg.

Το υπερκείμενο που αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι ενώ το ίζημα επαναιωρείται σε 400 μl υπέρτονου διαλύματος B (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 25% Glycerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF). Ακολουθεί ανάδευση για 1 λεπτό σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 30 min. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 7000xg και το υπερκείμενο που αποτελεί το πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι. Πριν την ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

B.2.27 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Με τη χρήση τεχνικών όπως ο ανοσοφθορισμός, είναι δυνατός ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Η παρατήρηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών είναι δυνατή με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι σε αυτές. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι συζευγμένα με μια φθορίζουσα ουσία (άμεσος ανοσοφθορισμός) είτε να αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει τη φθορίζουσα ομάδα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Και στις δύο περιπτώσεις το σήμα του φθορισμού υποδεικνύει το που εντοπίζεται η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος μας μέσα στα κύτταρα. Επιπλέον, ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση των HIF-1α, HIF-2α και των FLAG-HIF-2α μορφών. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την μέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%- 80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS1x και μονιμοποιήθηκαν με PBS1x/3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS και κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο αντίσωμα προστέθηκε για μια ώρα σε PBS-0.1% Tween/1% BSA, σε θερμοκρασία δωματίου για την περίπτωση έναντι του επιτόπου

FLAG, ενώ η επώαση με το πρώτο αντίσωμα στην περίπτωση των HIF-1α και HIF-2α πραγματοποιήθηκε για 16 ώρες στους 4°C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικά πλυσίματα με PBS 0,1% Tween. Ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με Cy3 σε αραιώση 1:500) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 4 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories ή Mowiol) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη) η οποία έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο DNA και έτσι να διακρίνονται οι πυρήνες. Η παρατήρηση των καλυπτρίδων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan, με μεγεθυντικούς φακούς 20X, 40X και 100X, με φίλτρα για DAPI, FITC, Cy3.

B.2.28 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων. Πιο, συγκεκριμένα, η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη χρήση μη λιπιδικού πολυμερούς (Turbofect, Fermentas). Το DNA εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός ιζήματος που σχηματίζεται με το διάλυμα ενός μη λιπιδικού πολυμερούς το οποίο προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Αρχικά, γίνεται η προετοιμασία του ιζήματος. Η γενική αναλογία DNA:μέσο διαμόλυνσης είναι 1:2 σε ένα σωληνάκι με θρεπτικό υλικό απουσία αντιβιοτικών και ορού. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA ανάλογα με τη διάμετρο του πιάτου ποικίλλει από 1 μg έως 8 μg για πλάκες των 24 πηγαδίων και πιάτα των 10 cm αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη του DNA και του μέσου διαμόλυνσης ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα. Κατόπιν στο μίγμα προστίθεται DMEM με 5% FBS και το μίγμα διασπείρεται πάνω από τα κύτταρα και ακολουθεί επώαση στους 37 °C, 5% CO₂ παρουσία του Turbofect. Μετά το τέλος της επώασης αντικαθίσταται το θρεπτικό υλικό με πλήρες και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37 °C, 5% CO₂. Την επόμενη μέρα γίνεται κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

B.2.29 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA

Με τον όρο “RNA παρέμβαση” (RNA interference-RNAi) ή αποσιώπηση αναφερόμαστε σε έναν θεμελιώδη βιολογικό μηχανισμό κυτταρικής ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων μετα-μεταγραφικά. Η εκκίνηση του γίνεται από πρόδρομα δίκλινα μόρια RNA (double-stranded RNA-dsRNA) των οποίων το μέγεθος και η προέλευση ποικίλει. Στη συνέχεια συμμετέχουν στην αναγνώριση των συμπληρωματικών τους μονόκλωνων μορίων RNA και οδηγούν είτε στη διάσπαση ή τη μεταφραστική καταστολή των τελευταίων.

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

Για την αποσιώπηση της έκφρασης της CK1δ έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το αντίστοιχο ολιγοριβονουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δημιουργίας λιποσωμάτων με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen). Ως αρνητικό δείγμα siRNA χρησιμοποιήθηκε το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών. Αρχικά έγινε προετοιμασία των λιποσωμάτων. Σε ένα σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκαν τα siRNA. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκε 1.5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX, ανακινήθηκε καλά και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το περιεχόμενο από τα δυο σωληνάκια ενώθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά για να δημιουργηθούν λιποσώματα που να περιέχουν το siRNA έναντι της CK1δ. Στη συνέχεια τα λιποσώματα μαζί με 400 μl DMEM, χωρίς ορό και αντιβιοτικά, τοποθετήθηκαν πάνω από την επιφάνεια κυττάρων (40-50% επικάλυψη επιφάνειας τρυβλίου) και έγινε επώαση για 4 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Μετά το πέρας των 4 ωρών έγινε αλλαγή σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και αντιβιοτικά και τα κύτταρα επώαστηκαν εκ νέου στους 37°C, 5% CO₂ για 16 ώρες, οπότε την επόμενη μέρα τα κύτταρα επεξεργάστηκαν κατάλληλα ανάλογα με την μετέπειτα πειραματική διαδικασία.

B.2.30 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{2+} . Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2 στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Ως πλασμίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα pGL3-VEGF-5HRE, pGL3-PGK1-Luc και pGL2-SOD2-Luc, και ως πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το μη λιπιδικό πολυμερές Turbofect. Τα κύτταρα λύθηκαν με 100-150 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay system kit της Promega) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση στις 300 rpm. Ακολούθησε στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (10000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 10 μl από το διάλυμα stop & glo (luciferase assay reagent, Promega) προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παρήχθη μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glo σταματάει την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και ταυτόχρονα παρέχει το υπόστρωμα για τη δράση της *Renilla* λουσιφεράσης.

B.2.31 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων ερυθροποιητίνης σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών

Η ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (EPO) είναι μια υψηλά γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη αποτελούμενη από 165 αμινοξέα. Τα επίπεδα της βιολογικά ενεργής EPO στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών προσδιορίστηκαν μέσω ανοσολογικής δοκιμής με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (DRG). Το kit χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα από οργανισμό ποντικού τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά συγκεκριμένες επικράτειες της ανθρώπινης EPO. Το

πρώτο αντίσωμα είναι βιοτινιλωμένο και το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση για ανίχνευση. Η διαδικασία έχει ως εξής: 200 μl από κάθε δείγμα και αρνητικό μάρτυρα προστίθενται σε πλάκα στρεπταβιδίνης. Στη συνέχεια προσθέτουμε στα δείγματα 25 μl από το βιοτινιλωμένο αντίσωμα (Reagent 1) και 25 μl από το συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση αντίσωμα (Reagent 2) και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση στις 170 rpm και χωρίς έκθεση σε φώς. Μετά την 2ωρη επώαση απορρίπτουμε όλο το υγρό από τα πηγαδάκια και ξεπλένουμε 5 φορές με 350 μl από το διάλυμα πλύσης (Working Wash Solution) ώστε να απομακρυνθούν όλα τα μη προσδεδεμένα συστατικά. Το ένζυμο που έχει προσδεθεί στη στερεά φάση, επωάζεται με 150 μl του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) (ELISA Reagent B) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση στις 170 rpm και χωρίς έκθεση σε φώς. Στο τέλος της επώασης, προσθέτουμε 100 μl όξινου διαλύματος (Stopping Solution) που σταματά την αντίδραση και μετατρέπει το χρώμα από μπλε σε κίτρινο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της EPO στο δείγμα. Αφού μετρήσουμε την απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm, κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με βάση τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων μαρτύρων και τελικά προσδιορίζουμε τις συγκεντρώσεις EPO στα δείγματά μας.

B.2.32 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1x, αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με χρήση 500 μl διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης (TriFast, Peqlab) και έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου και ακολούθησε πάλι έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα και φυγοκέντρηση 5 λεπτά στα 14000xg. Μετά την φυγοκέντρηση το ομογενοποίημα έχει διαχωριστεί σε τρεις φάσεις: την υδατική φάση που περιέχει το RNA, την ενδιάμεση φάση που περιέχει το DNA και την οργανική φάση που περιέχει την πρωτεΐνη. Η υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι, προστίθενται 400 μl ισοπροπανόλη και μετά από ανάδευση τοποθετείται για 30 λεπτά στους -20 °C. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 14000xg για την κατακρήμνιση του RNA και αφού απομακρυνθεί η υπερκείμενη ισοπροπανόλη, στο ίζημα προστίθεται 70% αιθανόλη ώστε να ξεπλυθεί το ίζημα. Ακολουθεί ανάδευση και μία ακόμη φυγοκέντρηση, και το ίζημα, από το οποίο έχει απομακρυνθεί η αιθανόλη,

επαναιωρείται σε 30 µl αποστειρωμένου ύδατος καθαρού από ένζυμα αποικοδόμησης του RNA. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκη κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Συγκεκριμένα η ποσότητα του RNA προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260 nm στηριζόμενοι στο ότι διάλυμα RNA 40µg/ml έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Σε μήκος κύματος 280nm ελέγχεται η πρόσμιξη πρωτεϊνών. Ο λόγος των τιμών απορρόφησης που παρουσιάζει ένα διάλυμα RNA, A260/A280, αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του και των προσμείξεων από DNA ή και πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμίξεις, τότε ο λόγος OD260:OD280 = 2. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 έως 2.

B.2.33 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, παράγονται αντίγραφα cDNA από εκμαγείο mRNA. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (σύνθεση πρώτου κλώνου). Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση του επόμενου κλώνου και στα ακόλουθα βήματα

ολοκληρώνεται η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

- ✓ Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με το High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). Στην αντίδραση χρησιμοποιείται RNA και ετοιμάζεται στο πάγο ως εξής:

- 10 µl δείγματος RNA 1 µg

- 2 µl RT Buffer (10x)
- 0,8 µl dNTP Mix (100 mM)
- 2 µl τυχαίων εκκινητών
- 1 µl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4,2 µl H₂O

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με βάση τις συνθήκες που ανέφερε το κιτ. Στα δείγματα μετά την αντίδραση προστίθενται 80 µl ddH₂O και στη συνέχεια διατηρούνται στους -20 °C.

✓ Real-Time PCR

Για την ανίχνευση του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των φθορίζουσων χρωστικών με τη χρωστική SYBR Green. Η SYBR Green δεσμεύεται μη ειδικά πάνω στο δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να εκπέμπει ακτινοβολία, ενώ αντίθετα η μη δεσμευμένη χρωστική δεν εκπέμπει. Κατά τη διάρκεια λοιπόν της επέκτασης του DNA, όλο και περισσότερη χρωστική προσδένεται με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιούνται στο μηχάνημα Mini Opticon System (BioRad). Αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Αυτό περιλαμβάνει το ζεύγος των δύο εκκινητών, το SYBR Green Master Mix και H₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0,5 pmol/µl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά πλαστικά 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 15 µl από το master mix και 5 µl δείγματος cDNA από τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται δύο φορές, σε δύο θέσεις του plate. Επίσης χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου, δείγματα από RNA των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών, τα οποία δεν έχουν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (RTC), καθώς και δείγματα στα οποία αντί cDNA προστίθεται H₂O (NTC).

Στη συνέχεια ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιούνται 40 κύκλοι ενίσχυσης. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 2 min → 50 °C Θερμική ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης
- 10 min → 94 °C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 15 sec → 95 °C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1 min → 60 °C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 40

- 2 sec → 60 °C Τελική επιμήκυνση

Με την τεχνική της Real Time RT-PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του κυττάρου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Με τη σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Στην εργασία αυτή, ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια της β-ακτίνης και της HPRT1. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχει εφαρμοσθεί το μαθηματικό μοντέλο του $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta C_t}$, που έχει και την πιο ευρεία χρήση, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με παρεμφερή τιμή απόδοσης (efficiency, E), καθώς δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση: $R = 2^{-(\Delta C_t \text{ δείγμα} - \Delta C_t \text{ μάρτυρας})}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

B.2.34 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad InStat με ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SEM). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι *** $p < 0.001$, ** $p < 0.001$ και * $p < 0.05$. Η ανάλυση της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με One-Way-analysis of Variance και η σύγκριση επιλεγμένων ζευγών με Bonferroni test.

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

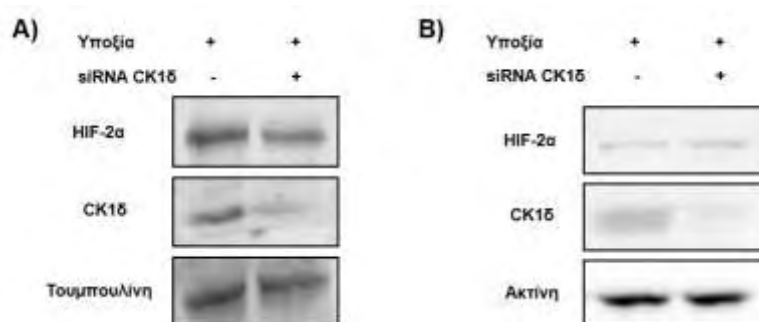
Γ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΣΩ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

Γ.1.1 Μελέτη της επίδρασης της κινάσης CK1δ στη ρύθμιση του HIF-2α

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, ο HIF-2α υφίσταται ρύθμιση σε επίπεδο μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ωστόσο, η γνώση μας σε αυτό το πεδίο με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης. Το εργαστήριό μας έχει μελετήσει εκτενώς τη ρύθμιση της ισομορφής του HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK1/2 και CK1δ. Επιπλέον, η επικράτεια στην οποία φωσφορυλιώνεται ο HIF-1-α (PAS domain) από την CK1δ παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον HIF-2α και στην αλληλουχία αυτή συναντώνται αμινοξικές δομές που είναι πιθανό να φωσφορυλιώνονται από τη CK1δ. Έτσι δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν ο HIF-2α θα μπορούσε να αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης. Το ερώτημα αυτό αποτέλεσε έναν από τους στόχους της παρούσας διατριβής και επιλέξαμε να εξετάσουμε την επίδραση της κινάσης της καζεΐνης (CK1δ) στη ρύθμιση του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, χρησιμοποιώντας ως βιολογικό σύστημα τις καθιερωμένες σειρές κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 και HepG2.

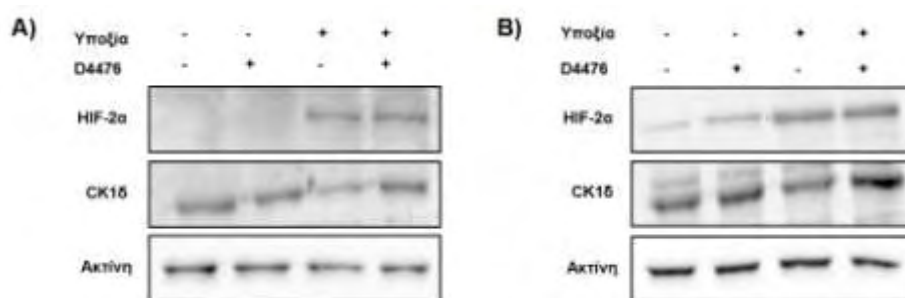
Γ.1.1.1 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στην έκφραση του HIF-2α

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της CK1δ στη ρύθμιση της έκφρασης του HIF-2α, εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής της κινάσης, με πειράματα στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφρασή της με χρήση siRNA. Κύτταρα Huh7 και HepG2 διαμολύνθηκαν με δύο ανεξάρτητες αλληλουχίες siRNA που στοχεύουν εξειδικευμένα την ισομορφή δ της CK1, και στη συνέχεια επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αλληλουχία siRNA που δε στοχεύει σε κανένα γονίδιο. Η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου όπως αναμενόταν, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης της CK1δ μειώθηκαν σημαντικά παρουσία και των δύο siRNA-CK1δ, ενώ τα επίπεδα πρωτεΐνης του HIF-2α και της ακτίνης παρέμειναν αμετάβλητα (**Εικόνα 36**).



Εικόνα 36: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ με siRNA στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α. **A)** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α, CK1δ και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που διαμολύνθηκαν με siRNA-CK1δ (10 nM) και επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. **B)** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α, CK1δ και ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 που διαμολύνθηκαν με εναλλακτική αλληλουχία siRNA-CK1δ (10 nM) και επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 16 ώρες.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, η δράση της CK1δ αναστάλθηκε επίσης με χορήγηση στα κύτταρα του εξειδικευμένου αναστολέα D4476 (10 μM) (Rena et al., 2004). Κύτταρα Huh7 και HepG2 επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας παρουσία ή όχι του αναστολέα D4476 για 16 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-2α και CK1δ δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτες μεταβολές παρουσία του αναστολέα σε καμία συνθήκη, υποδεικνύοντας ότι η αποσιώπηση ή η αναστολή της CK1δ δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α (Εικόνα 37).

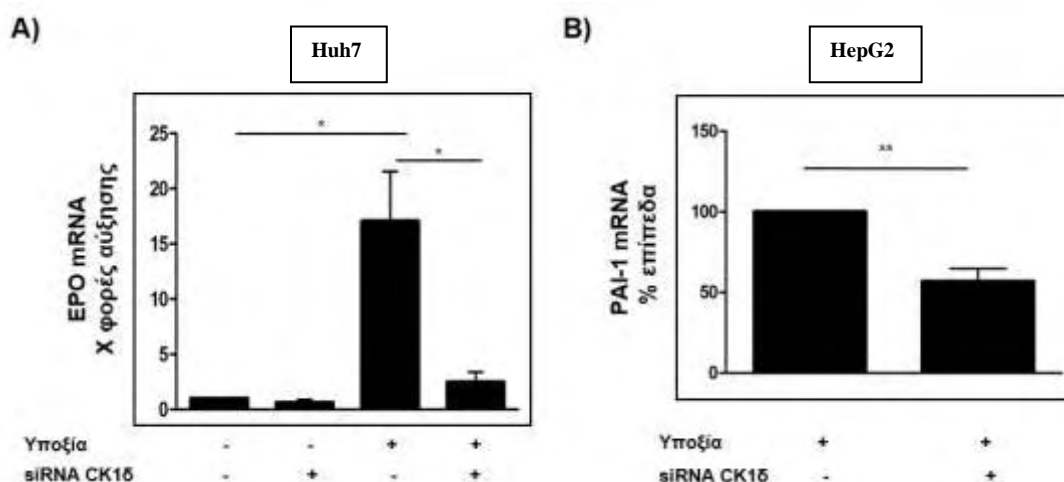


Εικόνα 37: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α, CK1δ και ακτίνη ολικού εκχυλίσματος **A)** κυττάρων Huh7 και **B)** κυττάρων HepG2 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μM) για 16 ώρες.

Γ.1.1.2 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2

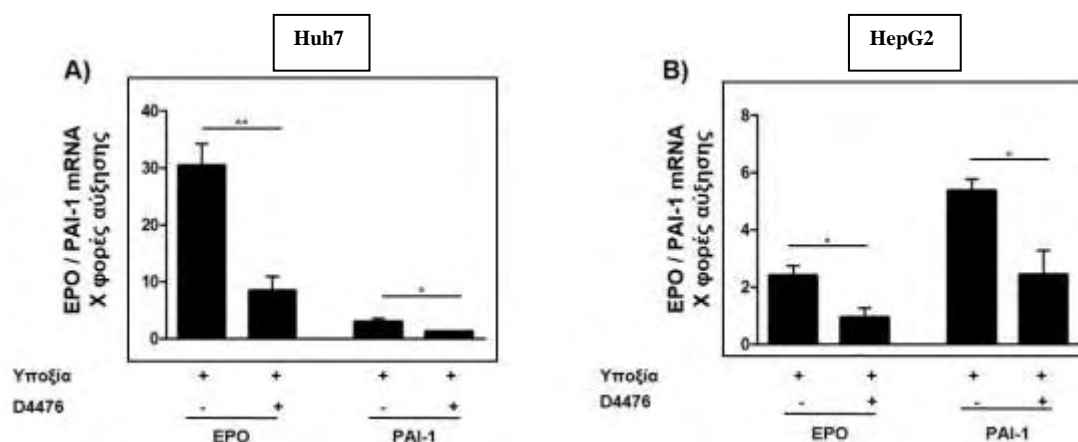
Το επόμενο ερώτημα που εξετάστηκε ήταν εάν η CK1δ επηρεάζει τον HIF-2 σε επίπεδο μεταγραφικής ενεργότητας. Ως εργαλεία για τα πειράματα ελέγχου της

μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, χρησιμοποιήθηκαν το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (*EPO*), το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενεργοποιείται στην υποξία ειδικά από τον HIF-2 σε νεφρικά, ηπατικά κύτταρα και αστροκύτταρα (Warnecke, C et al., 2004, Rankin, EB et al., 2007, Kapitsinou, PP et al., 2010, Befani et al.2013), και το γονίδιο του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*), που επίσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενεργοποιείται στην υποξία ειδικά από τον HIF-2 σε ηπατικά κύτταρα (Pawlus et al., 2012). Η μεταγραφή των παραπάνω εξειδικευμένων γονιδίων στόχων του HIF-2 ελέγχθηκε με τη μέθοδο της Real Time PCR σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με ταυτόχρονη αποσιώπηση ή φαρμακολογική αναστολή της κινάσης CK1δ. Μετρώντας τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* παρουσία και των δύο εναλλακτικών αλληλουχιών siRNA-CK1δ, παρατηρήσαμε δραματική μείωσή τους σε σύγκριση με την επαγωγή τους παρουσία του αρνητικού μάρτυρα siRNA σε υποξία, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αναστολή της έκφρασης της CK1δ σχετίζεται με μειωμένη μεταγραφική δράση του HIF-2 (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ με siRNA στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-2. **A)** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (*EPO*) με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που διαμολύνθηκαν με siRNA-CK1δ (10 nM) και επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*P<0,05). **B)** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με εναλλακτική αλληλουχία siRNA-CK1δ (10 nM) και επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* *P<0,01).

Επιπλέον, τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* μειώθηκαν σημαντικά σε υποξία παρουσία του αναστολέα D4476, σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα από την αποσιώπηση της κινάσης (Εικόνα 39).

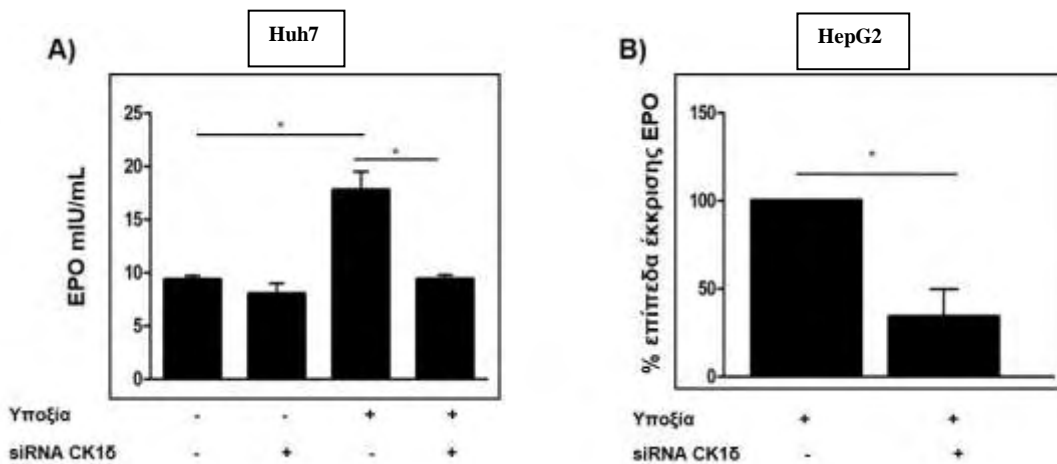


Εικόνα 39: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-2. Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε **A)** κύτταρα Huh7 και **B)** κύτταρα HepG2 που επωάστηκαν σε νορμοξία (21%O₂) και υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*P<0,05, **P<0,01).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η αποσιώπηση ή η αναστολή της CK1δ μειώνουν σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση των *EPO* και *PAI-1* και προτείνουν ότι η CK1δ έχει θετική επίδραση στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος, μέσω ενός μηχανισμού που δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην πρωτεϊνική του σταθερότητα.

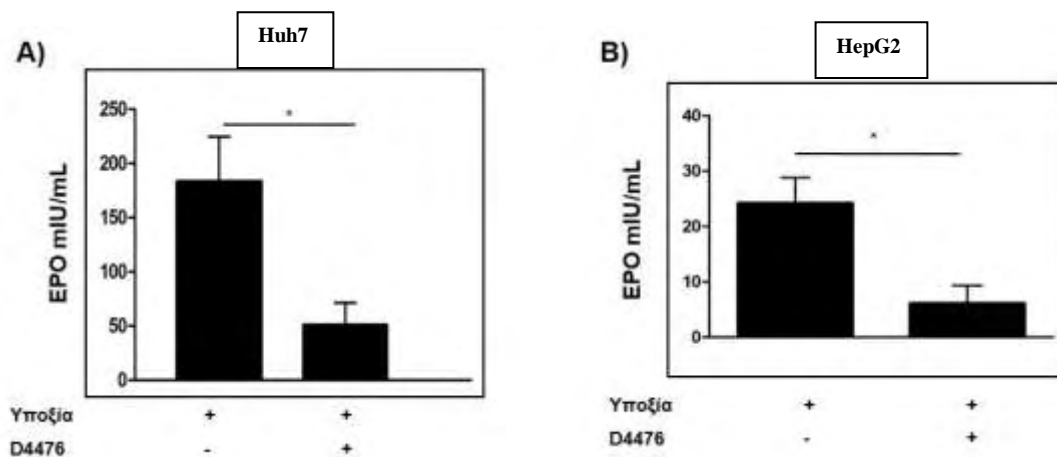
Γ.1.1.3 Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης CK1δ στην έκκριση ερυθροποιητίνης (EPO).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν η παρατηρούμενη επίδραση της CK1δ στη γονιδιακή έκφραση της *EPO*, αντανακλάται στα επίπεδα έκκρισης της EPO σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Για το λόγο αυτό, μετρήθηκαν τα εκκρινόμενα επίπεδα ερυθροποιητίνης (EPO) σε κύτταρα Huh7 και HepG2 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με ταυτόχρονη αποσιώπηση της CK1δ. Παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της κινάσης οδήγησε σε σημαντική μείωση της εκκρινόμενης EPO σε σύγκριση με την έκκρισή της μόνο σε συνθήκες υποξίας και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ με siRNA στην έκκριση ερυθροποιητίνης (EPO). **A)** Μέτρηση της έκκρισης EPO με ELISA σε κύτταρα Huh7 που διαμολύνθηκαν με siRNA-CK1δ (10 nM) και επωάστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*P<0,05). **B)** Μέτρηση της έκκρισης EPO με ELISA σε κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με εναλλακτική αλληλουχία siRNA-CK1δ (10 nM) και επωάστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*P<0,05).

Επιπλέον, το γεγονός ότι η CK1δ είναι απαραίτητη ώστε να διεγείρεται η έκκριση της EPO σε υποξία, επαληθεύθηκε όταν παρατηρήσαμε πως και παρουσία του αναστολέα D4476 σε υποξία, τα επίπεδα έκκρισης της EPO ήταν εμφανώς μειωμένα σε σύγκριση με τα επίπεδα παραγωγής της μόνο σε υποξία (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στην έκκριση ερυθροποιητίνης (EPO). Μέτρηση της έκκρισης EPO με ELISA σε **A)** κύτταρα Huh7 και **B)** κύτταρα HepG2 που επωάστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*P<0,05).

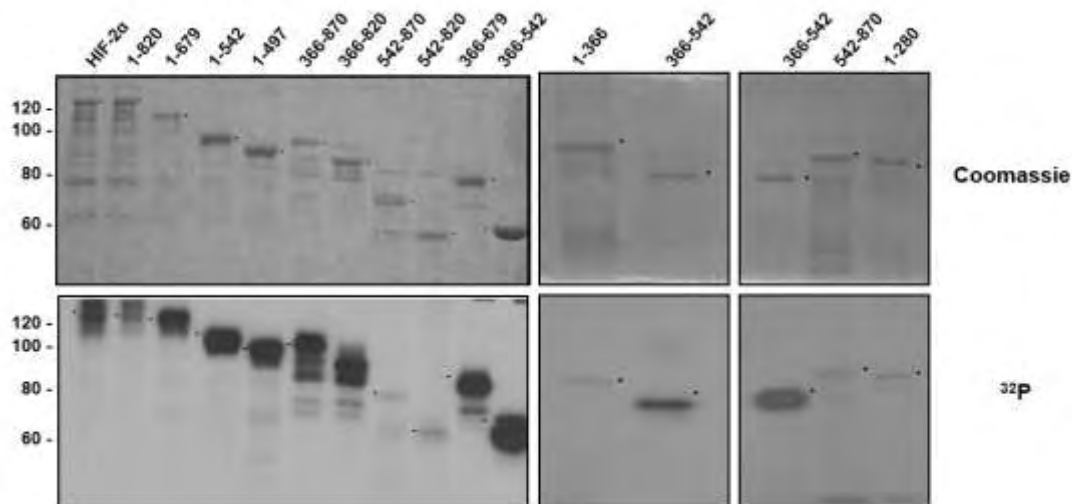
Ανακεφαλαιώνοντας, τα προκαταρκτικά αυτά πειράματα προτείνουν έναν καινούριο μηχανισμό ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση CK1δ, που φαίνεται να έχει βιολογική σημασία για την εξαρτώμενη από τον HIF-2 παραγωγή EPO σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος σε υποξία.

Γ.1.2. Μελέτη της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την CK1δ.

Τα αποτελέσματα που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα, οδήγησαν στην υπόθεση ότι η κινάση CK1δ ρυθμίζει τον HIF-2α με άμεσο τρόπο μέσω φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου γνωρίζουμε ότι η ισομορφή του HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης CK1δ στην Ser247 της επικράτειας PAS-B, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική του ενεργότητα λόγω εξασθένησης της δημιουργίας συμπλόκου με τον ARNT (**Kalousi et al.2010**). Δεδομένης της απόλυτης ομολογίας που εμφανίζουν οι HIF-1α και HIF-2α στην περιοχή αυτή, όπως προκύπτει από μελέτες συγκριτικής ανάλυσης αλληλουχιών, δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν και ο HIF-2α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από την ίδια κινάση.

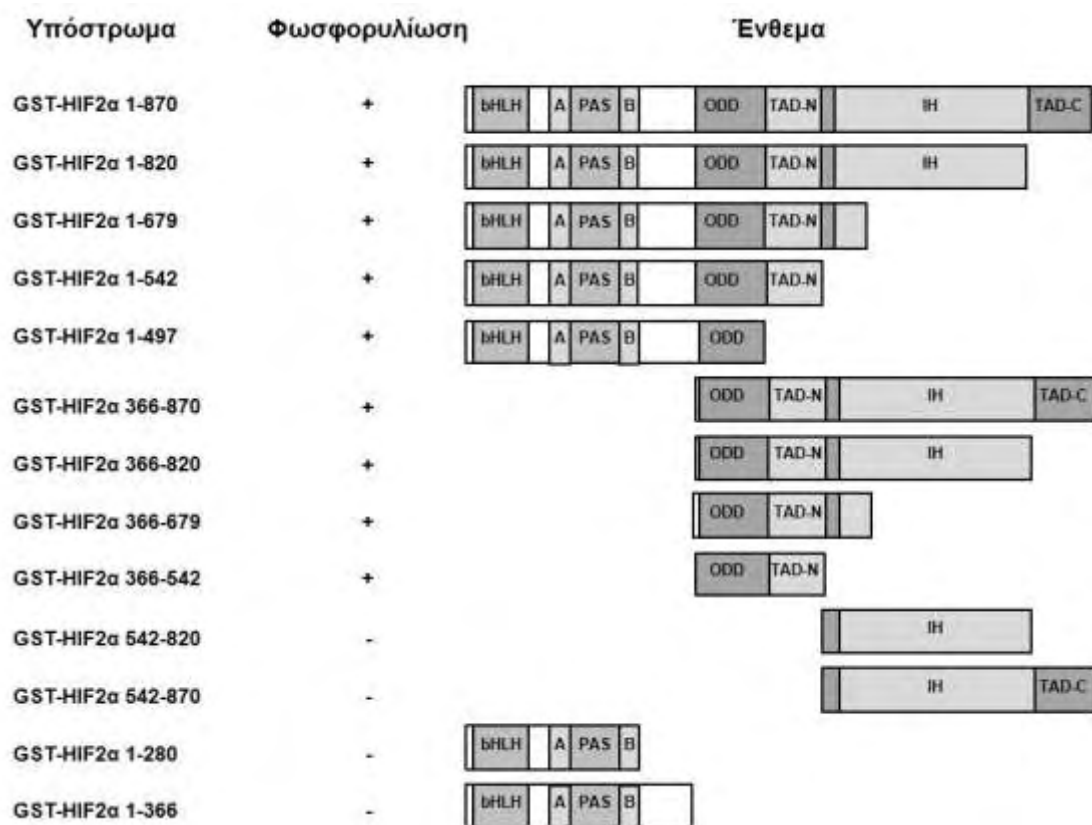
Γ.1.2.1 Μελέτη της *in vitro* φωσφορυλίωσης του ανασυνδυασμένου HIF-2α πλήρους μεγέθους και μικρότερων τμημάτων του από την CK1δ.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την μελέτη και χαρτογράφηση της φωσφορυλίωσης, ήταν η παραγωγή ανασυνδυασμένου HIF-2α πλήρους μεγέθους και μικρότερων τμημάτων του σε βακτήρια, το οποίο αποτελέσε αντικείμενο μελέτης προηγούμενης εργασίας. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τα τμήματα του HIF-2α : 1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 1-366, 1-280, 366-870, 366-820, 366-679, 366-542, 542-870 και 542-820. Ο HIF-2α πλήρους μήκους και τα μικρότερα τμήματά του που απομονώθηκαν, υπεβλήθησαν σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης χρησιμοποιώντας ως πηγή κινασών είτε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7, είτε εμπορικά ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ και ραδιενεργά σημασμένο ATP (³²P). Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία (**Εικόνα 42**).



Εικόνα 42: Φωσφορυλίωση του HIF-2α πλήρους μεγέθους και μικρότερων τμημάτων του *in vitro* χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ. Πάνω φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie, ενώ κάτω το φιλμ της αυτοραδιογραφίας (^{32}P). Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

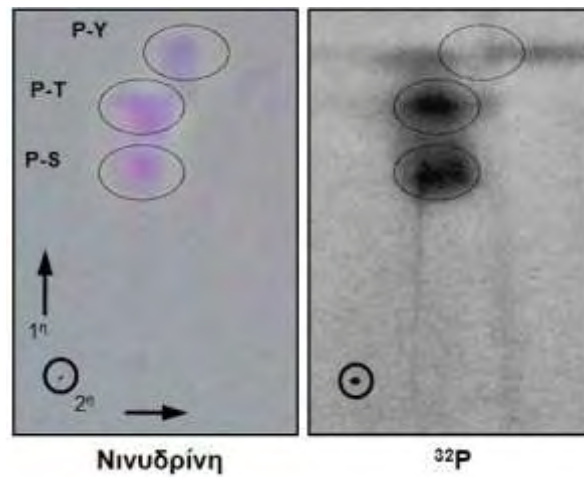
Σε κάθε περίπτωση, η φωσφορυλίωση που ανιχνεύθηκε στα αμιγώς αμινοτελικά (1-280, 1-366) και καρβοξυτελικά (542-820, 542-870) τμήματα του HIF-2α ήταν ελάχιστη έως μηδαμινή σε σύγκριση με την έντονη φωσφορυλίωση του HIF-2α πλήρους μήκους. Αντίθετα σε όλα τα υπόλοιπα τμήματα του HIF-2α (1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 366-870, 366-820, 366-679, 366-542) ανιχνεύθηκε από μέτρια έως πολύ έντονη φωσφορυλίωση, τόσο από τα κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και από την CK1δ (**Εικόνα 43**). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο HIF-2α αποτελεί άμεσο στόχο φωσφορυλίωσης από την CK1δ *in vitro*. Η φωσφορυλίωση εντοπίζεται κυρίως μεταξύ των αμινοξέων 366-542, μια περιοχή που περιλαμβάνει τις επικράτειες ODD και N-TAD του HIF-2α.



Εικόνα 43: Σηματική απεικόνιση του HIF-2α πλήρους μεγέθους και των μικρότερων τμημάτων που κατασκευάστηκαν σε σύντηξη με την GST και των σχετικών επιπέδων φωσφορυλίωσής τους. Στην εικόνα απεικονίζονται ο πλήρους μεγέθους HIF-2α και τα μικρότερα τμήματά του που κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν ως πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST, με σημασμένες τις διάφορες δομικές περιοχές τους. Στη μεσαία στήλη με το σύμβολο + έχουν σημειωθεί τα τμήματα του HIF-2α που ταυτοποιήθηκαν ως υποστρώματα της ανασυνδυασμένης κινάσης CK1δ με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων της *in vitro* φωσφορυλίωσης.

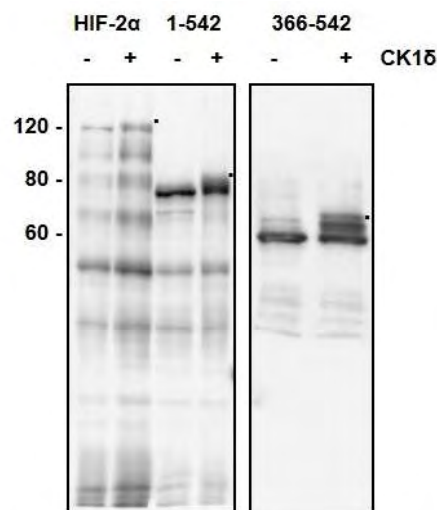
Γ.1.2.2 Ταυτοποίηση υποψήφιων θέσεων φωσφορυλίωσης από την CK1δ εντός της περιοχής 366-542

Προκειμένου να καθοριστεί η φύση των αμινοξικών καταλοίπων που στοχοποιούνται από τη CK1δ μέσα στην περιοχή 366-542 του HIF-2α, πραγματοποιήθηκε ανάλυση φωσφοαμινοξέων σε δύο διαστάσεις με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Το τμήμα GST-HIF-2α 366-542, αφού υπεβλήθη σε δοκιμή *in vitro* φωσφορυλίωσης με εμπορικά ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ και ραδιενεργά σημασμένο ATP (³²P), αναμίχθηκε με πρότυπα φωσφοαμινοξέα (pSer, pThr, pTyr). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης υπέδειξε ότι η CK1δ φωσφορυλιώνει τόσο κατάλοιπα σερίνης όσο και θρεονίνης μέσα στην περιοχή 366-542 του HIF-2α (Εικόνα 44).



Εικόνα 44: Ανάλυση φωσφοαμινοξέων σε δύο διαστάσεις με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στο τμήμα GST-HIF-2α 366-542. Το τμήμα GST-HIF-2α 366-542 μετά από *in vitro* φωσφορυλίωση με ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ, υπεβλήθη σε όξινη υδρόλυση, ανάλυση δύο διαστάσεων με TLC και αυτοραδιογραφία (δεξιά). Η ανίχνευση των πρότυπων φωσφοαμινοξέων, φωσφοσερίνη, φωσφοθρεονίνη και φωσφοτυροσίνη (pSer, pThr, pTyr) έγινε ύστερα από έκθεση της πλάκας TLC σε διάλυμα νινυδρίνης (αριστερά). Οι κύκλοι υποδεικνύουν το σημείο όπου έγινε η ενστάλαξη των δειγμάτων, ενώ τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μετανάστευσης των φωσφοαμινοξέων.

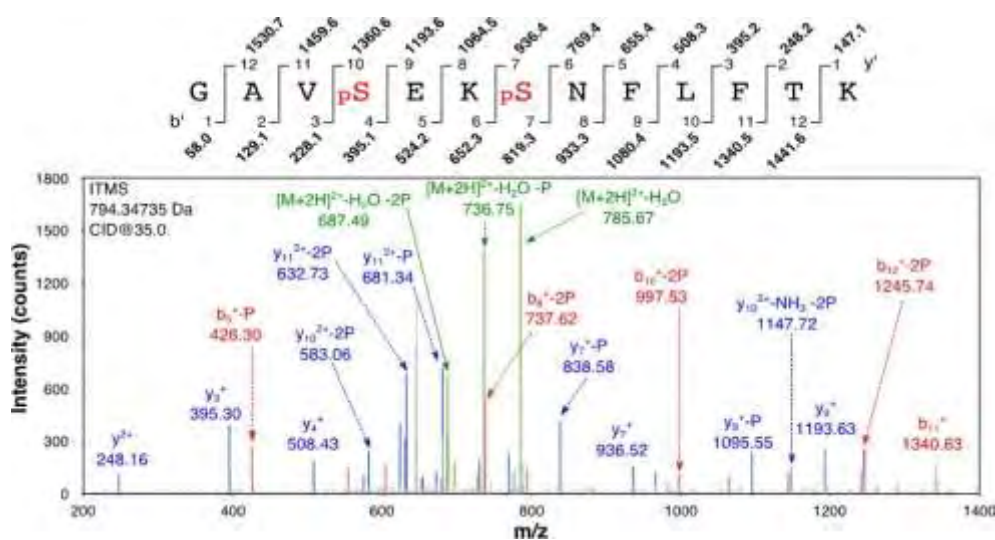
Για να καθοριστούν με ακρίβεια οι θέσεις φωσφορυλίωσης από την CK1δ, ο ανασυνδυασμένος πλήρους μήκους HIF-2α, καθώς και τα θετικά για φωσφορυλίωση τμήματα 1-542 και 366-542, επώαστηκαν με ή χωρίς CK1δ παρουσία ψυχρού ATP



Εικόνα 45: Φωσφορυλίωση του HIF-2α πλήρους μεγέθους και των τμημάτων 1-542 και 366-542 *in vitro* χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ και ψυχρό ATP. Ανοσοαποτύπωση με αντισώμα έναντι της GSTτων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-HIF-2α πλήρους μεγέθους και των τμημάτων GST-HIF-2α 1-542 και GST-HIF-2α 366-542, ύστερα από επώαση ή όχι με 100 units ανασυνδυασμένης κινάσης CK1δ παρουσία ψυχρού ATP. Παρουσία της CK1δ διακρίνονται ζώνες των χημικών πρωτεϊνών που μεταναστεύουν πιο αργά στην πηκτή, υποδεικνύοντας σημαντικά επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2α στα τμήματα αυτά). Οι κουκίδες δείχνουν τη μετατόπιση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα που είχαν επωαστεί με την CK1δ, παρατηρήθηκε πιο αργή μετανάστευση των χιμαιρικών πρωτεϊνών, γεγονός που υποδεικνύει σημαντικά επίπεδα φωσφορυλίωσης (**Εικόνα 45**).

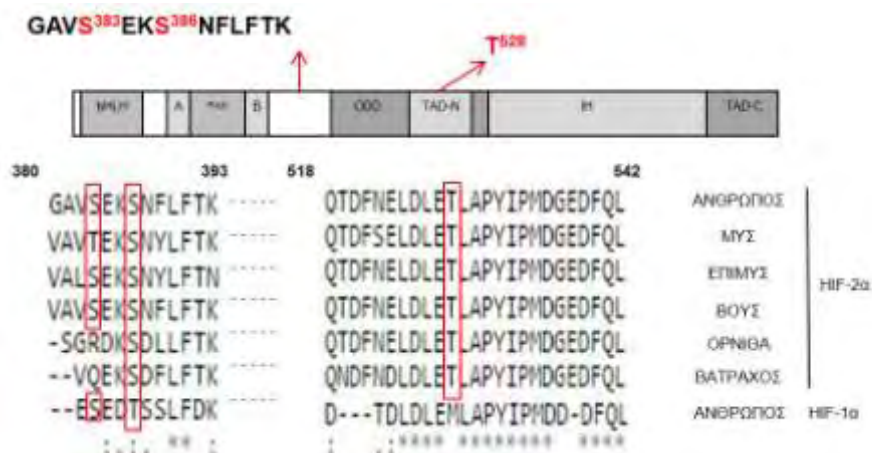
Οι πιο αργές ως προς τη μετακίνησή τους μέσα στο πήκτωμα, ζώνες αποκόπηκαν, αναλύθηκαν μέσω φασματοσκοπίας μαζών στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του κ. Παναγιώτου στο Ινστιτούτο Φλέμινγκ. Η ανάλυση ταυτοποίησε πέντε μοναδικά πεπτίδια του HIF-2α, με το πεπτίδιο GAVSEKSNFLFTK να περιέχει δύο φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης (Ser383 και Ser386) (**Εικόνα 46**).



Εικόνα 46: Ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας μαζών της φωσφορυλιωμένης από την CK1δ πρωτεΐνης GST-HIF-2α 366-542. Το φάσμα κατακερματισμού μιας διπλά φορτισμένης κορυφής στα m/z 794.34735 παρήγαγε μια σχεδόν ολόκληρη σειρά από ιόντα b και y (μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα), μαζί με μια εμφανή απώλεια ουδέτερων ιόντων (πράσινο χρώμα). Το αντίστοιχο πεπτίδιο που ταυτοποιήθηκε είναι το GAVS(p)EKS(p)NFLFTK, επιβεβαιώνοντας ότι οι σερίνες 4 και 7 είναι φωσφορυλιωμένες.

Η συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας αποκάλυψε ότι τουλάχιστον η μια σερίνη (Ser386) είναι συντηρημένη μεταξύ των ομολόγων του HIF-2α στα σπονδυλωτά, όπως και στην ανθρώπινη ισομορφή του HIF-1α. Η ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών δεν πρότεινε κάποιο υποψήφιο κατάλοιπο θρεονίνης για τροποποίηση από την CK1δ, σε αντίθεση με το αποτέλεσμα που είχε δώσει η ανάλυση φωσφοαμινοξέων. Ωστόσο, από μελέτες συγκριτικής ανάλυσης της αλληλουχίας 366-542, εντοπίστηκε μια μικρή και υψηλά συντηρημένη περιοχή που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 518-542 και που διαθέτει ένα μοναδικό κατάλοιπο συντηρημένης θρεονίνης (Thr528), το οποίο επίσης

αποτελεί μέρος του κλασσικού μοτίβου αναγνώρισης από την CK1δ (E/DxxS/T). (Εικόνα 47).

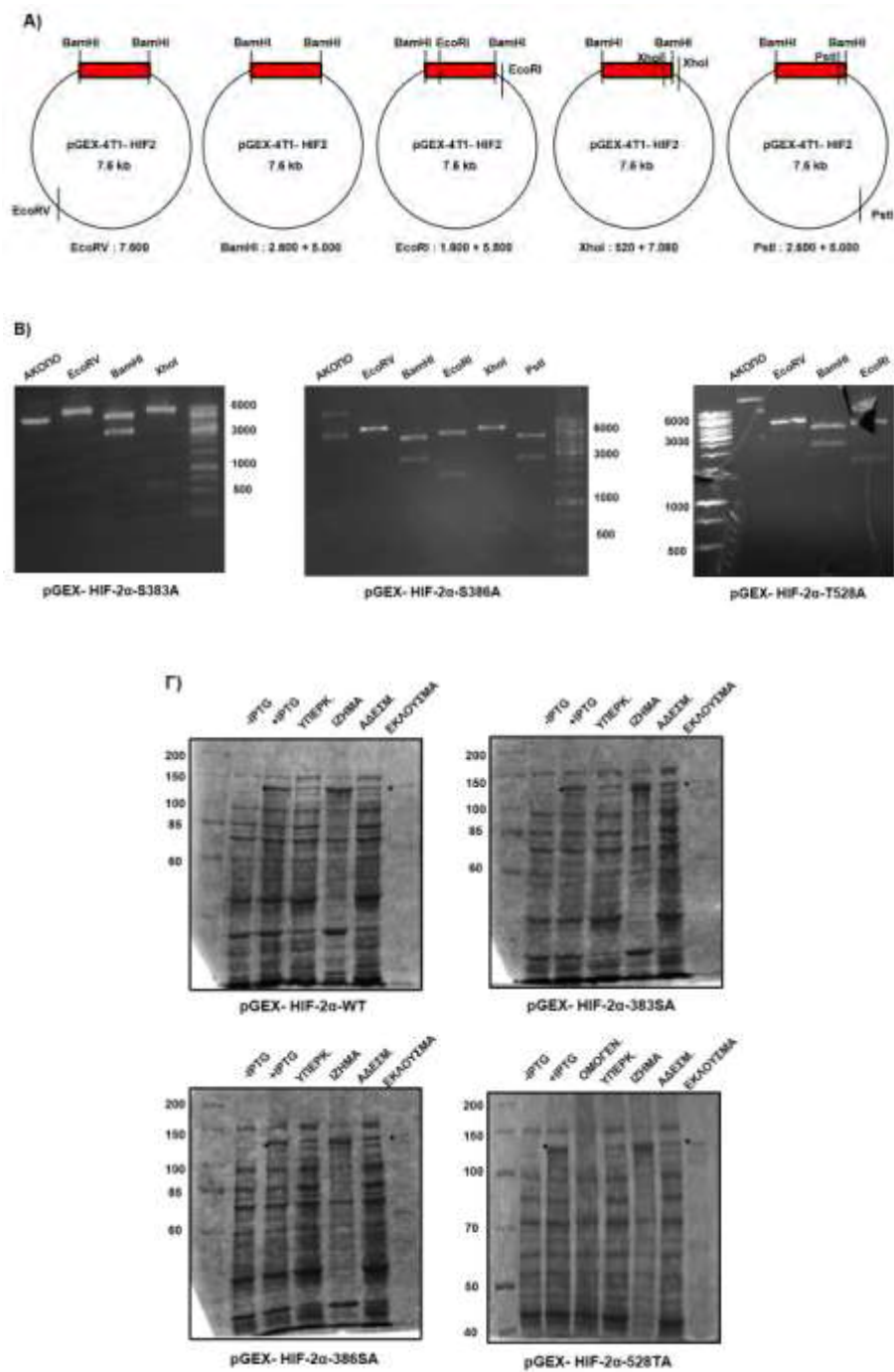


Εικόνα 47: Πολλαπλή ομοπαράθεση της αλληλουχίας 380-542 του HIF-2α από διάφορους ανώτερους οργανισμούς και από τον ανθρώπινο HIF-1α. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας του φωσφοπεπτιδίου που ταυτοποιήθηκε από τη φασματοσκοπία μαζών και εντοπίζεται στο τέλος της επικράτειας PAS-B. Οι σερίνες 383 και 386 είναι αρκετά συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη, ενώ τα αντίστοιχα αμινοξέα του HIF-1α είναι σερίνη και θρεονίνη αντίστοιχα. Στην εικόνα αναπαρίσταται επίσης η απολύτως συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη αλληλουχία του HIF-2α 518-542, που εντοπίζεται την επικράτεια N-TAD. Στην αλληλουχία αυτή εμπεριέχεται η θρεονίνη 528, η οποία ικανοποιεί το μοτίβο φωσφορυλίωσης από την CK1δ και δεν είναι συντηρημένη στον HIF-1α, όπου και αντικαθίσταται με μεθειονίνη.

Η θρεονίνη αυτή, που δεν είναι συντηρημένη στον HIF-1α, επιλέχθηκε για να εξεταστεί περαιτέρω, καθώς θεωρήθηκε ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει τον στόχο της CK1δ που ανιχνεύθηκε στην προηγούμενη ανάλυση.

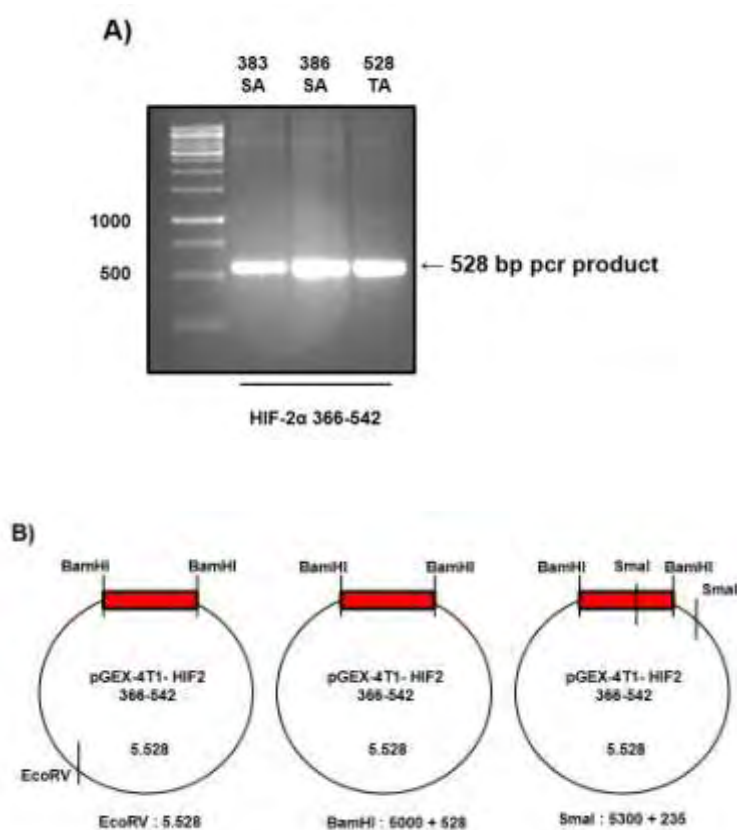
Γ.1.2.3 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α (S383A, S386A, T528A).

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μαζών για τις σερίνες 383 και 386, καθώς και για να ελεγχθεί η υπόθεση για την θρεονίνη 528, ότι αυτά τα κατάλοιπα ευθύνονται για την φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ, έγινε μετατροπή του καθενός ξεχωριστά σε αλανίνη (S383A, S386A, T528A), ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται. Η μετατροπή των παραπάνω καταλοίπων σε αλανίνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης (site directed mutagenesis), όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένες μορφές του cDNA του HIF-2α οι οποίες εισήχθησαν σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli BL21RIL όπου και έγινε επαγωγή της έκφρασής τους με IPTG και απομόνωσή τους σε σύντηξη με την GST πρωτεΐνη (Εικόνα 48).

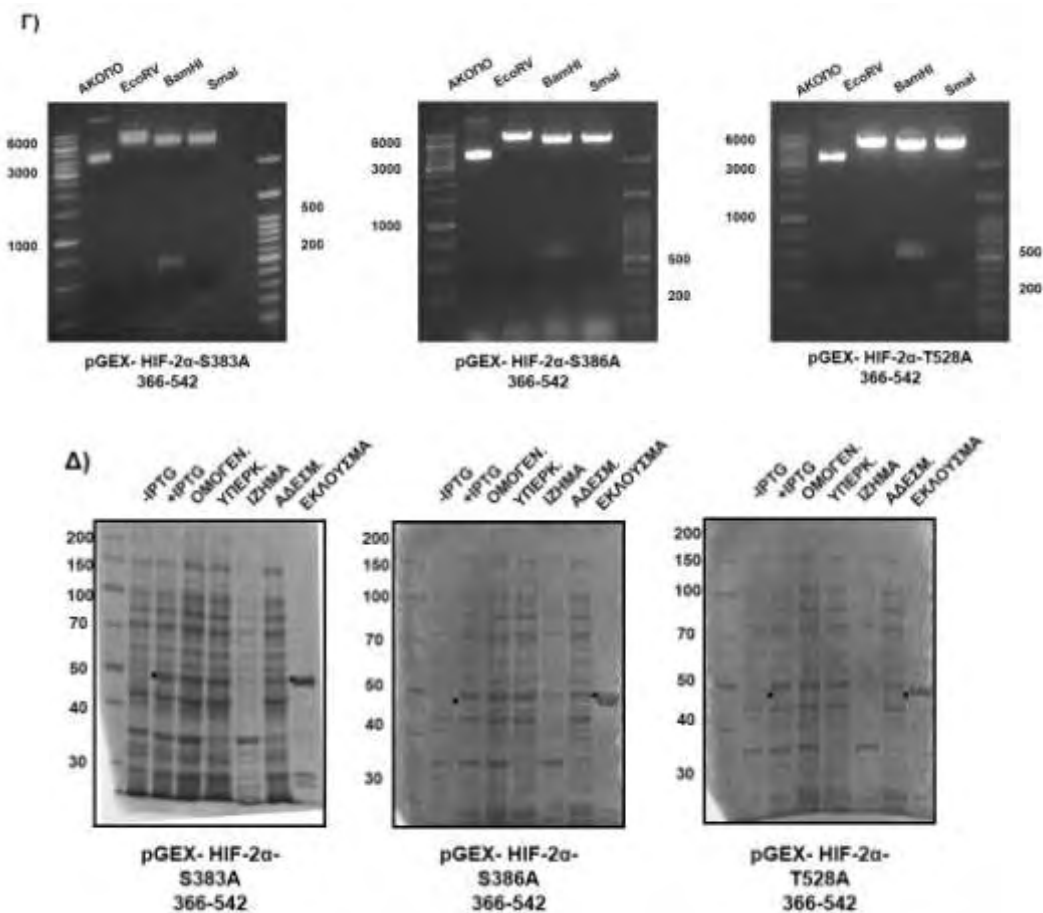


Εικόνα 48: Κλωνοποίηση και απομόνωση των GST-HIF-2α-S383A, GST-HIF-2α-S386A και GST-HIF-2α-T528A. Α) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέγης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Β) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pGEX- HIF-2α-S383A pGEX- HIF-2α-S386A και pGEX-HIF-2α-T528A με τα ενδεικνύμενα ένζυμα περιορισμού. Γ) Κύτταρα E.Coli που περιείχαν τα πλασμίδια για την έκφραση των πρωτεϊνών GST-HIF-2α-WT, GST-HIF-2α-S383A, GST-HIF-2α-S386A και GST-HIF-2α-T528A επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ομογενοποίημα, το ίζημα, το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και το έκλουσμα της GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε KDa).

Επιπλέον, η αλληλουχία cDNA που κωδικοποιεί το τμήμα 366-542 του HIF-2α που περιέχει τις μεταλλάξεις S383A, S386A και T528A, ενισχύθηκε με PCR και ακολούθησε κλωνοποίησή της στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Τα τμήματα 366-652 που πλέον περιείχαν τις μεταλλάξεις σε αλανίνη για κάθε θέση ξεχωριστά, υπερεκφράστηκαν σε βακτήρια και απομονώθηκαν σε σύντηξη με την GST πρωτεΐνη ώστε να μελετηθεί η φωσφορυλίωσή τους και να συγκριθεί με τη φωσφορυλίωση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης του HIF-2α από την CK1δ και από εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 (Εικόνα 49).



Εικόνα 49 A, B: Κλωνοποίηση και απομόνωση των επικρατειών 366-542 GST-HIF-2α-S383A, GST-HIF-2α-S386A και GST-HIF-2α-T528A. (A) Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών cDNA που κωδικοποιούν τις επικράτειες 366-542 S383A, S386A, T528A. (B) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού.

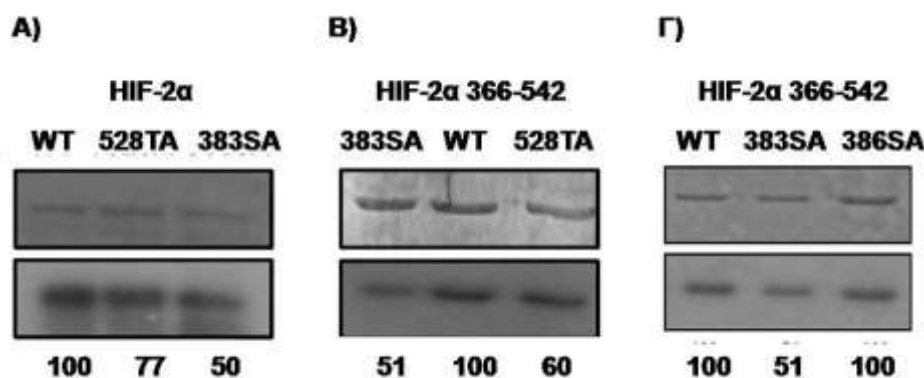


Εικόνα 49 Γ, Δ: Κλωνοποίηση και απομόνωση των επικρατειών 366-542 GST-HIF-2α-S383A, GST-HIF-2α-S386A και GST-HIF-2α-T528A. (Γ) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων 366-542 pGEX- HIF-2α-S383A, 366-542 pGEX- HIF-2α-S386A και 366-542 pGEX- HIF-2α-T528A με τα ενδεικνύμενα ένζυμα περιορισμού. Δ) Κύτταρα E.Coli που περιείχαν τα πλασμίδια για την έκφραση των πρωτεϊνών 366-542 GST-HIF-2α-S383A, 366-542 GST-HIF-2α-S386A και 366-542 GST-HIF-2α-T528A επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ομογενοποίημα, το ίζημα, το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και το έκλουσμα της GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Γ.1.2.4 Μελέτη της *in vitro* φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α S383A, S386A και T528A από την CK1δ και από ολικά εκχυλίσματα Huh7.

Ο HIF-2α πλήρους μεγέθους καθώς και τα τμήματα 366-542 που φέρουν τις μεταλλάξεις σε αλανίνη, μετά την απομόνωσή τους χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης με ανασυνδυασμένη CK1δ ή ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7, παρουσία ραδιενεργά σημασμένου ATP. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία και παρατηρήθηκε

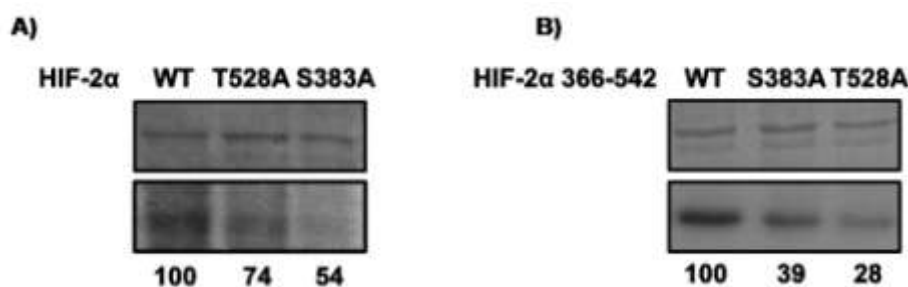
ότι στην περίπτωση της επώασης με CK1δ, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των HIF-2αS383A και HIF-2αT528A μειώθηκαν κατά 50% και 23% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του αγρίου τύπου HIF-2α. Η μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης για τα τμήματα HIF-2α-366-542 S383A και HIF-2α-366-542 T528A ήταν περίπου 49% και 40% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2α-366-542 αγρίου τύπου. Αντιθέτως, η μετάλλαξη της σερίνης 386 σε αλανίνη, δεν προκάλεσε καμία ουσιαστική μεταβολή στη φωσφορυλίωση από τη CK1δ συγκρινόμενη με τον HIF-2α αγρίου τύπου (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Φωσφορυλίωση του HIF-2α πλήρους μεγέθους και του τμήματος 366-542 που περιέχουν τις μεταλλάξεις S383A, S386A και T528A *in vitro* χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη κινάση CK1δ. Πάνω φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie, ενώ κάτω το φιλμ της αυτοραδιογραφίας (³²P) για τον πλήρους μεγέθους HIF-2α (A) και για το τμήμα 366-542 (B,Γ). Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης έπειτα από μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων ανά λεπτό (cpm). Η τιμή των cpm της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (wt) θεωρείται ότι δίνει το μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης (100%) και τα ποσοστά φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις τιμές cpm τους σε σχέση με την τιμή cpm του wt. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης της έντασης της φωσφορυλίωσης σε κάθε περίπτωση που ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν οι μεταλλαγμένες μορφές S383A και T528A του HIF-2α, παρατηρήθηκαν και όταν ως πηγή κινασών χρησιμοποιήθηκαν ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7. (Εικόνα 51).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω πειράματα υποδεικνύουν ότι η σερίνη 383 και η θρεονίνη 528 έχουν κυρίαρχο ρόλο στην *in vitro* φωσφορυλίωση του ανθρώπινου HIF-2α από την CK1δ, ενώ αντίθετα η σερίνη 386 δε φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο. Το γεγονός ότι η σερίνη 383 και η θρεονίνη 528 αποτελούν θέσεις τροποποίησης από τις κινάσες που είναι παρούσες στα εκχυλίσματα των κυττάρων Huh7, υποδεικνύει ότι η CK1δ αντιπροσωπεύει μια από τις βασικές κινάσες που αλληλεπιδρούν με τον HIF-2α μέσα στα κύτταρα Huh7.

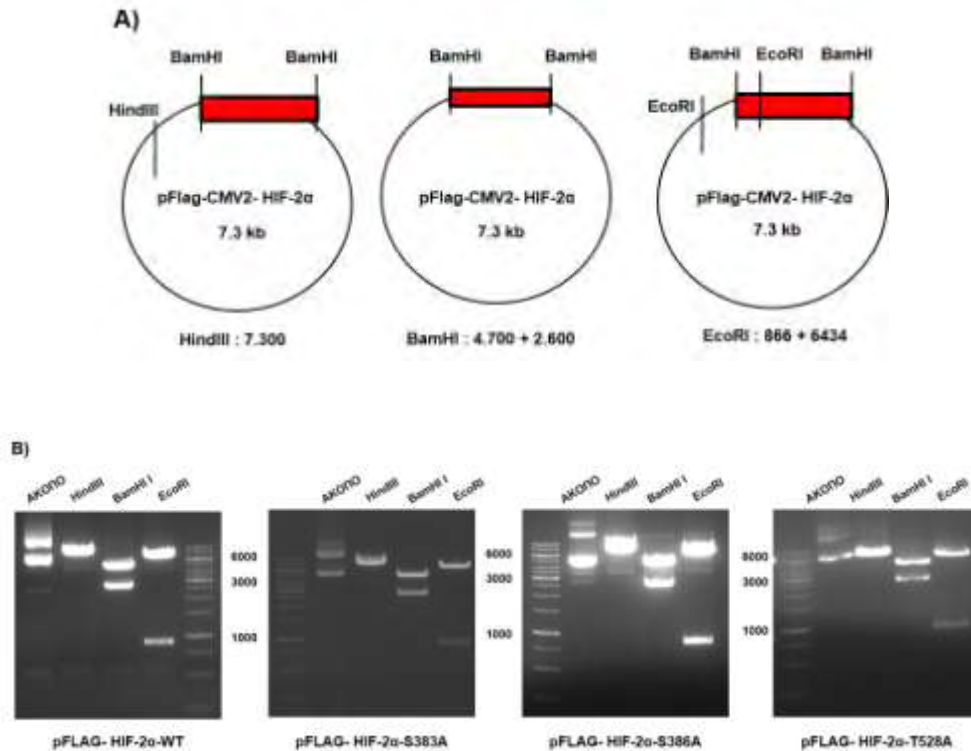


Εικόνα 51: Φωσφορυλίωση του HIF-2α πλήρους μεγέθους και του τμήματος 366-542 που περιέχουν τις μεταλλάξεις S383A και T528A *in vitro* χρησιμοποιώντας ως πηγή κινάσων ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7. Πάνω φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie, ενώ κάτω το φιλμ της αυτοραδιογραφίας (^{32}P) για τον πλήρους μεγέθους HIF-2α (A) και για το τμήμα 366-542 (B). Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης έπειτα από μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων ανά λεπτό (cpm). Η τιμή των cpm της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (wt) θεωρείται ότι δίνει το μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης (100%) και τα ποσοστά φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις τιμές cpm τους σε σχέση με την τιμή cpm του wt. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Γ.1.3. Μελέτη του ρόλου των θέσεων φωσφορυλίωσης (S383, T528) από την CK1δ στη ρύθμιση του HIF-2α.

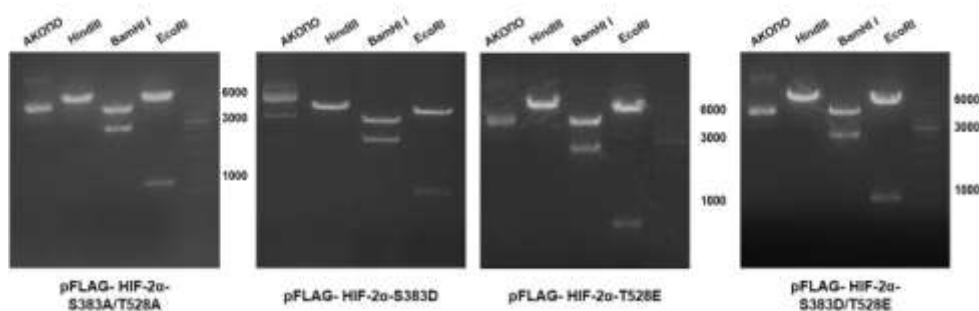
Τα αποτελέσματα που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα υποδεικνύουν πως η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ συμβαίνει στα αμινοξικά κατάλοιπα S383 και T528. Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα η επίδραση της φωσφορυλίωσης στις παραπάνω θέσεις στη λειτουργία του HIF-2α, κατασκευάστηκαν, επίσης μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης, οι μορφές του HIF-2α όπου έγινε μετατροπή και των δύο θέσεων ταυτόχρονα σε αλανίνη (HIF-2αSA/TA) (Εικόνα 52).

Ακόμη κατασκευάστηκαν και οι τρεις φωσφομιμητικές μορφές HIF-2αS383D, HIF-2αT528E, HIF-2αSD/TE, τα αρνητικά φορτία των οποίων θα μπορούν πιθανόν να μιμηθούν τα φορτία των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων (Εικόνα 53). Όλες οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες cDNA του πλήρους μήκους HIF-2α, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMVTM-2, ο οποίος χρησιμοποιείται για την έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG κατόπιν παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων.



Εικόνα 52: Κλωνοποίηση των HIF-2α αγρίου τύπου (WT), HIF-2α-S383A, HIF-2α-S386A και HIF-2α-T528A στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV2 για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών.

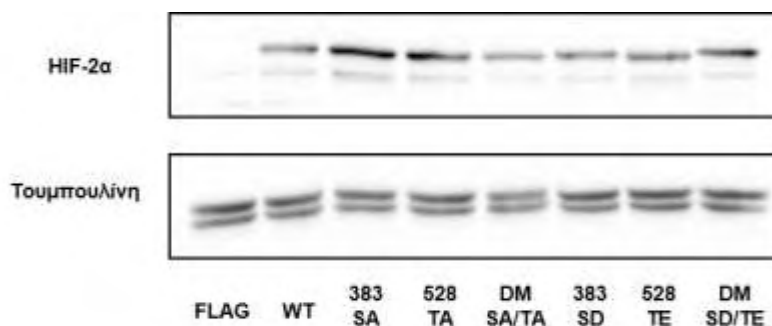
A) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πένησης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πένη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. **B)** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πένη των πλασμιδίων pFLAG-HIF-2α-WT, pFLAG-HIF-2α-S383A, pFLAG-HIF-2α-S386A και pFLAG-HIF-2α-T528A με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού.



Εικόνα 53: Κατασκευή των φωσφομιμητικών μεταλλαγμάτων pFLAG-HIF-2α-S383D, pFLAG-HIF-2α-T528E και των διπλών μεταλλαγμάτων pFLAG-HIF-2α-S383A/T528A, pFLAG-HIF-2α-S383D/T528E. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πένη των πλασμιδίων pFLAG-HIF-2α-S383A/ T528A, pFLAG-HIF-2α-S383D, pFLAG-HIF-2α-T528E και pFLAG-HIF-2α-S383D/T528E με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού.

Γ.1.3.1 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στην έκφρασή του.

Προκειμένου να διερευνηθεί η πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, οι οποίες είτε στερούνται την ικανότητα φωσφορυλίωσης, είτε μιμούνται τη φωσφορυλίωση από την CK1δ, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Huh7 και HepG2, με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG. Η ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, έδειξε ότι τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης όλων των μεταλλαγμάτων κυμαίνονταν σε παρόμοια επίπεδα με αυτά του αγρίου τύπου HIF-2α. (Εικόνα 54).



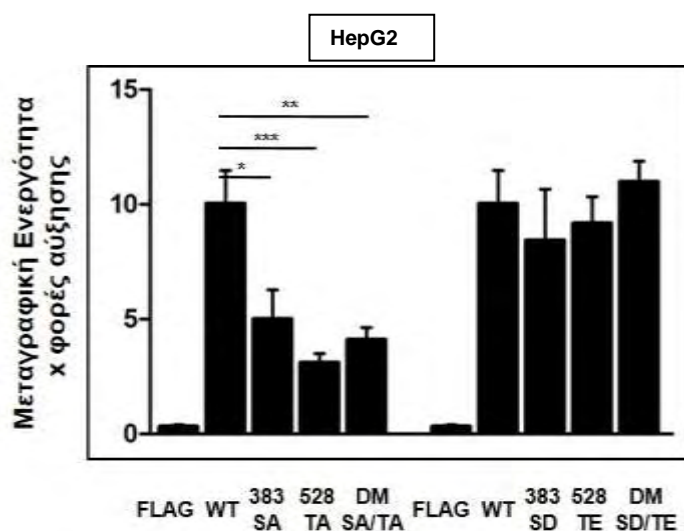
Εικόνα 54: Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, του pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του.

Συνεπώς, η φωσφορυλίωση από την CK1δ στις θέσεις Ser383 και T528 δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του HIF-2α σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως άλλωστε είχε ήδη προταθεί από τα αρχικά πειράματα αναστολής ή αποσιώπησης της κίνησης.

Γ.1.3.2 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στη μεταγραφική του ενεργότητα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση των μεταλλάξεων στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 χρησιμοποιώντας το σύστημα της λουσιφεράσης. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, καθώς και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla, η λειτουργία των οποίων περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα

μεταλλάγματα τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα να φωσφορυλιωθούν από την CK1δ, παρουσίασαν περίπου 50% μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας σε σύγκριση με αυτή του HIF-2α αγρίου τύπου. Αντίθετα, η μεταγραφική ενεργότητα όλων των φωσφομιμητικών μεταλλαγμάτων ήταν παρόμοια με αυτή του HIF-2α αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας ότι ο HIF-2α αγρίου τύπου υφίσταται σημαντική φωσφορυλίωση στα κατάποια Ser383 και Thr528. (Εικόνα 55).



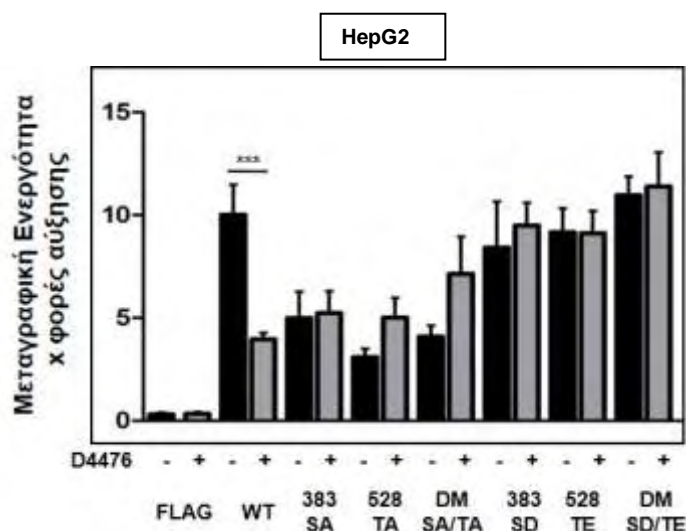
Εικόνα 55: Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,005).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της πρώτης ενότητας και ενισχύουν την υπόθεση ότι η κινάση CK1δ φαίνεται να συμβάλλει θετικά στη ρύθμιση της λειτουργίας του HIF-2.

Γ.1.3.3 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα D4476 στη μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α.

Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο η αναστολή της CK1δ, όσο και οι μεταλλάξεις HIF-2αS383A και HIF-2αT528A, επηρεάζουν αρνητικά τη δράση του HIF-2, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι Ser383 και Thr528 αποτελούν πραγματικούς στόχους της CK1δ, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε

ότι η επίδραση της CK1δ στον HIF-2 είναι ειδική και σχετίζεται άμεσα με την τροποποίηση των καταλοίπων Ser383 και Thr528, μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα όλων των μορφών (μεταλλαγμένων και μη) του HIF-2α, παρουσία ή απουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της CK1δ, D4476 σε νορμοξία με τη μέθοδο της λουσιφεράσης σε κύτταρα HepG2 (Εικόνα 56).

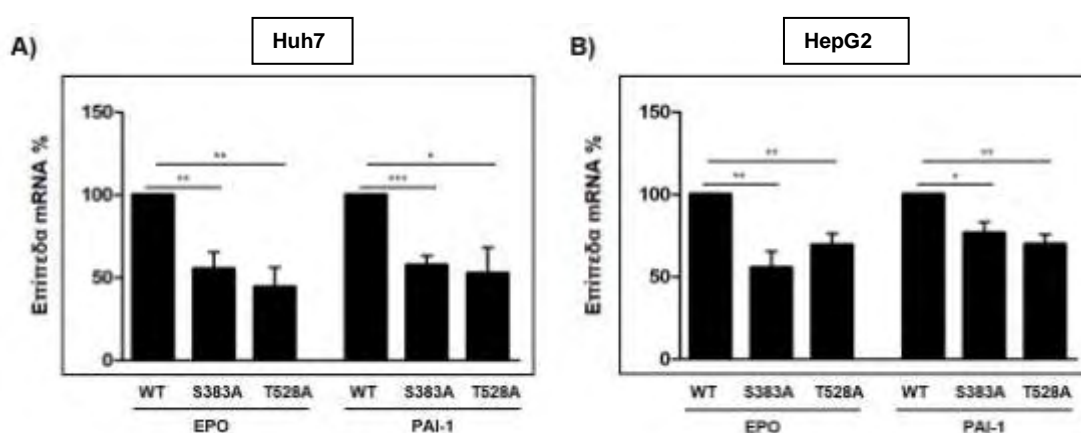


Εικόνα 56: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, μετά από διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,001).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η αγρίου τύπου μορφή ανταποκρίθηκε στην αναστολή της CK1δ, επιδεικνύοντας σημαντικά χαμηλότερη δράση, αναπαράγοντας ακριβώς τη συμπεριφορά του ενδογενούς και επαγόμενου από υποξία HIF-2α. Ωστόσο, ο αναστολέας D4476 της κινάσης, δεν επηρέασε ούτε την ήδη μειωμένη δράση των ανίκανων για φωσφορυλίωση μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, ούτε και τη φυσιολογική δράση των φωσφομιμητικών μεταλλαγμάτων του HIF-2α. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ρύθμιση του HIF-2α από την CK1δ πραγματοποιείται κυρίως μέσω των θέσεων Ser383 και Thr528 σε καρκινικές σειρές του ήπατος.

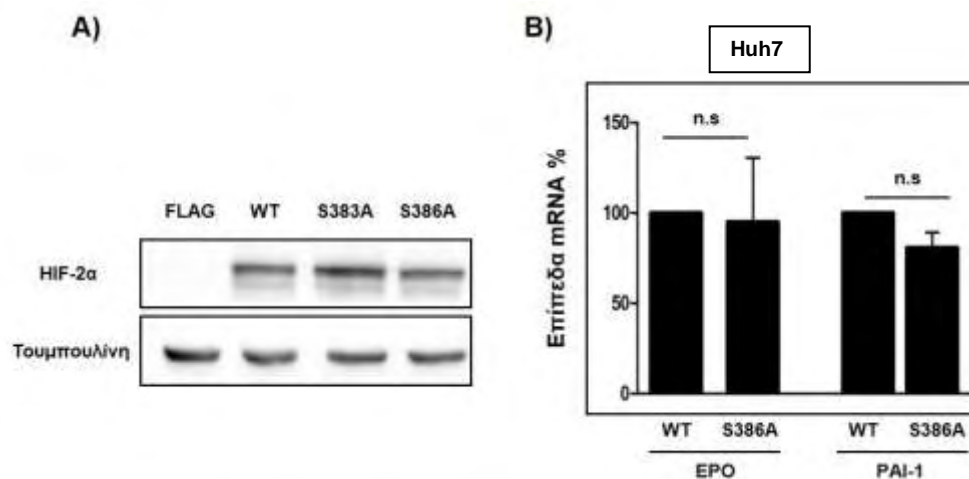
Γ.1.3.4 Μελέτη της επίδρασης των ανενεργών μορφών του HIF-2α στην έκφραση ενδογενών γονιδίων-στόχων του.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σημασία της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την CK1δ στις θέσεις Ser383 και Thr528, εξετάστηκε η έκφραση σε επίπεδο mRNA ενδογενών και εξειδικευμένων γονιδίων στόχων του HIF-2 και πιο συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* σε κύτταρα Huh7 και HepG2. Παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασής τους από τις μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α στις οποίες έχει καταργηθεί η φωσφορυλίωση, ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με την επαγωγή της έκφρασης που οφειλόταν στον HIF-2α αγρίου τύπου κατά περίπου 50% (Εικόνα 57).



Εικόνα 57: Επίδραση των μεταλλάξεων S383A και T528A στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-2. Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε **A)** κύτταρα Huh7 και **B)** κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-HIF-2α-WT, pFLAG-HIF-2α-S383A και pFLAG-HIF-2α-T528A. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001).

Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τόσο η σερίνη 383 όσο και η θρεονίνη 528, λειτουργώντας ως θέσεις φωσφορυλίωσης από την CK1δ, απαιτούνται για την πλήρη ενεργοποίηση και μεταγραφική δράση του HIF-2 στις κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος που εξετάστηκαν. Ανάλογο αποτέλεσμα δεν προέκυψε για την σερίνη 386 καθώς το μετάλλαγμα HIF-2α-S386A δεν προκάλεσε καμία σημαντική αλλαγή στα επίπεδα mRNA των γονιδίων *EPO* and *PAI-1* σε σύγκριση με την επαγωγή από τον HIF-2α αγρίου τύπου και η πρωτεϊνική του έκφραση κυμάνθηκε επίσης σε παρόμοια επίπεδα με αυτά του HIF-2α αγρίου τύπου (Εικόνα 58).

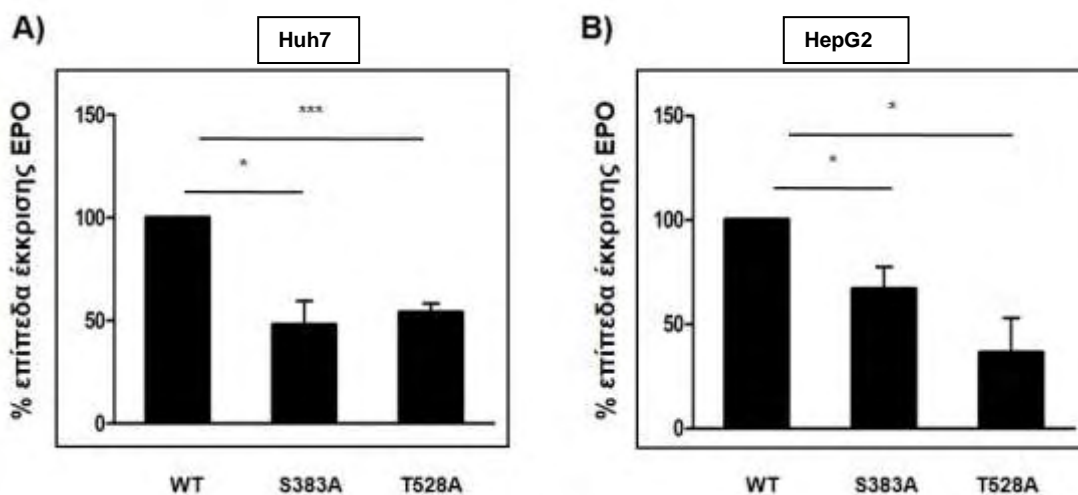


Εικόνα 58: Επίδραση της μεταλλάξης S386A στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α και στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων στόχων του. (A) Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-HIF-2α-WT και pFLAG-HIF-2α-S386A. (B) Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα που επεξεργάστηκαν όπως στο (A). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

Τα δεδομένα αυτά για το πώς επιδρά η κάθε μετάλλαξη στη μεταγραφική δράση του HIF-2, βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών φωσφορυλίωσης, τα οποία υποστηρίζουν ότι οι θέσεις σερίνη 383 και θρεονίνη 528, αλλά όχι η θέση σερίνη 386, τροποποιούνται από την CK1δ και συμμετέχουν στη ρύθμιση του HIF-2α.

Γ.1.3.5 Μελέτη της επίδρασης των ανενεργών μορφών του HIF-2α στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της EPO.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η επίδραση της CK1δ στην παραγωγή EPO που είχε παρατηρηθεί στα προκαταρκτικά πειράματα, διαμεσολαβείται όντως μέσω της φωσφορυλίωσης του HIF-2α στις θέσεις Ser383 και Thr528, τα επίπεδα έκκρισης της EPO αναλύθηκαν επίσης σε κύτταρα Huh7 και HepG2, στα οποία είχε γίνει παροδική διαμόλυνση με πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση του αγρίου τύπου HIF-2α και των μεταλλαγμάτων του HIF-2α-S383A και HIF-2α-T528A σε νορμοξία (Εικόνα 59).



Εικόνα 59: Επίδραση των μεταλλάξεων S383A και T528A στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση EPO. Μέτρηση της έκκρισης EPO με ELISA σε **A)** κύτταρα Huh7 και **B)** κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-HIF-2α-WT, pFLAG-HIF-2α-S383A και pFLAG-HIF-2α-T528A. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001).

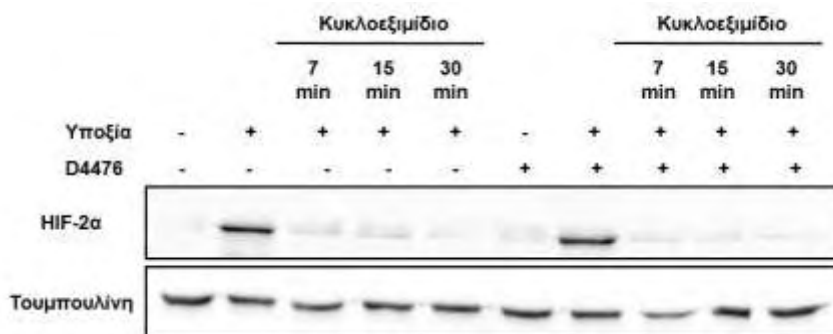
Οι μεταλλάξεις σε αλανίνη των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser383 και Thr528 ανέστειλαν σημαντικά την επαγόμενη από τον πλήρως φωσφορυλιωμένο HIF-2α έκκριση EPO. Συνολικά, τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η άμεση φωσφορυλίωση του HIF-2α στα αμινοξέα σερίνη 383 και θρεονίνη 528 από την CK1δ, επιδρά θετικά στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 παραγωγή ερυθροποιητίνης σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος.

Γ.1.4. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.

Τα αποτελέσματα που έχουν περιγραφεί ως τώρα προτείνουν ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από την CK1δ επηρεάζει αρνητικά τόσο τη μεταγραφική δράση του HIF-2 σε σειρές ηπατοκαρκινώματος, όσο και βιολογικές λειτουργίες οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από τον HIF-2, όπως η παραγωγή EPO. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στις παραπάνω διαδικασίες θα μπορούσαν να οφείλονται σε εμπλοκή της φωσφορυλίωσης από την CK1δ σε στάδια όπως η πρωτεϊνική σταθερότητα, η αλληλεπίδραση με συμπάροντες, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α. Στην ενότητα που ακολουθεί, περιγράφεται αναλυτικά η εξέταση όλων των παραπάνω υποθέσεων σχετικά με το μοριακό μηχανισμό ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.

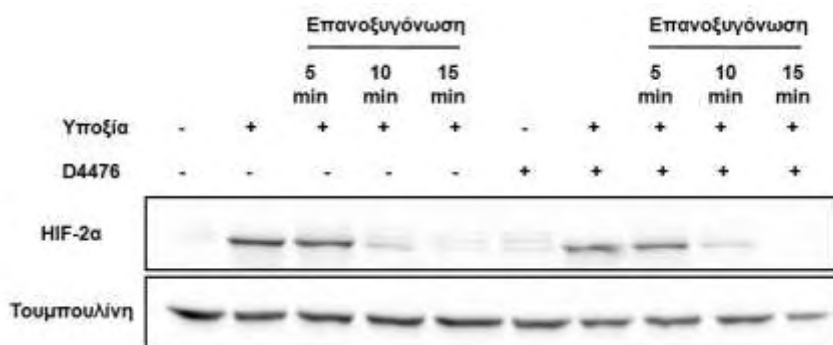
Γ.1.4.1 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η έλλειψη φωσφορυλίωσης από την CK1δ επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2, αρχικά εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής της CK1δ, στη σταθερότητα του HIF-2α, προσδιορίζοντας τον χρόνο ημιζωής του με πειράματα όπου είτε είχε ανασταλεί η διαδικασία της μετάφρασης είτε είχε καταργηθεί η υποξία. Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν σε υποξία παρουσία ή όχι του αναστολέα D4476, και στη συνέχεια στην καλλιέργεια προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο (CHX) το οποίο αναστέλλει τη μετάφραση ή η καλλιέργεια συνεχίστηκε σε συνθήκες νορμοξίας για διάφορες χρονικές περιόδους (Εικόνες 60,61).



Εικόνα 60: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στο χρόνο ημιζωής του HIF-2α.

Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μM) για 4 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από χορήγηση κυκλοεξιμιδίου (CHX 10 μg/ml) για 7, 15 και 30 λεπτά.



Εικόνα 61: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στην πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α.

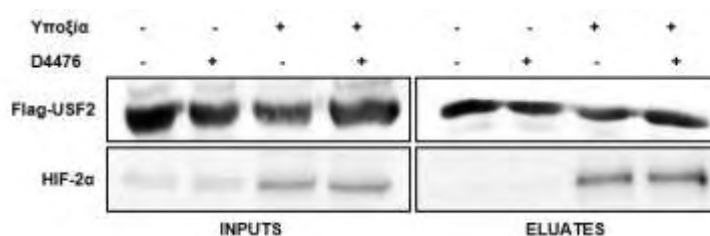
Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂) παρουσία ή

απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μ M) για 4 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επανοξυγόνωση (21% O₂) για 5, 10 και 15 λεπτά.

Η πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α δεν μεταβλήθηκε παρουσία του D4476, καθώς τα επίπεδα έκφρασής του μειώθηκαν σταδιακά μέχρι που αποδομήθηκαν πλήρως και τελικά εξαφανίστηκαν ακριβώς όπως και τα επίπεδα του HIF-2α απουσία του D4476, τόσο μετά την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης όσο και μετά τη επανοξυγόνωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση του HIF-2α από την CK1δ δεν σχετίζεται με την πρωτεϊνική του σταθερότητα. Επιπλέον, η σύγκριση των δύο πειραμάτων στην ίδια χρονικά στιγμή των 15 λεπτών, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι ο HIF-2α είναι πιο σταθερός σε υποξία, παρότι δεν συντίθενται εκ νέου πρωτεΐνη, παρά σε νορμοξία όπου συνεχίζει να λαμβάνει χώρα η μετάφραση.

Γ.1.4.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό συμπαράγοντα USF2.

Η επόμενη μηχανιστική υπόθεση που εξετάστηκε ήταν εάν η ρύθμιση του HIF-2α από την CK1δ αφορά στον έλεγχο της αλληλεπίδρασής του HIF-2α με κάποιον από τους γνωστούς και εξειδικευμένους μεταγραφικούς του συμπαράγοντες. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα USF2 (Upstream Stimulatory Factor), καθώς από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη προκειμένου να έχουμε τη βέλτιστη έκφραση των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* (Pawlus et al., 2012), των οποίων η έκφραση παρατηρήσαμε ότι μειώνεται σημαντικά όταν καταργηθεί η φωσφορυλίωση από την CK1δ. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει τον USF2 σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και στη συνέχεια επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία παρουσία ή όχι του αναστολέα D4476 (Εικόνα 62).



Εικόνα 62: Επίδραση του ειδικού αναστολέα D4476 της CK1δ στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον USF2. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του FLAG-USF2 και 24 ώρες μετά επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία και απουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μ M) για 16 ώρες. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον επίτοπο FLAG. Τα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) και

τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση των FLAG-USF2 και HIF-2α.

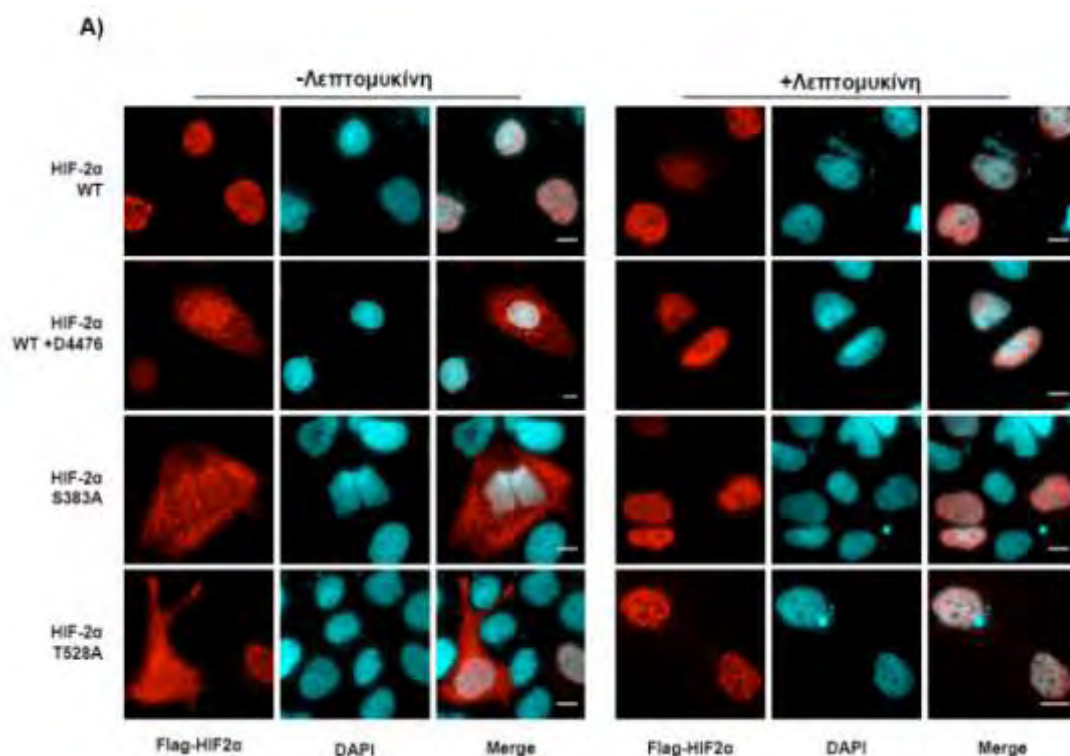
Ο HIF-2α συγκατακρημνίστηκε με τον Flag-USF2 στην υποξία όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της γνωστής τους αλληλεπίδρασης, η οποία έχει δειχθεί σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου μας σε κύτταρα Huh7 (**Befani et al., 2013**). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή παρέμεινε ανέπαφη παρουσία του αναστολέα D4476 στην υποξία, υποδηλώνοντας ότι η CK1δ δεν επηρεάζει στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον USF2.

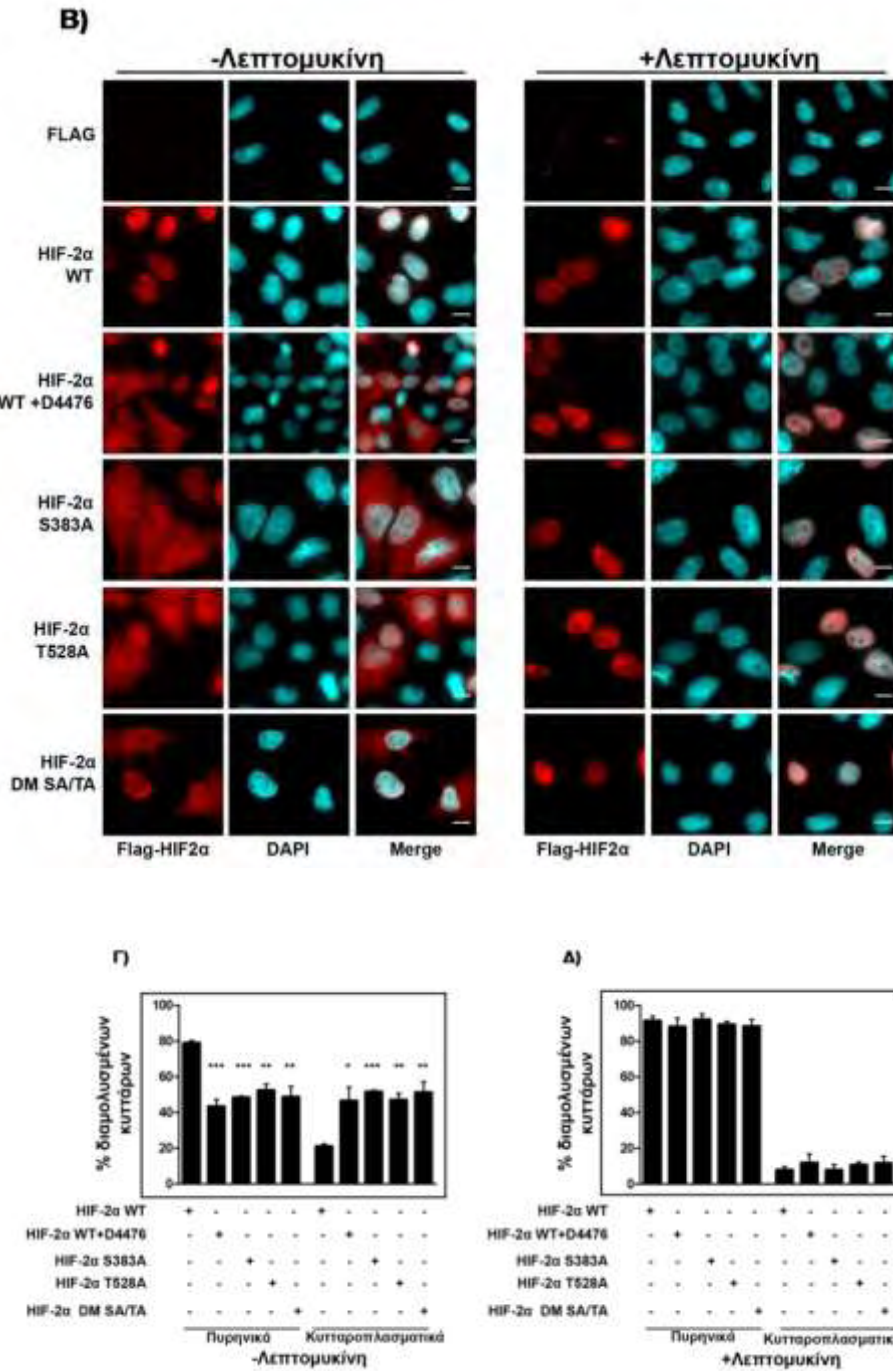
Γ.1.4.3 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α.

Έχοντας αποκλείσει την υπόθεση ότι ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α από την CK1δ εμπλέκεται στην πρωτεϊνική του σταθερότητα ή στην αλληλεπίδρασή του με τον συμπαράγοντα USF2, αναλύσαμε στη συνέχεια το εάν η ρύθμιση αυτή επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή του HIF-2α. Κύτταρα Huh7 και HepG2 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και ο εντοπισμός τους ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό. Ο HIF-2α αγρίου τύπου ανιχνεύθηκε αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα σε ποσοστό 80% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ σε ποσοστό 20% ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα αυτά είχαν επωαστεί παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της CK1δ, D4476, ο HIF-2α αγρίου τύπου βρέθηκε να κατανέμεται ταυτόχρονα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 50% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο (**Εικόνα 63**). Υπήρχε λοιπόν μια αρχική ένδειξη ότι η αναστολή της CK1δ εμποδίζει τη συσσώρευση του HIF-2α μέσα στον πυρήνα. Επιπλέον, όλες οι μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α που στερούνται την ικανότητα για φωσφορυλίωση από την CK1δ, επίσης εντοπίστηκαν ταυτόχρονα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 50% των κυττάρων που είχαν προσλάβει τα αντίστοιχα πλασμίδια, υποδεικνύοντας ξανά ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από την CK1δ εμποδίζει τη συσσώρευση του HIF-2α μέσα στον πυρήνα. Αντίθετα, όλα τα φωσφομιμητικά μεταλλάγματα του HIF-2α εντοπίζονταν κυρίως μέσα στον πυρήνα, πράγματι μιμούμενα τον εντοπισμό του HIF-2α αγρίου τύπου (**Εικόνα 64**).

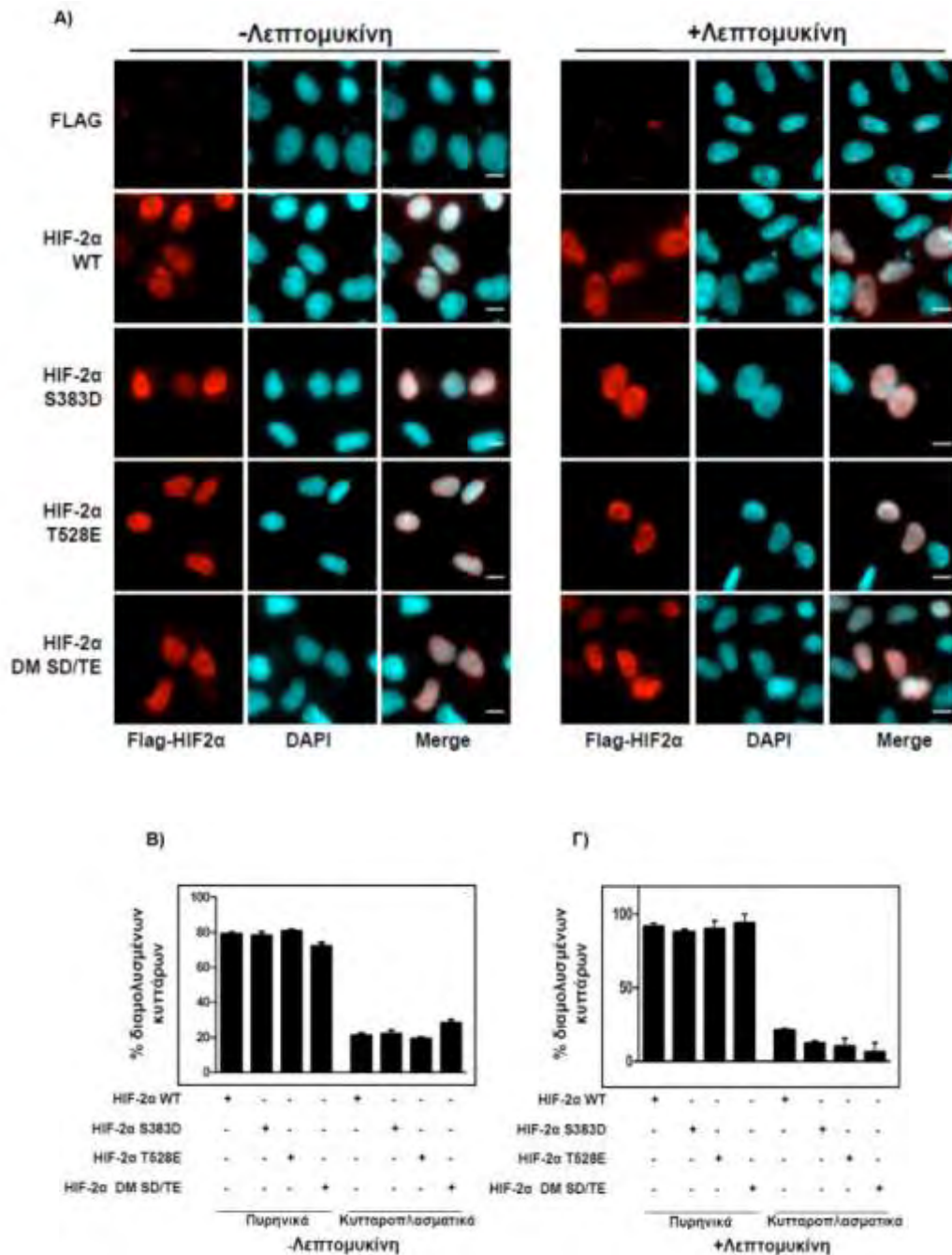
Γ.1.4.4 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην εξαρτώμενη από τη CRM1 έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα.

Η αυξημένη ανίχνευση των μεταλλαγμάτων HIF-2α-S383A, HIF-2α-T528A και HIF-2α-SA/TA, αλλά και του αγρίου τύπου HIF-2α παρουσία του D4476 στο κυτταρόπλασμα και στις δύο ηπατικές καρκινικές σειρές που ελέγχθησαν, θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε μειωμένη είσοδο μέσα στον πυρήνα, είτε σε αυξημένη έξοδο από αυτόν. Για να διαπιστωθεί ποια από τις δύο πιθανές περιπτώσεις είναι αυτή που τελικά ισχύει, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία λεπτομυκίνης (LMB), η οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλει την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 έξοδο από τον πυρήνα. Η χορήγηση λεπτομυκίνης προκάλεσε την εξολοκλήρου ανάκτηση του πυρηνικού εντοπισμού όλων των μεταλλαγμάτων που στερούνται φωσφορυλίωσης από την CK1δ, και επιπλέον κατέργησε την επίδραση του αναστολέα D4476 στον εντοπισμό του αγρίου τύπου μορφής του HIF-2α σε ποσοστό περίπου 90% των κυττάρων που είχαν προσλάβει τα αντίστοιχα πλασμίδια. Αντίθετα, παρουσία της λεπτομυκίνης, ο εντοπισμός του αγρίου τύπου HIF-2α και των φωσφομιμητικών μορφών δεν μεταβλήθηκε, εξακολουθώντας να είναι κατά βάση πυρηνικός (Εικόνες 63,64).





Εικόνα 63: Υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α WT και των μεταλλαγμάτων S383A, T528A και S383A/T528A υπό την επίδραση ή όχι των D4476 και LMB. Α) Κύτταρα Huh7 και Β) κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α που δε μπορούν να φωσφορυλιωθούν, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον επίτοπο FLAG. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI. Πριν τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επωάστηκαν με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες. Σε μια περίπτωση, τα κύτταρα επωάστηκαν παρουσία του ειδικού αναστολέα D4476 (10 μM) για 16 ώρες πριν τη μονιμοποίηση. Η κλίμακα των άσπρων μπαρών ισοδυναμεί με 10 μm. Γ,Δ) Υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων HepG2 που έχουν πυρηνικό ή κυτταροπλασματικό εντοπισμό απουσία (Γ) ή παρουσία LMB (Δ), με βάση την μέτρηση περίπου 100-150 διαμολυσμένων κυττάρων ανά συνθήκη. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001).

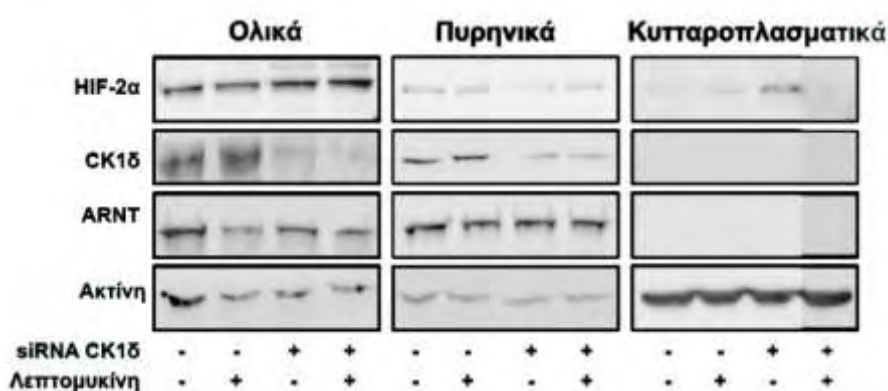


Εικόνα 64: Υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α WT και των φωσφομιμητικών μεταλλάξεων

S383D, T528E και S383D/T528E υπό την επίδραση ή όχι LMB. **A)** Κύτταρα HepG2 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των φωσφομιμητικών μορφών του HIF-2α, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον επίτοπο FLAG. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI. Πριν τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες. Η κλίμακα των άσπρων μπαρών ισοδυναμεί με 10 μm. **B,Γ)** Υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων HepG2 που έχουν πυρηνικό ή κυτταροπλασματικό εντοπισμό απουσία (**B**) ή παρουσία λεπτομυκίνης (LMB) (**Γ**), με βάση την μέτρηση περίπου 100-150 διαμολυσμένων κυττάρων ανά συνθήκη. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

Από τα δεδομένα αυτά, γίνεται φανερό ότι πρώτον, ο HIF-2α μετακινείται διαρκώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και δεύτερον ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από την CK1δ ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από τη CRM1 έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα, γεγονός που εξηγεί την παρατηρούμενη μερική του απενεργοποίηση ως μεταγραφικού παράγοντα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν περαιτέρω τα παραπάνω αποτελέσματα, εξετάστηκε η επίδραση της αποσιώπησης της CK1δ στον εντοπισμό του ενδογενούς HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. Σε κύτταρα HeLa, αποσιωπήθηκε η έκφραση της CK1δ με χρήση siRNA και στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν σε υποξία παρουσία ή απουσία LMB, και ο εντοπισμός του HIF-2α μελετήθηκε με τη μέθοδο της υποκυτταρικής κλασμάτωσης (Εικόνα 65).



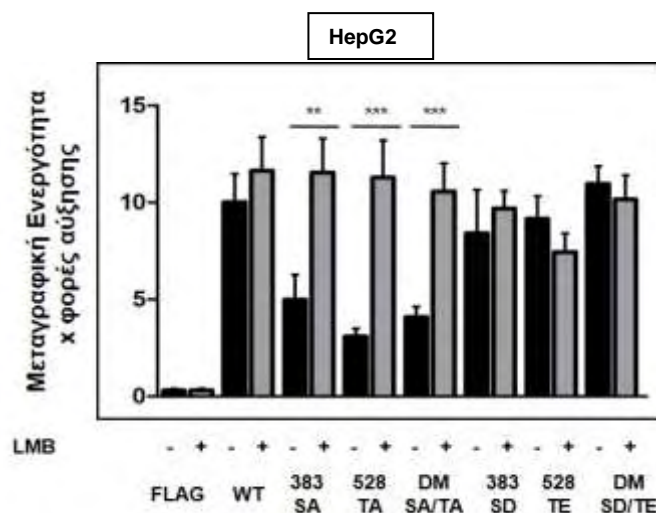
Εικόνα 65: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ με siRNA στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α, CK1δ, ARNT και ακτίνη ολικών, πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν με siRNA-CK1δ (10 nM) και επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Πριν τη λύση τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες.

Όπως αναμενόταν, ο HIF-2α σε υποξία, εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στο πυρηνικό κλάσμα των πρωτεϊνών, ανεξάρτητα από τη χορήγηση ή όχι LMB. Αντίθετα, σε συνθήκες αποσιώπησης της CK1δ, ένα σημαντικό κλάσμα της πρωτεΐνης του HIF-2α μετανάστευσε από το πυρηνικό προς το κυτταροπλασματικό κλάσμα πρωτεϊνών, ενώ παρουσία της LMB, το κλάσμα αυτό του HIF-2α, επανεντοπίστηκε σχεδόν όλο στο πυρηνικό κλάσμα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα του εντοπισμού των υπερεκφρασμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών HIF-2α SA/TA που παρουσιάστηκαν προηγουμένως. Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η απώλεια της CK1δ προωθεί την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα, ενώ η LMB επαναφέρει τη συσσώρευση του HIF-

2α μέσα στον πυρήνα, επιβεβαιώνοντας έτσι έναν εξαρτώμενο από την CRM1 μηχανισμό που ελέγχεται μέσω αυτής της φωσφορυλίωσης.

Γ.1.4.5 Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών του HIF-2α παρουσία LMB.

Αφού αποκαλύφθηκε ο μοριακός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την παρατηρούμενη μειωμένη λειτουργικότητα του HIF-2 σε περιπτώσεις όπου αναστέλλεται η φωσφορυλίωσή του από την κινάση CK1δ, μας δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν ο επανεντοπισμός των HIF-2α SA/TA μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα παρουσία της LMB, συνοδεύεται και από την επαναφορά της πλήρους μεταγραφικής τους δράσης. Κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, καθώς και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla και επώαστηκαν παρουσία ή όχι του ειδικού αναστολέα της CRM1 (LMB). Πράγματι, ενώ η LMB δεν επηρέασε τη δράση του αγρίου τύπου HIF-2α και των φωσφομιμητικών μορφών, ωστόσο αύξησε τη δράση όλων των μεταλλαγμένων μορφών που στερούνται φωσφορυλίωσης από την CK1δ, στα επίπεδα της πλήρους δράσης του αγρίου τύπου HIF-2α (Εικόνα 66).



Εικόνα 66: Επίδραση της λεπτομυκίνης (LMB) στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, μετά από διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με πλασμίδια για την έκφραση του φορέα pFLAG-CMV2, του pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla. Πριν τη λύση τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01, *** P<0,001).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι ο κυρίαρχος λόγος για την μερική απενεργοποίηση του HIF-2 λόγω μεταλλάξεων στις θέσεις φωσφορυλίωσης από την CK1δ, είναι ο αυξημένος αποκλεισμός του από τον πυρήνα, καθώς ο HIF-2 μπορεί να ανακτήσει εξολοκλήρου τη λειτουργία του παρουσία της LMB, όταν και εντοπίζεται αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα.

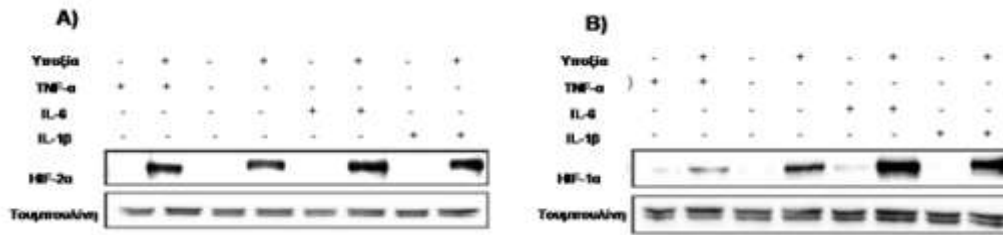
Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ HIF-1α.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το εάν και σε ποιο επίπεδο ρυθμίζεται ο HIF-2α από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ελάχιστα, ενώ αντίθετα υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τη ρύθμιση της ισομορφής HIF-1α. Επιπλέον, οι περισσότερες ερευνητικές μελέτες στο πεδίο αυτό, έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και κυρίως σε συνθήκες νορμοξίας. Δεδομένου ότι το ηπατοκαρκίνωμα (HCC) αποτελεί έναν όγκο που η εξέλιξή του σχετίζεται με την παρουσία φλεγμονής και υποξίας στο μικροπεριβάλλον του, στην παρούσα διατριβή, επιλέξαμε να διερευνήσουμε την επίδραση των προφλεγμονωδών παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στη ρύθμιση του HIF-2α, αλλά και να μελετήσουμε την επίδραση των παραπάνω παραγόντων στη ρύθμιση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, ώστε να τη συγκρίνουμε με εκείνη του HIF-2α χρησιμοποιώντας ως σύστημα μελέτης την καθιερωμένη σειρά ηπατοκαρκινώματος Huh7.

Γ.2.1 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των α υπομονάδων των HIF.

Προκειμένου να διευκρινιστεί η πιθανή ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-2α από τους φλεγμονώδεις παράγοντες IL-6, IL-1β και TNF-α, κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας υπό τη επίδραση ή όχι των παραπάνω ουσιών (**Εικόνα 67**).

Παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα πρωτεΐνης του HIF-2α δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη των ουσιών σε καμία συνθήκη. Συγκεκριμένα, εξακολούθησε να μην επάγεται η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα πρωτεΐνης του HIF-2α που είχαν επαχθεί από την υποξία.



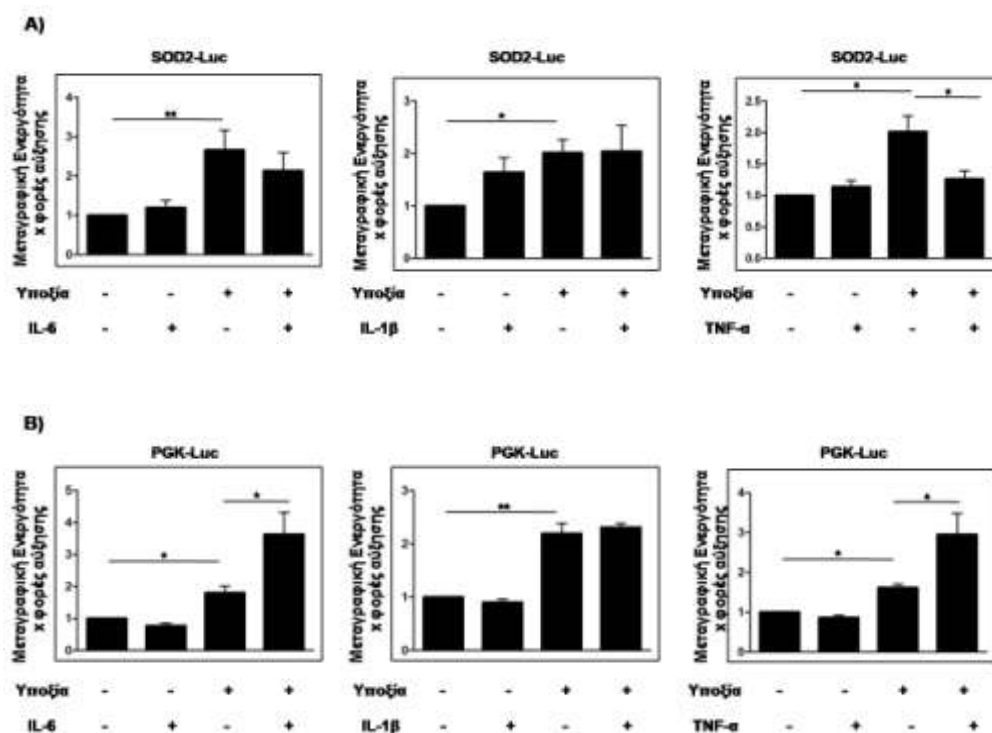
Εικόνα 67: Επίδραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων στην πρωτεϊνική έκφραση των HIF. A, B) Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α, HIF-1α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O₂) για 16 ώρες, απουσία ή παρουσία των παραγόντων φλεγμονής IL-6, IL-1β και TNF-α (10 ng/ml).

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε εάν οι ουσίες αυτές επηρεάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α. Παρατηρήθηκε ότι ενώ καμία ουσία δεν προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας, η επαγωγή της πρωτεΐνης του από την υποξία μεταβλήθηκε σημαντικά παρουσία των διαφόρων ουσιών. Οι ιντερλευκίνες IL-6 και IL-1β προκάλεσαν αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-1α, ενώ αντίθετα ο TNF-α προκάλεσε μείωση. Τα παραπάνω δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η έκφραση της α υπομονάδας των HIF ρυθμίζεται διαφορετικά από παράγοντες που εμπλέκονται στη φλεγμονή σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος.

Γ.2.2 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF.

Το επόμενο ερώτημα που εξετάστηκε, ήταν εάν οι παράγοντες φλεγμονής IL-6, IL-1β και TNF-α, επηρεάζουν τους HIF σε επίπεδο μεταγραφικής ενεργότητας. Για να αξιολογηθεί η μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-2 διακριτά από εκείνη του HIF-1 επιλέχθηκαν ειδικοί μεταγραφικοί στόχοι για τον HIF-1 και HIF-2 στα κύτταρα Huh7. Συγκεκριμένα, από προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου, (Befani et al., 2013) είναι γνωστό ότι οι υποκινητές των γονιδίων της μιτοχondριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου (*SOD2*) και της κινάσης του φωσφογλυκερικού οξέος (*PGK*) αποτελούν επιλεκτικούς ειδικούς στόχους του HIF-2 και του HIF-1 αντίστοιχα, σε κύτταρα Huh7. Έτσι, ακολούθησαν πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc ή pGL3-*PGK*-Luc και pCI*Renilla* και αφού πραγματοποιήθηκε επώαση σε υποξία ή νορμοξία για 16 ώρες παρουσία ή όχι των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α, μετρήθηκε η ενεργότητα της

λουσιφεράσης ως μέτρου της μεταγραφικής δραστηριότητας των HIF έναντι των αντίστοιχων υποκινητών (**Εικόνα 68**).



Εικόνα 68: Επίδραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων μεταγραφική ενεργότητα των HIF.

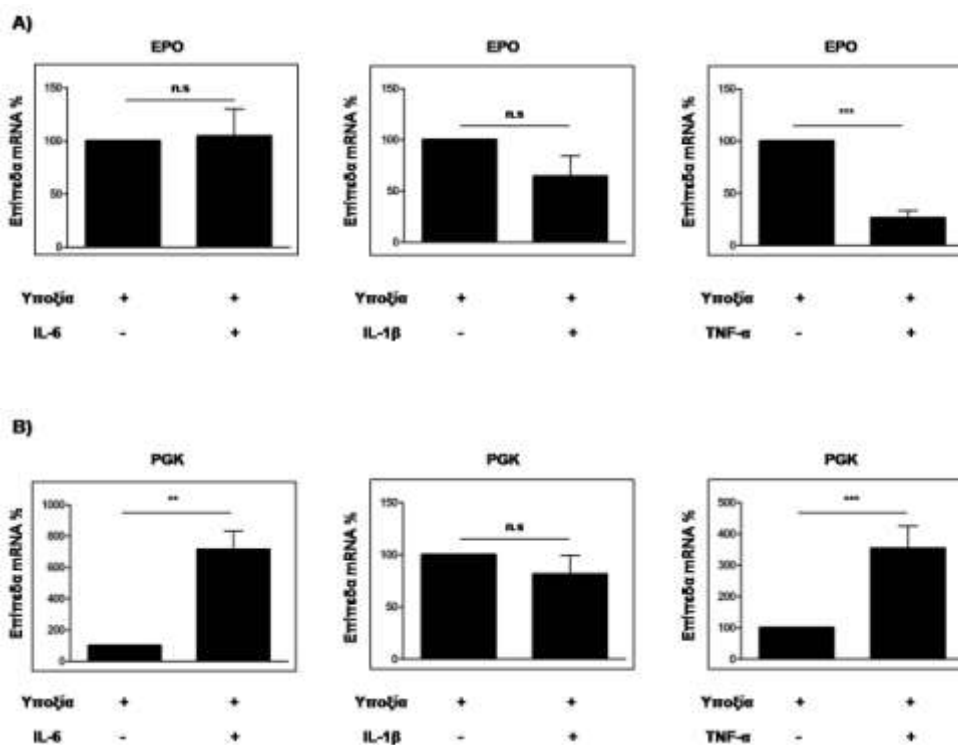
Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του γονιδίου της διμουτάσης του υπεροξειδίου 2 (*SOD2*) (**A**) και τον υποκινητή του γονιδίου της κινάσης του φωσφογλυκερινικού οξέος (*PGK*) (**B**) σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O₂) για 16 ώρες, απουσία ή παρουσία των παραγόντων φλεγμονής IL-6, IL-1β και TNF-α (10 ng/ml), έπειτα από διαμόλυνση με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc ή pGL3-*PGK*-Luc και pCI-*Renilla*. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της *Renilla* και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (* P<0,05, ** P<0,01).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας, επάγεται ο η μεταγραφή του υποκινητή του *SOD2* κατά 2 φορές περίπου σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν σε υποξία παρουσία TNF-α, η μεταγραφή του υποκινητή του *SOD2* μειώθηκε σε σχέση με εκείνη της υποξίας και δεν αυξήθηκε σε σχέση με αυτή των κυττάρων στη νορμοξία. Αντίστοιχα πειράματα παρουσία των IL-6 και IL-1β, δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή. Μελετώντας την ενεργοποίηση του υποκινητή του *PGK*, παρατηρήθηκε αύξηση σε συνθήκες υποξίας κατά 2 φορές περίπου σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η επώαση των κυττάρων σε υποξία παρουσία TNF-α και IL-6, προκάλεσε

περαιτέρω αύξηση στη μεταγραφή του υποκινητή του *PGK*. Η παρουσία της *IL-1β* στις ίδιες συνθήκες δεν είχε καμία επίδραση. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο *TNF-α* δρα αντίθετα στη μεταγραφική ενεργότητα των ισομορφών *HIF-1* και *HIF-2*, καθώς μειώνει σε συνθήκες υποξίας την ενεργότητα του *HIF-2*, ενώ αυξάνει σε υποξία την ενεργότητα του *HIF-1*. Επιπλέον, η *IL-6* φαίνεται να αυξάνει σε συνθήκες υποξίας την ενεργότητα του *HIF-1*, χωρίς να επηρεάζει την ενεργότητα του *HIF-2*, ενώ τέλος η *IL-1β* δεν επηρεάζει τη δράση των *HIF* σε επίπεδο μεταγραφής. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι οι μεταβολές στη δραστηριότητα των *HIF* υπό την επιρροή φλεγμονωδών παραγόντων σε υποξία, είναι διαφορετικές για κάθε ισομορφή, και φαίνεται να μη σχετίζονται άμεσα με αντίστοιχες μεταβολές σε επίπεδο πρωτεΐνης, στη σειρά ηπατοκαρκινώματος που εξετάστηκε.

Γ.2.3 Επίδραση των παραγόντων *IL-6*, *IL-1β* και *TNF-α* στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων-στόχων των *HIF*.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σημασία της επίδρασης των *IL-6*, *IL-1β* και *TNF-α* στους *HIF*, εξετάστηκε η έκφραση σε επίπεδο mRNA ενδογενών και εξειδικευμένων γονιδίων στόχων τους, και πιο συγκεκριμένα η έκφραση του γονιδίου *EPO* για τον *HIF-2* και η έκφραση του γονιδίου *PGKI* για τον *HIF-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 (**Εικόνα 69**). Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας για 16 ώρες τα επίπεδα mRNA του *EPO* αυξήθηκαν κατά 8 περίπου φορές σε σύγκριση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Ωστόσο, η ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του *TNF-α*, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 70% περίπου των επιπέδων mRNA του *EPO* σε σύγκριση με την επαγωγή της υποξίας, ενώ η ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας είτε με την *IL-6*, είτε με την *IL-1β* δεν προκάλεσε καμία αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα mRNA του *EPO* σε σύγκριση με την επαγωγή από υποξία. Αντίστοιχα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η έκφραση των επιπέδων mRNA του *PGKI* έδειξαν ότι η καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας για 16 ώρες, αύξησε κατά 4 περίπου φορές τα επίπεδα mRNA του *PGKI* σε σύγκριση με την καλλιέργεια των κυττάρων σε νορμοξία.

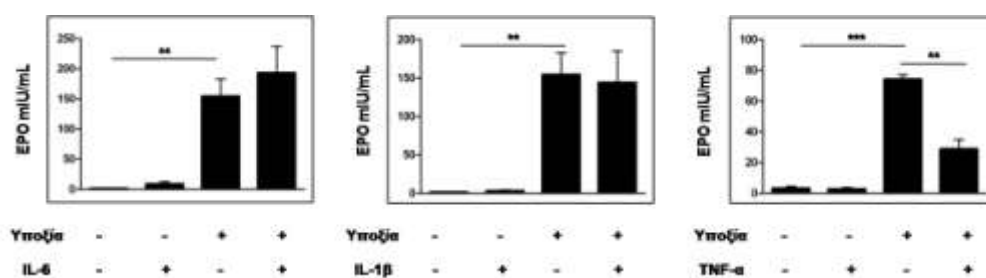


Εικόνα 69: Επίδραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων-στόχων των HIF. Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων της ερυθροποιητίνης (*EPO*) (A) και της κινάσης του φωσφογλυκερινικού οξέος (*PGK*) (B) σε κύτταρα Huh7 που επωάστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O₂) για 16 ώρες, απουσία ή παρουσία των παραγόντων φλεγμονής IL-6, IL-1β και TNF-α (10 ng/ml) με τη μέθοδο της Real Time PCR. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 4 τιμών από 2 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01,***P<0,001).

Κατά την ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του TNF-α ή της IL-6, παρατηρήθηκε τουλάχιστον διπλάσια επαγωγή των επιπέδων mRNA του *PGK1* σε σύγκριση με την επαγωγή της υποξίας, ενώ η ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας με την IL-1β δεν προκάλεσε καμία αξιοσημείωτη μεταβολή σε σύγκριση με την επαγωγή από υποξία. Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο TNF-α επιδρά αρνητικά στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 σε υποξία, μειώνοντας σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση του *EPO*. Αντιθέτα, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 φαίνεται να ρυθμίζεται θετικά στην υποξία τόσο από τον TNF-α, όσο και από την IL-6, οι οποίοι αυξάνουν σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση του *PGK1*.

Γ.2.4 Επίδραση των παραγόντων IL-6, IL-1β και TNF-α στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της EPO.

Για να διαπιστωθεί εάν η ανασταλτική δράση του TNF-α στη μεταγραφή της EPO ακολουθείται και από ανάλογη επίδραση στην έκκριση της ερυθροποιητίνης (EPO) σε κύτταρα Huh7, μετρήθηκε η εκκρινόμενη EPO με τη μέθοδο της ELISA (Εικόνα 70).



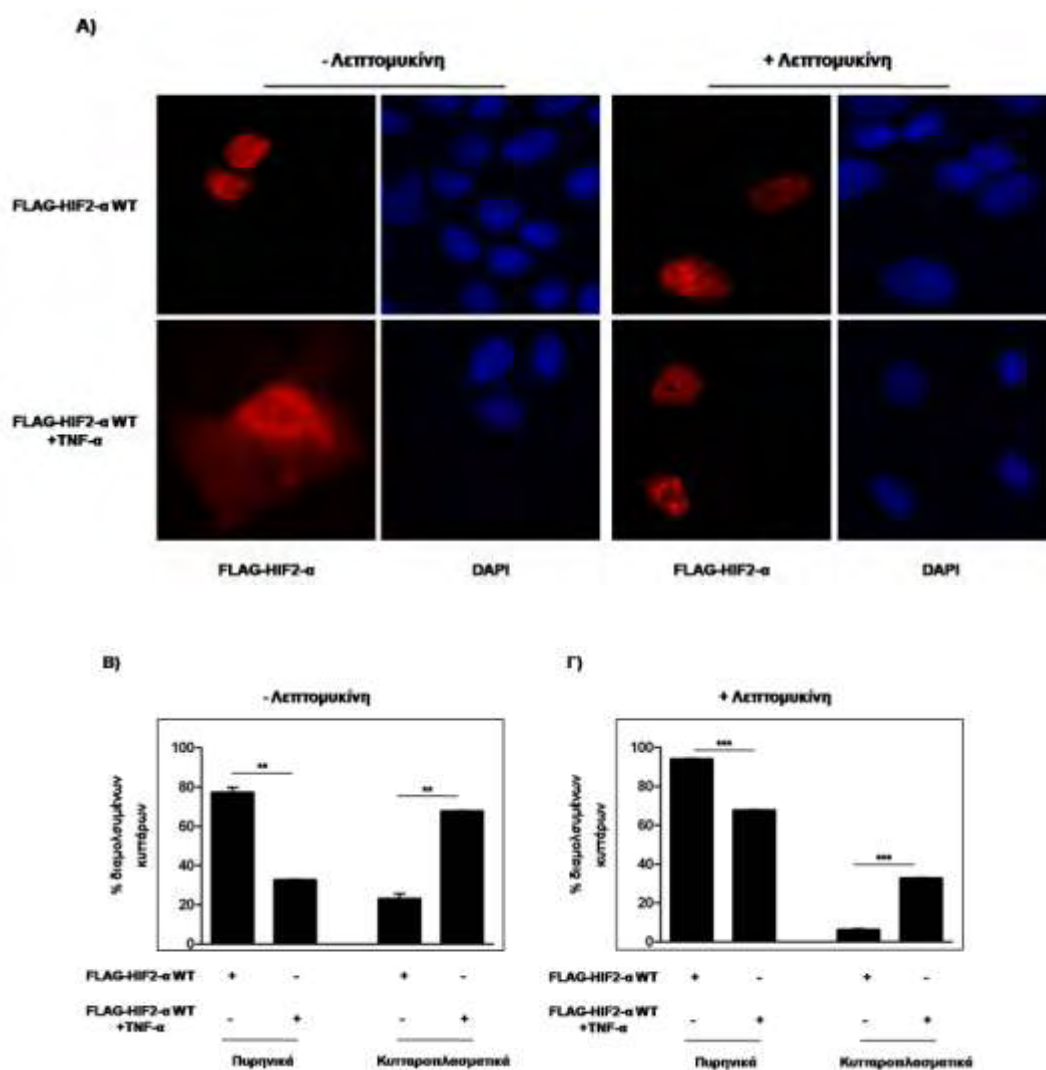
Εικόνα 70: Επίδραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση EPO. Μέτρηση της έκκρισης EPO με ELISA σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O₂) ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες απουσία ή παρουσία των παραγόντων φλεγμονής IL-6, IL-1β και TNF-α (10 ng/ml). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 4 τιμών από 2 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01, ***P<0,005).

Παρατηρήθηκε ότι η υποξία προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO κατά 40 περίπου φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε υποξία με ταυτόχρονη επίδραση TNF-α, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της εκκρινόμενης EPO σε ποσοστό περίπου 50% σε σύγκριση με την έκκρισή της σε συνθήκες υποξίας. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μηδενικής επίδρασης των IL-6 και IL-1β στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, οι παραπάνω ουσίες δεν προκάλεσαν επίσης καμία μεταβολή στα εκκρινόμενα επίπεδα της EPO σε σύγκριση με αυτά της υποξίας. Συμπερασματικά, προτείνεται ότι ο TNF-α αναστέλλει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 παραγωγή EPO σε συνθήκες υποξίας σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος.

Γ.2.5 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2α υπό την επίδραση του TNF-α

Προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος μέσω του οποίου ο TNF-α επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2, εξετάστηκε η επίδρασή του την υποκυτταρική κατανομή του HIF-2α. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που

κωδικοποιεί την έκφραση του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και στη συνέχεια επώαστηκαν σε νορμοξία παρουσία του TNF-α για 16 ώρες. Ο εντοπισμός του FLAG-HIF-2α στις διάφορες συνθήκες ελέγχθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 71).



Εικόνα 71: Επίδραση του TNF-α στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α. A) Κύτταρα Huh7 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση του rFLAG-HIF-2α-WT μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον επίτοπο FLAG. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI. Πριν τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επώαστηκαν σε νορμοξία με 10 ng/ml TNF-α για 16 ώρες και με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες. B,Γ) Υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων Huh7 που έχουν πυρηνικό ή κυτταροπλασματικό εντοπισμό απουσία (B) ή παρουσία λεπτομυκίνης (LMB) (Γ), με βάση την μέτρηση περίπου 100-150 διαμολυσμένων κυττάρων ανά συνθήκη. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

Ο HIF-2α ανιχνεύθηκε αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα σε ποσοστό περίπου 80% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ σε ποσοστό περίπου 20%

ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα είχαν επωαστεί παρουσία του TNF- α , ο HIF-2 α βρέθηκε να κατανέμεται ταυτόχρονα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα σε ποσοστό περίπου 70% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ αποκλειστικά πυρηνική κατανομή είχε μόλις στο 30% των κυττάρων.

Η αυξημένη ανίχνευση του HIF-2 α στο κυτταρόπλασμα παρουσία του TNF- α , θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε μειωμένη είσοδο μέσα στον πυρήνα, είτε σε αυξημένη έξοδο από αυτόν. Για να διαπιστωθεί ποια από τις δύο πιθανές περιπτώσεις είναι αυτή που τελικά ισχύει, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία λεπτομυκίνης (LMB), η οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλει την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 έξοδο από τον πυρήνα. Παρουσία της λεπτομυκίνης, ο εντοπισμός του HIF-2 α εξακολούθησε να είναι κατά βάση πυρηνικός αν και σε ελαφρώς ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (περίπου 90%). Αντίθετα, η χορήγηση λεπτομυκίνης ανέστρεψε την υποκυτταρική κατανομή του HIF-2 α παρουσία του TNF- α , προκαλώντας μερική ανάκτηση του πυρηνικού του εντοπισμού. Πιο συγκεκριμένα, υπό την ταυτόχρονη επίδραση TNF- α και LMB, ο HIF-2 α ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα σε ποσοστό περίπου 70% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ ανιχνεύθηκε ταυτόχρονα σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα μόλις στο 30% των κυττάρων.

Από τα δεδομένα αυτά, διαφαίνεται ότι ο TNF- α ενισχύει την επαγόμενη από τη CRM1 έξοδο του HIF-2 α από τον πυρήνα, γεγονός που εξηγεί την παρατηρούμενη απενεργοποίησή του ως μεταγραφικού παράγοντα. Ωστόσο, το γεγονός ότι κατά την ταυτόχρονη παρουσία της LMB και του TNF- α ανακτάται μεν ένα μεγάλο μέρος του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-2 α το οποίο όμως δεν φτάνει τα επίπεδα του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-2 α παρουσία μόνο της LMB, υποδηλώνει πως ο TNF- α ενδεχομένως ασκεί την αρνητική του δράση στον HIF-2 πιθανόν και μέσω άλλων μηχανισμών που χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου ότι η επαρκής παροχή οξυγόνου αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τη διατήρηση της αερόβιας ζωής, τα θηλαστικά έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς απαραίτητους για την επιβίωσή τους, προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις συνθήκες υποξίας. Σε μοριακό επίπεδο η απόκριση στην υποξία περιλαμβάνει ένα περίπλοκο βιοχημικό σύστημα στο οποίο κυρίαρχο ρόλο έχουν οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIF). Είναι γνωστό ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου οι HIF εκφράζονται συνεχώς, υδροξυλιώνονται από τις PHDs και αποικοδομούνται ταχύτατα στο πρωτεάσωμα, ενώ κατά την υποξία η απώλεια οξυγόνου καθιστά τις PHDs ανενεργές σταθεροποιώντας τους HIF και ενεργοποιώντας τη μεταγραφική δράση τους. Πέραν της υποξίας οι HIF ρυθμίζονται σε επίπεδο μεταγραφής, πρωτεϊνοσύνθεσης, σταθερότητας και δραστηριότητας από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, κυτταροκίνες και πρωτεϊνικές κινάσες. Οι HIF-1α και HIF-2α συμβάλλουν στη φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη των οργανισμών αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, με την κάθε ισομορφή να έχει διακριτές δράσεις.

Η υπερέκφραση των HIF, η οποία συχνά σχετίζεται με κακή πρόγνωση, έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου μεταξύ των οποίων και το ηπατοκαρκίνωμα (HCC). Το ηπατοκαρκίνωμα αποτελεί έναν πρωτοπαθή κακοήγη όγκο που αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των καρκίνων του ήπατος παγκοσμίως. Είναι ο πέμπτος πιο συχνός τύπος καρκίνου στους άντρες και ο ένατος πιο συχνός στις γυναίκες. Λόγω της διάγνωσής του σε προχωρημένα στάδια, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν είναι ιάσιμος (Ju et al., 2016). Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το ακριβή ρόλο του HIF-2α στο HCC είναι ανεπαρκή και αντικρουόμενα. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση του HIF-2α αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη του όγκου (Bangoura et al., 2007) ενώ άλλες προτείνουν έναν πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο (Sun et al., 2013). Στα πλαίσια αυτά, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της λειτουργίας του HIF-2α και των μηχανισμών που ρυθμίζουν τα επίπεδά του, την υποκυτταρική του κατανομή και τη δράση του, σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος (Huh7, HepG2), με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζει στο HCC.

Δ.1 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ένας καινούριος μηχανισμός ρύθμισης της δράσης του επαγόμενου από υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση της α υπομονάδας του HIF-2 από την κινάση της καζεΐνης CK1δ σε δύο διακριτές θέσεις, στη σερίνη 383 και στη θρεονίνη 528. Η φωσφορυλίωση αυτή, οδηγεί τελικά σε αυξημένη παραγωγή ερυθροποιητίνης, εμποδίζοντας την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 έξοδο του HIF-2α στο κυτταρόπλασμα. Η εύρεση του νέου αυτού μηχανισμού βασίστηκε στις ακόλουθες παρατηρήσεις:

Πρώτον, η αποσιώπηση της έκφρασης ή η αναστολή της δράσης της CK1δ μειώνει την επαγωγή της έκφρασης εξειδικευμένων γονιδίων στόχων του HIF-2 όπως η ερυθροποιητίνη (*EPO*) και ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) σε συνθήκες υποξίας. Η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 δε συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων, τα οποία διατηρούνται ανέπαφα ύστερα από την αποσιώπηση της έκφρασης ή την αναστολή της CK1δ. Δεύτερον, η CK1δ τροποποιεί τα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνη 383 και θρεονίνη 528 του HIF-2α *in vitro*. Τρίτον, η απενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης των θέσεων S383 και T528 ύστερα από μετατροπή τους σε αλανίνη αναστέλλει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 γονιδιακή έκφραση των *EPO* και *PAI-1*, ενώ οι φωσφομιμητικές μεταλλάξεις στα ίδια κατάλοιπα διατηρούν την ενεργότητα του HIF-2. Τέταρτον, η CK1δ δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α ή την αλληλεπίδρασή του με τον μεταγραφικό του συνενεργοποιητή USF2, αλλά ελέγχει την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα. Τέλος, είτε η καταστολή της CK1δ είτε οι μεταλλάξεις σε αλανίνη στις θέσεις φωσφορυλίωσης του HIF-2α, μειώνουν σημαντικά την έκκριση ερυθροποιητίνης σε δύο σειρές ηπατοκαρκινώματος.

Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία βρέθηκε ότι ο HIF-2α αποτελεί στόχο της CK1δ και ταυτοποιήθηκε ως στόχος φωσφορυλίωσης η σερίνη 383 η οποία εντοπίζεται ανάμεσα στις επικράτειες PAS-B και ODD του HIF-2α. Μέχρι σήμερα, από μελέτες ανάλυσης της κρυσταλλικής δομής του HIF-2α, έχει καθοριστεί ότι η επικράτεια PAS-B εκτείνεται ως το αμινοξύ 350 (Erbel et al., 2003, Wu et al., 2015), επομένως δε γνωρίζουμε με βεβαιότητα αν η σερίνη 383 ανήκει στην PAS-B, και κατά συνέπεια είναι δύσκολο να προβλέψουμε την εμπλοκή αυτού του αμινοξέος στη ρύθμιση του HIF-2α. Ο δεύτερος στόχος φωσφορυλίωσης από την CK1δ που

ταυτοποιήθηκε είναι η θρεονίνη 528 η οποία εντοπίζεται σε μια περιοχή όπου αλληλεπικαλύπτονται οι επικράτειες ODD και N-TAD (Maemura et al., 1999, O'Rourke et al., 1999). Είναι γνωστό ότι η επικράτεια ODD εμπλέκεται στην οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-2α, ενώ η επικράτεια N-TAD έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HIF-2α. Έχει βρεθεί ότι η αντικατάστασή της N-TAD με την ανάλογη επικράτεια του HIF-1α αλλάζει την ειδικότητά τους ως προς τους μεταγραφικούς στόχους τους (Hu et al., 2007). Επομένως, η φωσφορυλίωση στη θέση T528 θα μπορούσε να εμπλέκεται σε οποιαδήποτε από τις δύο παραπάνω διαδικασίες. Η οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-2α που λαμβάνει χώρα στην επικράτεια ODD περιλαμβάνει το πολύ καλά χαρακτηρισμένο σύστημα PHD-VHL-πρωτεασώματος, όπου συμβάντα υδροξυλίωσης στα κατάλοιπα προλίνη 405 και προλίνη 531 που καταλύονται από τις υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Δεδομένου ότι η T528 βρίσκεται πάρα πολύ κοντά στην P531, η τροποποίησή της από την CK1δ θα μπορούσε να επηρεάζει την υδροξυλίωση του HIF-2α και άρα τη σταθερότητα του μορίου του. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν για να αναλυθεί η επίδραση της αναστολής της CK1δ στο χρόνο ημιζωής του HIF-2α μετά από χρήση κυκλοεξιμιδίου ή επανοξυγόνωσης δεν ευνοούν αυτό το σενάριο, καθώς δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α.

Εναλλακτικά λοιπόν, η φωσφορυλίωση της T528 θα μπορούσε να εμπλέκεται στη λειτουργία της επικράτειας N-TAD και πιο συγκεκριμένα στην αλληλεπίδραση του HIF-2 με άλλους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Είναι αποδεδειγμένο ότι απαιτείται η συνεργασία πολλαπλών μεταγραφικών παραγόντων ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων ως απόκριση σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα (Thanos and Maniatis, 1995). Μεταξύ άλλων, ο USF2 έχει ταυτοποιηθεί ως ένας ειδικός μεταγραφικός συμπαράγοντας του HIF-2 που όχι μόνο απαιτείται για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων αλλά και για την εξαρτώμενη από τον HIF-2 ογκογένεση *in vitro* σε πολλές κυτταρικές σειρές όπως mES και Hep3B (Pawlus et al., 2012). Επιπλέον έχειδειχθεί ότι ο USF2 προσδένεται στους υποκινητές γονιδίων στόχων του HIF-2 *in vivo* και συμβάλλει σημαντικά στη ρυθμιζόμενη από την υποξία πρόσδεση των CBP και p300 στα γονίδια *EPO* και *PAI-1*. Σύμφωνα με τα παραπάνω, μια υπόθεση θα ήταν να παρατηρείται μειωμένη έκφραση των παραπάνω γονιδίων όταν αναστέλλεται η CK1δ, η οποία να οφείλεται στην εξασθενημένη αλληλεπίδραση

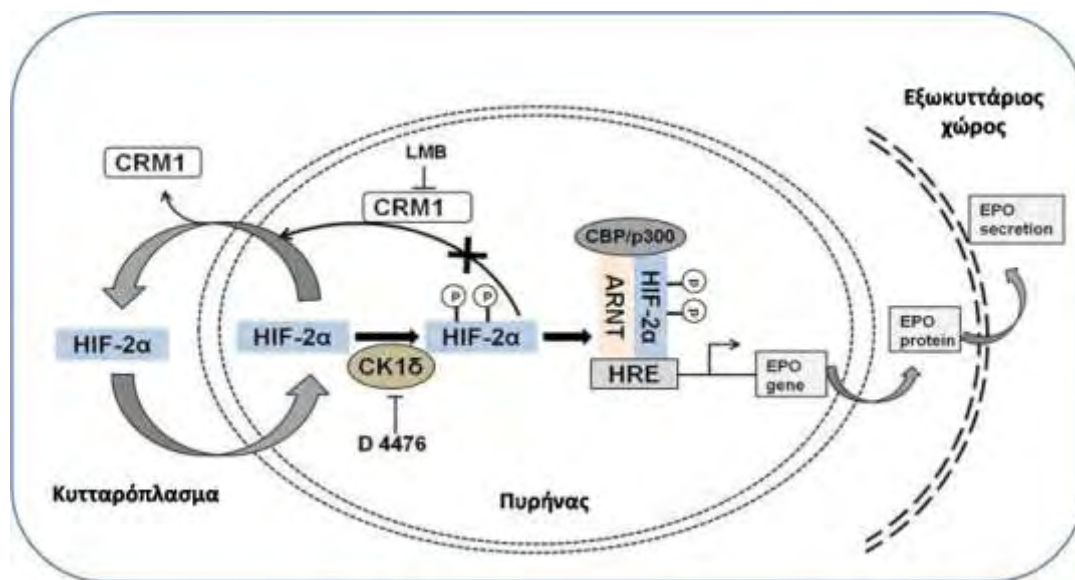
μεταξύ USF2 και μη φωσφορυλιωμένης επικράτειας N-TAD του HIF-2α. Ωστόσο, τα πειράματα συγκατακρήμνισης που έγιναν σε αυτή την κατεύθυνση έδειξαν ότι η αναστολή της CK1δ δεν επηρεάζει τη γνωστή αλληλεπίδραση μεταξύ USF2 και HIF-2 στην υποξία, καθιστώντας την εμπλοκή της φωσφορυλίωσης στην T528 μάλλον απίθανη σε αυτήν την υπόθεση.

Προσπαθώντας να προσδιορίσουμε τον λόγο της μειωμένης δράσης των μεταλλαγμένων σε αλανίνη μορφών του HIF-2α παρατηρήσαμε ότι εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό στο κυτταρόπλασμα, κάτι που παρατηρήσαμε επίσης και για τον αγρίου τύπου HIF-2α παρουσία του αναστολέα D4776. Επιπλέον, παρατηρήθηκε επανασυσσώρευση των παραπάνω πρωτεϊνών μέσα στον πυρήνα όταν αναστέλλεται η διεργασία εξόδου από τον πυρήνα με τη χρήση λεπτομυκίνης B (LMB), γεγονός που υπέδειξε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ είναι απαραίτητη προκειμένου αυτός να βρίσκεται μέσα στον πυρήνα και να μπορεί να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και για τον ενδογενή HIF-2α σε υποξία με πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι ενώ στα κύτταρα όπου είχε αποσιωπηθεί η έκφραση της CK1δ σημαντικό ποσοστό του HIF-2α μετατοπίστηκε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, παρουσία της LMB επανήλθε σχεδόν εξολοκλήρου στο πυρηνικό κλάσμα. Η αναστολή της εξόδου από τον πυρήνα που διαμεσολαβείται μέσω φωσφορυλίωσης αποτελεί πράγματι έναν αποτελεσματικό τρόπο για να διασφαλιστεί η συσσώρευση στον πυρήνα και η πλήρης ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται σε διαρκή μετακίνηση όπως έχει δείχθει προηγουμένως σε πολλές περιπτώσεις (**Ikuta et al., 2004, Lee and Bai, 2002, Zhang and Xiong, 2001**). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως η CK1 ρυθμίζει την μεταφορά του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF6 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα επάγοντας την εξαρτώμενη από τον παράγοντα CRM1 εξαγωγή του από τον πυρήνα μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης (**Biswas et al., 2011**).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, προτείνουμε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α στη Ser-328 ή την Thr-528 από την CK1δ είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική του συσσώρευση στον πυρήνα και την κατ' επέκταση πλήρη μεταγραφική του ενεργότητα, καθώς όταν η φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα αποτρέπεται η εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα μέσω της CRM-1 (**Εικόνα 72**). Το πώς ακριβώς σχετίζονται αυτές οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις με την εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο

μελλοντικής έρευνας. Είναι γνωστό ότι η CRM1 διαμεσολαβεί την μετακίνηση πολλών πρωτεϊνών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζοντας στην αμινοξική αλληλουχία τους σήματα πυρηνικής εξόδου (NES) τα οποία συνήθως αποτελούνται από 3-4 συντηρημένα υδρόφοβα αμινοξέα, κυρίως λευκίνες. Η έξοδος του HIF-1α από τον πυρήνα επίσης ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης, όμως σε αυτή την περίπτωση η τροποποίηση καταλύεται από τις ERK1/2 οι οποίες στοχεύουν δυο κατάλοιπα σερίνης (Ser 641 και Ser 643) που βρίσκονται δίπλα σε ένα μη συμβατικό CRM1-εξαρτώμενο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) (Mylonis et al., 2008, Mylonis et al., 2006). Ωστόσο, καμία από τις δύο θέσεις όπου δρουν οι ERK, ούτε και η περιοχή στην οποία περιέχεται το NES δεν είναι συντηρημένες στον HIF-2α. Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2α μέσω του προγράμματος ValidNESs (Fu et al., 2013) οδήγησε στην πρόβλεψη δύο πιθανώς λειτουργικών θέσεων NES πριν και μετά την Thr528, τα FNELDL και LPTYIPM αντίστοιχα. Το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ValidNESs δεν προέβλεψε κανένα λειτουργικό NES γύρω από τη δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης (Ser383), ωστόσο το φωσφοπεπτίδιο που ταυτοποιήθηκε από την ανάλυση φασματοσκοπίας μαζών και περιέχει την Ser383 περιέχει επίσης την υδρόφοβη περιοχή NFLF που θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα άτυπο NES.



Εικόνα 72: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-2α από την CK1δ (Pangou et al., 2016).

Η εξακρίβωση των παραπάνω προτεινόμενων NES για τον HIF-2α και ο ρόλος που μπορεί να έχουν στη φωσφορυλίωση από την CK1δ καθώς επίσης και το εάν η CRM1 αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τον HIF-2α, είναι σημαντικά ερωτήματα που

θα μπορούσαν να αποτελέσουν πειραματική συνέχεια της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Επιπλέον, η διαρκής μετακίνηση πρωτεϊνών μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος συχνά ελέγχεται από την ισορροπία των αντιστρεπτών διαδικασιών της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF6 που αναφέρθηκε και προηγουμένως, του οποίου η μετακίνηση ελέγχεται από τις αντίθετες δράσεις της CK1 και της καλσινευρίνης (**Biswas et al., 2011**). Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον να διερευνηθεί ως συνέχεια αυτής της εργασίας εάν υπάρχει κάποια φωσφατάση που αποφωσφορυλιώνει τον HIF-2α στα κατάλοιπα φωσφορυλίωσης από την CK1δ και μέσω ενός αντίθετου μηχανισμού τον απενεργοποιεί ενισχύοντας την έξοδό του από τον πυρήνα.

Η ρύθμιση των HIF-2α και HIF-1α από την CK1 αντιπροσωπεύει ένα καινούργιο παράδειγμα διακριτής – αντίθετης ρύθμισης των δύο ισομορφών. Σε αυτή την εργασία έχειδειχθεί ότι η τροποποίηση του HIF-2α από τη CK1δ στα κατάλοιπα σερίνης Ser383 και Thr528 ενισχύει τη μεταγραφική του ενεργότητα προάγοντας τη συγκέντρωσή του στον πυρήνα. Από την άλλη από το εργαστήριό μας έχει προηγουμένως δημοσιευθεί ότι ο HIF-1α τροποποιείται από τη CK1 στο κατάλοιπο Ser247 και ότι η τροποποίηση αυτή αναστέλλει την ενεργότητα του HIF-1 με το να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση HIF-1/ARNT (**Kalousi et al., 2010, Kourti et al., 2015**). Πραγματοποιώντας συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών είδαμε ότι οι δύο ισομορφές HIF-α παρουσιάζουν απόλυτη ομολογία στην περιοχή PAS-B όπου και φωσφορυλιώνεται ο HIF-1α. Όμως από τα πειράματα χαρτογράφησης που έγιναν αποκλείστηκε η πιθανότητα φωσφορυλίωσης από την CK1δ στην αντίστοιχη περιοχή του HIF-2α *in vitro* και οδηγηθήκαμε στην ταυτοποίηση των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser383 και Thr528 που βρίσκονται καρβοξυτελικά της PAS-B επικράτειας. Η Ser383 είναι συντηρημένη στην ισομορφή HIF-1α ενώ η Thr528 όχι. Έτσι, παρά τη γενική ομοιότητα που παρουσιάζουν οι HIF-1α και HIF-2α σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, στοχοποιούνται από την CK1δ σε διακριτές θέσεις με εντελώς αντίθετο αποτέλεσμα για τη λειτουργία τους. Δεν είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ότι ένας παράγοντας έχει αντίθετη δράση όσον αφορά στη ρύθμιση των ισομορφών του HIF-α. Έχειδειχθεί ότι ο παράγοντας HAF (HIF-associated factor) προσδένεται στην αμινοτελική επικράτεια του HIF-1α και τον αποσταθεροποιεί κατά έναν τρόπο εξαρτώμενο από το πρωτεάσωμα (**Koh et al., 2008**). Αντιθέτως, ο HAF προσδένεται στην καρβοξυτελική επικράτεια του HIF-2α και προωθεί τη μεταγραφική του

ενεργότητα (**Koh et al., 2011**). Φαίνεται πως σε κύτταρα που εκφράζουν και τις δύο ισομορφές του HIF-α είναι σημαντικό να μπορεί να επάγεται η ενεργότητα της μιας ισομορφής όταν η άλλη είναι απενεργοποιημένη, κατά τρόπο ιστοειδικό και υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Πιθανώς η CK1δ να συμμετέχει στη ρύθμιση αυτής της ισορροπίας, με αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ή ενεργότητάς της να οδηγούν σε επιλεκτική ενεργοποίηση του HIF-2α όταν κρίνεται απαραίτητο.

Τα μέλη της οικογένειας CK1 αποτελούν εξελικτικά συντηρημένα μέλη της οικογένειας των κινασών σερίνης/θρεονίνης. Εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, η επιδιόρθωση του DNA και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, ενώ έχει επίσης αναφερθεί ότι στα υποστρώματά τους ανήκουν μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων όπως ο TP53, ο Foxo1 και ο HIF-1α (**Bischof et al., 2011, Cheong and Virshup, 2011, Greer and Rubin, 2011, Gross and Anderson, 1998, Kalousi et al., 2010, Knippschild et al., 2005, Schittek and Sinnberg, 2014, Knippschild et al., 2014**). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο HIF-2α προστίθεται για πρώτη φορά στη λίστα των υποστρωμάτων της CK1, ενισχύοντας το ρόλο της στη ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία. Πέρα από τη διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο η CK1 επιδρά θετικά στον HIF-2 είναι σημαντικό να διευκρινιστεί υπό από ποιες συνθήκες λαμβάνει χώρα αυτή η φωσφορυλίωση. Όσον αφορά την CK1, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, αυτή αποτελεί μια πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα και η ενζυμική δράση της είναι συνεχής. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η φωσφορυλίωση από τη CK1 ρυθμίζει την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα μέσω της CRM1, η οποία συμβαίνει αποκλειστικά στον πυρήνα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι και η ρυθμιστική αυτή φωσφορυλίωση συμβαίνει στον πυρήνα. Ενδιαφέρον κομμάτι έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει το ενδεχόμενο η ενεργότητα της CK1 να επηρεάζεται από την υποξία και αν αυτό είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από τον HIF-2α. Η ανακάλυψη ενός μηχανισμού ανάδρομης τροφοδότησης μεταξύ HIF-2α και CK1δ θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα λογικό σενάριο, καθώς είναι μάλλον αναμενόμενο να υπάρχουν τέτοιου είδους μηχανισμοί όσον αφορά μεταγραφικούς παράγοντες που κωδικοποιούν γονίδια εμπλεκόμενα σε κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες (HIF-2 – EPO). Ένας παρόμοιος μηχανισμός ανάδρομης τροφοδότησης έχει περιγραφεί πρόσφατα για τον HIF-2α και την αποακετυλάση σιρτουίνη 1 (**Chen et al., 2012**). Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η Sirt1 αποακετυλιώνει τον

HIF-2α σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης και τον ενεργοποιεί. Από την άλλη, η γονιδιακή έκφραση της Sirt1 επάγεται κατά την υποξία κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον HIF-2, τόσο σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και σε ποντίκια.

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται επίσης για πρώτη φορά ότι η CK1 έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας της ερυθροποίησης, ελέγχοντας έμμεσα την παραγωγή ερυθροποιητίνης μέσω φωσφορυλίωσης του HIF-2α. Ο HIF-2α εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της παραγωγής EPO στο ήπαρ (**Rankin et al., 2007**). Κατά την εμβρυική ανάπτυξη αρχικά η κύρια παραγωγή της EPO εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ ενώ στα τελευταία στάδια της γαστριδίωσης μετατοπίζεται προς τους νεφρούς αν και συνεχίζει να παράγεται σε μικρότερο βαθμό και στο ήπαρ. Επομένως τα ηπατοκύτταρα αποτελούν την πρωταρχική πηγή εξωνεφρικής EPO στους ενήλικες (**Koury et al., 1991**), ενώ κάτω από συνθήκες έντονης υποξίας, η παραγωγή EPO στο ήπαρ αυξάνει και μπορεί να ξεπεράσει το 33% της συνολικής παραγωγής (**Eckardt and Kurtz, 2005**). Η απορύθμιση της έκφρασης της EPO έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναιμίας όταν τα επίπεδα της EPO στον ορό είναι ανεπαρκή ή πολυκυτταραιμίας όταν υπάρχει υπερπαραγωγή EPO (**Rankin et al., 2007**). Η ταυτοποίηση λοιπόν της CK1δ ως μιας κινάσης που ρυθμίζει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση EPO στα καρκινικά ηπατοκύτταρα έχει μεγάλη φυσιολογική σημασία και ενδέχεται να έχει σημαντικές θεραπευτικές εφαρμογές στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον, μια ερευνητική ομάδα έχει δείξει ότι η EPO και ο υποδοχέας της εμπλέκονται σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο που χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό αγγείωσης (**Ribatti et al., 2007**). Στη συγκεκριμένη περίπτωση η EPO εκκρίνεται από τα καρκινικά ηπατοκύτταρα και δρα πάνω στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των υποδοχέων της (EPOR) προάγοντας έτσι την αγγειογένεση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι κάποιες περιπτώσεις HCC σχετίζονται με αφύσικα υψηλά επίπεδα ερυθροκυττάρων. Αυτή η σχετιζόμενη με το HCC ερυθροκυττάρωση πιστεύεται πως προκαλείται μέσω αυξημένης παραγωγής EPO από τα καρκινικά ηπατοκύτταρα και πολλοί ασθενείς έχουν υψηλά επίπεδα EPO στο πλάσμα του αίματος (**Sakisaka et al., 1993**).

Λαμβάνοντας υπόψη το σημαντικό ρόλο του HIF-2 στο HCC, πολλές ενώσεις που παρεμβαίνουν άμεσα στη λειτουργία του HIF-2 ή στοχεύουν μονοπάτια που σχετίζονται με την υποξία γενικότερα, έχουν δοκιμαστεί πειραματικά ως αντικαρκινικές ουσίες χωρίς όμως να αποδειχθούν αποτελεσματικές (**Zhao et al.,**

2015a). Σύμφωνα με τα ευρήματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη διατριβή η στόχευση της CK1δ ίσως να είναι μια χρήσιμη εναλλακτική λύση για τη φαρμακολογική αναστολή της δράσης του HIF-2, ειδικά για τη θεραπεία της ερυθροκυττάρωσης που σχετίζεται με το HCC, κάτι που ωστόσο χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

Δ.2 Ρύθμιση του HIF-2α από παράγοντες φλεγμονής.

Το ηπατοκαρκίνωμα (HCC) αποτελεί έναν πρωτοπαθή κακοήγη όγκο για την έναρξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση του οποίου, απαιτείται η συνεργασία πολλών μοριακών μηχανισμών ανάμεσα στους οποίους είναι η φλεγμονή και η υποξία (**Aravalli et al., 2013**). Στα ηπατοκύτταρα εκφράζονται υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας για έναν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών όπως οι TNF-α, IL-6 και IL-1β. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος αποτελούν ταυτόχρονα στόχο αλλά και πηγή παραγωγής των παραπάνω κυτταροκινών, υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο για τις κυτταροκίνες αυτές στην καρκινογένεση του ήπατος (**Leonardi et al., 2012**). Παράλληλα, το HCC χαρακτηρίζεται από τοπική υποξία και ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων HIF οι οποίοι ρυθμίζουν και ρυθμίζονται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, επάγοντας σηματοδοτικούς καταρράκτες που ευνοούν τη μετάσταση (**Finger and Giaccia, 2010**).

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής διερευνήθηκε η λειτουργική σχέση μεταξύ υποξίας και φλεγμονής στο HCC χρησιμοποιώντας ως πειραματικό μοντέλο την καθιερωμένη σειρά ηπατοκαρκινώματος Huh7. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίστηκε η ρύθμιση του HIF-2α από τους προφλεγμονώδεις παράγοντες TNF-α, IL-6 και IL-1β και παράλληλα πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική μελέτη με τη ρύθμιση του HIF-1α από τους ίδιους παράγοντες υπό συνθήκες νορμοξίας ή υποξικού στρες. Τα ευρήματα που προέκυψαν για την επίδραση του καθενός παράγοντα στις δύο ισομορφές των HIF είναι τα ακόλουθα:

Η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) δεν επηρέασε σε κανένα επίπεδο τη ρύθμιση του HIF-2α, ενώ προκάλεσε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε υποξία. Η αύξηση αυτή δε συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) δεν επηρέασε σε κανένα επίπεδο τη ρύθμιση του HIF-2α ενώ προκάλεσε αύξηση τόσο στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α, όσο και στη μεταγραφική του ενεργότητα σε υποξία. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α)

προκάλεσε μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α και αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας σε υποξία. Αντίθετα, ενώ ο TNF-α δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α, προκάλεσε μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας σε υποξία η οποία συνοδεύτηκε από αντίστοιχη μείωση της εξαρτώμενης από τον HIF-2 έκκρισης ερυθροποιητίνης (EPO). Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο ότι ο TNF-α οδήγησε σε αυξημένη συσσώρευση του HIF-2α στο κυτταρόπλασμα, φαινόμενο που πιθανόν να οφείλεται μερικώς στον έλεγχο της εξαρτώμενης από την εξπορτίνη CRM1 εξόδου του HIF-2α από τον πυρήνα από τον TNF-α.

Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη για τη μακροχρόνια επίδραση παραγόντων φλεγμονής στους HIF-1α και HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος. Οι περισσότερες ερευνητικές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν γίνει κυρίως σε συνθήκες νορμοξίας και σε άλλους τύπους ιστών, έχοντας ως αντικείμενο την οξεία επίδραση των παραγόντων φλεγμονής κυρίως στην ισομορφία του HIF-1α. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη διατριβή αυτή προτείνουν ότι οι HIF-1α και HIF-2α υπόκεινται σε διακριτούς μηχανισμούς ρύθμισης από τους προφλεγμονώδεις παράγοντες TNF-α, IL-6 και IL-1β στο HCC. Από τις κυτταροκίνες που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι η IL-1β και η IL-6 δε φαίνεται να έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-2α στο HCC. Αντίθετα και οι δύο επηρεάζουν θετικά την έκφραση ή τη δράση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, σε συμφωνία με παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη θετική ρύθμιση του HIF-1α από τις παραπάνω κυτταροκίνες σε νορμοξία και σε άλλες κυτταρικές σειρές.

Για την IL-1β έχει αναφερθεί ότι επάγει σε νορμοξία την πρωτεΐνη του HIF-1α είτε μέσω του μονοπατιού NF-κB-COX-2 σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (**Jung et al., 2003**) είτε αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής και την πρωτεϊνική του σταθερότητα σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών (**Frede et al., 2005**). Πρόσφατες μελέτες σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος υποστηρίζουν ότι η IL-1β ρυθμίζει τον HIF-1α με αντίθετο τρόπο σε νορμοξικές και υποξικές συνθήκες στα κύτταρα αυτά. Σε νορμοξία η IL-1β επάγει την πρωτεΐνη και τη δράση του HIF-1α μέσω σηματοδότησης που ελέγχεται από το ογκογονίδιο RAS (**Sharma et al., 2011**) ενώ αντίθετα σε υποξία η IL-1β καταστέλλει τη δράση του HIF-1α προωθώντας την αποδόμηση του από το προτεάσωμα, οδηγώντας τελικά σε απόπτωση λόγω μειωμένης έκφρασης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου της αδρενομεδουλλίνης (ADM), που αποτελεί μεταγραφικό στόχο του HIF-1 (**Sun et al., 2014**).

Η παρατηρούμενη θετική ρύθμιση του HIF-1α από την IL-6 στο HCC έχει περιγραφεί από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και σε άλλες περιπτώσεις. Ο μηχανισμός της αυτοκρινούς σηματοδότησης IL-6/STAT3/HIF-1α έχει προταθεί από μελέτες για τον καρκίνο του παγκρέατος (Lang et al., 2007) και των ωοθηκών (Anglesio et al., 2011) ενώ μια μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση έχει συσχετίσει τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της IL-6 (Vasilopoulos et al., 2013). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η IL-6 δε φαίνεται να επηρεάζει τον HIF-2α σε κανένα επίπεδο στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος που εξετάστηκαν, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με βιβλιογραφικά δεδομένα που προτείνουν ότι ο HIF-2α και η IL-6 σχετίζονται. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι η διέγερση ηπατοκυττάρων ποντικού με IL-6 σε συνθήκες νορμοξίας ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση του *EPO* και αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση του *HIF-2α* (Ramadori et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της IL-6 ούτε στα επίπεδα mRNA του γονιδίου της *EPO* αλλά ούτε και στα επίπεδα έκκρισης της πρωτεΐνης της *EPO* σε συνθήκες νορμοξίας, τα οποία παρέμειναν σε μηδενικά επίπεδα. Μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη έρευνα σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα επίσης προτείνει τη ρύθμιση του HIF-2α από την IL-6 ταυτόχρονα μέσω επαγωγής της γονιδιακής του έκφρασης και αναστολής της αποδόμησής του, οδηγώντας τελικά σε αύξηση της βλαστικότητας των ανθεκτικών σε σισπλατίνη καρκινικών κυττάρων A549 and H157 (Zhang et al., 2016). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ανάμεσα στις προαναφερθείσες μελέτες και στη δικιά μας θα μπορούσαν να οφείλονται κατά κύριο λόγο στο μοναδικό μικροπερβάλλον που χαρακτηρίζει τον κάθε ιστό, αλλά και στο γεγονός ότι οι παραπάνω μελέτες έχουν διερευνήσει την οξεία επίδραση (2-6 ώρες) της IL-6 στον HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας, σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη η οποία εστίασε στη διερεύνηση της μακροχρόνιας επίδρασης (16 ώρες) της IL-6 στον HIF-2α σε συνθήκες υποξίας.

Από το σύνολο των κυτταροκινών που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία προέκυψε ότι ο TNF-α πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα καινούργιο παράδειγμα διακριτής – αντίθετης ρύθμισης των ισομορφών HIF-1α και HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος, καθώς δείχθηκε ότι ο TNF-α ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφική δράση του HIF-1 και αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 σε υποξία. Η σημερινή γνώση σχετικά με τη ρύθμιση του HIF-1α από τον TNF-α δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς υπάρχουν βιβλιογραφικές

αναφορές που προτείνουν ότι ο TNF- α έχει θετικό ρόλο και άλλες που προτείνουν ότι έχει αρνητικό ρόλο ανάλογα με το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται. Τα αποτελέσματά μας περί θετικής ρύθμισης του HIF-1 α από τον TNF- α συμφωνούν με τα ευρήματα πολλών ερευνητικών ομάδων που έχουν διεξάγει μελέτες σε ανθρώπινους όγκους γλοιοβλαστώματος (Tewari et al., 2012), ποντίκια με καρκίνο του πνεύμονα (Tang et al., 2014) αλλά και σε πρωτογενή σκελετικά μυϊκά κύτταρα ποντικών (Remels et al., 2015). Στη θετική αυτή ρύθμιση εμπλέκονται κυρίως τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν ο υποδοχέας TLR4 (Toll-like receptor 4) και ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B. Ωστόσο υπάρχουν και ερευνητικές μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο, ότι δηλαδή ο HIF-1 α υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση από τον TNF- α . Από μελέτες σε οστεοπρογενετικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η πρόκληση φλεγμονής μέσω χορήγησης TNF- α ενεργοποιεί τον παράγοντα NF- κ B ο οποίος ανταγωνίζεται την πρόσδεση του συμπαράγοντα p300 στους υποκινητές γονιδίων στόχων του HIF-1 (Mendonca et al., 2011). Επιπλέον, μελέτη σε κύτταρα PC12 φαιοχρωμοκυττώματος ποντικού έδειξε ότι ο TNF- α καταστέλλει τη δράση του HIF-1 ενεργοποιώντας την εξαρτώμενη από τον NF- κ B έκφραση της πρωτεΐνης της ανασταλτικής επικράτειας PAS (IPAS) (Goryo et al., 2011). Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε ότι ο TNF- α αναστέλλει την αλληλεπίδραση του HIF-1 α με τον ARNT και την πρόσδεση στο DNA σε λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών σε υποξία (Tsapournioti et al., 2013).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η ρύθμιση του HIF-2 α από τον TNF- α περιγράφεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ενισχύοντας το ρόλο του TNF- α στη ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία σε συνδυασμό με τη φλεγμονή. Προσπαθώντας να προσδιορίσουμε τον λόγο της μειωμένης δράσης του HIF-2 α υπό την επίδραση του TNF- α παρατηρήσαμε ότι ο HIF-2 α εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στο κυτταρόπλασμα παρουσία του TNF- α . Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι όταν αναστέλλεται η διεργασία εξόδου από τον πυρήνα με τη χρήση λεπτομυκίνης β (LMB), ενώ ένα μεγάλο ποσοστό του HIF-2 α επανεντοπίζεται στον πυρήνα, ένα σημαντικό μέρος του εξακολουθεί να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύγκριση με τον εξολοκλήρου πυρηνικό εντοπισμό του HIF-2 α παρουσία LMB και απουσία TNF- α . Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο TNF- α πιθανόν να συμμετέχει στη ρύθμιση της εξαρτώμενης από την εξπορτίνη CRM1 εξόδου του HIF-2 α από τον πυρήνα. Το γεγονός όμως ότι παρουσία LMB δεν παρατηρούμε πλήρη ανάκτηση του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-2 α υποδηλώνει ότι η αρνητική ρύθμιση του HIF-2 α

από τον TNF-α διαμεσολαβείται και από άλλους μοριακούς μηχανισμούς. Στη βιβλιογραφία περιγράφονται άλλες δύο περιπτώσεις όπου ο TNF-α προωθεί την έξοδο πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων από τον πυρήνα μέσω του μηχανισμού της CRM1. Η μια μελέτη έχει πραγματοποιηθεί σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα ποντικού και υποστηρίζει ότι ο TNF-α επάγει τη φωσφορλίωση της πρωτεΐνης C/EBPβ μέσα στην αλληλουχία που περιέχει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της (NLS), οδηγώντας σε αυξημένη αλληλεπίδρασή της με την CRM1 και έξοδό της από τον πυρήνα (**Buck et al., 2001**). Η δεύτερη μελέτη είναι πιο πρόσφατη και υποστηρίζει ότι ο TNF-α διεγείρει την έξοδο της ιντερλευκίνης 15 (IL-15) από τον πυρήνα σε κύτταρα HeLa μέσω της CRM1, ευνοώντας την εξωκυττάρωσή της μέσω της μικρής GTPάσης ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) (**Ouyang et al., 2013**).

Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός της ρύθμισης του HIF-2α από τον TNF-α που προτείνεται στην παρούσα εργασία παραμένει άγνωστος και αποτελεί αντικείμενο μελλοντικής έρευνας. Ο TNF-α θα μπορούσε να καταστέλλει τη μεταγραφική δράση του HIF-2 σε υποξία μέσω μηχανισμών που ενδεχομένως να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του HIF-2α με εξειδικευμένους συμπαραγόντες ή την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA. Στα πλαίσια της διερεύνησης του παραπάνω μηχανισμού είναι σημαντικό να διευκρινιστεί το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου ο TNF-α επιδρά αρνητικά στη ρύθμιση του HIF-2α. Η παρούσα μελέτη έχει πραγματοποιηθεί σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 τα οποία εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς του TNFα, TNFR1 και TNFR2. Επομένως η ρύθμιση που έχει ως τελικό στόχο τον HIF-2α μπορεί να περιλαμβάνει είτε την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού του NF-κB (TNFR1) είτε την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού των κασπασών (TNFR2) είτε την ταυτόχρονη ενεργοποίηση και αλληλεπίδραση μορίων που συμμετέχουν και στις δύο οδούς. Μια αρχική προσέγγιση των παραπάνω ερωτημάτων θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη μέτρηση του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του ρυθμού κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα όπου υπερεκφράζεται ο HIF-2α ή αποσιωπάται ο HIF-1α σε υποξία παρουσία του TNF-α. Τα δεδομένα που θα προέκυπταν από μια τέτοια μελέτη θα υπεδείκνυαν εάν ρύθμιση του HIF-2α από τον TNF-α προάγει την επιβίωση ή την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος και θα συνέβαλλαν στη διαλεύκανση των εμπλεκόμενων μοριακών μηχανισμών στην ηπατοκαρκινογένεση.

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της αλληλεπίδρασης υποξίας και χρόνιας φλεγμονής για την εξέλιξη του ηπατοκαρκινώματος (HCC) η ανακάλυψη μιας νέας πτυχής των παραπάνω συνεργαζόμενων μηχανισμών θα μπορούσε να οδηγήσει σε καινούριες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Σύμφωνα με τα ευρήματα που παρουσιάζονται σε αυτή τη διατριβή η αξιοποίηση των HIF-2α και TNF-α ως πιθανών φαρμακολογικών στόχων ίσως να αποτελεί μια αποτελεσματική πρόταση για τη θεραπεία του HCC, κάτι που ωστόσο χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119, 651-65.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Alam, M. W., Persson, C. U., Reinbothe, S., Kazi, J. U., Ronnstrand, L., Wigerup, C., Ditzel, H. J., Lykkesfeldt, A. E., Pahlman, S. & Jogi, A. (2016). HIF2alpha contributes to antiestrogen resistance via positive bilateral crosstalk with EGFR in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7, 11238-50.
- Anglesio, M. S., George, J., Kulbe, H., Friedlander, M., Rischin, D., Lemech, C., Power, J., Coward, J., Cowin, P. A., House, C. M., Chakravarty, P., Gorringer, K. L., Campbell, I. G., Okamoto, A., Birrer, M. J., Huntsman, D. G., De Fazio, A., Kalloger, S. E., Balkwill, F., Gilks, C. B. & Bowtell, D. D. (2011). IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 2538-48.
- Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279, 38458-65.
- Aprelikova, O., Wood, M., Tackett, S., Chandramouli, G. V. & Barrett, J. C. (2006). Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*, 66, 5641-7.
- Aravalli, R. N., Cressman, E. N. & Steer, C. J. (2013). Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol*, 87, 227-47.
- Bangoura, G., Liu, Z. S., Qian, Q., Jiang, C. Q., Yang, G. F. & Jing, S. (2007). Prognostic significance of HIF-2alpha/EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13, 3176-82.
- Befani, C., Mylonis, I., Gkotinakou, I. M., Georgoulas, P., Hu, C. J., Simos, G. & Liakos, P. (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2359-68.
- Bertout, J. A., Majmundar, A. J., Gordan, J. D., Lam, J. C., Ditsworth, D., Keith, B., Brown, E. J., Nathanson, K. L. & Simon, M. C. (2009). HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14391-6.
- Bischof, J., Muller, A., Fander, M., Knippschild, U. & Fischer, D. (2011). Neurite outgrowth of mature retinal ganglion cells and PC12 cells requires activity of CK1delta and CK1epsilon. *PLoS One*, 6, e20857.
- Biswas, A., Mukherjee, S., Das, S., Shields, D., Chow, C. W. & Maitra, U. (2011). Opposing action of casein kinase 1 and calcineurin in nucleo-cytoplasmic shuttling of mammalian translation initiation factor eIF6. *J Biol Chem*, 286, 3129-38.
- Block, K., Gorin, Y., Hoover, P., Williams, P., Chelmicki, T., Clark, R. A., Yoneda, T. & Abboud, H. E. (2007). NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression. *J Biol Chem*, 282, 8019-26.
- Bortolami, M., Venturi, C., Giacomelli, L., Scalerta, R., Bacchetti, S., Marino, F., Floreani, A., Lise, M., Naccarato, R. & Farinati, F. (2002). Cytokine, infiltrating macrophage and T cell-mediated response to development of primary and secondary human liver cancer. *Dig Liver Dis*, 34, 794-801.
- Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. & Peet, D. J. (2005). Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem*, 280, 14240-51.

- Brown, S. T. & Nurse, C. A. (2008). Induction of HIF-2alpha is dependent on mitochondrial O₂ consumption in an O₂-sensitive adrenomedullary chromaffin cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C1305-12.
- Brunelle, J. K., Bell, E. L., Quesada, N. M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R. C. & Chandel, N. S. (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 1, 409-14.
- Buck, M., Zhang, L., Halasz, N. A., Hunter, T. & Chojkier, M. (2001). Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *EMBO J*, 20, 6712-23.
- Carew, J. S., Esquivel, J. A., 2nd, Espitia, C. M., Schultes, C. M., Mulbaier, M., Lewis, J. D., Janssen, B., Giles, F. J. & Nawrocki, S. T. (2012). ELR510444 inhibits tumor growth and angiogenesis by abrogating HIF activity and disrupting microtubules in renal cell carcinoma. *PLoS One*, 7, e31120.
- Chan, M. C., Ilott, N. E., Schodel, J., Sims, D., Tumber, A., Lippl, K., Mole, D. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Ponting, C. P. & Schofield, C. J. (2016). Tuning the Transcriptional Response to Hypoxia by Inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) Prolyl and Asparaginyl Hydroxylases. *J Biol Chem*, 291, 20661-73.
- Chavez, J. C., Baranova, O., Lin, J. & Pichiule, P. (2006). The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci*, 26, 9471-81.
- Chen, R., Dioum, E. M., Hogg, R. T., Gerard, R. D. & Garcia, J. A. (2011). Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J Biol Chem*, 286, 13869-78.
- Chen, R., Xu, M., Hogg, R. T., Li, J., Little, B., Gerard, R. D. & Garcia, J. A. (2012). The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *J Biol Chem*, 287, 30800-11.
- Chen, W., Hill, H., Christie, A., Kim, M. S., Holloman, E., Pavia-Jimenez, A., Homayoun, F., Ma, Y., Patel, N., Yell, P., Hao, G., Yousuf, Q., Joyce, A., Pedrosa, I., Geiger, H., Zhang, H., Chang, J., Gardner, K. H., Bruick, R. K., Reeves, C., Hwang, T. H., Courtney, K., Frenkel, E., Sun, X., Zojwalla, N., Wong, T., Rizzi, J. P., Wallace, E. M., Josey, J. A., Xie, Y., Xie, X. J., Kapur, P., McKay, R. M. & Brugarolas, J. (2016). Targeting Renal Cell Carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*.
- Cheong, J. K. & Virshup, D. M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 465-9.
- Chun, S. Y., Johnson, C., Washburn, J. G., Cruz-Correa, M. R., Dang, D. T. & Dang, L. H. (2010). Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1alpha and HIF-2alpha target genes. *Mol Cancer*, 9, 293.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D. & Carmeliet, P. (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8, 702-10.
- Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C. & Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*, 20, 557-70.
- Cui, J., Duan, B., Zhao, X., Chen, Y., Sun, S., Deng, W., Zhang, Y., Du, J. & Gu, L. (2016). MBD3 mediates epigenetic regulation on EPAS1 promoter in cancer. *Tumour Biol*.
- Dang, C. V., Kim, J. W., Gao, P. & Yusteiu, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 51-6.
- Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. (2008). A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*, 1, 53-68.

- Dengler, V. L., Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49, 1-15.
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S. G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E. & Kohler, M. (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 394-404.
- Dery, M. A., Michaud, M. D. & Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 535-40.
- Dioum, E. M., Chen, R., Alexander, M. S., Zhang, Q., Hogg, R. T., Gerard, R. D. & Garcia, J. A. (2009). Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*, 324, 1289-93.
- Doedens, A. & Johnson, R. S. (2007). Transgenic models to understand hypoxia-inducible factor function. *Methods Enzymol*, 435, 87-105.
- Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., Johnson, R. S. & Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol*, 14, 1173-82.
- Eckardt, K. U. & Kurtz, A. (2005). Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest*, 35 Suppl 3, 13-9.
- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. & Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*, 278, 7520-30.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4273-8.
- Erbel, P. J., Card, P. B., Karakuzu, O., Bruick, R. K. & Gardner, K. H. (2003). Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15504-9.
- Fath, D. M., Kong, X., Liang, D., Lin, Z., Chou, A., Jiang, Y., Fang, J., Caro, J. & Sang, N. (2006). Histone deacetylase inhibitors repress the transactivation potential of hypoxia-inducible factors independently of direct acetylation of HIF-alpha. *J Biol Chem*, 281, 13612-9.
- Finger, E. C. & Giaccia, A. J. (2010). Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 285-93.
- Fiorito, V., Neri, F., Pala, V., Silengo, L., Oliviero, S., Altruda, F. & Tolosano, E. (2014). Hypoxia controls Flvcr1 gene expression in Caco2 cells through HIF2alpha and ETS1. *Biochim Biophys Acta*, 1839, 259-64.
- Flamme, I., Frohlich, T., Von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. & Risau, W. (1997). HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, 63, 51-60.
- Forrstal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. & Houghton, F. D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*, 139, 85-97.
- Franke, K., Gassmann, M. & Wielockx, B. (2013). Erythrocytosis: the HIF pathway in control. *Blood*, 122, 1122-8.
- Franovic, A., Holterman, C. E., Payette, J. & Lee, S. (2009). Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 21306-11.
- Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U. & Fandrey, J. (2007). Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol*, 435, 405-19.

- Frede, S., Freitag, P., Otto, T., Heilmaier, C. & Fandrey, J. (2005). The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res*, 65, 4690-7.
- Fu, S. C., Huang, H. C., Horton, P. & Juan, H. F. (2013). ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic Acids Res*, 41, D338-43.
- Gao, W., Li, J. Z., Chan, J. Y., Ho, W. K. & Wong, T. S. (2012). mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. *ISRN Otolaryngol*, 2012, 953089.
- Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M. & Mechta-Grigoriou, F. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*, 118, 781-94.
- Gonzalez-Flores, A., Aguilar-Quesada, R., Siles, E., Pozo, S., Rodriguez-Lara, M. I., Lopez-Jimenez, L., Lopez-Rodriguez, M., Peralta-Leal, A., Villar, D., Martin-Oliva, D., Del Peso, L., Berra, E. & Oliver, F. J. (2014). Interaction between PARP-1 and HIF-2alpha in the hypoxic response. *Oncogene*, 33, 891-8.
- Gordan, J. D., Lal, P., Dondeti, V. R., Letrero, R., Parekh, K. N., Oquendo, C. E., Greenberg, R. A., Flaherty, K. T., Rathmell, W. K., Keith, B., Simon, M. C. & Nathanson, K. L. (2008). HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*, 14, 435-46.
- Gordan, J. D. & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 71-7.
- Goryo, K., Torii, S., Yasumoto, K. & Sogawa, K. (2011). Tumour necrosis factor-alpha suppresses the hypoxic response by NF-kappaB-dependent induction of inhibitory PAS domain protein in PC12 cells. *J Biochem*, 150, 311-8.
- Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y. & Sogawa, K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 277, 23508-14.
- Grangeasse, C., Riberty, M., Vaganay, E. & Duclos, B. (1999). Alternative procedure for two-dimensional separation of phosphoamino acids. *Biotechniques*, 27, 62-4.
- Greer, Y. E. & Rubin, J. S. (2011). The role of centrosomal casein kinase 1 delta in neurite outgrowth and beyond. *Cell Cycle*, 10, 2605-6.
- Gross, S. D. & Anderson, R. A. (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal*, 10, 699-711.
- Gruber, M., Hu, C. J., Johnson, R. S., Brown, E. J., Keith, B. & Simon, M. C. (2007). Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2301-6.
- Gruber, M., Mathew, L. K., Runge, A. C., Garcia, J. A. & Simon, M. C. (2010). EPAS1 Is Required for Spermatogenesis in the Postnatal Mouse Testis. *Biol Reprod*, 82, 1227-36.
- Guan, Y., Reddy, K. R., Zhu, Q., Li, Y., Lee, K., Weerasinghe, P., Prchal, J., Semenza, G. L. & Jing, N. (2010). G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1alpha and HIF-2alpha and block tumor growth. *Mol Ther*, 18, 188-97.
- Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U. & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*, 1, 401-8.
- Haase, V. H. (2010). Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299, F1-13.
- Han, Y. P., Zhou, L., Wang, J., Xiong, S., Garner, W. L., French, S. W. & Tsukamoto, H. (2004). Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem*, 279, 4820-8.
- Hankinson, O. (2008). Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol Sci*, 103, 1-3.

- Hanna, S. C., Krishnan, B., Bailey, S. T., Moschos, S. J., Kuan, P. F., Shimamura, T., Osborne, L. D., Siegel, M. B., Duncan, L. M., O'Brien, E. T., 3rd, Superfine, R., Miller, C. R., Simon, M. C., Wong, K. K. & Kim, W. Y. (2013). HIF1alpha and HIF2alpha independently activate SRC to promote melanoma metastases. *J Clin Invest*, 123, 2078-93.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y. & Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 808-13.
- Hirankarn, N., Kimkong, I., Kummee, P., Tangkijvanich, P. & Poovorawan, Y. (2006). Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 12, 776-9.
- Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y. Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H. & Bradfield, C. A. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, 272, 8581-93.
- Hu, C. J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H. & Simon, M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell*, 18, 4528-42.
- Hua, S. & Dias, T. H. (2016). Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Target for Novel Therapies in Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol*, 7, 184.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y. & Kawajiri, K. (2004). Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 279, 19209-16.
- Imamura, T., Kikuchi, H., Herraiz, M. T., Park, D. Y., Mizukami, Y., Mino-Kenduson, M., Lynch, M. P., Rueda, B. R., Benita, Y., Xavier, R. J. & Chung, D. C. (2009). HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer. *Int J Cancer*, 124, 763-71.
- Imtiyaz, H. Z., Williams, E. P., Hickey, M. M., Patel, S. A., Durham, A. C., Yuan, L. J., Hammond, R., Gimotty, P. A., Keith, B. & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest*, 120, 2699-714.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*, 589, 1251-8.
- Ji, T., Li, G., Chen, J., Zhao, J., Li, X., Lin, H., Cai, X. & Cang, Y. (2016). Distinct role of interleukin-6 and tumor necrosis factor receptor-1 in oval cell-mediated liver regeneration and inflammation-associated hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*.
- Jin, F., Ji, H., Jia, C., Brockmeier, U., Hermann, D. M., Metzen, E., Zhu, Y. & Chi, B. (2012). Synergistic antitumor effects of endostar in combination with oxaliplatin via inhibition of HIF and CXCR4 in the colorectal cell line SW1116. *PLoS One*, 7, e47161.
- Joshi, S., Singh, A. R. & Durden, D. L. (2015). Pan-PI-3 kinase inhibitor SF1126 shows antitumor and antiangiogenic activity in renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 75, 595-608.
- Joshi, S., Singh, A. R., Zulcic, M. & Durden, D. L. (2014). A macrophage-dominant PI3K isoform controls hypoxia-induced HIF1alpha and HIF2alpha stability and tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Mol Cancer Res*, 12, 1520-31.
- Ju, C., Colgan, S. P. & Eltzschig, H. K. (2016). Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases. *J Mol Med (Berl)*, 94, 613-27.
- Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J. & Neckers, L. (2003). 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 J*, 17, 2115-7.
- Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*, 123, 2976-86.
- Kapitsinou, P. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Davidoff, O., Keith, B., Epstein, J. A., Moores, S. L., Erickson-Miller, C. L. & Haase, V. H. (2010). Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*, 116, 3039-48.

- Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. (2012). HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*, 12, 9-22.
- Kim, S. Y. & Yang, E. G. (2015). Recent Advances in Developing Inhibitors for Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylases and Their Therapeutic Implications. *Molecules*, 20, 20551-68.
- Kim, W. Y., Perera, S., Zhou, B., Carretero, J., Yeh, J. J., Heathcote, S. A., Jackson, A. L., Nikolinakos, P., Ospina, B., Naumov, G., Brandstetter, K. A., Weigman, V. J., Zaghul, S., Hayes, D. N., Padera, R. F., Heymach, J. V., Kung, A. L., Sharpless, N. E., Kaelin, W. G., Jr. & Wong, K. K. (2009). HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*, 119, 2160-70.
- Klotzsche-Von Ameln, A., Prade, I., Grosser, M., Kettelhake, A., Rezaei, M., Chavakis, T., Flamme, I., Wielockx, B. & Breier, G. (2013). PHD4 stimulates tumor angiogenesis in osteosarcoma cells via TGF-alpha. *Mol Cancer Res*, 11, 1337-48.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J. & Stoter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 17, 675-89.
- Knippschild, U., Kruger, M., Richter, J., Xu, P., Garcia-Reyes, B., Peifer, C., Halekotte, J., Bakulev, V. & Bischof, J. (2014). The CK1 Family: Contribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis. *Front Oncol*, 4, 96.
- Koh, M. Y., Darnay, B. G. & Powis, G. (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol*, 28, 7081-95.
- Koh, M. Y., Lemos, R., Jr., Liu, X. & Powis, G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*, 71, 4015-27.
- Koh, M. Y., Nguyen, V., Lemos, R., Jr., Darnay, B. G., Kiriakova, G., Abdelmelek, M., Ho, T. H., Karam, J., Monzon, F. A., Jonasch, E. & Powis, G. (2015). Hypoxia-induced SUMOylation of E3 ligase HAF determines specific activation of HIF2 in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 75, 316-29.
- Koivunen, P., Hirsila, M., Gunzler, V., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. (2004). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 279, 9899-904.
- Kong, H. S., Lee, S., Beebe, K., Scroggins, B., Gupta, G., Lee, M. J., Jung, Y. J., Trepel, J. & Neckers, L. (2010). Emetine promotes von Hippel-Lindau-independent degradation of hypoxia-inducible factor-2alpha in clear cell renal carcinoma. *Mol Pharmacol*, 78, 1072-8.
- Kourti, M., Ikonou, G., Giakoumakis, N. N., Rapsomaniki, M. A., Landegren, U., Siniouoglou, S., Lygerou, Z., Simos, G. & Mylonis, I. (2015). CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cell Signal*, 27, 1129-40.
- Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J. & Semenza, G. L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, 77, 2497-503.
- Krajewski, J., Batmunkh, C., Jelkmann, W. & Hellwig-Burgel, T. (2007). Interleukin-1beta inhibits the hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by suppressing hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Cell Mol Life Sci*, 64, 989-98.
- Kumar, H. & Choi, D. K. (2015). Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm*, 2015, 584758.
- Lancaster, D. E., Mcneill, L. A., McDonough, M. A., Aplin, R. T., Hewitson, K. S., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Schofield, C. J. (2004). Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*, 383, 429-37.

- Lang, S. A., Moser, C., Gaumann, A., Klein, D., Glockzin, G., Popp, F. C., Dahlke, M. H., Piso, P., Schlitt, H. J., Geissler, E. K. & Stoeltzing, O. (2007). Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1alpha autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin Cancer Res*, 13, 6459-68.
- Lee, D. C., Sohn, H. A., Park, Z. Y., Oh, S., Kang, Y. K., Lee, K. M., Kang, M., Jang, Y. J., Yang, S. J., Hong, Y. K., Noh, H., Kim, J. A., Kim, D. J., Bae, K. H., Kim, D. M., Chung, S. J., Yoo, H. S., Yu, D. Y., Park, K. C. & Yeom, Y. I. (2015). A lactate-induced response to hypoxia. *Cell*, 161, 595-609.
- Lee, H. & Bai, W. (2002). Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 22, 5835-45.
- Lee, J. H., Chung, Y. H., Kim, J. A., Shim, J. H., Lee, D., Lee, H. C., Shin, E. S., Yoon, J. H., Kim, B. I., Bae, S. H., Koh, K. C. & Park, N. H. (2013). Genetic predisposition of hand-foot skin reaction after sorafenib therapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 119, 136-42.
- Lee, Y., Park, U. S., Choi, I., Yoon, S. K., Park, Y. M. & Lee, Y. I. (1998). Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. *Clin Cancer Res*, 4, 1711-7.
- Leonardi, G. C., Candido, S., Cervello, M., Nicolosi, D., Raiti, F., Travali, S., Spandidos, D. A. & Libra, M. (2012). The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol*, 40, 1733-47.
- Li, H., Ko, H. P. & Whitlock, J. P. (1996). Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem*, 271, 21262-7.
- Lin, T. Y., Chou, C. F., Chung, H. Y., Chiang, C. Y., Li, C. H., Wu, J. L., Lin, H. J., Pai, T. W., Hu, C. H. & Tzou, W. S. (2014). Hypoxia-inducible factor 2 alpha is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the zebrafish embryo. *PLoS One*, 9, e101980.
- Liu, S., Kumar, S. M., Martin, J. S., Yang, R. & Xu, X. (2011). Snail1 mediates hypoxia-induced melanoma progression. *Am J Pathol*, 179, 3020-31.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Luan, Y., Gao, C., Miao, Y., Li, Y., Wang, Z. & Qiu, X. (2013). Clinicopathological and prognostic significance of HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract*, 209, 184-9.
- Luo, J. C. & Shibuya, M. (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene*, 20, 1435-44.
- Mabjeesh, N. J., Escuin, D., Lavallee, T. M., Pribluda, V. S., Swartz, G. M., Johnson, M. S., Willard, M. T., Zhong, H., Simons, J. W. & Giannakakou, P. (2003). 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*, 3, 363-75.
- Maemura, K., Hsieh, C. M., Jain, M. K., Fukumoto, S., Layne, M. D., Liu, Y., Kourembanas, S., Yet, S. F., Perrella, M. A. & Lee, M. E. (1999). Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem*, 274, 31565-70.
- Mandl, M. & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol Med*, 20, 215-20.
- Mandl, M., Kapeller, B., Lieber, R. & Macfelda, K. (2013). Hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta) is upregulated in a HIF-1alpha-dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 434, 166-72.

- Mansfield, K. D., Guzy, R. D., Pan, Y., Young, R. M., Cash, T. P., Schumacker, P. T. & Simon, M. C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab*, 1, 393-9.
- Martini, M., Teofili, L., Cenci, T., Giona, F., Torti, L., Rea, M., Foa, R., Leone, G. & Larocca, L. M. (2008). A novel heterozygous HIF2AM535I mutation reinforces the role of oxygen sensing pathway disturbances in the pathogenesis of familial erythrocytosis. *Haematologica*, 93, 1068-71.
- Masoud, G. N. & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 5, 378-89.
- Masson, N., Singleton, R. S., Sekirnik, R., Trudgian, D. C., Ambrose, L. J., Miranda, M. X., Tian, Y. M., Kessler, B. M., Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2012). The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep*, 13, 251-7.
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S. & Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest*, 119, 1159-66.
- Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A. & Ohh, M. (2005). Human HIF-3 α is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*, 19, 1396-406.
- Mendonca, D. B., Mendonca, G., Aragao, F. J. & Cooper, L. F. (2011). NF- κ B suppresses HIF-1 α response by competing for P300 binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 404, 997-1003.
- Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N. & Brune, B. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) versus HIF-2 α in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*, 51, 2183-92.
- Minamishima, Y. A., Moslehi, J., Padera, R. F., Bronson, R. T., Liao, R. & Kaelin, W. G., Jr. (2009). A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol*, 29, 5729-41.
- Mohlin, S., Hamidian, A., Von Stedingk, K., Bridges, E., Wigerup, C., Bexell, D. & Pahlman, S. (2015). PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res*, 75, 4617-28.
- Movafagh, S., Crook, S. & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*, 116, 696-703.
- Muller, J. M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A. & Rupec, R. A. (1997). Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 272, 23435-9.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 202-10.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13.
- Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem*, 283, 27620-7.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S. & Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*, 281, 33095-106.
- Nakanishi, T. & Ross, D. D. (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer*, 31, 73-99.
- Nakazaki, H. (1992). Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. *Cancer*, 70, 709-13.

- Nakazawa, M. S., Eisinger-Mathason, T. S., Sadri, N., Ochocki, J. D., Gade, T. P., Amin, R. K. & Simon, M. C. (2016). Epigenetic re-expression of HIF-2alpha suppresses soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun*, 7, 10539.
- Nanduri, J., Peng, Y. J., Yuan, G., Kumar, G. K. & Prabhakar, N. R. (2015). Hypoxia-inducible factors and hypertension: lessons from sleep apnea syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 93, 473-80.
- Nayak, B. K., Feliars, D., Sudarshan, S., Friedrichs, W. E., Day, R. T., New, D. D., Fitzgerald, J. P., Eid, A., Denapoli, T., Parekh, D. J., Gorin, Y. & Block, K. (2013). Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene*, 32, 3147-55.
- Neelam, S., Brooks, M. M. & Cammarata, P. R. (2013). Lenticular cytoprotection. Part 1: the role of hypoxia inducible factors-1alpha and -2alpha and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell survival in hypoxia. *Mol Vis*, 19, 1-15.
- Nilsson, M. B., Zage, P. E., Zeng, L., Xu, L., Cascone, T., Wu, H. K., Saigal, B., Zweidler-Mckay, P. A. & Heymach, J. V. (2010). Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1alpha and HIF-2alpha in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors. *Oncogene*, 29, 2938-49.
- O'rourke, J. F., Tian, Y. M., Ratcliffe, P. J. & Pugh, C. W. (1999). Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, 274, 2060-71.
- Oliver, K. M., Taylor, C. T. & Cummins, E. P. (2009). Hypoxia. Regulation of NFkappaB signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res Ther*, 11, 215.
- Ouyang, S., Hsuchou, H., Kastin, A. J. & Pan, W. (2013). TNF stimulates nuclear export and secretion of IL-15 by acting on CRM1 and ARF6. *PLoS One*, 8, e69356.
- Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V. & Johnson, R. S. (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*, 41, 518-28.
- Palsson-Mcdermott, E. M. & O'Neill, L. A. (2013). The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*, 35, 965-73.
- Pangou, E., Befani, C., Mylonis, I., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G. & Liakos, P. (2016). HIF-2alpha phosphorylation by CK1delta promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci*.
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., Osterreicher, C. H., Takahashi, H. & Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140, 197-208.
- Pawlus, M. R., Wang, L., Murakami, A., Dai, G. & Hu, C. J. (2013). STAT3 or USF2 contributes to HIF target gene specificity. *PLoS One*, 8, e72358.
- Pawlus, M. R., Wang, L., Ware, K. & Hu, C. J. (2012). Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF2alpha) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol*, 32, 4595-610.
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L. & Fong, G. H. (2000). The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8386-91.
- Percy, M. J. (2008). Familial erythrocytosis arising from a gain-of-function mutation in the HIF2A gene of the oxygen sensing pathway. *Ulster Med J*, 77, 86-8.
- Percy, M. J., Chung, Y. J., Harrison, C., Mercieca, J., Hoffbrand, A. V., Dinardo, C. L., Santos, P. C., Fonseca, G. H., Gualandro, S. F., Pereira, A. C., Lappin, T. R., McMullin, M. F. & Lee, F. S. (2012). Two new mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Am J Hematol*, 87, 439-42.
- Place, T. L. & Domann, F. E. (2013). Prolyl-hydroxylase 3: Evolving Roles for an Ancient Signaling Protein. *Hypoxia (Auckl)*, 2013, 13-17.
- Preitschopf, A., Schorghofer, D., Kinslechner, K., Schutz, B., Zwickl, H., Rosner, M., Joo, J. G., Nehrer, S., Hengstschlager, M. & Mikula, M. (2016). Rapamycin-Induced Hypoxia

- Inducible Factor 2A Is Essential for Chondrogenic Differentiation of Amniotic Fluid Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*, 5, 580-90.
- Puppo, M., Battaglia, F., Ottaviano, C., Delfino, S., Ribatti, D., Varesio, L. & Bosco, M. C. (2008). Topotecan inhibits vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity induced by hypoxia in human neuroblastoma by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha. *Mol Cancer Ther*, 7, 1974-84.
- Ramadori, P., Ahmad, G. & Ramadori, G. (2010). Cellular and molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6. *Lab Invest*, 90, 1306-24.
- Rankin, E. B., Biju, M. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Johnson, R. S., Simon, M. C., Keith, B. & Haase, V. H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*, 117, 1068-77.
- Rankin, E. B. & Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 15, 678-85.
- Rankin, E. B. & Giaccia, A. J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science*, 352, 175-80.
- Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L. & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, 25, 5675-86.
- Remels, A. H., Gosker, H. R., Verhees, K. J., Langen, R. C. & Schols, A. M. (2015). TNF-alpha-induced NF-kappaB activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1alpha. *Endocrinology*, 156, 1770-81.
- Rena, G., Bain, J., Elliott, M. & Cohen, P. (2004). D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep*, 5, 60-5.
- Ribatti, D., Marzullo, A., Gentile, A., Longo, V., Nico, B., Vacca, A. & Dammacco, F. (2007). Erythropoietin/erythropoietin-receptor system is involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, 50, 591-6.
- Ryu, J. H., Chae, C. S., Kwak, J. S., Oh, H., Shin, Y., Huh, Y. H., Lee, C. G., Park, Y. W., Chun, C. H., Kim, Y. M., Im, S. H. & Chun, J. S. (2014). Hypoxia-inducible factor-2alpha is an essential catabolic regulator of inflammatory rheumatoid arthritis. *PLoS Biol*, 12, e1001881.
- Sakisaka, S., Watanabe, M., Tateishi, H., Harada, M., Shakado, S., Mimura, Y., Gondo, K., Yoshitake, M., Noguchi, K., Hino, T. & Et Al. (1993). Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: immunohistochemical evidence. *Hepatology*, 18, 1357-62.
- Sanchez, M., Galy, B., Muckenthaler, M. U. & Hentze, M. W. (2007). Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 420-6.
- Saxena, R., Chawla, Y. K., Verma, I. & Kaur, J. (2014). IFN-gamma (+874) and not TNF-alpha (-308) is associated with HBV-HCC risk in India. *Mol Cell Biochem*, 385, 297-307.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88.
- Schett, G., Dayer, J. M. & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 14-24.
- Scheuermann, T. H., Li, Q., Ma, H. W., Key, J., Zhang, L., Chen, R., Garcia, J. A., Naidoo, J., Longgood, J., Frantz, D. E., Tambar, U. K., Gardner, K. H. & Bruick, R. K. (2013). Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol*, 9, 271-6.
- Scheuermann, T. H., Stroud, D., Sleet, C. E., Bayeh, L., Shokri, C., Wang, H., Caldwell, C. G., Longgood, J., Macmillan, J. B., Bruick, R. K., Gardner, K. H. & Tambar, U. K. (2015).

- Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2. *J Med Chem*, 58, 5930-41.
- Scheuermann, T. H., Tomchick, D. R., Machius, M., Guo, Y., Bruick, R. K. & Gardner, K. H. (2009). Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 450-5.
- Schitteck, B. & Sinnberg, T. (2014). Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer*, 13, 231.
- Schonenberger, M. J. & Kovacs, W. J. (2015). Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol*, 3, 42.
- Scortegagna, M., Ding, K., Zhang, Q., Oktay, Y., Bennett, M. J., Bennett, M., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Moe, O. & Garcia, J. A. (2005). HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*, 105, 3133-40.
- Scortegagna, M., Morris, M. A., Oktay, Y., Bennett, M. & Garcia, J. A. (2003). The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*, 102, 1634-40.
- Selvarajah, J., Nathawat, K., Moumen, A., Ashcroft, M. & Carroll, V. A. (2013). Chemotherapy-mediated p53-dependent DNA damage response in clear cell renal cell carcinoma: role of the mTORC1/2 and hypoxia-inducible factor pathways. *Cell Death Dis*, 4, e865.
- Semenza, G. L. (2009). Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*, 114, 2015-9.
- Sharma, V., Dixit, D., Koul, N., Mehta, V. S. & Sen, E. (2011). Ras regulates interleukin-1beta-induced HIF-1alpha transcriptional activity in glioblastoma. *J Mol Med (Berl)*, 89, 123-36.
- Shay, J. E. & Celeste Simon, M. (2012). Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 389-94.
- Shen, C. & Kaelin, W. G., Jr. (2013). The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 23, 18-25.
- Shiraki, K., Yamanaka, T., Inoue, H., Kawakita, T., Enokimura, N., Okano, H., Sugimoto, K., Murata, K. & Nakano, T. (2005). Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 26, 1273-81.
- Simon, M. C. & Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 285-96.
- Sun, H. X., Xu, Y., Yang, X. R., Wang, W. M., Bai, H., Shi, R. Y., Nayar, S. K., Devbhandari, R. P., He, Y. Z., Zhu, Q. F., Sun, Y. F., Hu, B., Khan, M., Anders, R. A. & Fan, J. (2013). Hypoxia inducible factor 2 alpha inhibits hepatocellular carcinoma growth through the transcription factor dimerization partner 3/ E2F transcription factor 1-dependent apoptotic pathway. *Hepatology*, 57, 1088-97.
- Sun, W., Depping, R. & Jelkmann, W. (2014). Interleukin-1beta promotes hypoxia-induced apoptosis of glioblastoma cells by inhibiting hypoxia-inducible factor-1 mediated adrenomedullin production. *Cell Death Dis*, 5, e1020.
- Takeda, N., O'dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M. C., Hoffmann, A. & Johnson, R. S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev*, 24, 491-501.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, 157, 411-21.
- Tang, M., Tian, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kuang, C., Hu, P., Wang, Y., Wang, J., Su, K. & Wei, L. (2014). TNF-alpha mediated increase of HIF-1alpha inhibits VASP expression, which

- reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury (ALI). *PLoS One*, 9, e102967.
- Tavakolpour, S. & Sali, S. (2016). Tumor Necrosis Factor-alpha-308 G/A Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Hepat Mon*, 16, e33537.
- Taylor, S. E., Bagnall, J., Mason, D., Levy, R., Fernig, D. G. & See, V. (2016). Differential sub-nuclear distribution of hypoxia-inducible factors (HIF)-1 and -2 alpha impacts on their stability and mobility. *Open Biol*, 6.
- Tewari, R., Choudhury, S. R., Ghosh, S., Mehta, V. S. & Sen, E. (2012). Involvement of TNFalpha-induced TLR4-NF-kappaB and TLR4-HIF-1alpha feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl)*, 90, 67-80.
- Thanos, D. & Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell*, 83, 1091-100.
- Thompson, A. A., Elks, P. M., Marriott, H. M., Eamsamrng, S., Higgins, K. R., Lewis, A., Williams, L., Parmar, S., Shaw, G., Mcgrath, E. E., Formenti, F., Van Eeden, F. J., Kinnula, V. L., Pugh, C. W., Sabroe, I., Dockrell, D. H., Chilvers, E. R., Robbins, P. A., Percy, M. J., Simon, M. C., Johnson, R. S., Renshaw, S. A., Whyte, M. K. & Walmsley, S. R. (2014). Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood*, 123, 366-76.
- Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W. & Mcknight, S. L. (1998). The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*, 12, 3320-4.
- Tian, H., Mcknight, S. L. & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11, 72-82.
- To, K. K., Sedelnikova, O. A., Samons, M., Bonner, W. M. & Huang, L. E. (2006). The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J*, 25, 4784-94.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M. & Foster, D. A. (2008). Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem*, 283, 34495-9.
- Tsapournioti, S., Mylonis, I., Hatziefthimiou, A., Ioannou, M. G., Stamatiou, R., Koukoulis, G. K., Simos, G., Molyvdas, P. A. & Paraskeva, E. (2013). TNFalpha induces expression of HIF-1alpha mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 228, 1745-53.
- Van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S. & Vertegaal, A. C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*, 38, 1922-31.
- Vasilopoulos, Y., Sourli, F., Zafiriou, E., Klimi, E., Ioannou, M., Mamuris, Z., Simos, G., Koukoulis, G. & Roussaki-Schulze, A. (2013). High serum levels of HIF-1alpha in psoriatic patients correlate with an over-expression of IL-6. *Cytokine*, 62, 38-9.
- Wallace, E. M., Rizzi, J. P., Han, G., Wehn, P. M., Cao, Z., Du, X., Cheng, T., Czerwinski, R. M., Dixon, D. D., Goggin, B. S., Grina, J. A., Halfmann, M. M., Maddie, M. A., Olive, S. R., Schlachter, S. T., Tan, H., Wang, B., Wang, K., Xie, S., Xu, R., Yang, H. & Josey, J. A. (2016). A Small-Molecule Antagonist of HIF2alpha Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*, 76, 5491-500.
- Walter, K. M., Schonenberger, M. J., Trotsmuller, M., Horn, M., Elsasser, H. P., Moser, A. B., Lucas, M. S., Schwarz, T., Gerber, P. A., Faust, P. L., Moch, H., Kofeler, H. C., Krek, W. & Kovacs, W. J. (2014). Hif-2alpha promotes degradation of mammalian peroxisomes by selective autophagy. *Cell Metab*, 20, 882-97.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.

- Wang, G. L. & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270, 1230-7.
- Wang, H. X., Qin, C., Han, F. Y., Wang, X. H. & Li, N. (2014). HIF-2alpha as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet Mol Res*, 13, 2817-26.
- Wann, A. K., Thompson, C. L., Chapple, J. P. & Knight, M. M. (2013). Interleukin-1beta sequesters hypoxia inducible factor 2alpha to the primary cilium. *Cilia*, 2, 17.
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V. A., Frei, U., Wiesener, M. & Eckardt, K. U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J*, 18, 1462-4.
- Wheelhouse, N. M., Chan, Y. S., Gillies, S. E., Caldwell, H., Ross, J. A., Harrison, D. J. & Prost, S. (2003). TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *Int J Mol Med*, 12, 889-94.
- Wiesener, M. S., Jurgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Horstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H. & Eckardt, K. U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*, 17, 271-3.
- Wolff, M., Jelkmann, W., Dunst, J. & Depping, R. (2013). The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics. *Cell Physiol Biochem*, 32, 849-58.
- Wong, V. W., Yu, J., Cheng, A. S., Wong, G. L., Chan, H. Y., Chu, E. S., Ng, E. K., Chan, F. K., Sung, J. J. & Chan, H. L. (2009). High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer*, 124, 2766-70.
- Wong, W. J., Qiu, B., Nakazawa, M. S., Qing, G. & Simon, M. C. (2013). MYC degradation under low O2 tension promotes survival by evading hypoxia-induced cell death. *Mol Cell Biol*, 33, 3494-504.
- Wrann, S., Kaufmann, M. R., Wirthner, R., Stiehl, D. P. & Wenger, R. H. (2013). HIF mediated and DNA damage independent histone H2AX phosphorylation in chronic hypoxia. *Biol Chem*, 394, 519-28.
- Wu, D., Potluri, N., Lu, J., Kim, Y. & Rastinejad, F. (2015). Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature*, 524, 303-8.
- Xue, X. & Shah, Y. M. (2013). Hypoxia-inducible factor-2alpha is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis*, 34, 163-9.
- Yang, S. L., Wu, C., Xiong, Z. F. & Fang, X. (2015). Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep*, 12, 2411-6.
- Yoshimura, H., Dhar, D. K., Kohno, H., Kubota, H., Fujii, T., Ueda, S., Kinugasa, S., Tachibana, M. & Nagasue, N. (2004). Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res*, 10, 8554-60.
- Zhang, F., Duan, S., Tsai, Y., Keng, P. C., Chen, Y. & Lee, S. O. (2016). Cisplatin treatment increases stemness through upregulation of hypoxia-inducible factors by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 107, 746-54.
- Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P. J. & Duan, C. (2014). Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep*, 6, 1110-21.
- Zhang, Y. & Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, 292, 1910-5.
- Zhao, J., Du, F., Luo, Y., Shen, G., Zheng, F. & Xu, B. (2015a). The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 41, 623-33.

- Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F. & Xu, B. (2015b). The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell Death Dis*, 6, e1600.
- Zimmer, M., Ebert, B. L., Neil, C., Brenner, K., Papaioannou, I., Melas, A., Tolliday, N., Lamb, J., Pantopoulos, K., Golub, T. & Iliopoulos, O. (2008). Small-molecule inhibitors of HIF-2 α translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell*, 32, 838-48.
- Zimmer, M., Lamb, J., Ebert, B. L., Lynch, M., Neil, C., Schmidt, E., Golub, T. R. & Iliopoulos, O. (2010). The connectivity map links iron regulatory protein-1-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor-2 α translation to the anti-inflammatory 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Cancer Res*, 70, 3071-9.
- Zimmermann, C., Stevant, I., Borel, C., Conne, B., Pitetti, J. L., Calvel, P., Kaessmann, H., Jegou, B., Chalmel, F. & Nef, S. (2015). Research resource: the dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Mol Endocrinol*, 29, 627-42.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη
bHLH: Βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας
BSA: Αλβουμίνη ορού βοδιού
CHX: Κυκλοεξιμίδιο
CIP: Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού
cDNA: Συμπληρωματικό DNA
CK1: Κινάση καζεΐνης 1
CMV: Cytomegalovirus
CPM: Κρούσεις ανά λεπτό
DAPI: 4', 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο
DMSO: διμεθυλσουλφοξείδιο
DTT: Διθειοθρεϊτόλη
EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EPO: Ερυθροποιητίνη
FBS: Ορός εμβρύου βοός
FIF: Παράγοντας που αναστέλλει τον HIF
GST: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HEPES: N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζίν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
HIF-1α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α
HIF-2α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2α
HIF-3α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 3α
HRE: Στοιχείο απόκρισης στην υποξία
HRP: Υπεροξειδάση του αγριοραδικιού
IL-1β: Ιντερλευκίνη 1β
IL-6: Ιντερλευκίνη 6
IPTG: Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο
LB: Luria Broth
LMB: Λεπτομυκίνη β
MCS: Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης
mTOR: Στόχος της ραπαμυκίνη

PAI-1: Αναστολές του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1
PAS: Per-Arnt-Sim
PBS: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PGK: Κινάση του φωσφορογλυκερινικού οξέος
PHD: Πρόλυλο-υδροξυλάση
PI3K: Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης
PMSF: Φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος
RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ
ROS: Ενεργές ρίζες οξυγόνου
SDS: Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
SOD2: Δισμουτάση του υπεροξειδίου
SV40: Simian Virus 40
TAE: Tris-οξικό οξύ-EDTA
TEMED: N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη
TNF- α : Παράγοντας νέκρωσης όγκων
Tris: Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
VEGF: Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων