



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF1 α ΚΑΙ HIF2 α ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΟΥΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΙΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΚΙΑΝΗ ΣΩΤΗΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR'S THESIS

“STUDY OF THE HYPOXIA-INDUCIBLE FACTORS HIF1 α AND HIF2 α REGULATION
BY SPECIFIC PROTEASOME INHIBITORS ADMINISTERED IN CANCER
TREATMENT”

SUPERVISING PROFESSOR: LIAKOS PANAGIOTIS, ASSOCIATE PROFESSOR OF MEDICAL
BIOCHEMISTRY

SKIANI SOTIRIA

LARISA, 2019

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Λιάκος Παναγιώτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας (επιβλέπων)

Λεωνίδας Δημήτρης

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας (συνεπιβλέπων)

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (μέλος επιτροπής)

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, κ. Λιάκου Παναγιώτη, το χρονικό διάστημα Μάρτιος – Νοέμβριος 2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα θερμά τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας Κ. Λιάκο Παναγιώτη που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία και φυσικά για την ανεκτίμητη επιστημονική καθοδήγηση και τις πολυτιμότερες συμβουλές που μου προσέφερε.

Θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σίμο Γεώργιο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Μπεφάνη Χριστίνα, για τον χρόνο της και την πολύτιμη και συνεχή βοήθεια που αφιέρωσε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Γκοτινάκου Ιωάννα-Μαρία, και την υποψήφια διδάκτωρ, Δισερή Κατερίνα, καθώς υπήρξαν δίπλα μου οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκα προσφέροντας τη βοήθειά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας για το φιλικότατο και θερμό κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο από την αρχή.

Περίληψη

Οι συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου ονομαζόμενες «υποξία» παρατηρούνται σε φυσιολογικές διεργασίες όπως είναι αυτές της εμβρυογένεσης, αλλά και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως το μικροπεριβάλλον ανάπτυξης συμπαγούς όγκου προκαλώντας ανεξέλεγκτη αγγειογένεση. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF (Hypoxia Induced Factors – HIFs) αποτελούν τους κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστές της κυτταρικής ομοιοστασίας σε συνθήκες υποξίας και διακρίνονται σε δύο ισομορφές, αυτήν του HIF-1 και αυτήν του HIF-2, με την πρώτη να είναι καλύτερα χαρακτηρισμένη. Οι HIF λειτουργούν ως ετεροδιμερή και αποτελούνται από μια οξυγονο-εξαρτώμενη α υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη β υπομονάδα. Σε συνθήκες νορμοξίας, οι HIF υφίστανται ουβικιτίνωση και αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα. Το πρωτεάσωμα αποτελεί το ενδοκυτταρικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο αποικοδομεί μη λειτουργικές ή μη αναγκαίες πρωτεΐνες του κυττάρου μέσω πρωτεόλυσης. Σήμα για αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι τα μόρια της ουβικιτίνης που προστίθενται από τις E3 λιγάσες της ουβικιτίνης. Ωστόσο, είναι γνωστό πως ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος, *Βορτεζομίδη* και, ο νεότερος και λιγότερα μελετημένος, *Καρφιλζομίδη*, χορηγούνται ευρέως στην αντικαρκινική θεραπεία και κυρίως του πολλαπλού μυελώματος. Προηγούμενες μελέτες, έχουν δείξει ένα διαφορετικό ρόλο των αναστολέων του πρωτεασώματος σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όπως του καρκίνου του προστάτη, μεταβάλλοντας την έκφραση και την δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των αναστολέων του πρωτεασώματος *Βορτεζομίδη* και *Καρφιλζομίδη* σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος *Huh7*. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα *Huh7* καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), και σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), παρουσία ή απουσία βορτεζομίδης ή καρφιλζομίδης σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις. Μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην έκφραση των HIF-1/2α αλλά και στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF-1/2α, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες ειδικά γονίδια-στόχους τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία βορτεζομίδης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται και η έκφραση των HIF-1/2α επάγεται, σε συνθήκες υποξίας. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α δεν φαίνεται να επηρεάζεται, ενώ του HIF-2α ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο για τα γονίδια-στόχους του (επαγωγή PAI-1, καταστολή EPO). Παρουσία καρφιλζομίδης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται και η έκφραση των HIF-1/2α επάγεται, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας, όσο και υποξίας. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α μειώνεται σε συνθήκες υποξίας ενώ του HIF-2α ρυθμίζεται και πάλι με διαφορετικό τρόπο για τα γονίδια-στόχους του (επαγωγή PAI-1, καταστολή EPO). Οι πολύπλοκοι μηχανισμοί αυτών των επιδράσεων απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Abstract

Low oxygen concentration conditions called "hypoxia" are observed in physiological processes such as those of embryogenesis, but also in many pathological conditions such as the microenvironment of growth in solid tumors, causing uncontrolled angiogenesis. Hypoxia Induce Factors (HIFs) are the main transcription regulators of the cellular homeostasis in hypoxia and are distinguished in two isoforms, that of HIF-1 and that of HIF-2, with the first to have been better studied. HIFs act as heterodimers and consist of an oxygen-dependent subunit α and consistently expressed β subunit. Under conditions of normoxia, HIFs undergo ubiquitination and are subsequently degraded in the proteasome. Proteasome is the intracellular protein complex that degrades malfunctioning or unnecessary cell proteins through proteolysis. Signal transduction for protein degradation require the ligation of molecules of ubiquitin added from the E3 ubiquitin ligase. Proteasome inhibitor agents, Bortezomib and, the newest and least studied, Carfilzomib, are widely administered to patients as anticancer therapy, especially in multiple myeloma. Previous studies have shown a different role of proteasome inhibitors in human cell lines such as prostate cancer, altering the expression and transcriptional activity of the transcription factor HIF-1.

The aim of this thesis was to study the impact of proteasome inhibitors Bortezomib and Carfilzomib on hepatocellular carcinoma cells, Huh7. For this purpose, Huh7 cells were cultured under the conditions of normoxia (21% O₂), and hypoxia (1% O₂), in the presence or absence of Bortezomib and Carfilzomib, in selected concentrations. The effect of the inhibitors was studied concerning cell proliferation, HIF-1/2 α expression and the transcriptional activity of HIF-1/2 α , using as controls their specific target genes. Results showed that in the presence of bortezomib under hypoxic conditions, cell proliferation is inhibited and the expression of HIF-1/2 α is induced. The transcriptional activity of HIF-1 α does not appear to be affected, while the transcriptional activity of HIF-2 α is differently adjusted for different target genes (PAI-1 induction, EPO suppression). In the presence of carfilzomib, cell proliferation is inhibited and the expression of HIF-1/2 α is induced, both under normoxic and hypoxic conditions. The transcriptional activity of HIF-1 α is reduced in hypoxic conditions while HIF-2 α is yet again regulated differently (PAI-1 induction, EPO suppression). The complex mechanisms that underlie these effects require further investigation.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF
 - 1.1.1. HIF-1
 - 1.1.2. HIF-2
- 1.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ
 - 1.2.1. Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση
 - 1.2.1.1. Υδροξυλίωση των HIF-1/2α
 - 1.2.2. Μη οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση
 - 1.2.2.1. Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής
 - 1.2.2.2. Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης
 - 1.2.2.3. Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
 - 1.2.2.3.1. Ακετυλίωση
 - 1.2.2.3.2. Σουμοϋλίωση
 - 1.2.2.3.3. Φωσφορυλίωση
 - Η οικογένεια κινασών καζεΐνης (CK1δ)
 - Η οικογένεια κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK)
- 1.3. ΚΟΙΝΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ HIFs
- 1.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ HIF
 - 1.4.1. Βορτεζομίδη
 - 1.4.2. Καρφιλζομίδη
- 1.5. HIF-2 ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ
- 1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1. ΥΛΙΚΑ
 - 2.1.1. Κυτταρικές Σειρές
 - 2.1.2. Αναστολείς Πρωτεασώματος
 - 2.1.3. Χημικές Ενώσεις – Αντιδραστήρια
 - 2.1.4. Υλικά Μοριακής Βιολογίας
 - 2.1.5. Αντισώματα
 - 2.1.6. Εκκινητές
- 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ
 - 2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες
 - 2.2.2. Πάγωμα Κυττάρων και Επανέναρξη Καλλιιεργειών
 - 2.2.3. Απομόνωση Ολικού Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από τα Κύτταρα
 - 2.2.4. Προσδιορισμός Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης
 - 2.2.5. Ανάλυση Πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση
 - 2.2.6. Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)
 - 2.2.7. Απομόνωση Ολικού Κυτταροπλασματικού RNA
 - 2.2.8. Προσδιορισμός της Ποσότητας και της Καθαρότητας του RNA, Φασματοφωτομέτρηση RNA

2.2.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time, RT-PCR)

2.2.10. Μελέτη Του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT

2.2.11. Στατιστική Ανάλυση

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη της επίδρασης των Βορτεζομίδη και Καρφιλζομίδη στους HIF-1α/HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7

3.2. Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α/HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7

3.3. Μελέτη της επίδρασης των Βορτεζομίδη και Καρφιλζομίδη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για τα περισσότερα μετάζωα η επαρκής παροχή μοριακού οξυγόνου (O_2) είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του φυσιολογικού μεταβολισμού και της ομοιόστασης (Cavadas, Cheong, & Taylor, 2017). Η σταθερή τροφοδότηση των οργανισμών αλλά και των κυττάρων με το μοριακό οξυγόνο είναι ζωτικής σημασίας καθώς αυτό συμμετέχει στην παραγωγή ενέργειας μέσω παρασκευής ATP αλλά παράλληλα λειτουργεί και ως δέκτης ηλεκτρονίων σε πολλές αντιδράσεις εντός του κυττάρου (Fajersztajn & Veras, 2017). Η βέλτιστη οξυγόνωση όλων των κυττάρων του εκάστοτε οργανισμού έχει εξασφαλιστεί μέσω της εξέλιξης των φυσιολογικών συστημάτων ώστε να εγκαθιδρυθεί ένα δομημένο σύστημα μεταφοράς του οξυγόνου (Michiels, 2004). Το οξυγόνο μεταφέρεται στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και η φυσιολογική κατανομή του σε αυτούς προκύπτει από τη διαφορετική κατανάλωσή του που πραγματοποιείται στα διάφορα όργανα τα οποία διαπερνά (Brahimi-Horn & Rouysségur, 2007). Η μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου ενδοκυτταρικά (<1% O_2) ορίζεται ως υποξία.

Ένας ιδιαίτερα σημαντικός φυσιολογικός ρόλος της υποξίας είναι στην περίπτωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και σε πιο συγκεκριμένες διαδικασίες όπως είναι η πλακουντογένεση, η αγγειογένεση και η αιμοποίηση (Fajersztajn & Veras, 2017). Ωστόσο, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς συναντώνται και σε πολυάριθμες παθολογικές καταστάσεις όπως οι ισχαιμικές διαταραχές (εγκεφαλική και καρδιαγγειακή), ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, οι φλεγμονοπάθειες, η προεκλαμψία, η ψωρίαση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος (COPD) και ο καρκίνος (Brahimi-Horn & Rouysségur, 2007).

1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

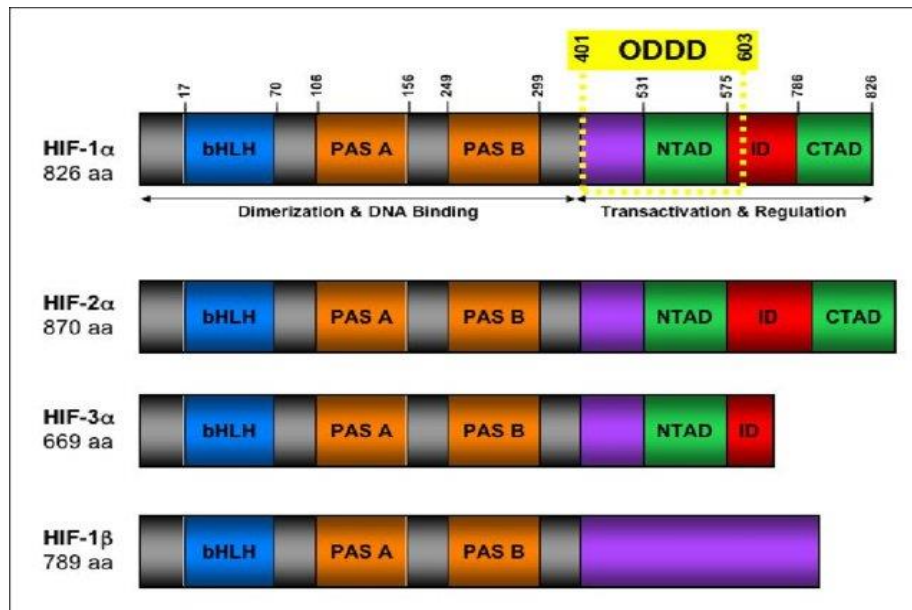
Η υποξία προκαλεί τη διέγερση ποικίλων αποκρίσεων για την προσαρμογή των κυττάρων η οποία διαμεσολαβείται από την οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (Hypoxia Inducible Factors – HIF). Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF συμμετέχουν στη ρύθμιση μεταβολικών μονοπατιών αλλά και ποικίλων διεργασιών των κυττάρων όπως είναι η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση, μέσω της επαγωγής της μεταγραφικής ενεργότητας μιας πληθώρας γονιδίων στόχων τους. Έτσι, το υποξικό στρες που γίνεται αντιληπτό από τα κύτταρα επάγει στοχευμένη γονιδιακή ρύθμιση μέσω των κυρίαρχων ρυθμιστών της κυτταρικής μεταγραφικής απόκρισης στην υποξία, HIF (Suzuki, Gradin, Poellinger, & Yamamoto, 2017).

Οι HIF είναι ετεροδιμερή τα οποία συνιστώνται από μια α και μια β υπομονάδα, και έχουν βασική πρωτεϊνική δομή έλικας-στροφής-έλικας (bHLH). Η υπομονάδα HIF-β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) δεν επηρεάζεται από τις μεταβολές του οξυγόνου και εκφράζεται σταθερά αποτελώντας αναπόσπαστο κομμάτι στο σχηματισμό του λειτουργικού ετεροδιμερούς συμπλόκου HIF. (Cassavaugh & Lounsbury, 2011) Η α υπομονάδα η οποία ρυθμίζεται από τις μεταβολές του οξυγόνου, κωδικοποιείται από το ανθρώπινο γονιδίωμα σε τρεις διακριτές ισομορφές, τις HIF-1α και HIF-2α οι οποίες αναγνωρίζονται ως αγωνιστές τους συστήματος, και την HIF-3α που στις περισσότερες περιπτώσεις δρα ανταγωνιστικά. (Pugh, 2016). Περισσότερο μελετημένες είναι οι δύο πρώτες υπομονάδες, στη ρύθμιση των οποίων επικεντρώνεται και η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Τέλος, το ετεροδιμερές HIF-α και ARNT σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας, μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται στο DNA και πιο συγκεκριμένα στον υποκινητή ή σε περιοχή ενισχυτή του γονιδίου-στόχου με κωδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων 5'-RCGTG-3' προκειμένου να επάγει τα γονίδια-στόχους του. (Cassavaugh & Lounsbury, 2011)

1.1.1 HIF-1

Ο HIF-1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Είναι ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας συνιστώμενος από την HIF-1α και την HIF1β (ARNT) υπομονάδα. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (19%), η HIF-1α υπομονάδα οδηγείται στο 28S πρωτεάσωμα και αποσυντίθεται ενώ σε συνθήκες υποξίας η αποδόμηση της υπομονάδας HIF-1α αναστέλλεται, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ενδοκυττάρια. Κατόπιν, μετατοπίζεται στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT. (Schumacker, 2005) Η HIF-1α πρωτεΐνη αποτελείται από 826 αμινοξέα και εμπεριέχει αλληλουχία σηματοδότησης πυρηνικού εντοπισμού καθώς και ένα βασικό μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας (bHLH). Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση του παράγοντα στο DNA (G/ACGTG) καθώς και για τον διμερισμό της υπομονάδας. Ακόμη, η πρωτεΐνη HIF-1α φέρει μια επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποδόμησης (Oxygen-dependent degradation domain - ODDD) στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 401-603, μέσω της οποίας σηματοδοτείται η αποδόμησή της σε συνθήκες νορμοξίας, όπως προαναφέρθηκε. Επιπλέον, στον HIF-1α εντοπίζονται δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation domains - TAD), οι οποίες ευθύνονται για την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων στόχων του HIF-1. Διακρίνονται σε αμινοτελική (N-TAD) και καρβοξυτελική (C-TAD) και βρίσκονται μεταξύ των καταλοίπων 531-575 και 813-826.



Εικόνα 1: Δομή των πρωτεϊνικών επικρατειών των τριών ισομορφών της α υπομονάδας και της β υπομονάδας των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF. Όλες οι ισομορφές εμπεριέχουν bHLH επικράτεια και δύο Per-ARNT-Sim (PAS A/PAS B) υποεπικράτειες απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό και την πρόσδεση του παράγοντα στο DNA. Στις ισομορφές HIF-1α και HIF-2α υπάρχουν οι υπεύθυνες για τη λειτουργία επικράτειες N-TAD και C-TAD, στις οποίες παρεμβάλλεται η ανασταλτική περιοχή ID. Μεταξύ των αμινοξέων 401-603 εντοπίζεται η οξυγено-εξαρτώμενη επικράτεια ODDD.

1.1.2 HIF-2

Ο HIF-2α, ή αλλιώς EPAS-1 (Endothelial PAS domain protein 1) εντοπίστηκε αρχικά στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Tian, Hammer, Matsumoto, Russell, & McKnight, 1998) όμως σε επόμενες μελέτες διαπιστώθηκε ότι δεν εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά παρατηρείται κυρίως στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο δωδεκαδάκτυλο, στον εγκέφαλο, στην καρδιά και τους πνεύμονες. Σε επίπεδο κυττάρου, ο HIF-2α εκφράζεται παράλληλα με τον HIF-1α στα ηπατοκύτταρα, στα καρδιομυοκύτταρα και τα μυοκαρδιακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ στους νεφρούς και τους πνεύμονες η έκφραση του HIF-2α περιορίζεται στα μη παρεγχυματικά κύτταρα. (WIESENER et al., 2003). Ωστόσο, σε άλλες δημοσιεύσεις αναφέρεται ότι ο HIF-2α εκφράζεται σε αγγειακά κύτταρα όγκων αλλά και σε παρεγχυματικά κύτταρα, δεδομένα που οδηγούν στην υπόθεση ότι ο HIF-2α ενδέχεται να παίζει ρόλο σε πολλαπλά είδη κυττάρων στην ογκογένεση. (Hu, Wang, Chodosh, Keith, & Simon, 2003).

Ο HIF-2α παρουσιάζει μεγάλη ομολογία περίπου 48% με τον HIF-1α (Tian et al., 1998). Δομικά, κατά συνέπεια, ο HIF-2 ομοιάζει με τον HIF-1 και πιο συγκεκριμένα το 83% των της επικράτειας του bHLH ταυτίζεται, όπως και το 70% των PAS περιοχών. Έτσι, ο HIF-

2α επίσης ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HREs). Ακόμη, άλλα βασικά μοτίβα παραμένουν, όπως οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής στην καρβοξυτελική περιοχή, η N-TAD και η C-TAD. Στη N-TAD εντοπίζεται και μια περιοχή για την οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση και την αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300.

1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF- α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

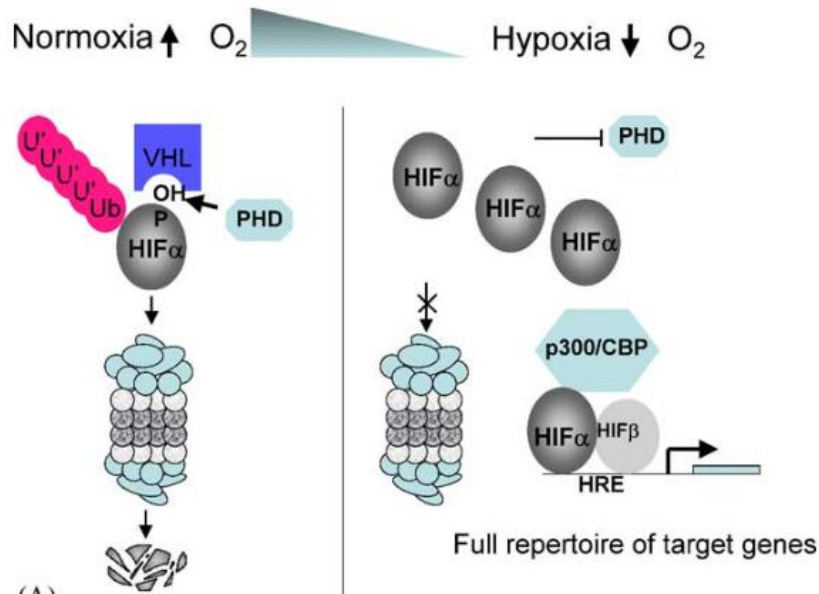
Η ρύθμιση των α -υπομονάδων πραγματοποιείται με πολύπλοκους μηχανισμούς είτε μέσω της διαθεσιμότητας του μοριακού οξυγόνου στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον είτε με μη οξυγονο-εξαρτώμενο τρόπο, από ποικίλα ένζυμα όπως κινάσες, ακετυλάσες και σουμοϋλάσες

1.2.1 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

1.2.1.1. Υδροξυλίωση των HIF-1/2 α

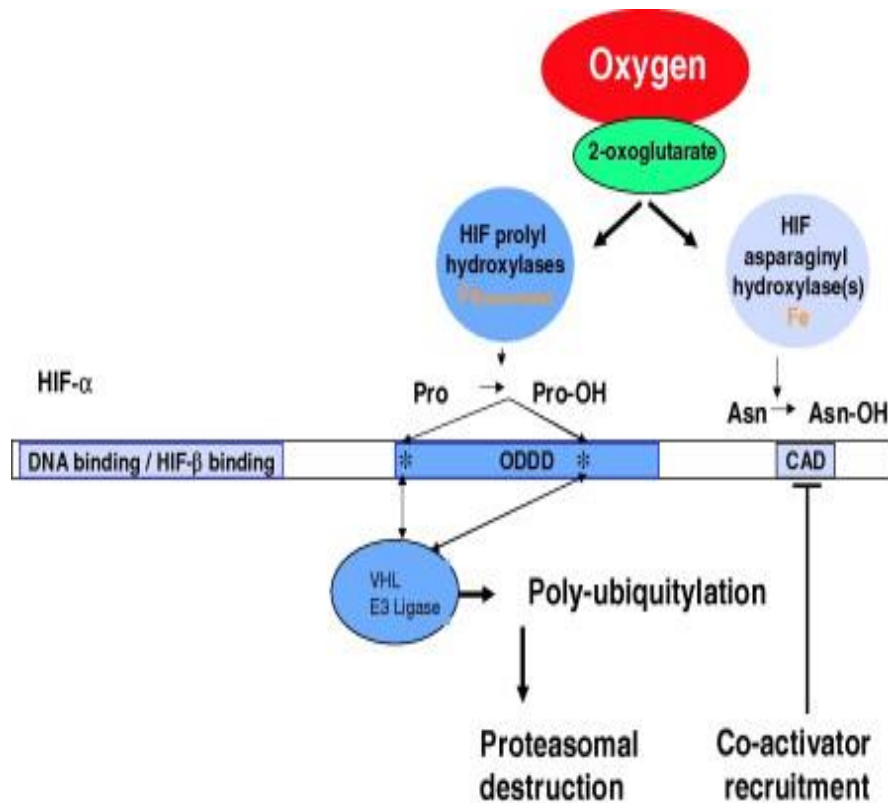
Σε καλά οξυγονωμένα περιβάλλοντα, οι HIF- α υπομονάδες υπόκεινται σε υδροξυλίωση σε ειδικά συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 402 και 564 για τον HIF-1 α και στις θέσεις 405 και 531 για τον HIF-2 α , από ειδικά ένζυμα που αναγνωρίζουν τις θέσεις αυτές. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται προλυλ-υδροξυλάσες ή PHDs (Prolyl-Hydroxylase Domain) και οι δράσεις τους καθορίζονται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, καθώς αυτό αποτελεί το άμεσο υπόστρωμα του ενζύμου, σε συνδυασμό με τον δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) και το ασκορβικό οξύ. Έτσι, οι PHDs δημιουργούν άμεση συσχέτιση μεταξύ της μοριακής απόκρισης των HIF με τη κυτταρική συγκέντρωση του οξυγόνου.

Η μεταγωγή του σήματος συνεχίζεται μέσω των υδροξυλομάδων στις ειδικές θέσεις οι οποίες αποτελούν σημεία αναγνώρισης για την E3 λιγάσης της ουβικιτίνης μέσω του πρωτεϊνικού ογκοκατασταλτικού συμπλόκου von Hippel-Lindau (pVHL), (Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C, 2010) Αποτέλεσμα αυτής της αναγνώρισης είναι η προσθήκη ουβικιτινών και η μεταφορά του HIF στο 26S πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της HIF- α υπομονάδας από τις προλυλ-υδροξυλάσες και το 26S πρωτεάσωμα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Στη νορμοξία, οι HIF μετά από υδροξυλίωση από τις PHD, ουβικιτινώνονται με τη βοήθεια της VHL E3 λιγάσης και αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα. Στην υποξία, αναστέλλεται η δράση των PHD και αποτρέπεται η αποικοδόμησή τους. Αλληλοεπιδρούν με τους συνενεργοποιητές της μεταγραφής στον πυρήνα και τα γονίδια-στόχοι τους ενεργοποιούνται.

Ακόμη, πραγματοποιείται και η ασπαραγίνο-υδροξυλίωση (Asn803 για τον HIF-1 α και Asn851 για τον HIF-2 α) στην καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (C-TAD), η οποία καταλύεται από τον παράγοντα αναστολής HIF ή αλλιώς FIH (factor inhibiting HIF). Η συγκεκριμένη ασπαραγίνο-υδροξυλίωση αποτρέπει την αλληλεπίδραση της α υπομονάδας με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP και p300, οι οποίοι ειδάλλως θα προσδένονταν στην περιοχή αυτή. (Schofield & Ratcliffe, 2005). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πέραν του μοριακού οξυγόνου ως υπόστρωμα για τα οξυγόνο-εξαρτώμενα ρυθμιστικά ένζυμα, τόσο οι PHDs όσο και οι FIH για να είναι πλήρως λειτουργικά απαιτούν την πρόσδεση του α -κετογλουταρικού ως συν-υπόστρωμα με ρόλο ηλεκτρονιοδότη, όπως επίσης και του δισθενή σιδήρου και του ασκορβικού οξέος. (Palazon, Goldrath, Nizet, & Johnson, n.d.)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της HIF- α υπομονάδας από προλυλ- και ασπαραγίνο-υδροξυλίωση. Η προλυλ-υδροξυλίωση γίνεται σε δύο σημεία (*) εντός της επικράτειας ODDD ενώ η ασπαραγίνο-υδροξυλίωση γίνεται στην περιοχή C-TAD. (Schofield & Ratcliffe, 2005)

1.2.2 ΜΗ ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

1.2.2.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Ο μηχανισμός της ρύθμισης του γονιδίου του HIF-1 α στο επίπεδο της μεταγραφής μελετήθηκε εκτενώς και πολλά δεδομένα είναι πια διαθέσιμα στη βιβλιογραφία. Μελέτες έδειξαν την ικανότητα της πρωτεϊνικής μεθυλο-τρανσφεράσης (Protein methyl-transferase - PRMT) να ρυθμίζει τη μεταγραφή του HIF-1 α , καθώς μετά από αποσιώπηση μέσω siPRMT1 επάχθηκε δραματική αύξηση στα επίπεδα των HIF-1 α μεταγράφων. Ως εκ τούτου, ο PRMT1 καταχωρείται ως μεταγραφικός αναστολέας του HIF-1 α . (Lafleur, Richard, & Richard, 2014). Άλλες αναφορές υποδεικνύουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B αλλά και τον TNF- α ως ρυθμιστές των επιπέδων mRNA του HIF-1 α σε συνθήκες απόκρισης στη φλεγμονή. (Palazon et al., 2014).

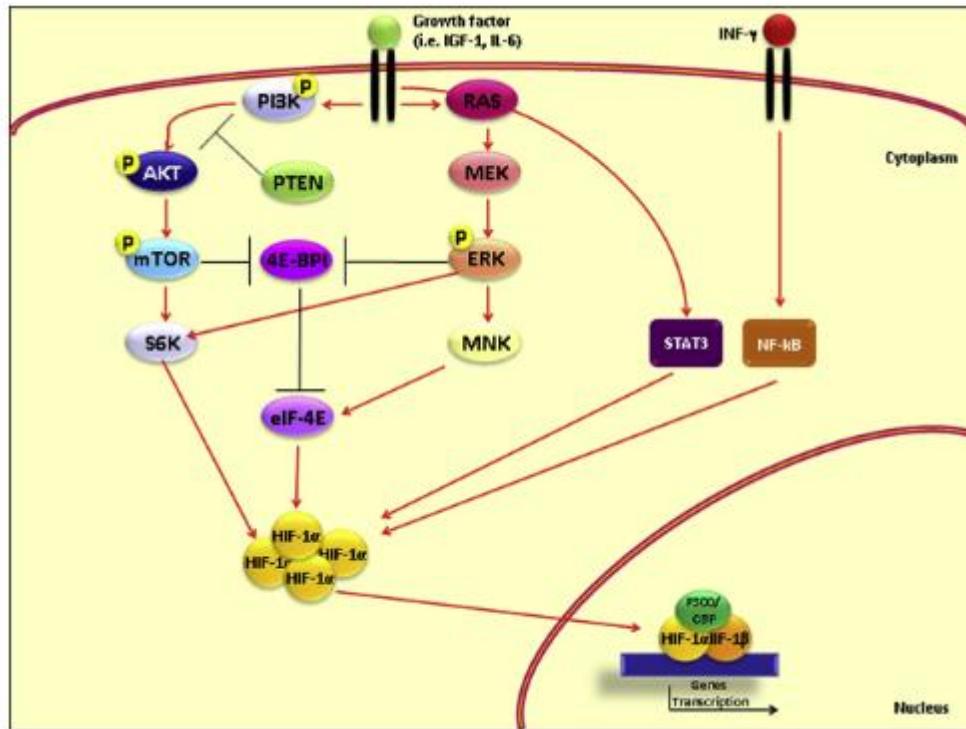
Ως θετικός ρυθμιστής της έκφρασης του HIF-1 α αναφέρεται η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Sp με τα ειδικά, πλούσια σε GC μοτίβα πρόσδεσής τους στο DNA να είναι παρόντα στον υποκινητή του HIF-1 α . Οι δύο κυριότερες μορφές της

οικογένειας Sp που συναντώνται είναι οι Sp1 και Sp3. (Lafleur et al., 2014). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ROS υποστηρίζεται επίσης ότι επάγουν τη μεταγραφική διαδικασία των HIF-1a είτε μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου του HIF-1a είτε μέσω ρύθμισης της δράσης της των υδροξυλασών της ασπαραγίνης FIH, ο ακριβής μηχανισμός ωστόσο παραμένει άγνωστος (Palazon et al., 2014.). Τα επίπεδα των mRNA του HIF-2a φαίνεται να ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο από εκείνα του mRNA του HIF-1a, χωρίς να έχει διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός.

1.2.2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Σε επόμενο στάδιο της ρύθμισης της έκφρασης των HIFs βρίσκεται η σηματοδότηση ως προς την πρωτεϊνική σύνθεσή τους. Αν και η υποξία είναι ο κυριότερος παράγοντας αύξησης των επιπέδων των HIFs, ωστόσο, ρυθμιστικό ρόλο διαφαίνεται να έχουν αυξητικοί και ορμονικοί παράγοντες που προσδίδουν στα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF ιστοειδικό χαρακτήρα. Η έκφραση του HIF-1a εκτείνεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, σε αντίθεση με τον HIF-2a του οποίου η έκφραση έχει ταυτοποιηθεί να εντοπίζεται στα ηπατοκύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα διάμεσα νεφρικά κύτταρα και του δωδεκαδακτύλου. (Hansen, Kristensen, Law, Jørgensen, & Engelholm, 2011)

Πιο αναλυτικά, η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1a φαίνεται να ρυθμίζεται και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από το οξυγόνο όπως μέσω ενεργοποίησης της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK). Η αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση που σηματοδοτείται από αυξητικούς παράγοντες πραγματοποιείται ανεξάρτητα της υποξίας, όπως μέσω της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων RAS, PI3K, ή μέσω της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών στοιχείων όπως ο αναστολέας της PI3K, PTEN. Το μονοπάτι της PI3K δια μέσου της πρωτεϊνικής κινάσης B (κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt) και του στόχου της ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mTOR/mammalian target of rapamycin) επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση του HIF-1a. Το μονοπάτι των MAPK (RAS-MEK-ERK) ωστόσο διεγείρει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω των κινασών που ενεργοποιούνται από τα εξωκυττάρια σήματα των ERK1/2. Οι ERK1/2 και mTOR, απενεργοποιώντας τους μεταφραστικούς αναστολείς 4EBP και ενεργοποιώντας την ριβοσωμική πρωτεΐνη κινάση S6, ενεργοποιούν τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNA. Με την απενεργοποίηση των 4EBP καθίσταται εφικτός ο σχηματισμός του συμπλόκου eIF4F, διευκολύνοντας τη μετάφραση των mRNA με ρυθμιστικά στοιχεία στην 5' αμετάφραστη περιοχή, συμπεριλαμβανομένου και των mRNA των HIF-1/2a (Hansen et al., 2011).



Εικόνα 4: Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR-S6K-4EBP και MEK-ERK στη μετάφραση και σταθεροποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF. (Pugh, C. W., 2016).

1.2.2.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

1.2.2.3.1 Ακετυλίωση

Μία από τις γνωστότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκεινται οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι η ακετυλίωση. Έτσι και οι HIF υφίστανται ακετυλίωση από ειδικά ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση της μεταφοράς των ακετυλομάδων, τις ακετυλοτρανσφεράσες, αλλά και από-ακετυλίωση, μια ενζυμική διεργασία που καταλύεται από τις απο-ακετυλάσες. Κατά συνέπεια ρυθμίζεται η, όπως συμβαίνει κατά τη δράση της spermidine/spermine N1 ακετυλοτρανσφεράσης-1 (SSAT1), η οποία διευκολύνει την ουβικιτίνωση της υπομονάδας των HIF μέσω σταθεροποίησης του συμπλόκου HIF-α/VHL, ώστε αυτό να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα. (Hansen et al., 2011). Μία ακόμη N-ακετυλοτρανσφεράση που εμπλέκεται στη ρύθμιση του HIF-1α είναι η arrest-defective-1 (ARD1), η οποία ακετυλιώνει τη λυσίνη 532 στην ODD επικράτεια με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση του pVHL και την επαγωγή της πρωτεασωμικής αποικοδόμησής του. (Bae et al., 2004)

Ενώ έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α ακετυλιώνεται σε συνθήκες υποξίας αλλά απο-ακετυλιώνεται γρήγορα με το ένζυμο της Σιρτουίνης-1 (Sirt1), ως απόκριση στο υποξικό στρες. Η απο-ακετυλίωση αυτή επιδρά επιλεκτικά σε καθορισμένα κατάλοιπα λυσίνης και κατά συνέπεια, η δράση των ακετυλο-τρανσφερασών δρα στα κατάλοιπα αυτά. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η ακετυλοτρανσφεράση της λυσίνης,

η αποκρινόμενη στο cAMP CBP πρωτεΐνη, σε συνδυασμό με την p300, συμμετέχει στην ακετυλίωση του HIF-2α και πιο συγκεκριμένα, στην επαγωγή του γονιδίου-στόχου του, της ερυθροποιητίνης. (R. Chen et al., 2012) Αναφορικά με τον HIF-1α, έχει βρεθεί ότι η Sirt1 προσδένεται σε αυτόν και τον από-ακετυλιώνει στο κατάλοιπο Lys674, αποτρέποντας τη στρατολόγηση του p300 και άρα καταστέλλοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα. (Lim et al., 2010)

1.2.2.3.2 Σουμοϋλίωση

Η σουμοϋλίωση ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μεταγραφικών και μη παραγόντων. Η τροποποίηση αυτή πραγματοποιείται από ειδικό μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο, την SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier), που ομοιάζει με την ουβικιτίνη ως προς το μηχανισμό δράσης υπό την έννοια ότι απαιτείται η συμμετοχή των E1, E2 και E3 ενζύμων. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης αφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό, στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας πολλών γονιδίων, Η SUMO προσδένεται ομοιοπολικά σε κατάλοιπα λυσίνης κατά το αμινοξικό πρότυπο ψKχE (όπου ψ υδρόφοβο αμινοξύ, όπου χ οποιοδήποτε αμινοξύ) -όσον αφορά τον HIF-1α, η σουμοϋλίωση πραγματοποιείται στα κατάλοιπα Lys³⁹¹ και Lys⁴⁷⁷. Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α, όπως επίσης και η αύξηση της πρωτεϊνικής του σταθερότητας. (Bae et al., 2004) Σχετικά με τον HIF-2α, έχει βρεθεί ότι εμπεριέχει δύο περιοχές συμβατές για σουμοϋλίωση, τα LK₃₉₄EE και LK₄₉₇IE. Το σύμπλοκο που δημιουργείται υφίσταται γρήγορη αποικοδόμηση υπό υποξικές συνθήκες. (Van Hagen, Overmeer, Abolvardi, & Vertegaal, n.d.)

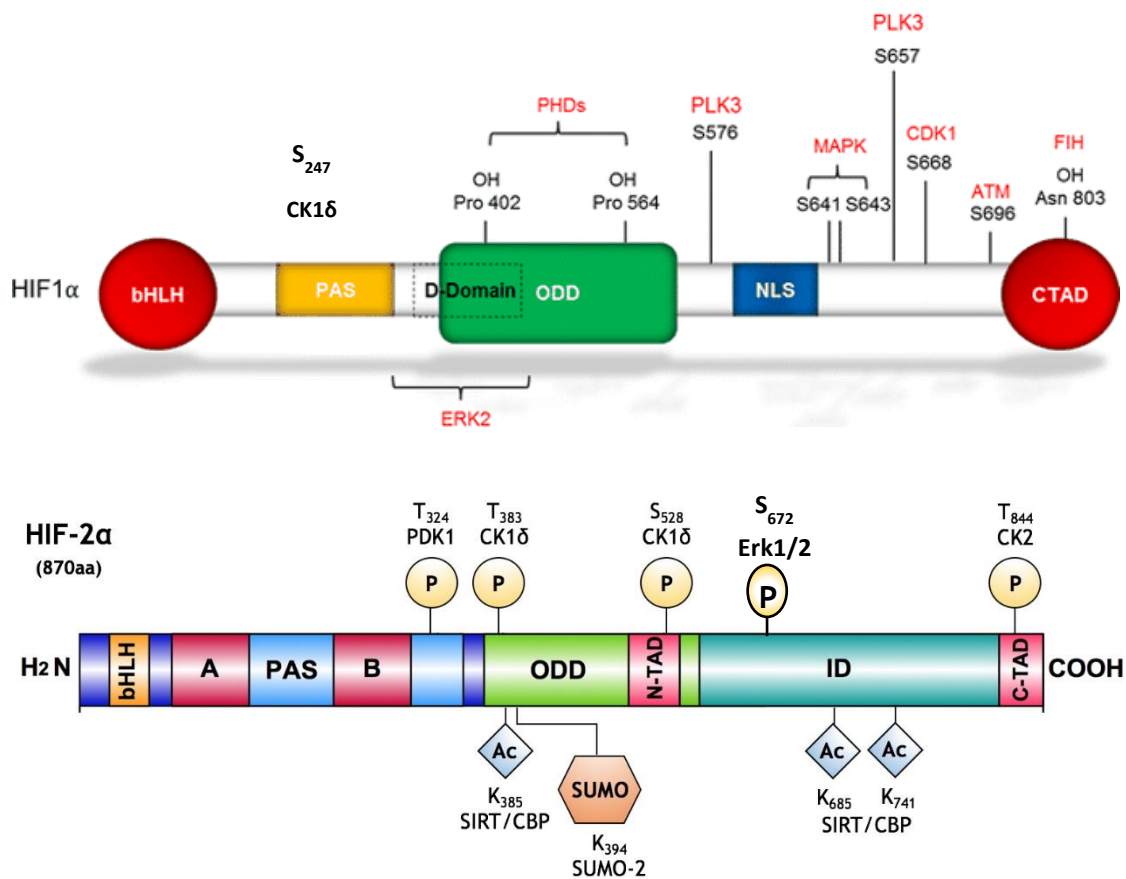
1.2.2.3.3 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α είναι μια μη οξυγονο-εξαρτώμενη μετα-μεταφραστική ρύθμιση που επηρεάζει την έκφραση και τη σταθερότητά του.

Αναφορικά με τον HIF-1α έχει βρεθεί ότι η μεταγραφική λειτουργικότητά του αλλά και ο ορθός υποκυτταρικός εντοπισμός κρίνεται σε μεγάλο βαθμό από την άμεση φωσφορυλίωσή του από τις ERK1/2 στις θέσεις των αμινοξικών καταλοίπων Ser-641 και Ser-643. (Mylonis et al., 2006). Με τη φωσφορυλίωση αυτή, επιτυγχάνεται η παραμονή του HIF-1α στον πυρήνα, καθώς δημιουργείται παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης ενός σήματος πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal – NES) με την πρωτεΐνη CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Mylonis, Chachami, Paraskeva, & Simos, 2008). Έτσι, διασφαλίζεται η πλήρης δράση του HIF-1α ως μεταγραφικός παράγοντας για τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό. Ακόμη, ο HIF-1α στοχεύεται από την κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ) στην αμινοτελική του περιοχή και συγκεκριμένα στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser-247. Η εν λόγω φωσφορυλίωση αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, ρυθμίζοντας αρνητικά τον

λειτουργικό ετεροδιμερισμό της HIF-1α υπομονάδας με την υπομονάδα ARNT. (Kaloussi et al., 2010)

Κατά παρόμοιο τρόπο, η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 είναι μεγάλης σημασίας για τον HIF-2α, όσον αφορά την ενεργότητά του αλλά και τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Οι κινάσες ERK1/2 φωσφορυλιώνουν το αμινοξικό κατάλοιπο της Ser-672, δηλαδή στην περιοχή ανάμεσα στις N-TAD και C-TAD του HIF-2α. Έτσι ελέγχεται ο υποκυτταρικός του εντοπισμός μέσω παρεμπόδισης αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης CRM1 και ενός πιθανού στοιχείου NES στην αλληλουχία του HIF-2α (Gkoutinakou, Befani, Simos, & Liakos, 2019). Ο HIF-2α επίσης φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ) στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser-383 και Thr-528, μια τροποποίηση που έχει ως αποτέλεσμα τον επιτυχή πυρηνικό εντοπισμό του καθώς και την πλήρη μεταγραφική του ενεργότητα του HIF2 επάγοντας την έκκριση της EPO στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Pangou et al 2016).



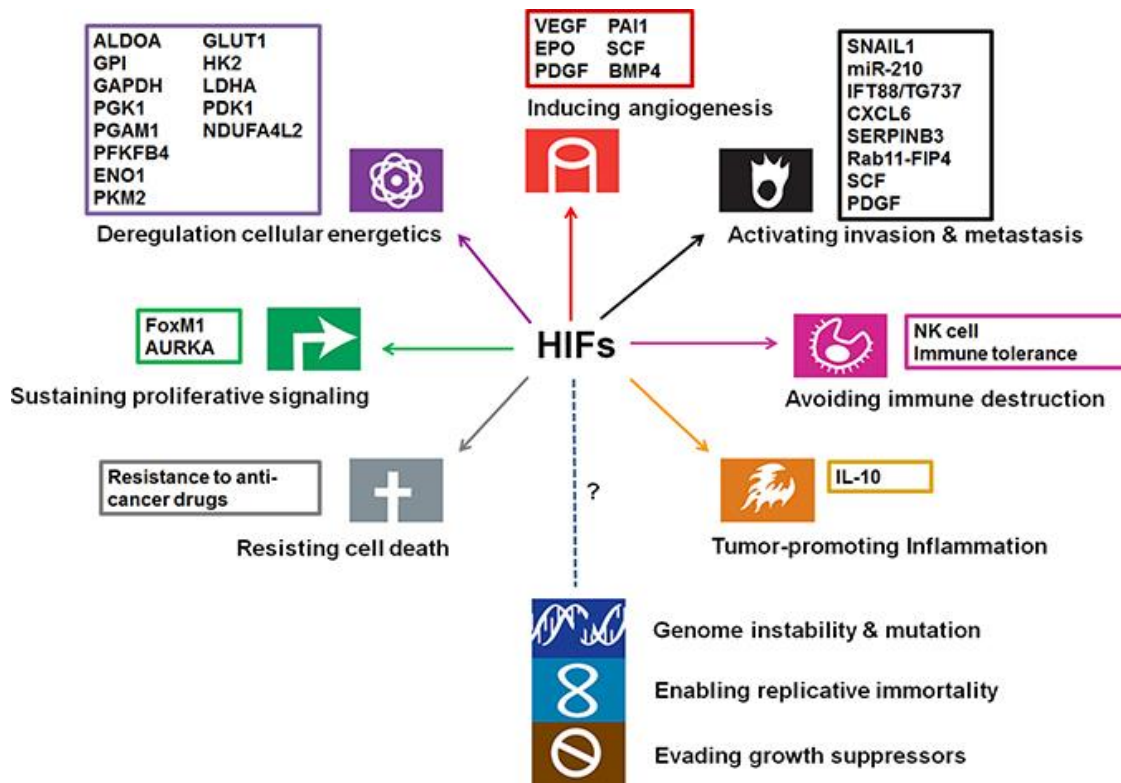
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση θέσεων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στον HIF-1α Ortman, B., Druker, J., & Rocha, S. (2014) και HIF-2α.

1.3. ΚΟΙΝΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ HIFs

Η κυτταρική προσαρμογή στην υποξία συμπεριλαμβάνει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με σκοπό τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Αρχικά, ενεργοποιείται η έκφραση ομάδων γονιδίων που σχετίζονται με διεργασίες όπως η αγγειογένεση, η ερυθροποίηση και η γλυκόλυση. Ο μηχανισμός που υποστηρίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η HIF-α υπομονάδα φέρει μια βασική περιοχή δομής έλικας-στροφής-έλικας για τη σύνδεση με το DNA αλλά και μια συντηρημένη επικράτεια Per, ARNT, SIM (PAS). Ο ετεροδιμερισμός των HIF-α υπομονάδων με την ARNT υπομονάδα γίνεται μέσω των δύο PAS επικρατειών που βρίσκονται στις δύο αυτές ισομορφές και έτσι μπορεί να πραγματοποιηθεί η επιτυχή πρόσδεση των HIF στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs). Επιπλέον, οι HIF-1α και HIF-2α φέρουν δύο επικράτειες ενεργοποίησης, N-TAD και C-TAD. Ιδιαίτερα η C-TAD είναι σημαντική για τη συμπλοκοποίηση των HIF με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές όπως CBP/p300. (Suzuki et al., 2017)

Τα γονίδια-στόχοι διακρίνονται σε κοινά αλλά και ειδικά για τον HIF-1α ή τον HIF-2α, αντίστοιχα. Ο HIF-1 σχετίζεται με την κωδικοποίηση γονιδίων γλυκολυτικών ενζύμων μετατροπής της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ (*HK1*, *HK2*, *PGK1* κ.ά.), της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης 1 (*PDK1*), αλλά και γονίδια που συμμετέχουν στην αυτοφαγία των μιτοχονδρίων (*BNIP3*) (Semenza, 2012). Ο HIF-2α, αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι στοχεύει στη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η αγγειογένεση (*Ang-1*), η ερυθροποίηση (*EPO*), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (*CCND1*), η διαφοροποίηση (*Oct-4*) και η μετάσταση (*LOX*).

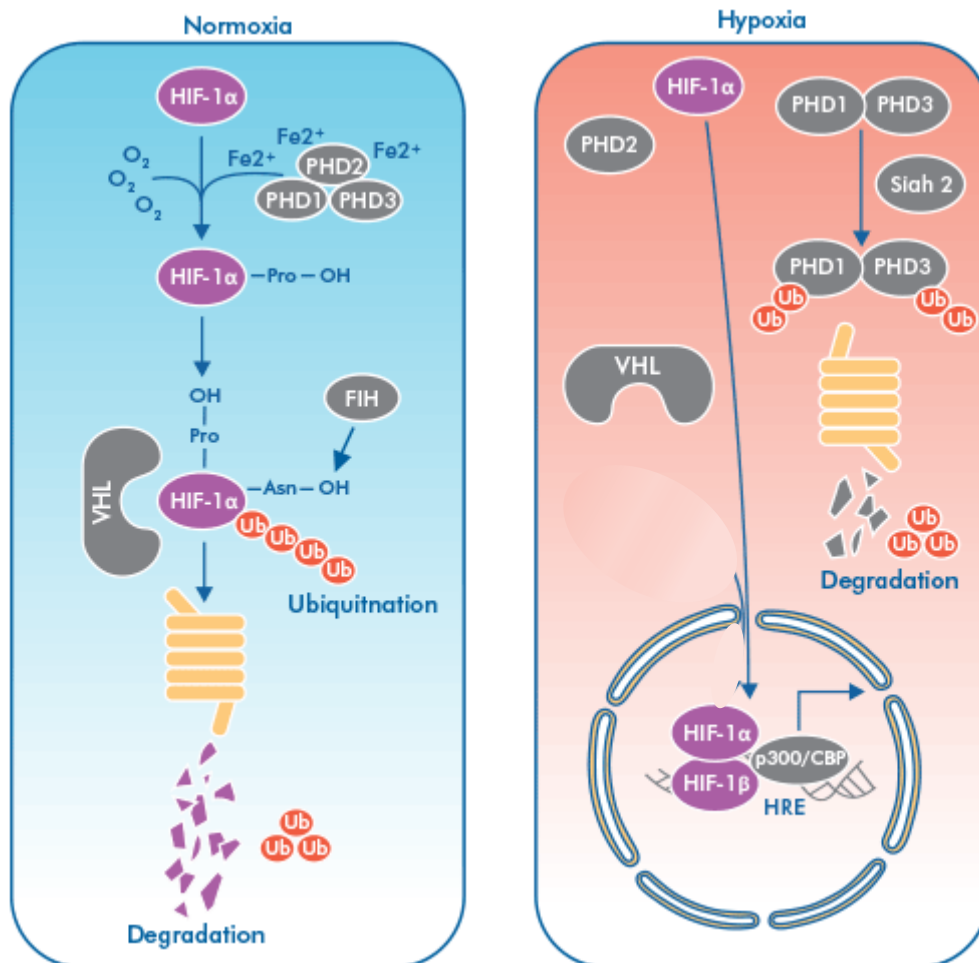
Τα κοινά γονίδια-στόχοι των HIF-1α και HIF-2α περιλαμβάνουν διεργασίες όπως η αγγειογένεση, και σε αυτή συμπεριλαμβάνεται ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (*VEGF*), η ομοιόσταση του pH (*CAXII*), ο μεταβολισμός των λιπιδίων (*ADRP*) και η μεταφορά της γλυκόζης (*GLUT-1*). (Keith, Johnson, & Simon, 2012)



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των βασικών ρόλων και γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων HIF. Τα γονίδια-στόχοι των HIF συμμετέχουν κυρίως σε λειτουργίες όπως η επαγωγή της αγγειογένεσης, η γλυκόλυση, η κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη, η φλεγμονή, η ανθεκτικότητα στην αντικαρκινική θεραπεία κ.ά. (Jochmanová, I., Yang, C., Zhuang, Z., & Pacak, K., 2013)

1.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ HIF

Σε συνθήκες νορμοξίας, οι HIF-1/2α υδροξυλιώνονται από τις PHDs, γεγονός που επιτρέπει την αναγνώρισή του από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL, η οποία είναι συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικουτίνης, με αποτέλεσμα την πολυουβικιτινίωση και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα.

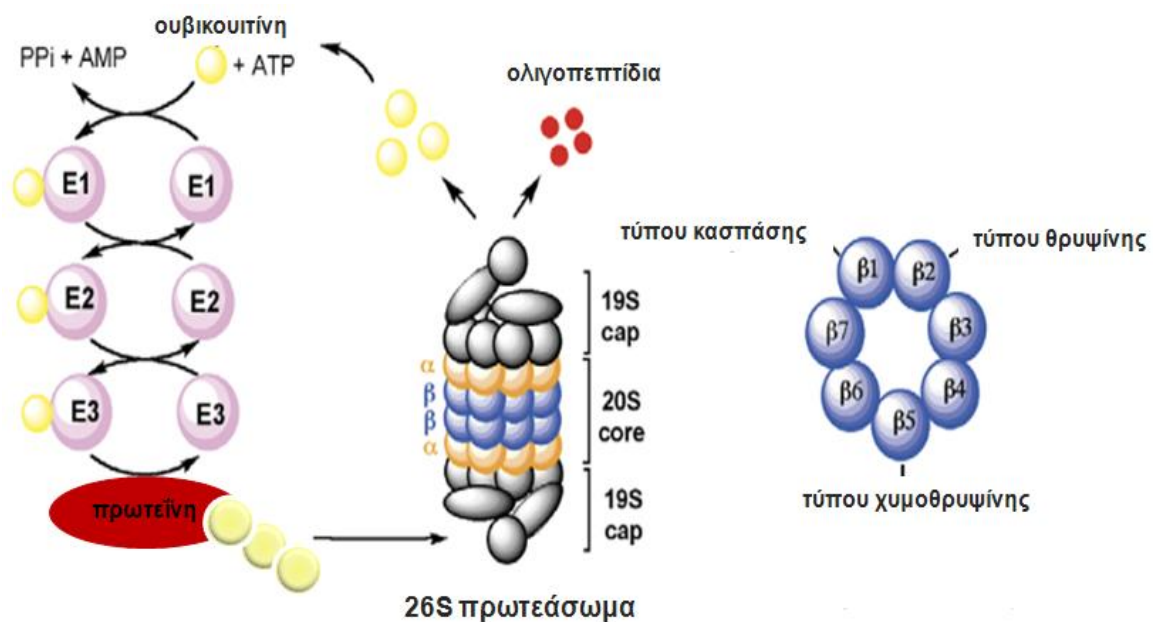


Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της αποικοδόμησης του HIF-α σε συνθήκες νορμοξίας μετά από υδροξυλίωση από τις PHDs και στρατολόγησης της pVHL, με τελικό αποτέλεσμα την πολυουβικιτινίωση και την πρωτεόλυση. Σταθεροποίηση της πρωτεΐνης σε συνθήκες υποξίας λόγω απενεργοποίησης των ενζύμων. FAQs - Hypoxia and HIFs. (2020). <https://www.novusbio.com/support/hypoxia-and-hif-faqs>

Το σύστημα ουβικιτίνης πρωτεασώματος ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες του κυττάρου όπως η μεταγραφή, ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η αποκατάσταση βλαβών του DNA. Μια σειρά ενζύμων συμμετέχουν στην διαδικασία της σύνδεσης εκατοντάδων πρωτεϊνών με την ουβικιτίνη ώστε να αναγνωριστούν στη συνέχεια από το πρωτεάσωμα και να αποδομηθούν. Η συνολική πολυπρωτεϊνική δομή του πρωτεασώματος ονομάζεται 26S και έχει μοριακό βάρος 2,5 MDa και κυλινδρικό σχήμα.

Αποτελείται από δύο λειτουργικές υπομονάδες, τα δύο άκρα του 26S κυλίνδρου καλύπτονται από 19S ρυθμιστικές υπομονάδες που λειτουργούν ως αναγνωριστική υπομονάδα της συνδεδεμένης με την ουβικουιτίνη πρωτεΐνης, ενώ στο κέντρο βρίσκεται ο καταλυτικός 20S πυρήνας του συμπλόκου αποτελούμενο από δύο επταμερείς α υπομονάδες και δύο επταμερείς β υπομονάδες και οι δύο σε δακτυλιοειδή μηχανισμό. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από κατάλοιπα θρεονίνης, των οποίων οι υδροξυλομάδες λειτουργούν ως πυρηνόφιλα κέντρα. Το 20S πρωτεάσωμα έχει τρεις καταλυτικές δραστηριότητες, τύπου χυμοθρυψίνης, τύπου θρυψίνης και τύπου κασπάσης (β5, β2 και β1, αντίστοιχα) (Εικόνα 8). Η σημασία της κάθε ενζυμικής δραστηριότητας ποικίλει ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης-υποστρώματος

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη πολυενζυμική διεργασία. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση, αρχικά σημαίνονται με μια αλυσίδα πολυ-ουβικουιτίνης, δηλαδή αρκετά μόρια ουβικουιτίνης συνδέονται σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών. Μέσω αυτής της αλυσίδας, η 19S ρυθμιστική υπομονάδα μπορεί να τις αναγνωρίσει ως υποστρώματα για πρωτεόλυση. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και εισέρχονται στον 20S πρωτεολυτικό πυρήνα. Εκεί λαμβάνει χώρα η τελική διάσπασή τους σε μικρά πεπτίδια, μεγέθους 3 ως 23 αμινοξέα (Adams, J 2003, Vlachostergios, PJ et al., 2009, Vlachostergios, PJ et al., 2012) (Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση, αρχικά σημαίνονται με μια αλυσίδα πολυ-ουβικιτίνης, και μέσω αυτής της αλυσίδας, η 19S ρυθμιστική υπομονάδα μπορεί να τις αναγνωρίσει ως υποστρώματα για πρωτεόλυση. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και εισέρχονται στον 20S πρωτεολυτικό πυρήνα. Εκεί λαμβάνει χώρα η τελική διάσπασή τους σε μικρά πεπτίδια, μεγέθους 3 ως 23 αμινοξέα. Το 20S πρωτεάσωμα έχει τρεις καταλυτικές δραστηριότητες, τύπου χυμοθρυψίνης, τύπου θρυψίνης και τύπου κασπάσης (β5, β2 και β1 αντίστοιχα) (Moore, BS et al., 2008).

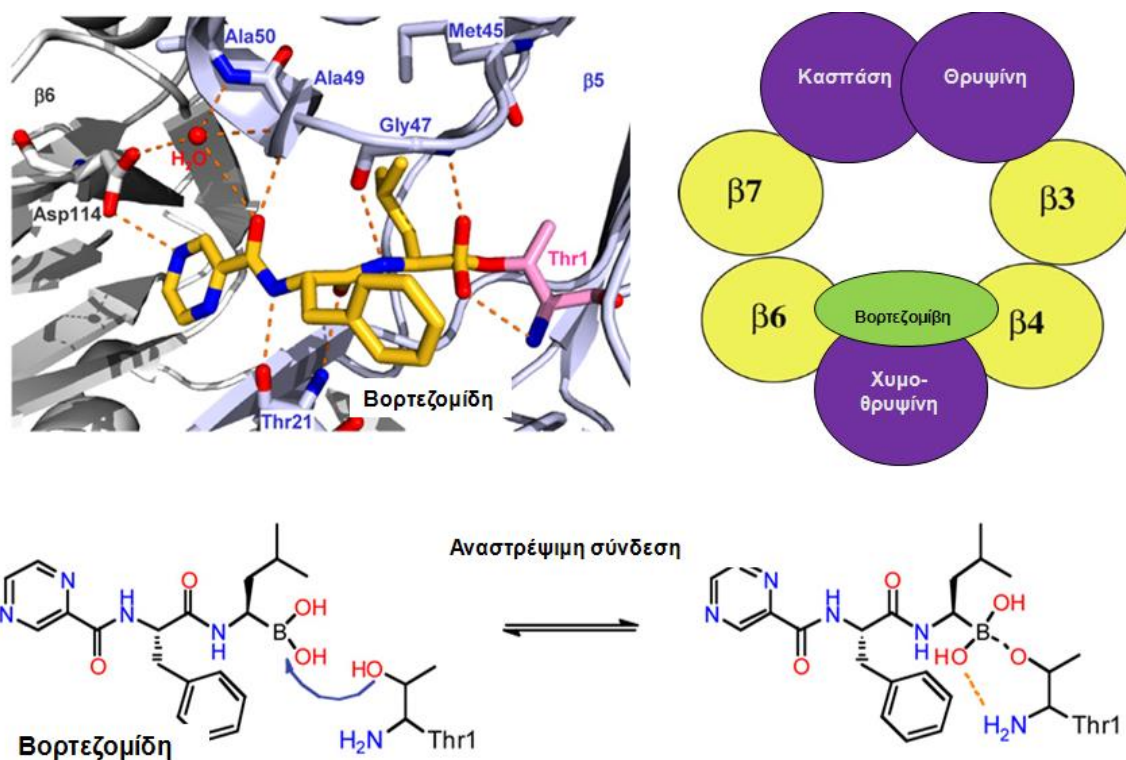
Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει εδραιωθεί ως ισχυρή και υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, και αναστολείς του πρωτεασώματος έχουν χρησιμοποιηθεί έναντι διάφορων καρκινικών τύπων, τόσο σε ζωικά όσο και κλινικά μοντέλα, αλλά και στην αντιμετώπιση κακοήθων ασθενειών. Οι συνέπειες της αναστολής αυτής διαφέρουν σημαντικά, καθώς μπορεί να προκαλέσει απλή τροποποίηση των λειτουργιών του κυττάρου μέχρι και κυτταρικό θάνατο. (Ikezoe, T et al., 2004) Η αντικαρκινική δράση των αναστολέων του πρωτεασώματος υποστηρίζεται ότι οφείλεται κυρίως στην ρύθμιση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, p53 και p21, σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως του NF-κB (Fahy, BN et al., 2005).

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος είναι ουσίες που ποικίλλουν ως προς τις ιδιότητες και τον τρόπο με τον οποίο αναστέλλουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Υπάρχουν αναστολείς πρωτεασώματος που είναι α) τριπεπτίδια με αλδεΰδη (π.χ. το MG132, ο αναστολέας καλπαΐνης I και το φυσικό τριπεπτίδιο λευπεπτίνη) και πεπτίδια με βορονικό οξύ (π.χ. η βορτεζομίδη) τα οποία προκαλούν αναστρέψιμη αναστολή, β) μη αλδεϋδικά πεπτίδια που προκαλούν μη αναστρέψιμη αναστολή (π.χ. οι εποξυκετόνες) και γ) μη πεπτιδικά φυσικά προϊόντα όπως είναι β-λακτόνες (π.χ. η λακτακυστεΐνη). Οι αναστολείς αυτοί απενεργοποιούν το πρωτεάσωμα διότι μεταβάλλουν κυρίως την δραστηριότητα του πρωτεασώματος τύπου χυμοθρυψίνης (Moore, BS et al., 2008).

Παρόλο που η δράση του πρωτεασώματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των HIF-1/2α, δεν έχει εκτενώς μελετηθεί η επίδραση των αναστολέων του πρωτεασώματος στη λειτουργία των HIF-1/2α. Παλαιότερη βιβλιογραφία αναφέρει ότι οι αναστολείς πρωτεασώματος λακτακυστεΐνη και MG132 επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α σε κύτταρα ινοβλαστών και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη σε συνθήκες νορμοξίας, χωρίς όμως να επάγουν την μεταγραφική του ενεργότητα (Kallio, PJ et al., 1999, Mabweesh, NJ et al., 2002). Οι πιο πρόσφατες μελέτες έχουν εστιαστεί στην επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη (Bortezomib, VELCADE®, Millennium Pharmaceuticals, Inc. and Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C.) στην λειτουργία του HIF-1α. Βρέθηκε ότι η βορτεζομίδη αναστέλλει την αγγειογένεση σε κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος και σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνοντας τα επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) μέσω αναστολής του HIF-1α (Roccaro, AM et al., 2006, Veschini, L et al., 2007).

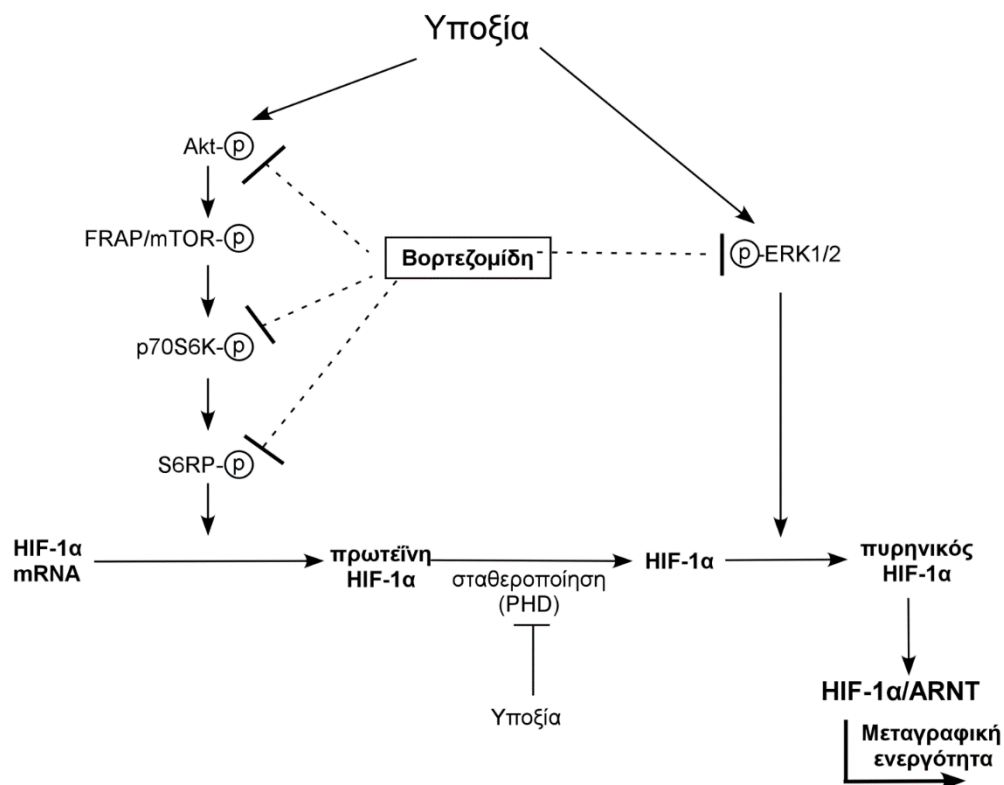
1.4.1. Η ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗ (BORTEZOMIB)

Η βορτεζομίδη είναι ένα διπεπτίδιο με βορονικό οξύ το οποίο έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα κύτταρα και να αναστέλλει εξειδικευμένα και αναστρέψιμα το 26S πρωτεάσωμα (Εικόνα 9). Συγκεκριμένα, προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος τροποποιώντας απευθείας τα καταλυτικά κατάλοιπα θρεονίνης των β υπομονάδων. Σε σύγκριση με άλλους, δομικά ανάλογους αναστολείς, προσδένεται πολύ πιο αποτελεσματικά και αναστέλλει το πρωτεάσωμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η βορτεζομίδη έχει εγκριθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η πάθηση εξελίσσεται παρά την προηγούμενη χορήγηση άλλης χημειοθεραπείας και σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για μεταμόσχευση μυελού των οστών (Parandreu, CN and Logothetis, CJ 2004, Chen, D et al., 2011).



Εικόνα 9: Σχηματικά η πρόσδεση της βορτεζομίδης σε κατάλοιπα θρεονίνης. Η βορτεζομίδη είναι ένα διπεπτίδιο βορονικού οξέος το οποίο έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα κύτταρα και να αναστέλλει εξειδικευμένα και αναστρέψιμα το 26S πρωτεάσωμα. Η βορτεζομίδη προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος τροποποιώντας απευθείας τα καταλυτικά κατάλοιπα θρεονίνης των β υπομονάδων Η βορτεζομίδη μεταβάλλει τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος τύπου χυμοθρυψίνης (Adams, J 2003, Moore, BS et al., 2008).

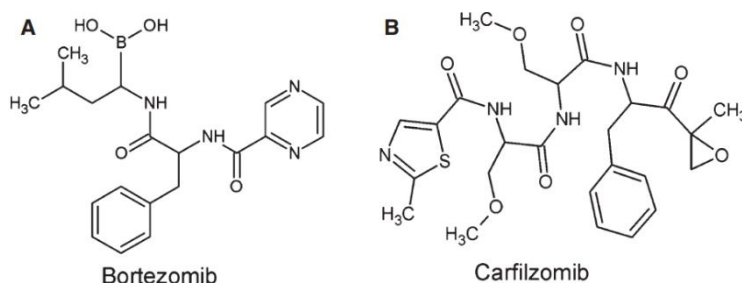
Παλιότερες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία της βορτεζομίδης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF και αναστέλλει την αγγειογένεση (Williams, S et al., 2003). Το αποτέλεσμα αυτό είναι παράδοξο από τη στιγμή που η χρήση ενός αναστολέα πρωτεασώματος σε καρκινικά κύτταρα όπως του προστάτη αναμένεται να προκαλέσει σταθεροποίηση των HIFs και κατά συνέπεια αύξηση της έκφρασης του VEGF. Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής στη Λάρισα, έδειξαν πράγματι ότι στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, όπου ο HIF-1α έχει κυρίαρχο ρόλο, η βορτεζομίδα αναστέλλει την έκκριση του VEGF επιδρώντας αρνητικά στον HIF-1α με διπλό τρόπο, διότι ταυτόχρονα αναστέλλει την εξαρτώμενη από την Akt πρωτεϊνική του σύνθεση και την εξαρτώμενη από τις ERK1/2 συγκέντρωση του στον πυρήνα γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1 (Εικόνα 10). Δεδομένα που υποστηρίζουν στην κατανόηση της αντικαρκινικής δράσης της βορτεζομίδης και στηρίζουν την περαιτέρω κλινική εφαρμογή του στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη. (Befani C et al 2013). Ωστόσο παραμένει άγνωστος ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του δεύτερου μέλους της οικογένειας των HIF, HIF-2α από τη βορτεζομίδα.



Εικόνα 10: Σχηματικό μοντέλο του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-1α από τη βορτεζομίδα σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (Befani C et al 2013).

1.4.2. Η ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗ (CARFILZOMIB)

Η καρφιλζομίδη είναι ο δεύτερος ειδικός αναστολέας του πρωτεασώματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Πρόκειται για έναν μη αντιστρεπτό αναστολέα του πρωτεασώματος, ο οποίος φέρει τη μοριακή δομή τετραπεπτιδικής εποξυκετόνης. Ο μηχανισμός της δράσης της καρφιλζομίδης εστιάζεται στην πρόσδεση στη β5 καταλυτική υπομονάδα του πρωτεασώματος όπου παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης από τη Βορτεζομίδη. Προ-κλινικές μελέτες έχουν υποδείξει την καρφιλζομίδη ως έναν από τους πιο υποσχόμενους για την αποτελεσματικότητά τους ειδικούς αναστολείς του πρωτεασώματος. Πιο συγκεκριμένα, η καρφιλζομίδη έχει τη δυνατότητα σχηματισμού ενός εξαμερούς συμπλόκου μορφής «δαχτυλιδιού» γύρω από τη β5 υπομονάδα, οδηγώντας σε μια ενδομοριακή κυκλοποίηση. Η ενδομοριακή αυτή κυκλοποίηση είναι ένας μηχανισμός που πραγματοποιείται σε δύο στάδια, μέσω πυρηνόφιλων προσθηκών στην εποξυκετονική ομάδα. (Kubiczkova et al., 2014) Η πρόσδεσή του μπορεί να γίνεται τόσο στις υδροξυ- όσο και στις αμινο-ομάδες των θρεονινών του καταλυτικού κέντρου με υψηλό βαθμό ακρίβειας. (Crawford, Walker, & Irvine, 2011) Η πρωτεασωμική δραστηριότητα μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα του 20% της αρχικής και έτσι η αποκατάστασή της μπορεί να γίνει μόνο μέσω εκ νέου σύνθεσης των καταλυτικών υπομονάδων. Τα χαρακτηριστικά του αυτά ήταν ο λόγος που εγκρίθηκε το 2012 για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος από τον FDA της Αμερικής.



Εικόνα 11: Χημική δομή των ειδικών αναστολέων του πρωτεασώματος (A) *Bortezomib* και (B) *Carfilzomib* (Kubiczkova et al., 2014.)

Όσον αφορά τις *in vitro* μελέτες της καρφιλζομίδης, λίγα δεδομένα είναι γνωστά για την επίδρασή της στους μεταγραφικούς παράγοντες HIF, συγκριτικά με αυτές για τη βορτεζομίδη.

1.5. HIFs ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Ένα από τα είδη καρκίνου με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα και ταυτοχρόνως τις πιο περιορισμένες θεραπείες είναι αυτό του ηπατικού καρκίνου. Πάνω από 780.000 νέες περιπτώσεις ασθενών εμφανίζονται με το συγκεκριμένο είδος καρκίνου κάθε χρόνο. Βασικές αιτίες εμφάνισης αυτής της ασθένειας είναι οι ιϊκές λοιμώξεις από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C, ο διαβήτης, το ήδη υπάρχον έδαφος κίρρωσης, η γενετική διαταραχή της αιμοχρωμάτωσης του ήπατος αλλά και βλαβερές συνήθειες όπως το κάπνισμα και η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ. Οι επιλογές που υπάρχουν σήμερα για τη θεραπεία του ηπατοκαρκινώματος αφορούν στην ηπατεκτομή, στη μεταμόσχευση, στη θεραπεία με χρήση ακτινοβολιών, τη χημειοθεραπεία, τον διαρτηριακό χημειοεμβολισμό (TACE) αλλά και τον θερμοκαυτηριασμό των όγκων, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξής του.

Το ηπατοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλαπλών οζιδίων με υψηλή αγγείωση και ραγδαίο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συνεπώς δημιουργείται ένα από τα εντονότερα υποξικά μικροπεριβάλλοντα μεταξύ διάφορων ειδών καρκίνου, με το μέσο επίπεδο οξυγόνου να βρίσκεται στο 0,8%. Βασική θέση στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων κατέχουν οι HIFs και για τον λόγο αυτό αποτελούν το βασικό αντικείμενο μελέτης ως πιθανοί στόχοι αντικαρκινικής θεραπείας.

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η στόχευση των HIFs ή και των συμπαράγοντων τους παραμένει στο επίκεντρο της προσοχής των ερευνών ως ένα πιθανό και υποσχόμενο εργαλείο για την αντιμετώπιση του ηπατικού καρκίνου (C. Chen & Lou, 2017). Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία και η αναστολή του έχει εδραιωθεί ως ισχυρή και υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Οι συνέπειες της αναστολής αυτής διαφέρουν σημαντικά, καθώς μπορεί να προκαλέσει απλή τροποποίηση των λειτουργιών του κυττάρου μέχρι και κυτταρικό θάνατο.

Ο αναστολέας του πρωτεασώματος βορτεζομίδη, χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και σε ασθενείς με λέμφωμα στα κύτταρα μανδύα. Η αντικαρκινική δράση της βορτεζομιδης είναι η πιο καλά μελετημένη τόσο σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα με διάφορους τύπους καρκινικού όγκου (Papandreou, CN and Logothetis, CJ 2004, Chen, D et al., 2011) και έχει βρεθεί ότι η παρουσία της σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF και αναστέλλει την αγγειογένεση (Williams, S et al., 2003). Προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας (Μπεφάνη και άλλοι) έχει διερευνήσει το μηχανισμό δράσης της βορτεζομιδης σε συνθήκες υποξίας και βρέθηκε ότι αναστέλλει στην έκφραση και στην δραστηριότητα του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη.

Ο νεότερος αναστολέας του πρωτεασώματος καρφιλζομίδη δεν έχει εκτενώς μελετηθεί στους διάφορους τύπους καρκινικού όγκου και η επίδρασή του σε συνθήκες υποξίας, στη ρύθμιση της έκφρασης και της μεταγραφής των HIF παραμένουν άγνωστοι.

Έτσι στη παρούσα διπλωματική, αναζητήθηκε να απαντηθούν τα ερωτήματα, για το ποια είναι η αντικαρκινική δράση των δύο αυτών αναστολέων του πρωτεασώματος σε συνθήκες υποξίας και πιο συγκεκριμένα κατά πόσο επηρεάζουν την έκφραση και τη δραστηριότητα των HIF-1α και HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος Huh7 που εκφράζουν και τις δύο ισομορφές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- ✓ Huh-7: Κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος

2.1.2. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι η βορτεζομίδη (Bortezomib, VELCADE® (Janssen-Cilag Pharmaceuticals) και η καρφιλζομίδη (Carfilzomib, Kyprolis (Onyx Pharmaceuticals)).

2.1.3. ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

2.1.4. ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

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

2.1.5. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού σε αραιώση 1:750 (Novus Biologicals®).
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα από ορό κουνελιού σε αραιώση 1:1000. (Lyberopoulou et al., 2007).
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-ακτίνη αντίσωμα από ορό κουνελιού σε αραιώση 1:5000 (Cell Signaling).
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-τουμπουλίνη αντίσωμα από ορό ποντικού σε αραιώση 1:3000 (Cell Signaling).
- ✓ Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντικό τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα (Cell Signaling).

2.1.6. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-PCR σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής και κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech (η αλληλουχία είναι διαθέσιμη κατόπιν αιτήματος).

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η κυτταρική σειρά Huh7 καλλιεργήθηκε 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 καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στον επωαστήρα Heal Force HF 90 σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και σε 5% CO₂.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ HIF-1α ΚΑΙ HIF-2α

Για την εφαρμογή υποξίας, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h σε 1% O₂, 94% N₂, και 5% CO₂ στον ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO2 200 (Baker Ruskinn, Sanford, Maine, USA). Για τη μελέτη της δράσης των αναστολέων βορτεζομίδη και καρφιλζομίδη στην έκφραση και μεταγραφική ενεργότητα των HIFs, τα κύτταρα προ επώαστηκαν για μια ώρα με τους αναστολείς σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται στα αποτελέσματα και ακολούθησε επώαση σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας για 24 h.

2.2.2 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

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 επωάστηκε για 5 λεπτά στους 37°C ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 1500 rpm, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml θρεπτικού μέσου ψύξης που περιείχε 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM. 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, 10% FBS και 100U/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης, και επωάστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂.

2.2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

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 και DTT). Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών και προστίθεται ακριβώς πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης, ενώ το DTT χρησιμοποιείται για την αποφυγή σχηματισμού δεσμών θείου μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης μεταξύ των πρωτεϊνών. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επωάστηκε για 15 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο που αποτελεί και το διαλυτό ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι. Προκειμένου να αναλυθούν οι πρωτεΐνες του δείγματος με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, προστίθεται DTT 1mM και διάλυμα Laemli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue). Το δείγμα θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 95 °C και αποθηκεύεται στους -20 °C.

2.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο Bradford Assay. 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 (Biogad). 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).

2.2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

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 πολυακρυλαμιδίου και το άλας νατρίου τουθειικού δωδεκυλίου (SDS) που δρα ως αποδιατακτικό μέσο. Το SDS είναι ένα ανιονικό αντιδραστήριο που εφόσον δεσμευτεί στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων δεσμών και τις αποδιατάξει, τους προσθέτει καθαρό αρνητικό φορτίο. Η πρόσδεση του SDS στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες προκαλεί ομοιόμορφη κατανομή του φορτίου ανά μονάδα μάζας και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους. Το αποτέλεσμα είναι ότι τελικά η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Αυτό συμβαίνει διότι το SDS δεσμεύεται πάνω στις πρωτεΐνες ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4gr SDS/gr πρωτεΐνης). Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές 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 επιστοίβαξης (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 (APS), 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 120V.

2.2.6 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (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 60 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 γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS-0,1% Tween 20 (3 x 5 λεπτά). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 40C. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS-0,1% Tween 20 (3 x 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 αραίωση, 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 (3 x 5 λεπτά). Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 30 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξειδίο 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. Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Immobilon Crescendo HRP Substrate και η λήψη των εικόνων έγινε στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software.

2.2.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ RNA

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1x, αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με χρήση 200 μl διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης (NucleoZOL, Macherey-Nagel) και έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση 15 λεπτά στα 12000xg. 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 500 μl ισοπροπανόλη και μετά από ανάδευση τοποθετείται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 12000xg για την κατακρήμνιση του RNA και αφού απομακρυνθεί η υπερκείμενη ισοπροπανόλη, στο ίζημα προστίθεται 75% αιθανόλη ώστε αυτό να ξεπλυθεί. Ακολουθεί ανάδευση και μία ακόμη φυγοκέντρηση στα 6000 x g για 3 λεπτά, και μετά την απόρριψη του υπερκείμενου η τελευταία φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται για βέλτιστο ξέπλυμα του ιζήματος. Ακολουθεί spin στα 13.000rpm για 1 λεπτό και το ίζημα, από το οποίο έχει απομακρυνθεί η αιθανόλη, επαναιωρείται σε 40 μl αποστειρωμένου ύδατος καθαρού από ένζυμα αποικοδόμησης του RNA. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80 οC.

2.2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ RNA - ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ RNA

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 προσμίξη πρωτεϊνών. Ο λόγος των τιμών απορρόφησης που παρουσιάζει ένα διάλυμα RNA, A_{260}/A_{280} , αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του και των προσμίξεων από DNA ή και πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμίξεις, τότε ο λόγος $OD_{260}:OD_{280} = 2$. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 έως 2.

2.2.9 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (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 θερμοανθεκτικών 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 SensiFAST cDNA Synthesis Kit, Bioline. Στην αντίδραση χρησιμοποιείται RNA και ετοιμάζεται στο πάγο ως εξής:

- 10 μl δείγματος RNA 1 μg
- 2 μl RT Buffer M-MuLU (10x)
- 1 μl dNTP Mix (10 mM)
- 2 μl τυχαίων εκκινητών (100μM)
- 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης RT M-MuLU
- 4 μl H₂O

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- ✓ 5 min → 25°C για την επιτυχή πρόσδεση των εκκινητών
- ✓ 15 min → 42°C για την προώθηση της αντίστροφης μεταγραφής
- ✓ 20 min → 65°C για την απενεργοποίηση
- ✓ 4°C hold

Στα δείγματα μετά την αντίδραση προστίθενται 80μl 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 φθορίζουσών 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 επιμήκυνσης 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 KAPA SYBR® FAST (REF: KK4602) και H₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0,5 pmol/μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά strips 8 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 7,5 μl από το master mix και 2,5 μl δείγματος cDNA από τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται τρεις φορές, σε τρεις διαδοχικές θέσεις του strip. 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 για τη θερμική ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης
- ✓ 10 min → 94 °C για την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- ✓ 15 sec → 95 °C για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- ✓ 1 min → 60 °C για την υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 40

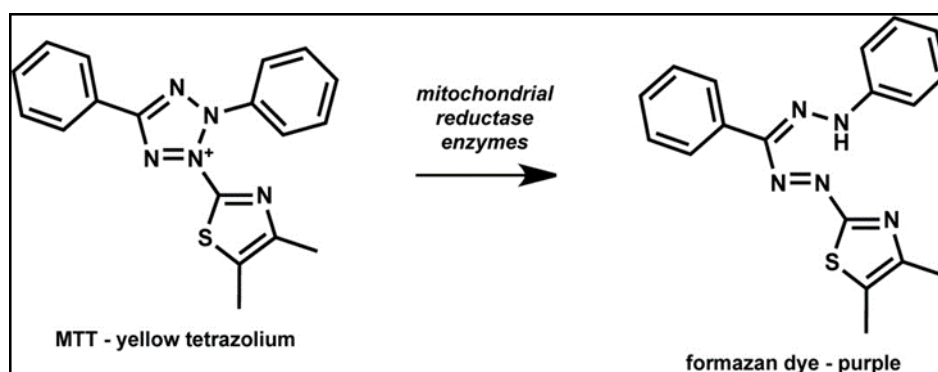
- 2 sec → 60 °C Τελική επιμήκυνση

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 χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο του 18S rRNA. 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)

2.2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MTT

Η MTT Assay είναι μια *in vitro* μέθοδος μέτρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας, στην περίπτωση που μεταβολικά γεγονότα οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση. Αρχικά, έγινε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαδοχικές συγκεντρώσεις κυττάρων Huh7, ώστε να καθοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα. 5000 κύτταρα Huh7/πηγάδι εμβολιάστηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών, σε τρεις επαναλήψεις και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνεια της πλάκας.

Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 0 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂). 10μl της ένωσης τετραζολίου MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) προστέθηκαν στα πηγάδια, έγινε ανακίνηση της πλάκας για να περάσει το αντιδραστήριο στα κύτταρα, και έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στη νορμοξία ή στην υποξία. Το MTT ανάγεται από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα σε αδιάλυτους κρυστάλλους χρώματος ιώδους της χρωστικής φορμαζάνης (Εικόνα 6). Έτσι αφού γίνει η απομάκρυνση του υπερκειμένου, έπειτα σε κάθε πηγάδι προστίθενται 100μl διαλύματος DMSO και γίνεται καλή ανάδευση με πιπετάρισμα για να αποκολληθούν οι κρύσταλλοι της χρωστικής και να διαλυτοποιηθούν ώστε να μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση της χρωστικής χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε απευθείας στα πηγάδια. Τέλος, γίνεται 10 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται φωτομέτρηση στα 650-570 nm. Βέλτιστο μήκος κύματος για την απορρόφηση είναι 570nm, αλλά οποιοδήποτε φίλτρο που απορροφά μεταξύ 550-600nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Ο βαθμός της αναγωγής του τετραζολίου είναι ανάλογος με το βαθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα δεδομένα που προέκυψαν εκφράστηκαν ως ποσοστό της απορρόφησης που μετρήθηκε σε κύτταρα control.



Εικόνα 12: Η αναγωγή του MTT σε έγχρωμους κρυστάλλους της χρωστικής φορμαζάνης.

2.2.11 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.04. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SD). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ και * $p < 0.05$. Η σύγκριση των μέσο όρων έγινε με Unpaired t-test.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έδειξαν ότι ο αναστολέας του πρωτεασώματος βορτεζομίδη μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη LNCap και PC3 (Befani et al., 2012). Προκειμένου να διερευνηθεί η δράση της βορτεζομίδης αλλά και του νέου ειδικού αναστολέα του πρωτεασώματος καρφιλζομίδη στην έκφραση και τη μεταγραφική ενεργότητα τόσο του HIF-1α όσο και του HIF-2α χρησιμοποιήθηκε η καθιερωμένη κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος Huh7, η οποία εκφράζει τον HIF-1α αλλά και τον HIF-2α.

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗ ΣΤΟΥΣ HIF-1α και HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7

Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α και χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος Huh7, τα οποία εκφράζουν τόσο τον HIF-1α όσο και τον HIF-2α. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), και σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), παρουσία ή απουσία βορτεζομίδης ή καρφιλζομίδης (σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τη βιβλιογραφία) για 24h.

Η μελέτη της έκφρασης των HIF-1α/HIF-2α έγινε με ανάλυση των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Οι συγκεντρώσεις των ειδικών αναστολέων του πρωτεασώματος κυμάνθηκαν μεταξύ των 10 - 1000 nM.

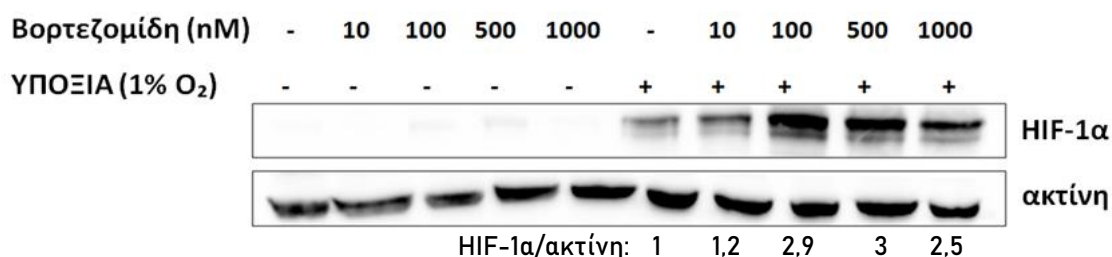
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗΣ

Στη νορμοξία, ο HIF-1α δεν εκφράζεται σε κύτταρα Huh7 και η παρουσία βορτεζομίδης δεν προκάλεσε επαγωγή του HIF-1α σε οποιαδήποτε συγκέντρωση (Εικόνα 13A). Παράλληλα, στις ίδιες συνθήκες παρουσία βορτεζομίδης παρατηρείται να είναι οριακά ανιχνεύσιμος ο HIF-2α στις συγκεντρώσεις 500 και 1000 nM (Εικόνα 13B).

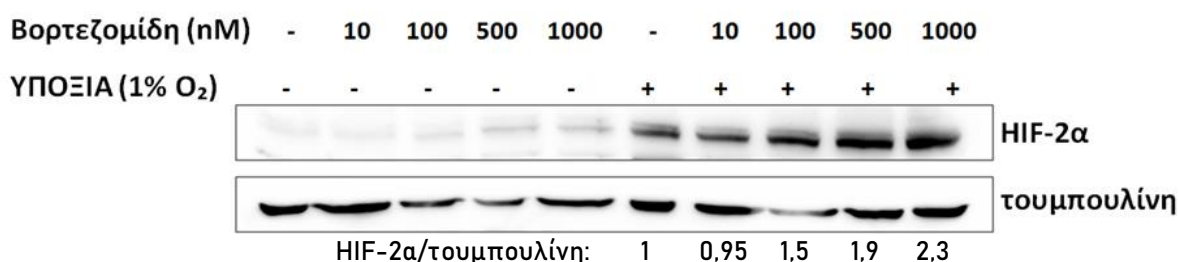
Σε συνθήκες υποξίας, HIF-1α επάγεται στις 24 ώρες και η παρουσία βορτεζομίδης προκαλεί παραπάνω αύξηση της επαγωγής του HIF-2α στην υποξία με μέγιστη επαγωγή στα 100-500 nM (Εικόνα 13A).

Παράλληλα, ο HIF-2α επίσης επάγεται από την υποξία στις 24 ώρες σε κύτταρα Huh7 και η παρουσία βορτεζομίδης προκαλεί μεγαλύτερη επαγωγή σε σχέση με την υποξία απουσία βορτεζομίδης με μέγιστη επαγωγή στα 500-1000 nM.

A



B



Εικόνα 13: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην έκφραση του HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον (A) HIF-1α και την ακτίνη, (B) στον HIF-2α και την τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία Βορτεζομίδης (10, 100, 500 και 1000 nM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αριθμοί κάτω από κάθε διαδρομή είναι οι λόγοι των επιπέδων πρωτεΐνης των HIF-1α/ακτίνης και HIF-2α/τουμπουλίνης, όπως προσδιορίστηκαν μετά από ποσοτικοποίηση και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από δυο ανεξάρτητα πειράματα.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗΣ

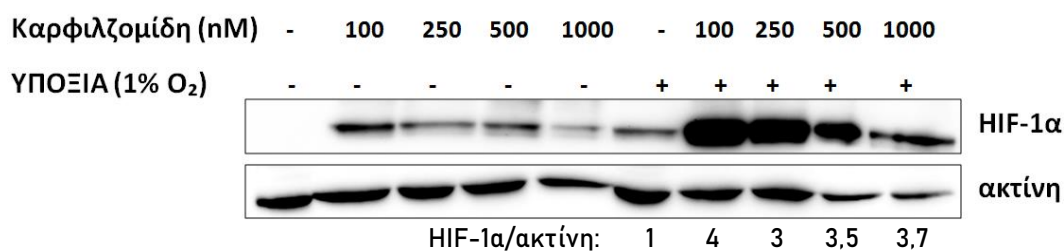
Σε συνθήκες νορμοξίας, παρατηρούμε ότι ο HIF-1α δεν εκφράζεται. Ωστόσο, παρουσία της καρφιλζομίδης επάγεται η έκφραση του HIF-1α σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Κατά παρόμοιο τρόπο, ο HIF-2α επάγεται σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία της καρφιλζομίδης με μέγιστη επαγωγή στη συγκέντρωση 1000 nM.

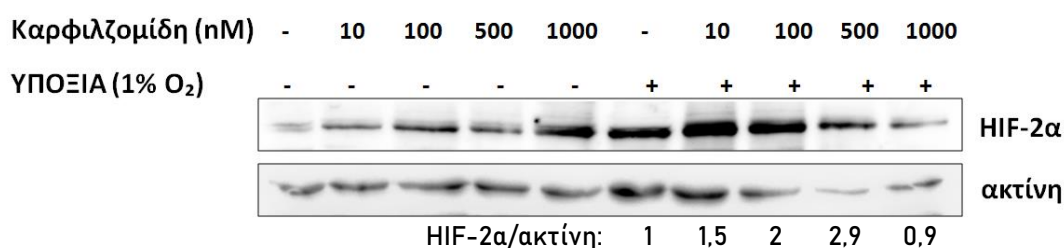
Σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του HIF-1α επάγεται σε σχέση με την νορμοξία απουσία της καρφιλζομίδης. Σε συνθήκες υποξίας παρουσίας καρφιλζομίδης παρατηρείται έντονη αύξηση της έκφρασης του HIF-1α σε σχέση με αυτήν απουσία καρφιλζομίδης. Στη συγκέντρωση 100 και 250 nM φαίνεται εντονότερη επαγωγή της έκφρασης συγκριτικά με αυτή της υποξίας.

Κατά παρόμοιο τρόπο, σε συνθήκες υποξίας παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α απουσία του καρφιλζομίδης. Η επαγωγή αυξάνεται παρουσία του αναστολέα εντονότερα στις συγκεντρώσεις 10 και 100 nM

A



B



Εικόνα 14: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος καρφιλζομίδη στην έκφραση του HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 24 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία καρφιλζομίδης (10, 100, 500 και 1000 nM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αριθμοί κάτω από κάθε διαδρομή είναι οι λόγοι των επιπέδων πρωτεΐνης των HIF-1α/ακτίνης και HIF-2α/ακτίνης, όπως προσδιορίστηκαν μετά από ποσοτικοποίηση και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από δυο ανεξάρτητα πειράματα.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ HIF-1α/HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7

Το επόμενο βήμα εφόσον παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση των ισομορφών HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7, παρουσία ή απουσία των ειδικών αναστολέων του πρωτεασώματος Bortezomib και Carfilzomib, ακολούθησε η διερεύνηση της επίδρασης στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF.

Για να μπορεί να πραγματοποιηθεί επαρκής σύγκριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μεταξύ του HIF-1 και του HIF-2, μελετήθηκαν ειδικά γονίδια στόχοι για την κάθε μια υπομονάδα διακριτά, στα κύτταρα Huh7. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων ήταν η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι το γονίδιο της κινάσης του φωσφογλυκερικού οξέος (PGK-1) επάγεται ειδικά από τον HIF-1, ενώ το γονίδιο του

αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) καθώς και το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO) ρυθμίζονται από τον HIF-2. Η εξειδίκευση των HIF επηρεάζεται από τον κυτταρικό τύπο και για τον λόγο αυτό είχε ήδη πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό Βιοχημείας έλεγχος για το εάν το γονίδιο PGK-1 είναι ειδικός στόχος του HIF-1 και τα γονίδια PAI-1 και EPO είναι ειδικοί στόχοι του HIF-2 στα κύτταρα Huh7 (Befani et al., 2013, Gkotinakou et al., 2019). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό του 18S της ριβοσωμικής υπομονάδας.

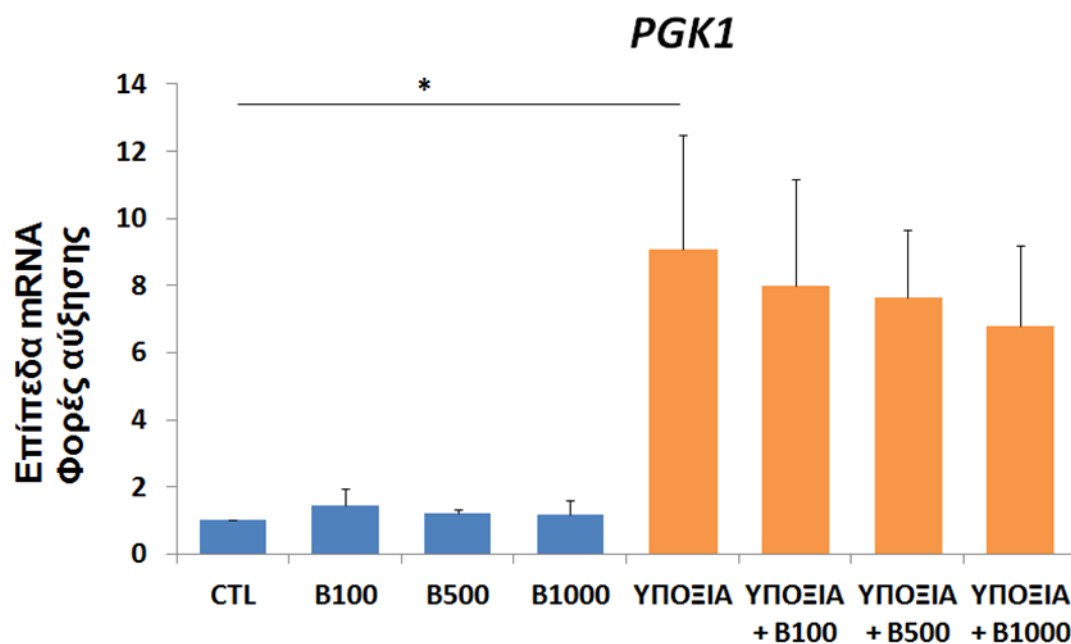
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗΣ

Αρχικά μελετήθηκε η δράση της βορτεζομίδης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και πραγματοποιήθηκε Q-RT-PCR για το ειδικό γονίδιο στόχο του HIF-1, PGK1, σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, παρουσία ή απουσία βορτεζομίδης σε κύτταρα Huh7, σε συγκεντρώσεις 100, 500 και 1000 nM.

Σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία του αναστολέα βορτεζομίδη δεν παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα mRNA του PGK-1 σε σχέση με τη νορμοξία απουσία βορτεζομίδης (control).

Σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα mRNA της PGK-1 αυξήθηκαν κατά 9 φορές περίπου σε σχέση με την νορμοξία, ενώ η παρουσία της βορτεζομίδης δεν μειώνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση των mRNA της PGK-1 παρά μόνο παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης του μέσου όρου των τιμών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 14).

Συνεπώς υπάρχει μόνο μια ένδειξη για τάση αναστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 παρουσία της βορτεζομίδης.

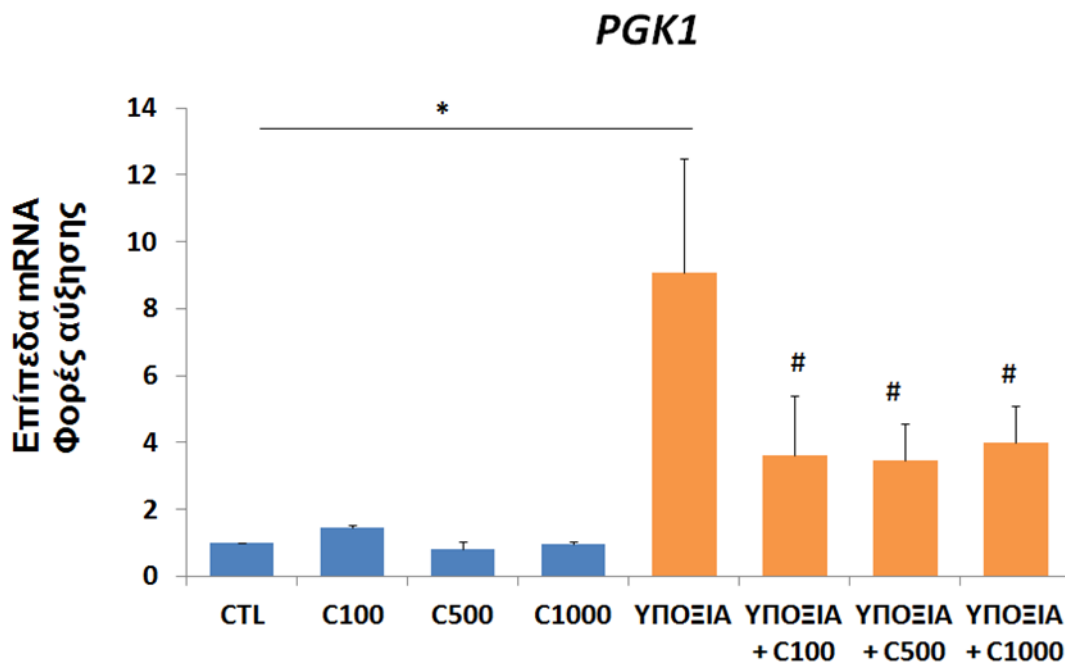


Εικόνα 14: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος βορτεζομίδη στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του PGK1 σε κύτταρα

Huh7 μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας απουσία ή παρουσία βορτεζομίδης (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο ± SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0,05$ ως προς CTL.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗΣ

Αναφορικά με την καρφιλζομίδα, σε συνθήκες νορμοξίας δεν παρατηρείται μεταβολή των επιπέδων mRNA του PGK-1. Σε συνθήκες υποξίας, η επαγόμενη έκφραση των επιπέδων mRNA του PGK-1 και συνεπώς η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μειώνεται στατιστικά σημαντικά παρουσία καρφιλζομίδης σε όλες τις συγκεντρώσεις (100, 500 και 1000 nM) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος Καρφιλζομίδα στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα *Huh7*. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του PGK1 σε κύτταρα *Huh7* μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας απουσία ή παρουσία των Καρφιλζομίδης. (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο ± SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0,05$ και # $p < 0,05$ ως προς τα αντίστοιχα CTL της νορμοξίας και της υποξίας

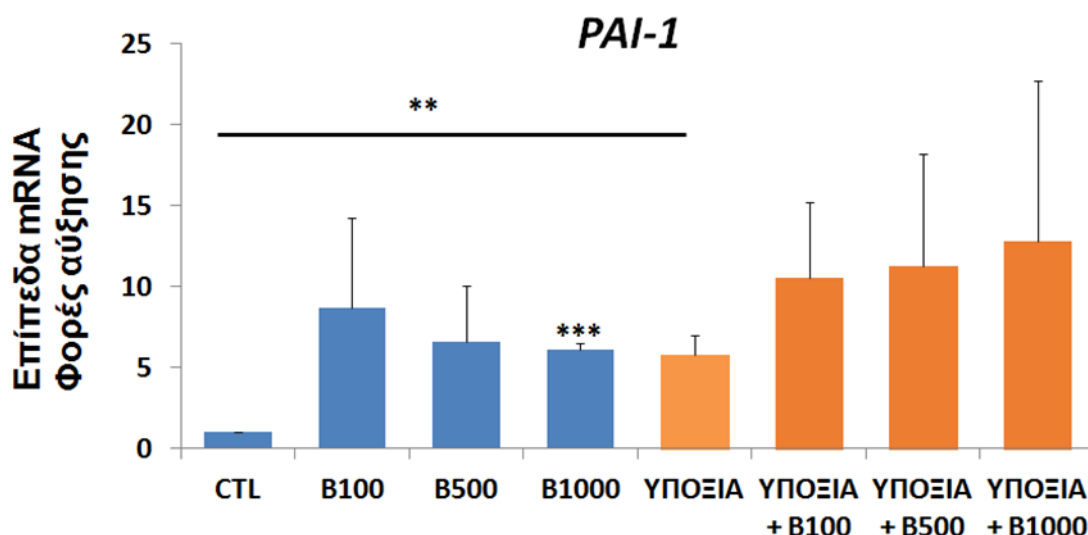
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗΣ

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της βορτεζομίδης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, πραγματοποιήθηκε Q-RT-PCR για το ειδικό γονίδιο στόχο του HIF-2, PAI-1,

σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης σε κύτταρα Huh7, σε συγκεντρώσεις 100, 500 και 1000 nM.

Σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία του αναστολέα της βορτεζομίδης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων mRNA του PAI-1 περίπου 6-7 φορές σε σχέση με το control με στατιστικά σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση των 1000 nM.

Σε συνθήκες υποξίας, παρατηρείται στατιστικά σημαντική επαγωγή των επιπέδων mRNA του PAI-1 περίπου 6 φορές συγκριτικά με την νορμοξία. Η παρουσία της βορτεζομίδης προκάλεσε μια σχετική αύξηση της μέσης τιμής των επιπέδων mRNA του PAI-1 χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 16). Κατά συνέπεια, υπάρχει ένδειξη ότι ο αναστολέας του πρωτεασώματος βορτεζομίδη σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει μια επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 σε συνθήκες νορμοξίας ανάλογη της προκαλούμενης επαγωγής από την υποξία..

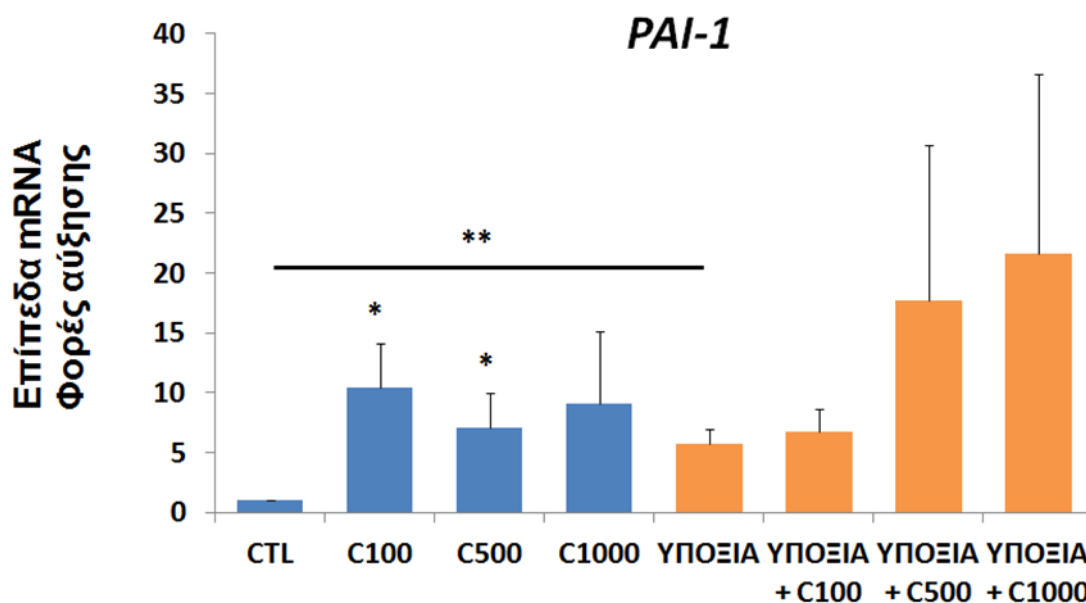


Εικόνα 16: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος βορτεζομίδη στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA PAI-1 σε κύτταρα Huh7 μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας απουσία ή παρουσία βορτεζομίδης (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο \pm SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ ως προς CTL

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗΣ

Μελετώντας τη δράση της καρφιλζομίδης, παρατηρούμε σε συνθήκες νορμοξίας, παρουσία του αναστολέα, αύξηση των επιπέδων mRNA του PAI-1 περίπου 7-10 φορές σε σχέση με το control με στατιστικά σημαντική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των 100 nM και 500 nM.

Σε συνθήκες υποξίας, η παρουσία της καρφιλζομίδης προκάλεσε επίσης αύξηση των επιπέδων mRNA του PAI-1 χωρίς ωστόσο στατιστική σημαντικότητα στις συγκεντρώσεις των 500 nM και 1000 nM (Εικόνα 17). Κατά συνέπεια, παρατηρούμε ότι παρουσία του αναστολέα καρφιλζομίδης προκαλεί επίσης μια τάση επαγωγής της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2.



Εικόνα 17: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος Carfilzomib στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA PAI-1 σε κύτταρα Huh7 μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας απουσία ή παρουσία καρφιλζομίδης (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο ± SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ ως προς CTL.

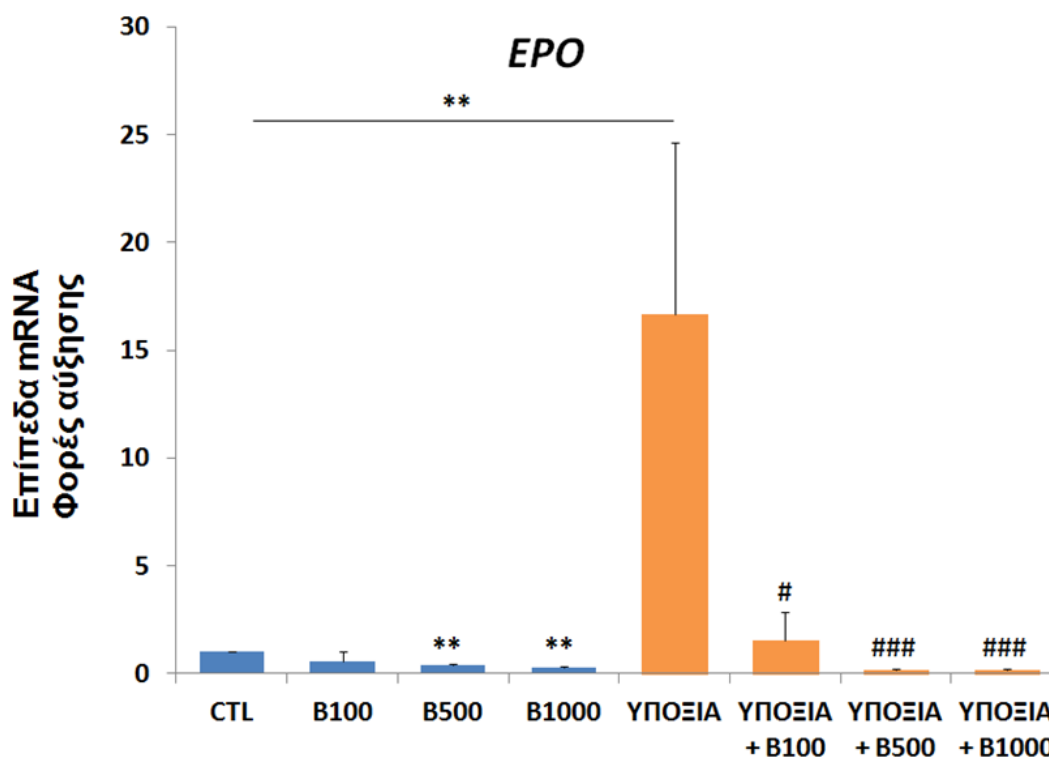
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗΣ

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δράση της βορτεζομίδης και της καρφιλζομίδης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 στα κύτταρα Huh7, ελέγχθηκε η επίδρασή τους στη μεταγραφή και άλλων ειδικών μεταγραφικών στόχων του HIF-2 όπως του EPO. Και πραγματοποιήθηκε Q-RT-PCR σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης ή της καρφιλζομίδης σε κύτταρα Huh7, σε συγκεντρώσεις 100, 500 και 1000 nM.

Σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία του αναστολέα της βορτεζομίδης παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του EPO σε σχέση με το control.

Σε συνθήκες υποξίας, παρατηρείται στατιστικά σημαντική επαγωγή των επιπέδων mRNA του EPO περίπου 16 φορές συγκριτικά με την νορμοξία. Η παρουσία της βορτεζομίδης στην υποξία προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων

mRNA του EPO και στις συγκεντρώσεις 500 και 1000 nM τα επίπεδα mRNA του EPO είναι χαμηλότερα της νορμοξίας. (Εικόνα 18).



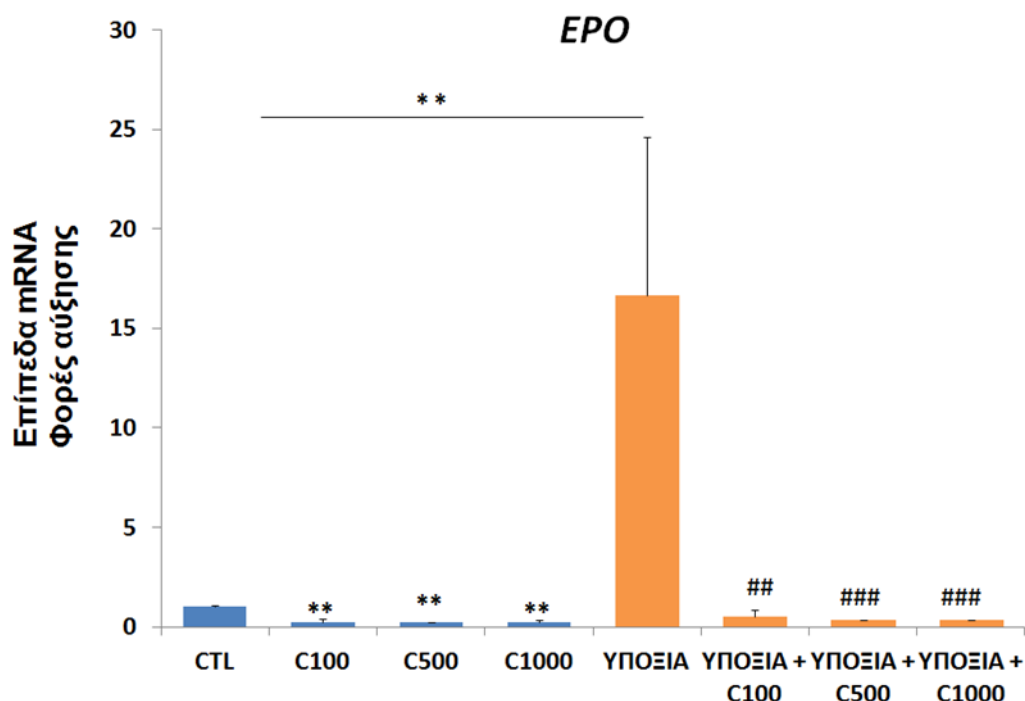
Εικόνα 18: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος *Bortezomib* στη μεταγραφική ενεργότητα του *HIF-2* σε κύτταρα *Huh7*. Μέτρηση των επιπέδων mRNA EPO μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο ± SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ και ως προς τα αντίστοιχα CTL της νορμοξίας και της υποξίας

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗΣ

Αναφορικά με τον αναστολέα του πρωτεασώματος Καρφυλζομίδα, παρατηρούμε ότι στις συνθήκες νορμοξίας η καρφυλζομίδα προκαλεί αναστολή της έκφρασης των επιπέδων mRNA του EPO σε όλες τις συγκεντρώσεις 100, 500 και 1000 nM σε σχέση με το control.

Στις συνθήκες υποξίας, η επαγόμενη έκφραση του mRNA του EPO αναστέλλεται στατιστικά σημαντικά σε όλες τις συγκεντρώσεις καρφυλζομίδης (Εικόνα 19). Συνεπώς, οι αναστολείς του πρωτεασώματος βορτεζομίδα και καρφυλζομίδα παρουσιάζουν

διαφορετική και αντίθετη δράση στη μεταγραφή διαφορετικών ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7.

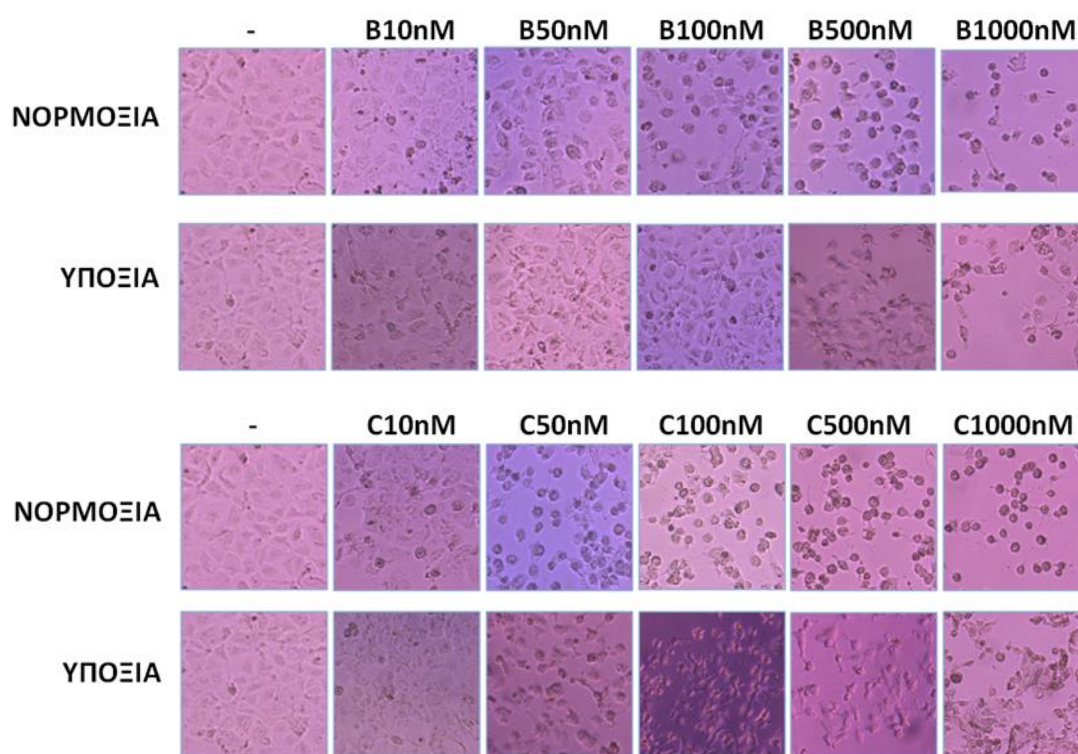


Εικόνα 19: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος καρφιλζομίδη στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA EPO μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Q-RT-PCR) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας απουσία ή παρουσία των καρφιλζομίδη (100, 500 και 1000 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο ± SD τριών τιμών από δύο ανεξάρτητα πειράματα. ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ και ως προς τα αντίστοιχα CTL της νορμοξίας και της υποξίας.

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν εάν οι ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος βορτεζομίδη και καρφιλζομίδη επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των Huh7. Προκειμένου να γίνει προσδιορισμός των συγκεντρώσεων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων για κάθε αναστολέα μεταξύ 10 έως 1000 nM, με ενδιάμεσες συγκεντρώσεις αυτές των 50, 100 και 500 nM.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για 24 ώρες και τα πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 20: Επίδραση των πρωτεασωμικών αναστολέων βορτεζομίδη και καρφιλζομίδη στην μορφολογία των κυττάρων Huh7.

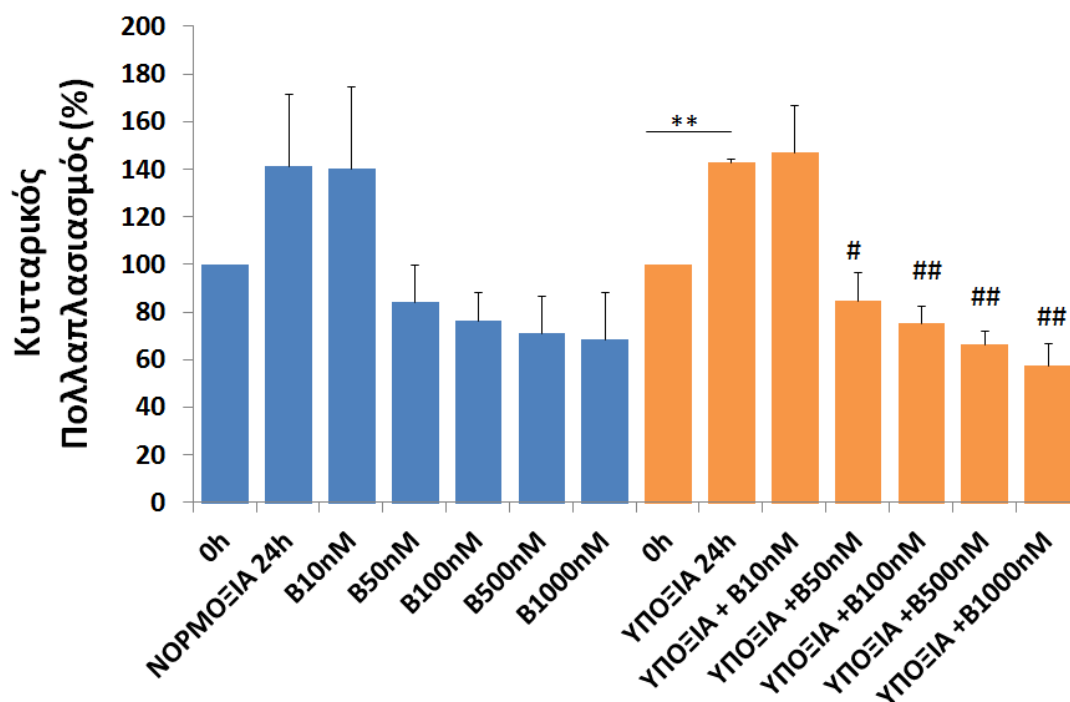
Στις παραπάνω εικόνες της μορφολογίας των κυττάρων Huh7 παρουσία και απουσία των αναστολέων του πρωτεασώματος Βορτεζομίδη και Καρφιλζομίδη, παρατηρούμε ότι παρουσία της Βορτεζομίδης, η μορφολογία διατηρείται σχεδόν αναλλοίωτη έως και τη συγκέντρωση των 50nM, ενώ από τα 100nM και άνω αλλάζει σημαντικά η φυσιολογική κυτταρική μορφή, ιδιαίτερα στη νορμοξία. Παρουσία της καρφιλζομίδης, παρατηρείται εντονότερη αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων Huh7 ήδη από τα 10nM του ειδικού αναστολέα, τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΔΗΣ

Στις συνθήκες της νορμοξίας, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας παρατηρείται ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυξάνεται περίπου κατά 40% χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, παρουσία βορτεζομίδης στις ίδιες συνθήκες, παρατηρείται μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα (δύο ανεξάρτητα πειράματα).

Σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) παρατηρούμε ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων στις 24 ώρες αυξάνει στατιστικά σημαντικά, περίπου 40%, σε σχέση με τις 0 ώρες. Αντίθετα, η παρουσία βορτεζομίδης σε υποξία, μειώνει τον ρυθμό του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού Η μείωση είναι στατιστικά σημαντική από τη συγκέντρωση των 50 nM, ενώ η μείωση γίνεται εντονότερη στις συγκεντρώσεις των 100, 500 και 1000 nM. Σημειώνουμε ότι η συγκέντρωση των 10 nM δεν παρουσιάζει καμία μεταβολή τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας.

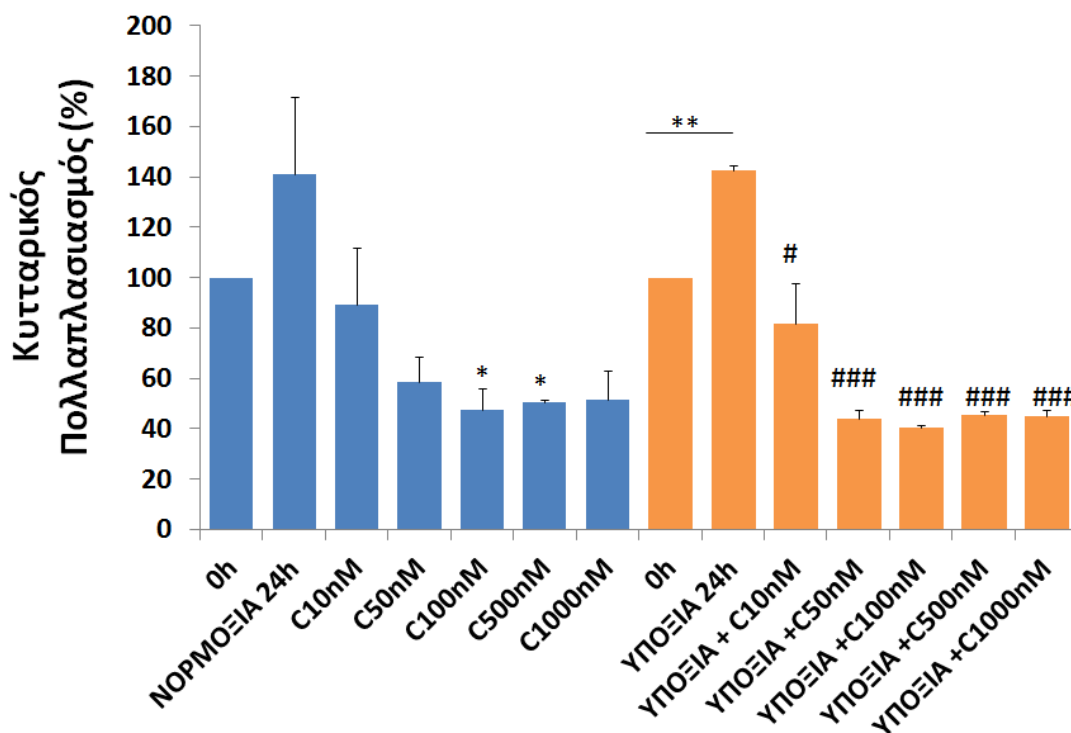


Εικόνα 21: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος Βορτεζομίδη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα Huh7. Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Huh7 με τη μέθοδο MTT μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων βορτεζομιδης (B10, B50, B100, B500 και B1000 Nm) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % ± SD σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (0 h) και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 2 ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν. ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ως προς τα αντίστοιχα CTL της νορμοξίας και της υποξίας

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΔΗΣ

Παρουσία καρφιλζομιδης, φαίνεται μια σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες νορμοξίας παρουσία καρφιλζομιδης παρατηρείται μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη συγκέντρωση 10nM. Η μείωση αυτή εντείνεται στις συγκεντρώσεις των 50, 100, 500 και 1000 nM με στατιστική σημαντικότητα στις συγκεντρώσεις 100 και 500nM.

Σε συνθήκες υποξίας, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία καρφιλζομίδης ήδη από τη συγκέντρωση των 10 nM και εντείνεται στις συγκεντρώσεις των 50, 100, 500 και 1000 nM.



Εικόνα 22: Επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος καρφιλζομίδη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα Huh7. Προσδιορισμός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Huh7 με τη μέθοδο MTT μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων καρφιλζομίδης (C10, C50, C100, C500 και C1000 nM) για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % ± SD σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (0 h) και αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 2 ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν. ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ ως προς τα αντίστοιχα CTL της νορμοξίας και της υποξίας.

Συμπερασματικά και οι δύο αναστολείς μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και διαφαίνεται η δράση του να είναι πιο αποτελεσματική από την συγκέντρωση των 50nM και άνω. Επιπλέον η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την καρφιλζομίδη διαφαίνεται να είναι πιο σημαντική από εκείνη της βορτεζομίδης σε όλες τις συγκεντρώσεις.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κυριότεροι ρυθμιστές της κυτταρικής ομοιοστασίας σε συνθήκες υποξίας είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIF έχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία του κυττάρου, ρυθμίζοντας μεταβολικά μονοπάτια αλλά και διεργασίες όπως είναι η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση, μέσω της επαγωγής της μεταγραφής πληθώρας γονιδίων-στόχων τους. Έτσι το υποξικό στρες, το οποίο γίνεται αντιληπτό από τα κύτταρα, επάγει στοχευμένη γονιδιακή ρύθμιση και μεταβολικό επαναπρογραμματισμό.

Οι δύο πιο καλά μελετημένες ισομορφές είναι αυτές του HIF-1 και HIF-2, των οποίων η HIF-α υπομονάδα υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ άλλων, και του ηπατοκαρκινώματος. Οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α διαφαίνεται να επηρεάζονται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου αλλά και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Έτσι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, τα επίπεδα των πρωτεϊνών των HIF-1α και HIF-2α μειώνονται λόγω αποικοδόμησής τους από το πρωτεάσωμα ενώ σε συνθήκες υποξίας σταθεροποιούνται, μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου διμερίζονται με τον ARNT και ώστε να επάγουν την μεταγραφή ειδικών γονιδίων στόχων τους.

Οι HIF-1 και HIF-2 έχουν κοινά γονίδια στόχους όπως ο VEGF αλλά και ειδικά για τον καθένα. Ο HIF-1 κωδικοποιεί κυρίως για γονίδια των γλυκολυτικών ενζύμων (όπως η PGK-1), ενώ HIF-2α, έχει βρεθεί ότι στοχεύει στη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1).

Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος το οποίο ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες του κυττάρου όπως ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, επιβίωσης, αγγειογένεση μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται και οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες. Έτσι εξαιτίας του σημαντικού ρόλου του στην κυτταρική ομοιοστασία, η αναστολή του έχει καθιερωθεί ως υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Οι συνέπειες της αναστολής αυτής μπορεί να προκαλέσουν από μια απλή τροποποίηση των λειτουργιών του κυττάρου μέχρι και κυτταρικό θάνατο.

Η βορτεζομίδη είναι ο πρώτος ειδικός αναστολέας του πρωτεασώματος ο οποίος έχει εγκριθεί και χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και λέμφωμα και δράση του έχει μελετηθεί σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα διάφορων τύπου καρκίνου. Ενώ η δράση του νεότερου αναστολέα του πρωτεασώματος, η καρφιλζομίδη, η οποία χρησιμοποιείται και αυτή στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, όμως δεν έχει εκτενώς μελετηθεί στους διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων. Γι' αυτό και οι δύο παραπάνω αναστολείς μελετήθηκαν παράλληλα στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Επίσης, η επίδραση της καρφιλζομίδης στους μεταγραφικούς παράγοντες HIF δεν έχει ακόμη διερευνηθεί.

Συνεπώς, στόχος της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της δράσης της βορτεζομίδης και της καρφιλζομίδης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 καθώς και η επίδρασή τους σε συνθήκες υποξίας στην έκφραση και στη δραστικότητα των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων πρωτεασώματος στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου κι σε συνθήκες υποξίας (1%). Έτσι χορηγήθηκαν οι συγκεντρώσεων αυξανόμενες συγκεντρώσεις από 10 έως και 1000nM βορτεζομίδης σε συνθήκες νορμοξίας και τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι δεν προκλήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, σε συνθήκες υποξίας, τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Στις ίδιες συνθήκες, παρουσία της καρφιλζομίδης, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας, για όλες τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις και με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ακόμη, παρατηρείται αλλοίωση στη μορφολογία των κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες, ειδικότερα παρουσία της καρφιλζομίδης, ήδη από χαμηλή συγκέντρωση (10nM).

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η καρφιλζομίδα παρουσιάζει ισχυρότερη δράση αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν οι δύο αναστολείς πρωτεασώματος στοχεύουν και τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι γενικά αποδεκτό ότι ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων Huh7.

Τα αποτελέσματα μας δείξαν ότι χρησιμοποιώντας τον αναστολέα βορτεζομίδα στις συγκεντρώσεις μεταξύ 10 και 1000nM δεν παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του HIF-1α, σε συνθήκες νορμοξίας. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να μην συμβαδίζουν με το αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψη ότι η αναστολή του πρωτεασώματος θα προκαλούσε συσσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α. Ωστόσο, σε συνθήκες υποξίας, όπου είναι γνωστό ότι η έκφραση της HIF-1α υπομονάδας σταθεροποιείται, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων 10, 100, 500 και 1000nM του αναστολέα βορτεζομίδα τα επίπεδα της πρωτεΐνης του αυξήθηκαν. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η δράση της βορτεζομίδης ευνοεί την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α πιο αποτελεσματικά σε συνθήκες υποξίας και πιθανόν οι συνθήκες υποξίας να ενισχύουν τη δράση της βορτεζομίδης ως αναστολέας του πρωτεασώματος.

Στις ίδιες συνθήκες υποξίας, όπου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του HIF-1α παρουσία βορτεζομίδης, ελέγχθηκε εάν ο HIF-1 είναι και μεταγραφικά ενεργός, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα το ειδικό γονίδιο-στόχο του, την κινάση του φωσφογλυκερικού (PGK1) της οποίας και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η παρουσία της βορτεζομίδης δεν ενίσχυσε επιπλέον την προκαλούμενη από την υποξία επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας, συμπεραίνοντας ότι η αύξηση της έκφρασης του HIF-1 στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος από τη βορτεζομίδα δεν προκαλεί και την μεταγραφική ενεργοποίησή του.

Τα μέχρι τώρα, γνωστά στη βιβλιογραφία, αποτελέσματα των μελετών των μηχανισμών της επίδρασης της βορτεζομίδης στα καρκινικά κύτταρα φαίνονται να είναι αντιφατικά. Σε κάποιες καρκινικές κυτταρικές σειρές, έδειξαν ότι η βορτεζομίδα ενισχύει τη σύνδεση της FIH με τον HIF-1α εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον p300 και άρα προκαλώντας την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. (Shin, DH et al., 2008). Ωστόσο, σε άλλες κυτταρικές σειρές όπως του καρκίνου του μαστού, οστεοσαρκώματος και γλοιώματος βρέθηκε ότι η βορτεζομίδα αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω αναστολής της C-TAD περιοχής χωρίς να επηρεάζεται η σύνδεση του HIF-1 με τον συμπαράγοντα της μεταγραφής p300 (Kaluz, S et al., 2006, Birle, DC and Hedley, DW 2007). Ενώ αποτελέσματα της ομάδας μας σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη έδειξαν ότι η βορτεζομίδα που επιδρούν στην θετική μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης της βορτεζομίδης και έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τόσο την έκφραση όσο και τη δραστηριότητα του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη αναστέλλοντας το μονοπάτι της PI3K/Akt και των p42/p44, αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η βορτεζομίδα φαίνεται να έχει διαφορετική δράση στον HIF-1α ανάλογα με το είδος του κυττάρου.

Από τη βιβλιογραφία είναι ευρέως γνωστό ότι όπως ο HIF-1α, έτσι και ο HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της βορτεζομίδης στην έκφραση του HIF-2α, όπου και παρατηρήθηκε ότι μόνο η μεγαλύτερη συγκέντρωσή της (1000nM) προκάλεσε αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-2α όμοια με αυτή που προκάλεσε η υποξία από μόνη της. Σε συνθήκες υποξίας, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας HIF-2α αυξάνονται και φαίνεται να παραμένουν σταθερά παρουσία όλων των συγκεντρώσεων της βορτεζομίδης, όπως θα αναμενόταν να προκαλεί η παρουσία ενός αναστολέα πρωτεασώματος.

Στη συνέχεια θέλοντας να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α, χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες ειδικά γονίδια-στόχοι του, το γονίδιο του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) και το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε συνθήκες νορμοξίας δείχνουν αύξηση των επιπέδων mRNA του PAI-1, ειδικά στη συγκέντρωση των 1000nM της βορτεζομίδης ενώ σε συνθήκες υποξίας, τα επίπεδα mRNA του PAI-1 παραμένουν αμετάβλητα. Ωστόσο, η μελέτη του 2ου γονιδίου-στόχου, της ερυθροποιητίνης, έδειξε καταστολή της έκφρασής της, τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία. Τα παρατηρούμενα αντίθετα αποτελέσματα μεταξύ των δύο γονιδίων-στόχων του HIF-2α, PAI-1 και EPO, υποδεικνύουν ότι πιθανόν η βορτεζομίδα να εμπλέκεται και να ρυθμίζει μέσω της δράσης της στο πρωτεάσωμα τους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής των δύο παραπάνω γονιδίων. Οι μηχανισμοί αυτοί χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης των HIF παρουσία της καρφιλζομίδης στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, έδειξαν αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης του HIF-1α τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας. Ωστόσο η αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-1α παρουσία της καρφιλζομίδης δεν προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α, αλλά μείωση. Συμπεραίνουμε ότι η αύξηση των επιπέδων του HIF-1α που προκαλείται από τη καρφιλζομίδα δεν επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητά του σε

συνθήκες νορμοξίας, ενώ σε συνθήκες υποξίας προκαλείται μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν δεδομένα για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία και επιπλέον πειράματα θα μπορέσουν να αναδείξουν τον μοριακό μηχανισμό δράσης της στον HIF-1.

Όσον αφορά τη δράση της καρφιλζομίδης στην έκφραση του HIF-2α, παρατηρήσαμε μια αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας. Σε συνθήκες υποξίας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως η πρωτεΐνη του HIF-2α αυξάνεται, ωστόσο στη συνέχεια μειώνεται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της καρφιλζομίδης. Τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης της επίδρασης της καρφιλζομίδης στη μεταγραφική του PAI-1 έδειξαν, σε συνθήκες νορμοξίας, αύξηση των επιπέδων του mRNA PAI-1. Η αύξηση αυτή πιθανόν να συνδέεται με την επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α, στις ίδιες συνθήκες. Σε συνθήκες υποξίας, παρουσία της καρφιλζομίδης, τα επίπεδα mRNA του PAI-1 δεν μεταβάλλονται, παρά τα μειωμένα επίπεδα του HIF-2α, στις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της EPO παρατηρείται να ρυθμίζονται διαφορετικά, καθώς τόσο στην νορμοξία όσο και στην υποξία μειώνονται σημαντικά, υποδεικνύοντας καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α, όπως συνέβη και παρουσία της βορτεζομίδης. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα της δράσης της καρφιλζομίδης σε σχέση με τον HIF-2 και τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αναστολέων της βορτεζομίδης και της καρφιλζομίδης.

Η διπλωματική παρουσιάζει νέα δεδομένα όσον αφορά τη δράση της βορτεζομίδης και της καρφιλζομίδης στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος Huh7. Αναδεικνύεται η ανασταλτική δράση των αναστολέων του πρωτεασώματος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την εμπλοκή τους στους πολύπλοκους μηχανισμούς ρύθμισης των HIF. Βρέθηκε επίσης ότι και οι δύο αναστολείς πρωτεασώματος επηρεάζουν διαφορετικά δύο ειδικά γονίδια-στόχους του HIF-2, επάγοντας τον PAI-1 και αναστέλλοντας την EPO. Επιπλέον για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία δείχνουμε ότι η καρφιλζομίδα έχει πιο έντονη δράση από τη βορτεζομίδα στη ρύθμιση της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

Όλα τα παραπάνω ωστόσο χρήζουν περισσότερης διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους οι αναστολείς του πρωτεασώματος βορτεζομίδα και καρφιλζομίδα επιδρούν στους μεταγραφικούς παράγοντες HIF και στην κυτταρική ομοιοστασία των κυττάρων του ηπατοκαρκινώματος Huh7.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J., & Kim, K. W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.068>
- Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2007, July 31). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, Vol. 581, pp. 3582–3591. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>
- Cassavaugh, J., & Lounsbury, K. M. (2011). Hypoxia-mediated biological control. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 735–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.22956>
- Cavadas, M. A. S., Cheong, A., & Taylor, C. T. (2017). The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Experimental Cell Research*, 356(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.024>
- Chen, C., & Lou, T. (2017). Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(28), 46691–46703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17358>
- 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* *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244780>
- Fajersztajn, L., & Veras, M. M. (2017, October 16). Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Research*, Vol. 109, pp. 1377–1385. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1142>
- Gkotiakou, I.-M., Befani, C., Simos, G., & Liakos, P. (2019). *ERK1/2 phosphorylates HIF-2 α and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling*. <https://doi.org/10.1242/jcs.225698>
- Hansen, A. E., Kristensen, A. T., Law, I., Jørgensen, J. T., & Engelholm, S. A. (2011). Hypoxia-inducible factors - regulation, role and comparative aspects in tumorigenesis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(1), 16–37. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00233.x>
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003>
- Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell Science*, 123(17), 2976–2986. <https://doi.org/10.1242/jcs.068122>
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (n.d.). *HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression*.
- Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (n.d.). *Proteasome inhibitors-molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12279>
- Lafleur, V. N., Richard, S., & Richard, D. E. (2014). *Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. 25*.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0423>

- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W. (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular Cell*, *38*(6), 864–878. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.023>
- Michiels, C. (2004). Physiological and pathological responses to hypoxia. *American Journal of Pathology*, Vol. 164, pp. 1875–1882. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63747-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9)
- Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1α by MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(41), 27620–27627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803081200>
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., ... Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1α. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(44), 33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200>
- Palazon, A., Goldrath, A., Nizet, V., & Johnson, R. S. (n.d.). *HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
- Pugh, C. W. (2016). Modulation of the hypoxic response. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 903, pp. 259–271). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_18
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2005, December 9). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 338, pp. 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.111>
- Schumacker, P. T. (2005). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Critical Care Medicine*, *33*(12 SUPPL.), 10–12. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000191716.38566.E0>
- Semenza, G. L. (2012). *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy Hypoxia and cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005>
- Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., & Yamamoto, M. (2017). Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Experimental Cell Research*, *356*(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.013>
- 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 and Development*, *12*(21), 3320–3324. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3320>
- Van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S., & Vertegaal, A. C. O. (n.d.). *RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2α*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1157>
- WIESENER, M. S., JÜRGENSEN, J. S., ROSENBERGER, C., SCHOLZE, C. K., HÖRSTRUP, J. H., WARNECKE, C., ... ECKARDT, K.-U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*, *17*(2), 271–273. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0445fje>

Jochmanová, I., Yang, C., Zhuang, Z., & Pacak, K. (2013, September 4). Hypoxia-inducible factor signaling in pheochromocytoma: Turning the rudder in the right direction. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 105, pp. 1270–1283. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt201>

FAQs - Hypoxia and HIFs. (2014) Retrieved February 2, 2020, from <https://www.novusbio.com/support/hypoxia-and-hif-faqs>

Chen, C., & Lou, T. (2017). Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(28), 46691–46703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17358>

Borsi, E., Terragna, C., Brioli, A., Tacchetti, P., Martello, M., & Cavo, M. (2015, June 1). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factor 1 alpha in multiple myeloma. *Translational Research*, Vol. 165, pp. 641–650. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.12.001>

Yeo, E.-J. (n.d.). Hypoxia and aging. *Experimental & Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>

Gajate, P., Alonso-Gordoa, T., Martínez-Sáez, O., Molina-Cerrillo, J., & Grande, E. (2018, May 1). Prognostic and predictive role of the PI3K–AKT–mTOR pathway in neuroendocrine neoplasms. *Clinical and Translational Oncology*, Vol. 20, pp. 561–569. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1758-3>

(17) (PDF) Subcellular localization of hypoxia-inducible factors and HIF regulatory hydroxylases in rat liver. (n.d.). Retrieved February 2, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/277129432_Subcellular_localization_of_hypoxia-inducible_factors_and_HIF_regulatory_hydroxylases_in_rat_liver

Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015, July 1). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, Vol. 20, pp. 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>

Kikuchi, J., Shibayama, N., Yamada, S., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., ... Furukawa, Y. (2013). Homopiperazine Derivatives as a Novel Class of Proteasome Inhibitors with a Unique Mode of Proteasome Binding. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060649>

Groll, M., Berkers, C. R., Ploegh, H. L., & Ovaa, H. (2006). Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure*, 14(3), 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.11.019>

Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (n.d.). Proteasome inhibitors-molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12279>

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy Hypoxia and cancer. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005>

Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., & Yamamoto, M. (2017). Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Experimental Cell Research*, 356(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.013>

- Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell Science*, 123(17), 2976–2986. <https://doi.org/10.1242/jcs.068122>
- Gkotinakou, I.-M., Befani, C., Simos, G., & Liakos, P. (2019). ERK1/2 phosphorylates HIF-2 α and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling. <https://doi.org/10.1242/jcs.225698>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27620–27627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803081200>
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., ... Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200>
- Van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S., & Vertegaal, A. C. O. (n.d.). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α . <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1157>
- Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J., & Kim, K. W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.068>
- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W. (2010). Sirtuin1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular Cell*, 38(6), 864–878. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.023>
- 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 *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244780>
- Hansen, A. E., Kristensen, A. T., Law, I., Jørgensen, J. T., & Engelholm, S. A. (2011). Hypoxia-inducible factors - regulation, role and comparative aspects in tumorigenesis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(1), 16–37. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00233.x>
- Palazon, A., Goldrath, A., Nizet, V., & Johnson, R. S. (n.d.). HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
- Takeda, N., O’dea, E. L., Doedens, A., Kim, J.-W., Weidemann, A., Stockmann, C., ... Johnson, R. S. (n.d.). Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. <https://doi.org/10.1101/gad>
- Palazon, A., Goldrath, A., Nizet, V., & Johnson, R. S. (n.d.). HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
- Koyasu, S., Kobayashi, M., Goto, Y., Hiraoka, M., & Harada, H. (2018). Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity : Two decades of knowledge. (December 2017), 560–571. <https://doi.org/10.1111/cas.13483>

- Lafleur, V. N., Richard, S., & Richard, D. E. (2014). Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. 25. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0423>
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2005, December 9). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 338, pp. 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.111>
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2005, December 9). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 338, pp. 617–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.111>
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (n.d.). Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003>
- 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 and Development*, 12(21), 3320–3324. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3320>
- WIESENER, M. S., JÜRGENSEN, J. S., ROSENBERGER, C., SCHOLZE, C. K., HÖRSTRUP, J. H., WARNECKE, C., ... ECKARDT, K.-U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*, 17(2), 271–273. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0445fje>
- Flamme, I., Fröhlich, 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 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of Development*, 63(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(97\)00674-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00674-6)
- Schumacker, P. T. (2005). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Critical Care Medicine*, 33(12 SUPPL.), 10–12. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000191716.38566.E0>
- Déry, M. A. C., Michaud, M. D., & Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 37, pp. 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.08.012>
- Cassavaugh, J., & Lounsbury, K. M. (2011). Hypoxia-mediated biological control. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 735–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.22956>
- Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., & Yamamoto, M. (2017). Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Experimental Cell Research*, 356(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.013>
- Pugh, C. W. (2016). Modulation of the hypoxic response. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 903, pp. 259–271). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_18

- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (n.d.). Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>
- Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2007, July 31). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, Vol. 581, pp. 3582–3591. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018>
- Fajersztajn, L., & Veras, M. M. (2017, October 16). Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Research*, Vol. 109, pp. 1377–1385. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1142>
- Cavadas, M. A. S., Cheong, A., & Taylor, C. T. (2017). The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Experimental Cell Research*, 356(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.024>
- Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, 27(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003>
- Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M., Vasselli, J. R., Riss, J., Maranchie, J. K., ... Barrett, J. C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. [Erratum appears in *J Cell Biochem*. 2004 Oct 15;93(3):639]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(3), 491–501. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=15156561>
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nature Medicine*, Vol. 9, pp. 677–684. <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>
- Pugh, C. W. (2016). Modulation of the hypoxic response. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 903, pp. 259–271). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_18
- Crawford, L. J., Walker, B., & Irvine, A. E. (n.d.). Proteasome inhibitors in cancer therapy. <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0121-7>
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (n.d.). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (n.d.). Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress.
- Frankland-Searby, S., & Bhaumik, S. R. (2011). The 26S Proteasome Complex: An Attractive Target for Cancer Therapy. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.003>
- Chen, C., & Lou, T. (2017). Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(28), 46691–46703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17358>
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>
- Michiels, C. (2004). Physiological and pathological responses to hypoxia. *American Journal of Pathology*, Vol. 164, pp. 1875–1882. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63747-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63747-9)

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>