



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ Μεταβολισμός των λιπιδίων στην
υποξία και στον καρκίνο:
ο ρόλος της οικογένειας των
ακυλοτρανσφερασών της 3-φωσφορικής
ακυλογλυκερόλης (1-Acylglycerol-3-
Phosphate O-Acyltransferases, AGPATs)”**

Κωνσταντίνα Παρασκευά του Παρασκευά

Λάρισα
Φεβρουάριος, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY



DIPLOMA PROJECT

“Lipid metabolism in hypoxia and cancer: the role of 1-Acylglycerol-3-Phosphate O- Acyltransferases (AGPATs)”

Konstantina Paraskeva

Larissa
February, 2021

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ευφροσύνη Παρασκευά, Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας
Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Άννα Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κυρία Παρασκευά Ευφροσύνη, Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την υποστήριξη, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω προς την Καραγιώτα Αγγελική, μεταδιδάχτορα του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την καθοδήγηση της οποίας πραγματοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της πτυχιακής μου. Ευχαριστώ επίσης θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Άννα Μαρία Ψαρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τον χρόνο που διάθεσαν για την παρακολούθηση και την ανάγνωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας για την βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
SUMMARY	9
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
A.1 Η προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία και οι επαγόμενοι από την υποξία παραγόντες (Hypoxia Inducible Factors, HIFs).....	10
A.1.1 Δομή των παραγόντων HIF	11
A.1.3 Η ρύθμιση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α	11
A.1.3.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α HIF-1α και HIF-2α	11
A.1.3.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α	13
A.1.4 Γονίδια-στοχοί των HIFs και λειτουργίες που επηρεάζουν.....	14
A.1.4.1 Επίδραση του HIF-1 στο μεταβολισμό των λιπιδίων	14
A.2 Η οικογένεια των AGPAT και ο ρόλος τους στον καρκίνο	15
A.2.1 Μονοπάτι βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων (TGs).....	15
A.2.2 Η οικογένεια των AGPAT	17
A.2.2.1 Υποστρώματα, υποκυτταρικός εντοπισμός και ιστοειδική έκφραση των ισομορφών AGPAT	17
A.2.3 Ο ρόλος των AGPAT σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες	19
A.2.3.1 Ο ρόλος και η ρύθμιση της έκφρασης των AGPAT στον καρκίνο και στην υποξία.....	20
A.2.4 Επίδραση της υποξίας στην έκφραση των AGPAT	21
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ	23
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
B.1 ΥΛΙΚΑ	24
B.1.1 Κυτταρικές Σειρές	24
B.1.2 Βακτηριακά Στελέχη	24
B.1.3 Πλασμιδιακοί Φορείς	24
B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	26
B.2.1 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με θερμικό σοκ	26
B.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	26
B.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων	27
B.2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	27
B.2.5 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	28
B.2.6 Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης	28
B.2.7 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης	28
B.2.8 Αντίδραση λιγάσης	29
B.2.9 Κυτταροκαλλιέργειες.....	29
B.2.9.1 Καλλιέργεια κυττάρων	29
B.2.9.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων	29
B.2.9.3 Παροδική διαμόλυση των κυττάρων HEK293	30

B.2.10 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας με χρήση του γονιδίου της λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς (Δοκιμασία λουσιφεράσης)	30
B.2.11 Στατιστική ανάλυση.....	31
B.2.12 Βιοπληροφορική Ανάλυση	31
B.2.12.1 Ανάλυση προφίλ γονιδιακής έκφρασης	31
B.2.12.2 Ανάλυση επιβίωσης	31
B.2.12.3 Ανάλυση συσχέτισης	31
Γ. Αποτελέσματα	35
Γ.1 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου <i>AGPAT4</i>	35
Γ.1.1 Υποκλωνοποίηση του υποκινητή των γονιδίων <i>AGPAT4</i> και <i>AGPAT2</i> στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-promoter	35
Γ.1.2 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας της λουσιφεράσης	42
Γ.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>AGPAT</i> με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής πλατφόρμας GEPIA2	42
Γ.2.1 Ανάλυση <i>AGPAT1</i> με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2.....	43
Γ.2.1.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης	43
Γ.2.1.2 Ανάλυση Επιβίωσης	44
Γ.2.1.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του <i>AGPAT1</i> και γονιδίων δεικτών της υποξίας	45
Γ.2.2 Ανάλυση <i>AGPAT2</i> με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2.....	47
Γ.2.2.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης	47
Γ.2.2.2 Ανάλυση Επιβίωσης	48
Γ.2.2.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του <i>AGPAT2</i> και γονιδίων δεικτών της υποξίας	48
Γ.2.3 Ανάλυση <i>AGPAT3</i> με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2	50
Γ.2.3.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης	50
Γ.2.3.2 Ανάλυση Επιβίωσης	50
Γ.2.3.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του <i>AGPAT3</i> και γονιδίων δεικτών της υποξίας	51
Γ.2.4 Ανάλυση <i>AGPAT4</i> με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2	53
Γ.2.4.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης	53
Γ.2.4.2 Ανάλυση Επιβίωσης	53
Γ.2.4.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του <i>AGPAT4</i> και γονιδίων δεικτών της υποξίας	53
Γ.2.5 Ανάλυση <i>AGPAT5</i> με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2	57
Γ.2.5.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης	57
Γ.2.5.2 Ανάλυση Επιβίωσης	58
Γ.2.5.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του <i>AGPAT5</i> και γονιδίων δεικτών της υποξίας	58
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρκινικά κύτταρα στους στερεούς όγκους, εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία). Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors - HIFs), προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό μικροπεριβάλλον του όγκου, μέσω της μεταγραφής των γονιδίων, τα οποία ρυθμίζουν, μεταξύ άλλων, τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Ανάμεσα στα γονίδια-στόχους του HIF-1 που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, είναι η ακυλοτρανσφεράση-2 της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης (1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2, AGPAT2). Η AGPAT2 ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων AGPAT1-5, που καταλύουν την μετατροπή του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) σε φωσφατιδικό οξύ (PA), στην οδό βιοσύνθεσης τριακυλογλυκερολών (TAGs). Εκτός από την AGPAT2, η έκφραση της AGPAT4, ενός ακόμη ενζύμου της οικογένειας των AGPAT, αυξάνεται επίσης σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των ισομορφών AGPAT σχετίζεται με την πρόγνωση και έκβαση διαφόρων τύπων καρκίνου.

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή, μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση της υποξίας στη έκφραση του γονιδίου AGPAT4. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση τμήματος υποκινητή του γονιδίου της AGPAT4 στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-promoter, διαμόλυνση HEK293 κυττάρων με το πλασμίδιο pGL3-prom AGPAT4 και μέτρηση της δράσης του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράση, σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Σε συνθήκες υποξίας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δράσης λουσιφεράσης σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την κατασκευή που έφερε τον υποκινητή της AGPAT4, σε σχέση με τη νορμοξία. Ωστόσο, παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που έφεραν τον πλασμιδιακό φορέα pGL3-promoter. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, δεν είναι δυνατό να διευκρινιστεί αν το συγκεκριμένο τμήμα του υποκινητή της AGPAT4 μεσολαβεί την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου AGPAT4 σε συνθήκες υποξίας.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων από δημόσιες τράπεζες πληροφοριών, ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων AGPAT σε διάφορους τύπους καρκίνου, καθώς και η συσχέτιση τους με τους παράγοντες HIF και με την επιβίωση των ασθενών. Από την παραπάνω ανάλυση, προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης των AGPAT, σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου. Επίσης, φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των AGPAT, με την έκφραση των HIF1α ή/και HIF2α, αλλά και με την έκφραση γονιδίων στόχων τους. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σημασία των AGPAT ως πιθανών προγνωστικών δεικτών ή θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

SUMMARY

Cancer cells in solid tumors are exposed to low oxygen concentrations (hypoxia). Hypoxia Inducible Factors (HIFs) promote the survival and proliferation of cancer cells in the hypoxic tumor microenvironment, by the transcription of genes that regulate, several procedures, including lipid metabolism. One of the HIF-1 target genes involved in lipid metabolism, is 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2 (AGPAT2). AGPAT2 belongs to the AGPAT1-5 family of enzymes, which catalyze the conversion of lysophosphatidic acid (LPA) to phosphatidic acid (PA), in the triacylglycerol (TAG) biosynthesis pathway. In addition to AGPAT2, the expression of AGPAT4, another AGPAT family member, also increases under hypoxia. Moreover, several studies have shown that the expression of the AGPAT isoforms is related with the prognosis and outcome of various types of cancer.

In the present study, the effect of hypoxia on AGPAT4 gene expression was further studied. Specifically, a region of the AGPAT4 gene promoter was subcloned to pGL3-promoter vector. The construct, plasmid pGL3-prom AGPAT4, was used to transfect HEK293 cells and measure the activity of the luciferase reporter gene, under normoxic or hypoxic conditions. In cells transfected with the plasmid pGL3-prom AGPAT4, luciferase activity was increased significantly under hypoxic conditions. However, a similar increase was observed in cells carrying the plasmid vector pGL3-promoter. Based on these results, it is not possible to determine whether this part of the AGPAT4 promoter mediates the increase in the transcription of the AGPAT4 gene under hypoxic conditions.

At the same time, a bioinformatics analysis was to study the expression level of AGPAT genes in various types of cancer, as well as their association with HIF factors and patient survival. The findings show that the expression levels of AGPATs are related to the survival of patients in various types of cancer. In addition, there is a positive correlation between the expression of AGPATs, and the expression of HIF1 α and / or HIF2 α , but also with the expression of their target genes. These findings confirm the importance of AGPATs as potential prognostic markers or therapeutic targets for cancer treatment.

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Η προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία και οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors, HIFs)

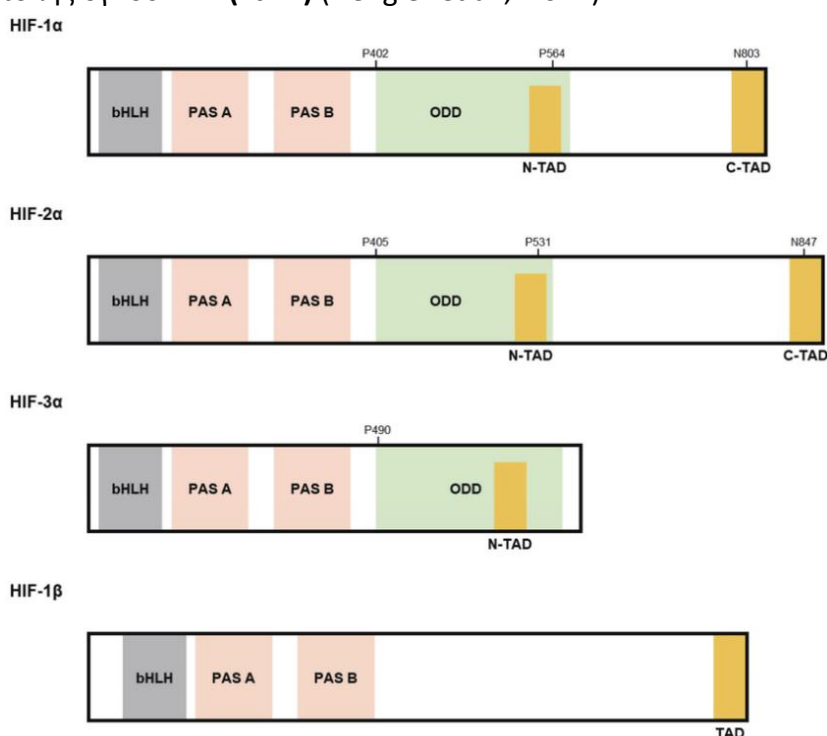
Η υποξία ορίζεται ως η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου κάτω από τα φυσιολογικά πλαίσια σε επίπεδο κυττάρου ή ιστού. Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ισοροπίας μεταξύ παροχής οξυγόνου και των μεταβολικών απαιτήσεων ενός οργανισμού και εμφανίζεται τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως είναι η έντονη σωματική άσκηση ή η παραμονή σε μεγάλο υψόμετρο, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου και των πνευμονικών παθήσεων. Προκειμένου να επιβιώσουν τα κύτταρα κάτω από μειωμένη παροχή οξυγόνου, έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς. Ένας μηχανισμός είναι, η ενεργοποίηση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (Hypoxia Inducible Factors, HIFs).

Οι HIF είναι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούνται από μια άλφα υπομονάδα, η σταθεροποίηση της οποίας ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση οξυγόνου και μια βήτα υπομονάδα, η οποία εκφράζεται συνεχώς. Είναι μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων bHLH – PAS (basic Helix-Loop-Helix - Per-ARNT-Sim). Υπάρχουν τρεις ισομορφές για την άλφα υπομονάδα (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) και μία βήτα υπομονάδα (HIF-1β ή ARNT) (Dengler et al., 2014). Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέων και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και ιστούς. Ο HIF-2α (ονομάζεται επίσης EPAS1), αποτελείται από 870 αμινοξέα, η έκφραση του σε ιστούς είναι περιορισμένη και ιδιαίτερα άφθονη στα αιμοφόρα αγγεία (Keith et al., 2011). Ο HIF-3α, είναι η λιγότερο μελετημένη ισομορφή HIF-α, έχει ιστοειδική έκφραση και υπάρχει σε πολλά εναλλακτικά μετάγραφα ματίσματος (Ravenna et al., 2016). Ο HIF-β (ARNT) είναι μια πρωτεΐνη 789 αμινοξέων. Ο ARNT, εκτός από τη δράση του στην οδό των HIF σε συνθήκες υποξίας, διαδραματίζει βασικό ρόλο στην οδό του υποδοχέα AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Mandl et al., 2014).

Σε συνθήκες υποξίας το ετεροδιμερές σύμπλοκο HIF-α/ARNT, συνδέεται σε αλληλουχίες DNA που φέρουν την ακολουθία 5'-A/G CGTG-3', και ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HRE). Στοιχεία HRE βρίσκονται τόσο σε περιοχές υποκινητών όσο και ενισχυτών γονιδίων που αποτελούν γονίδια-στόχους των HIF και προάγουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής τους (Wigerup et al., 2016). Τα γονίδια που επάγουν οι HIF, είναι υπεύθυνα για την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Ρυθμίζουν διεργασίες όπως η αγγειογένεση και η παραγωγή ερυθροκυττάρων, ενισχύοντας την πρόσληψη και τη μεταφορά οξυγόνου. Ακόμη μεσολαβούν τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου (Semenza et al., 2012).

A.1.1 Δομή των παραγόντων HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF παρουσιάζουν δομικά συντηρημένες επικράτειες. Τόσο οι HIF-α όσο και ο HIF-β περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο την περιοχή bHLH (basic helix-loop-helix), μέσω της οποίας δεσμεύονται στον DNA και δύο περιοχές PAS (PAS-A, PAS-B), που είναι απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό τους. Στο καρβοξυτελικό τους άκρο, οι HIF-1α και HIF-2α διαθέτουν τις περιοχές N-TAD και C-TAD (Transactivation Domains), ενώ ο HIF-3α έχει μόνο την N-TAD. Οι περιοχές TAD είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που εξαρτάται από τους HIF, αφού σε αυτές δεσμεύονται συμπαράγοντες της μεταγραφής. Επίσης οι HIF-α διαθέτουν τη περιοχή ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain), η οποία δρα ως θέση αναγνώρισης για την πρωτεΐνη καταστολής όγκου VHL (**Εικ.1**) (Dengler et al., 2014).



Εικ 1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των HIF. Οι HIF είναι ετεροδιμερείς, αποτελούνται από δύο υπομονάδες: μία α (HIF-1α, HIF-2α ή HIF-3α) και μία β (HIF-β) υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα διαθέτει διαφορετικές λειτουργικές περιοχές που εμπλέκονται στη σύνδεση του με το DNA (bHLH), στον ετεροδιμερισμό (PAS-A, PAS-B), στην οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση (ODD) και στη ενεργοποίηση της μεταγραφής (N-TAD, C-TAD) (Lee et al., 2021).

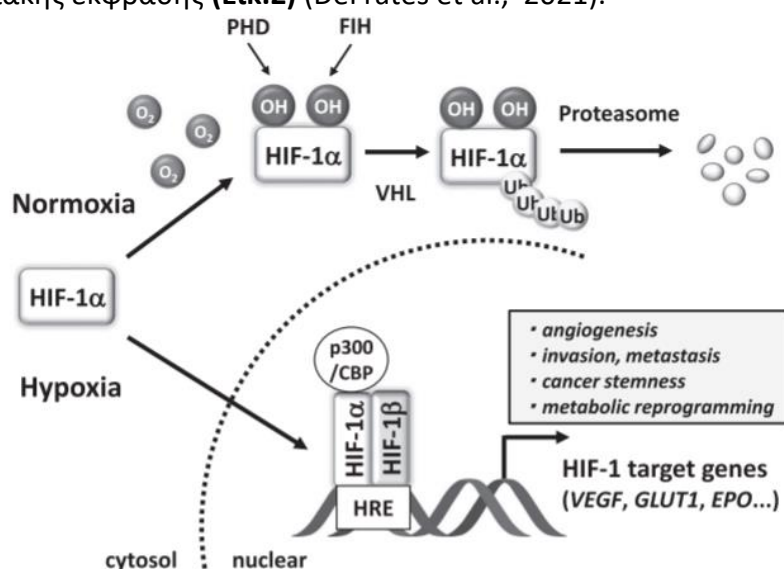
A.1.3 Η ρύθμιση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α

A.1.3.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία), οι HIF-α αναστέλλονται μέσω συνεχώς αποικοδόμησης τους. Στη νορμοξία, ένζυμα της οικογένειας πρόλυλο-υδροξυλασών (Prolyl hydroxylase domain, PHDs) που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως υπόστρωμα και δρουν ως «αισθητήρες οξυγόνου» στο κύτταρο, υδροξυλιώνουν την α-υπομονάδα του HIF σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης, στην επικράτεια

ODD. Η υδροξυλιωμένη α -υπομονάδα αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL (von Hippel–Lindau, pVHL), η οποία είναι μέρος του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και στοχεύει την α -υπομονάδα για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα με την προσθήκη ουβικιτίνης. Απουσία οξυγόνου, οι PHDs είναι ανενεργές και δεν είναι σε θέση να υδροξυλιώσουν το HIF-1 α . Έτσι ο HIF- α δεν ουβικουτινώνεται, αλλά εισέρχεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τον HIF-1 β και το ετεροδιμερές σύμπλοκο επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Εικ.2) (Schofield et al., 2005).

Ένα άλλο ένζυμο, ο παράγοντας που αναστέλλει τον HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH), έχει επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζει το HIF-1 α , αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα οξυγόνου απ' ό,τι τα ένζυμα PHDs. Όπως οι PHDs, έτσι και ο FIH χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα, για να υδροξυλιώσει την α -υπομονάδα του HIF-1. Σε αντίθεση με τα ένζυμα PHDs, το ένζυμο FIH υδροξυλιώνει κατάλοιπα ασπαραγίνης εντός της περιοχής C-TAD του HIF-1 α και αποτρέπει τη σύνδεση του στους συμπαραγόντες μεταγραφής p300/CBP, που είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Εικ.2) (DeFrates et al., 2021).



Εικ 2. Εξαρτημένη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1 α . Στη νορμοξία, ο HIF-1 α υδροξυλιώνεται από την προλυλ-υδροξυλάση (PHD) ή τον παράγοντα που αναστέλλει τον HIF-1 (FIH) και στην υδροξυλιωμένη του μορφή αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη VHL, με αποτέλεσμα την ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Αντίθετα, στην υποξία ο HIF-1 α σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Το συμπλόκο HIF-1 α /HIF-1 β συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης υποξίας (HRE) και σε συνεργασία με τους συμπαραγόντες μεταγραφής p300/CBP ενεργοποιεί την έκφραση πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1) και της ερυθροποιητίνης (EPO) (Ikeda et al., 2021).

A.1.3.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1 α

Η έκφραση και η δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 α ελέγχονται, επίσης από μηχανισμούς ανεξάρτητους από το οξυγόνο.

Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας NF κ B συνδέεται στον υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον HIF-1 α και επάγει τη μεταγραφή του. Επιπλέον,

μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγραφή του HIF-1α ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT3, SP1 και SP3 (Schödel et al., 2019).

Αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια, επάγουν τη παραγωγή του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των MAPK κινασών (Mitogen-activated Protein Kinase) (Koyasu et al., 2018).

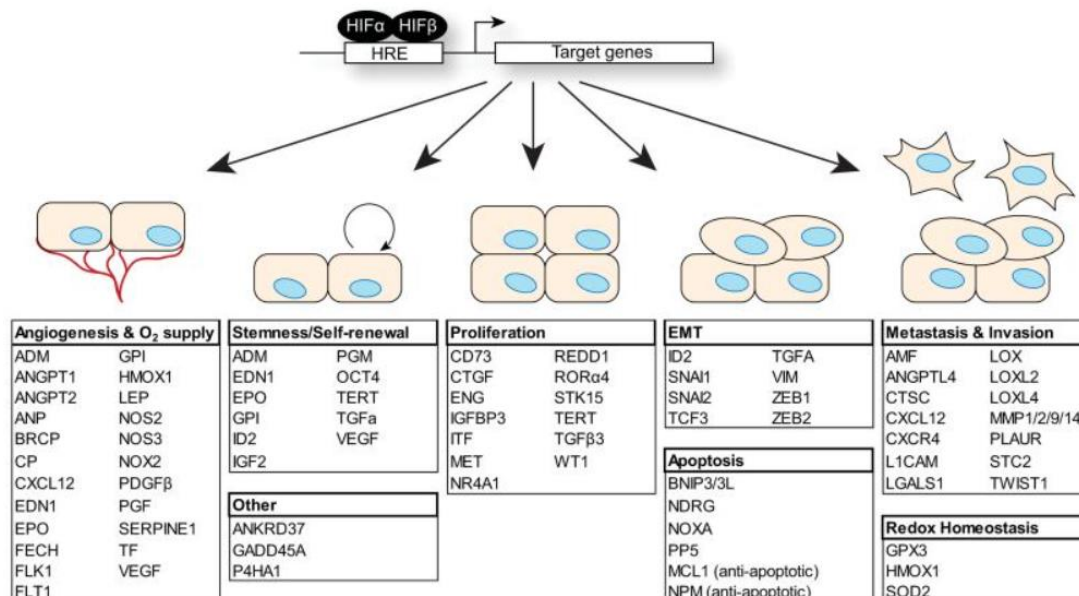
Ο HIF-1α ρυθμίζεται επίσης, μέσω της αλληλεπίδρασης του με άλλες πρωτεΐνες, όπως με τις πρωτεΐνες Hsp90 και RACK1. Η σύνδεση του με την πρωτεΐνη μοριακό συνοδό HSP90 (heat shock protein 90) έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίησή του, αφού τον προστατεύει από αποικοδόμηση. Αντίθετα η σύνδεση του με την πρωτεΐνη RACK1 (Receptor of activated protein C kinase 1) έχει το αντίθετο αποτέλεσμα, αφού οδηγεί στην απόσπαση της HSP90 από τον HIF-1α και ο HIF-1α είναι εκτεθειμένος για αποικοδόμηση (Koyasu et al., 2018).

Επιπρόσθετα, διάφορα ένζυμα τροποποιούν μετα-μεταφραστικά τον HIF-1α, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης του και την δραστικότητα του. Εκτός από την υδροξυλίωση, ο HIF-1α υπόκειται σε σουμουλίωση, ακετυλίωση, αποακετυλίωση και S-νιτροζυλίωση (Mylonis et al., 2019). Η σημαντικότερη και πιο καλά μελετημένη τροποποίηση που επηρεάζει τη λειτουργία του HIF-1α είναι η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α επηρεάζει τη σταθεροποίησή του στο κυτταρόπλασμα, την είσοδο του στον πυρήνα και τη μεταγραφική του δραστικότητα. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), οδηγεί στην αποικοδόμησή του (Kietzmann et al., 2016). Αντίθετα η φωσφορυλίωση του από τις κινάσες ATM, CDK1 ή PKA, οδηγεί στη σταθεροποίησή του, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του (Mylonis et al., 2019). Ακόμη ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες p42/44 MAPK (ERK1/2) σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης (Ser641 και Ser643) που βρίσκονται στην περιοχή ETD (ERK1/2 Targeted Domain) στο κάρβοξυ-τελικό του άκρο. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal, NES). Η φωσφορυλίωση του HIF-1α οδηγεί στην απόκρυψη του σήματος NES και την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασής του HIF-1α με τη CRM1 (chromosomal maintenance 1), η οποία είναι ο βασικός υποδοχέας εξαγωγής μακρομορίων από τον πυρήνα κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο HIF-1α να παραμένει στον πυρήνα, να ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και να ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Mylonis et al., 2006), (Mylonis et al., 2008).

A.1.4 Γονίδια-στόχοι των HIFs και λειτουργίες που επηρεάζουν

Έχουν, μέχρι σήμερα αναφερθεί πάρα πολλά γονίδια στόχοι των HIF και ο αριθμός τους αυξάνεται συνεχώς, με τα περισσότερα να αποτελούν στόχους του HIF-1. Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η πρόσληψη και μεταφορά οξυγόνου (ερυθροποιητίνη –EPO, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας – VEGF), η αναερόβια παραγωγή ενέργειας (μεταφορείς γλυκόζης GLUT1 και GLUT3), ο

κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Wilms tumor protein 1, WT1), η αυτοφαγία και η απόπτωση (BCL2 Interacting Protein 3, BNIP3), η αυτοανανέωση (Adrenomedullin, ADM) και η μετάσταση (Autocrine motility factor, AMF). Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζονται σχηματικά οι διαδικασίες αυτές και τα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται από τους HIF (Dengler et al., 2014).

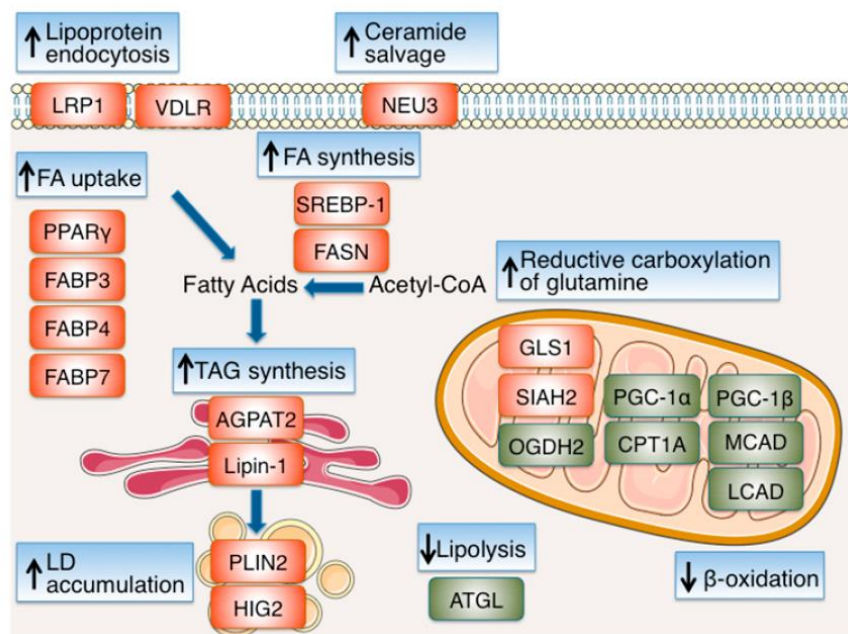


Εικ 3. Τα γονίδια-στόχοι των HIF και οι διάφορες βιολογικές οδοί που συμμετέχουν (Dengler et al., 2014)

A.1.4.1 Επίδραση του HIF-1 στο μεταβολισμό των λιπιδίων

Ο ρόλος των HIF στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων έχει μελετηθεί εκτενώς. Ο HIF-1 ελαττώνει την αερόβια παραγωγή ενέργειας, μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που την αναστέλλουν, όπως η κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1). Η PDK1 αναστέλλει το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και κατά συνέπεια μειώνεται η οξείδωση του πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια και αυξάνεται η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ στο κυτταρόπλασμα από την γαλακτική δεϋδρογονάση (Lactate Dehydrogenase, LDH) (Majmundar et al., 2010). Παράλληλα ο HIF-1 ενισχύει την αναερόβια παραγωγή ενέργειας, καθώς διεγείρει την έκφραση σχεδόν όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν τα γλυκολυτικά ένζυμα. Επίσης προάγει την πρόσληψη γλυκόζης, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς GLUT1 και GLUT3 (Mylonis et al., 2019). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι ο HIF-1 εμπλέκεται και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, στην υποξία, ο HIF-1α ενεργοποιεί άμεσα την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ, ο οποίος προάγει την πρόσληψη λιπαρών οξέων και παραγωγή τριακυλογλυκερολών (Krishnan et al., 2009). Επίσης η εξωκυτταρική πρόσληψη λιπαρών οξέων και η λιπογένεση σε συνθήκες υποξίας, ενισχύονται μέσω επαγωγής της έκφρασης των πρωτεϊνών FABP3, FABP4, FABP7 από τον HIF-1. Επιπλέον, ο HIF-1, προάγει την

ενδοκύττωση λιποπρωτεϊνών, επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα LRP1 (Lipoprotein receptor related protein) και του υποδοχέα VLDL (VLDLR) (Mylonis et al., 2019). Δύο ένζυμα της οδού βιοσύνθεσης τριακυλογλυκερολών, η AGPAT2 (ακυλοτρανσφεράση 2 της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης) (Triantafyllou et al., 2018) και η λιπίνη-1 (LIPIN 1) (Mylonis et al., 2012), τα γονίδια που τις κωδικοποιούν αποτελούν γονίδια-στόχοι του HIF-1. Τα δύο αυτά ένζυμα επάγουν την παραγωγή TAGs που ακολούθως αποθηκεύονται σε LDs. Στην **Εικόνα 4** παρουσιάζονται τα γονίδια-στόχοι του HIF που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων.



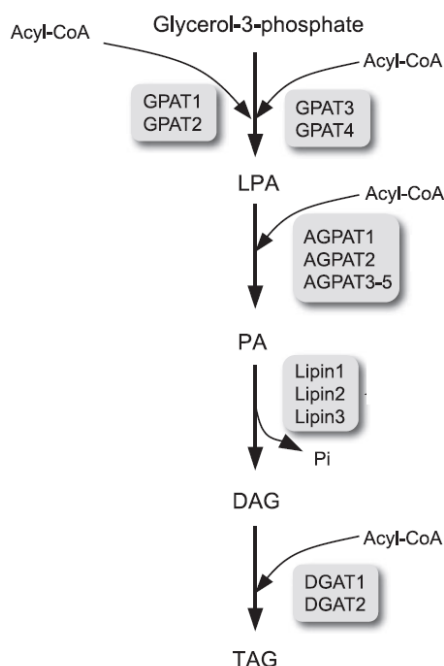
Εικ 4. Γονίδια-στόχοι του HIF που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Mylonis et al., 2019)

A.2 Η οικογένεια των AGPAT και ο ρόλος τους στον καρκίνο

A.2.1 Μονοπάτι βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων (TGs)

Τα τριγλυκερίδια χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας, αλλά και ως πρόδρομα μόρια για τη παραγωγή φωσφολιπιδίων και σηματοδοτικών μορίων. Η βιοσύνθεση των TG, γίνεται στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και πραγματοποιείται σε 4 στάδια από τα ένζυμα GPATs (Glycerol-3-phosphate acyltransferases, ακυλοτρανσφεράσες της 3-φωσφορικής γλυκερόλης) AGPATs (Acylglycerophosphate acyltransferases, ακυλοτρανσφεράση της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης), Lipins (Λιπίνες) και DGATs (Diacylglycerol acyltransferases, ακυλοτρανσφεράσεων των διγλυκεριδίων). Η πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης TGs είναι η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (Glycerol 3-phosphate, G-3-P) σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), από τα ένζυμα της οικογένειας GPAT. Στο επόμενο στάδιο οι AGPAT ή αλλιώς ακυλοτρανσφεράσες του λυσοφωσφατιδικού οξέος (Lysophosphatidic acid acyltransferases, LPAATs) καταλύουν την μετατροπή του λυσοφωσφατιδικού οξέος σε φωσφατιδικό οξύ (PA). Το φωσφατιδικό οξύ που παράγεται μπορεί να ακολουθήσει 2 πορείες. Μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως το πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI) ή μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί σε διακυλογλυκερόλη (DAG) με την δράση των λιπίνων. Η διάκυλογλυκερόλη μετατρέπεται σε τριάκυλογλυκερολη (TAG) από τα ένζυμα DGAT. Εναλλακτικά η διάκυλογλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση φωσφολιπιδίων, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) (Εικ.5). Οι TAG αποθηκεύονται σε λιποσταγονίδια (LDs) και λειτουργούν ως αποθήκες τριγλυκεριδίων για την παραγωγή ενέργειας με την διάσπαση τους (Agarwal et al., 2012)(Coleman et al., 2011). Επίσης η αποθήκευση τους σε LD, είναι ένας προσαρμοστικός μηχανισμός που προστατεύει τα κύτταρα από την τοξικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (λιποτοξικότητα), που μπορεί να τα οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (Mylonis et al., 2019).

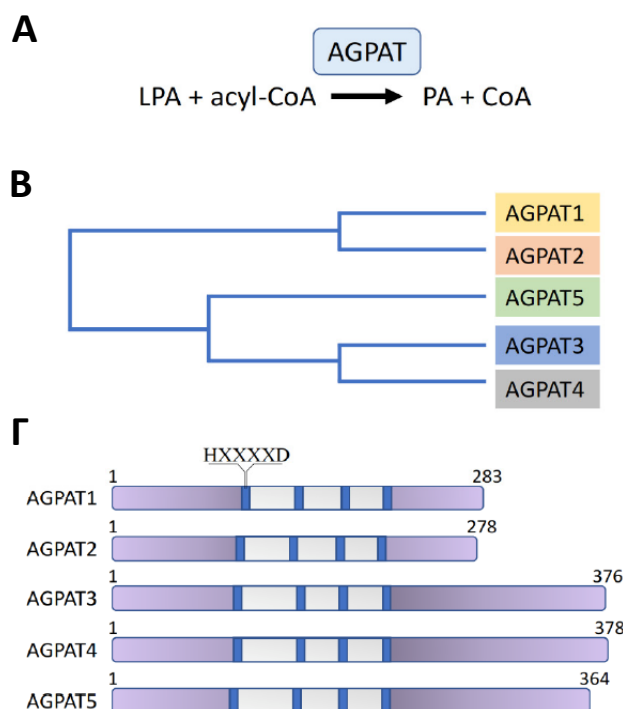


Εικ 5. Μονοπάτι βιοσύνθεσης τριγλυκεριδίων (Προσαρμογή από : (Takeuchi K, 2009)

A.2.2 Η οικογένεια των AGPAT

Οι AGPAT είναι μια οικογένεια πέντε ενζύμων που καταλύουν το δεύτερο βήμα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριγλυκεριδίων. Το PA που παράγεται, εκτός από ενδιάμεσο στη σύνθεση TAG, είναι και πρόδρομο μόριο των γλυκεροφωσφολιπιδίων και παίζει ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση. Οι πέντε ισομορφές της οικογένειας AGPAT (AGPAT1-5) κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι AGPAT1 και AGPAT2, είναι εξελικτικά πιο κοντά σε σχέση με τις άλλες ισομορφές. Το ίδιο συμβαίνει και με τις AGPAT3 και AGPAT4, ενώ η AGPAT5 έχει μικρότερη ομολογία σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των AGPAT (Karagiota et al., 2022). Οι AGPAT περιέχουν τέσσερα μοτίβα ακυλοτρανσφεράσης και μια υπογραφή HXXXXD,

στο πρώτο μοτίβο ακυλοτρανσφεράσης, η οποία τους προσδίδει την καταλυτική τους δράση (Εικ.6) (Yamashita et al., 2014).



Εικ 6. Η οικογένεια των ενζύμων AGPAT. Α) Η αντίδραση που καταλύεται από τις AGPAT. Τα ένζυμα AGPAT καταλύουν τη προσθήκη ακυλο-CoA στο λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), μετατρέποντας το σε φωσφατιδικό οξύ (PA). Β) Φυλογενετικό δέντρο των 5 ισομορφών AGPAT. Γ) Σχηματική αναπαράσταση της δομής των AGPAT. Τα τέσσερα μοτίβα ακυλοτρανσφεράσης παρουσιάζονται με μπλε χρώμα. Η υπογραφή HXXXXD, που προσδίδει καταλυτική δράση ακυλοτρανσφεράσης, εντοπίζεται στο πρώτο μοτίβο ακυλοτρανσφεράσης όλων των ισομορφών (Προσαρμογή από : (Karagiota et al., 2022)).

A.2.2.1 Υποστρώματα, υποκυτταρικός εντοπισμός και ιστοειδική έκφραση των ισομορφών AGPAT

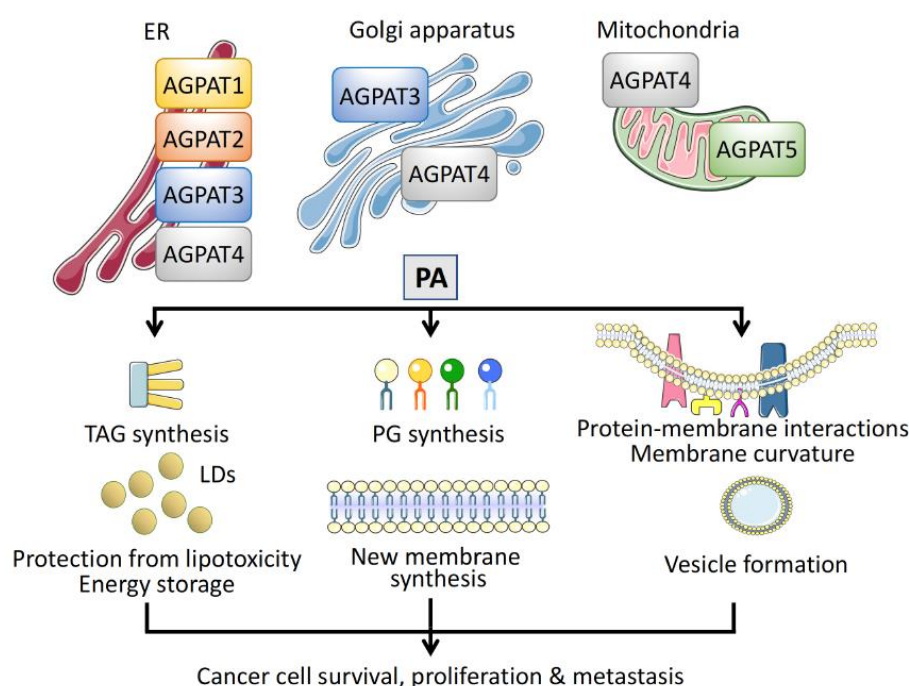
Παρόλο που οι ισομορφές των AGPAT καταλύουν την ίδια αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης TAG, η απώλεια μιας ισομορφής σε μεγάλο βαθμό δεν μπορεί να αντικατασταθεί από μια άλλη, υπογραμίζοντας τη σημαντικότητα κάθε ισομορφής (Wang et al., 2017). Αυτό διαπιστώθηκε από μεταλλάξεις των AGPAT, που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή απώλεια της λειτουργικότητας τους (Zhukovsky et al., 2019).

Η μοναδικότητα των ισομορφών AGPAT μπορεί να οφείλεται στην προτίμηση τους για τα διαφορετικά είδη ακυλο-CoA και συνεπώς στην παραγωγή συγκεκριμένων ειδών PA. Τα φωσφολιπίδια αυτά, καθορίζουν τη δομή και τις ιδιότητες των διαφόρων βιολογικών μεμβρανών, συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος και σε κυτταρικές λειτουργίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι AGPAT1 και AGPAT2 έχουν ευρεία εξειδίκευση ως προς ακυλο-CoA που λειτουργεί ως δότης ακυλίου. Οι AGPAT3 και AGPAT4, δείχνουν μια προτίμηση για τα πολυακόρεστα

λιπαρά ακυλ-CoA και επίσης η AGPAT3 έχει δείχθει ότι είναι σημαντική για τη σύνθεση των πολυακόρεστων φωσφολιπιδίων (PUFA) (Karagiota et al, 2022).

Επίσης οι ισομορφές των AGPAT εντοπίζονται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Οι AGPAT1 και AGPAT2 βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η AGPAT3 έχει εντοπιστεί στις μεμβράνες του ER και στο σύστημα Golgi, η AGPAT4 στο ER, στο σύστημα Golgi και στα μιτοχόνδρια. Τέλος η AGPAT5, έχει ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια (**Εικ.7**) (Karagiota et al, 2022).

Όσον αφορά την έκφραση των ισομορφών AGPAT στους ιστούς, μελέτες έδειξαν ότι οι AGPAT1 και AGPAT3 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς. Αντίθετα οι υπόλοιπες AGPAT έχουν ιστοειδική έκφραση, με την AGPAT2 να εκφράζεται κυρίως στα λιποκύτταρα, στο ήπαρ και στο πάγκρεας, την AGPAT4 στον εγκέφαλο και στους μύς και την AGPAT5 στους όρχεις (Karagiota et al, 2022).



Εικ 7. Υποκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών AGPAT και ο ρόλος τους στον καρκίνο (Karagiota et al, 2022).

A.2.3 Ο ρόλος των AGPAT σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες

Η AGPAT2, είναι η πιο μελετημένη ισομορφή των ενζύμων της οικογένειας των AGPAT. Η AGPAT2 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού και μεταλλάξεις του γονιδίου της έχουν συσχετιστεί άμεσα με το κληρονομούμενο σύνδρομο λιποδυστροφίας τύπου 1 (CGL 1) (Wang et al, 2017) (Agarwal et al, 2002). Οι ασθενείς με CGL 1 εμφανίζουν ολική απώλεια λιπώδους ιστού, μεταβολικό σύνδρομο και στεάτωση. Καμία άλλη ισομορφή των AGPAT δεν μπορεί να αναπληρώσει την απώλεια της AGPAT2 (Agarwal et al, 2011). Ο ρόλος της AGPAT2 στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και στη βιοσύνθεση των λιπιδίων έχει αποσαφηνιστεί από μελέτες σε ποντίκια. Τα ποντίκια με μεταλλάξεις της AGPAT2

(AGPAT2^{-/-}) αναπτύσσουν σοβαρή λιποδυστροφία, αντίσταση στην ινσουλίνη, διαβήτη και ηπατική στεάτωση (Cortés et al, 2009).

Σε αντίθεση με την AGPAT2, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με τον φυσιολογικό ρόλο των υπόλοιπων ισομορφών AGPAT. Μέλετες επίσης σε ποντίκια υπέδειξαν ότι η απώλεια του ενζύμου AGPAT1 (AGPAT1^{-/-}), δεν οδηγεί σε ανάπτυξη λιποδυστροφίας, όπως συμβαίνει με τα ποντίκια που είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο AGPAT2. Πάραλληλα τα ποντίκια AGPAT1^{-/-}, εμφάνισαν νευρολογικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων των επιληπτικών κρίσεων (Agarwal et al, 2017).

Η AGPAT3 εμπλέκεται στη βιοσύνθεση πολυακόρεστων φωσφολιπιδίων (PUFA) και συγκεκριμένα ευνοεί τη σύνθεση φωσφολιπιδίων που περιέχουν εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA). Η δράση της AGPAT3, μέσω παραγωγής φωσφολιπιδίων που περιέχουν DHA είναι σημαντική σε ιστούς, όπως οι οφθαλμοί και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Πειράματα σε ποντίκια με μεταλλάξεις της AGPAT3 (AGPAT3^{-/-}), έδειξαν ότι τα ποντίκια αυτά ανέπτυξαν ανωμαλίες του αμφιβληστροειδούς και είχαν μειωμένη όραση (Shindou et al, 2017).

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η AGPAT4 έχει υψηλή έκφραση στον εγκέφαλο καθώς μελέτες σε ποντίκια με απώλεια της AGPAT4 (AGPAT4^{-/-}), έδειξαν ότι τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν βλάβες στη χωρική μάθηση και μνήμη. Πιθανότατα λόγω της μειωμένης έκφρασης των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος, NMDA και AMPA, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή (Bradley et al, 2017).

Οι φυσιολογικοί ρόλοι της AGPAT5, πέρα από τη σύνθεση PA, παραμένουν μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστοι (Karagiota et al, 2022).

A.2.3.1 Ο ρολος και η ρυθμιση της έκφρασης των AGPAT στον καρκίνο και στην υποξία

Οι AGPAT προάγουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω της καταλυτικής τους δράσης που οδηγεί στην παραγωγή PA. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το PA είναι ένα ενδιάμεσο για τη σύνθεση των TAGs, που αποθηκεύονται σε λιποσταγονίδια (LDs), τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποθήκες ενέργειας και προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από τη λιποτοξικότητα. Επιπλέον, το PA είναι πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των φωσφολιπιδίων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση νέων μεμβρανών σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, η παρουσία του PA στην μεμβράνη προκαλεί μια κάμψη στη δομή της, που είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό κυστιδίων και εξωσωμάτων (Karagiota et al, 2022)(**Εικ.5**). Τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταφέρουν miRNA, mRNA και πρωτεΐνες, μεσολαβώντας στη εγκατάσταση καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα σημεία και τη δημιουργία μεταστάσεων. (Adem et al, 2020).

Πράγματι, μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου, δείχνουν ότι οι AGPAT διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, ως θετικοί ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της μετάστασης του όγκου και της κακής πρόγνωσης της ασθένειας.

Συγκεκριμένα, το γονίδιο που κωδικοποιεί την AGPAT1, υπερεκφράζεται σε δείγματα όγκων που πάρθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (ορθοκολικό καρκίνωμα, CRC). Κατά συνέπεια, η AGPAT1 έχει αναγνωριστεί ως αρνητικός προγνωστικός δείκτης, που σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής της ασθένειας και μικρότερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με CRC (Fernández et al, 2017), (Ren et al, 2020). Ακόμη από μια ανάλυση μικροσυστοιχίας για την ταυτοποίηση γονιδίων βιοδεικτών του καρκίνου των ωοθηκών, η AGPAT1 ήταν ένα από αυτά. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της AGPAT1 σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με υγιείς άτομα (Lee et al, 2012).

Όσον αφορά την AGPAT2, πειράματα έδειξαν, ότι τα επίπεδα έκφρασης της ήταν αυξημένα σε δείγματα καρκίνου των ωοθηκών σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Παράλληλα, σε δείγματα καρκίνου των ωοθηκών τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της AGPAT2 συσχετίστηκαν με επιθετικό, υψηλού βαθμού όγκο και με μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών (Niesporrek et al, 2005). Επιπλέον, σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT2 ήταν αυξημένα. Ειδικότερα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης AGPAT2 ήταν υψηλότερα στους ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία με σισπλατίνη σε σύγκριση με αυτούς που δεν είχαν λάβει, υποδεικνύοντας τη συσχέτιση της έκφρασης της AGPAT2 με την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Song et al, 2016). Υψηλότερα επίπεδα AGPAT2 συσχετίστηκαν επίσης και με καρκίνο του στομάχου (Li et al, 2011). Επιγονιδιωματικές μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο AGPAT2 είναι υπομεθυλωμένο σε σύνολα δεδομένων από ασθενείς με παιδική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (PALL) σε σύγκριση με φυσιολογικούς αιμοδότες (Sanchez et al, 2020). Επιπρόσθετα στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος, η σίγηση του AGPAT2 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (Blaskovich et al, 2013). Επίσης, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) και αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας (HeLa), η αναστολή της AGPAT2 μέσω siRNA και σίγησης του HIF-1α, επηρεάζει τη σύνθεση TAG και φωσφολιπιδίων, και έτσι αποτρέπει τη συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της βιωσιμότητας και αύξηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στο χημειοθεραπευτικό φάρμακο ετοποσίδη (Triantafyllou et al, 2018).

Μια ανάλυση δεδομένων μεταγραφώματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού υπέδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της AGPAT4 σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας (Dória et al, 2014). Ακόμη τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT4 ήταν υψηλά σε δείγματα όγκου από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) (Zhang et al, 2020), μελάνωμα (Sumantran et al, 2015) και καρκίνο της

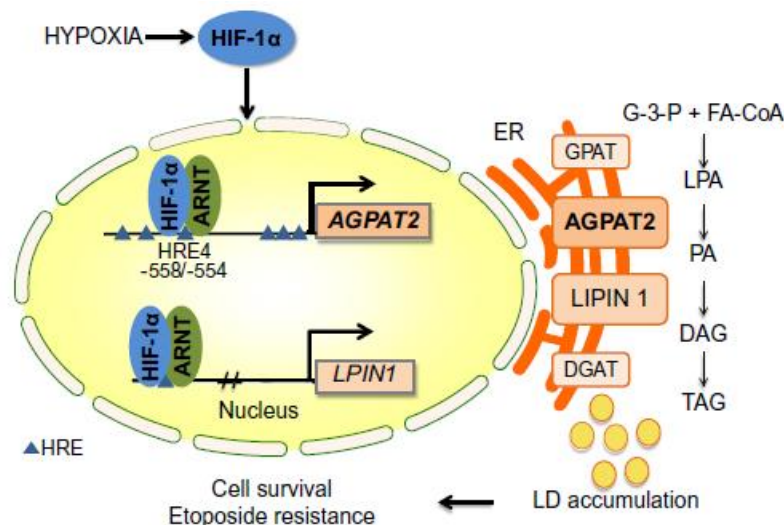
στοματικής κοιλότητας (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (OSCC) (Huang et al, 2021).

Με βάση τα παραπάνω, η στόχευση του μεταβολισμού των λιπιδίων, στον καρκίνο, μέσω των AGPAT είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική.

A.2.4 Επίδραση της υποξίας στην έκφραση των AGPAT

Τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α αυξάνονται στους συμπαγείς όγκους λόγω του υποξικού μικροπεριβάλλοντος. Μελέτες, έχουν δείξει ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου, η σίγηση της έκφρασης του HIF ή των γονιδίων-στόχων του που παίζουν ρόλο στη συσσώρευση λιπιδίων, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του όγκου καθώς και της αντίστασης των κυττάρων του όγκου σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Αντίστοιχα, η υπερέκφραση των γονιδίων-στόχων του HIF που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων, έχει συσχετιστεί με κακοήθεις τύπους καρκίνων και κακή πρόγνωση της ασθένειας. (Mylonis et al, 2019).

Μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των δύο ενζύμων της οικογένειας των AGPAT, AGPAT2 και AGPAT4, αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Δείχθηκε ότι η AGPAT2 αποτελεί άμεσο γονίδιο-στόχο του HIF-1α και η επαγωγή της είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έδειξαν ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7 και HeLa, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της AGPAT2 αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Παράλληλα, έπειτα από σίγηση του γονιδίου HIF-1α, τα επίπεδα αυτά μειώνονται τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία. Ακόμη η καταστολή της AGPAT2, οδήγησε σε μειωμένο μέγεθος και αριθμό LD. Παράλληλα οδήγησε σε μειωμένη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων και αύξησε την ευαισθησία τους στον αποπτωτικό παράγοντα ετοποσίδη (Εικ.8) (Triantafyllou et al, 2018).



Εικ 8. Μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της AGPAT2 και σχηματισμού LD στη υποξία

Όσον αφορά την AGPAT4, πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7, MCF7, A549 και H1299, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της

AGPAT4 αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Παράλληλα αποσιώπηση του γονιδίου HIF-1α, οδηγεί σε μειωμένα έως μη υπαρκτά επίπεδα πρωτεϊνών της AGPAT4 τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και νορμοξίας, αναδεικνύοντας την AGPAT4 ως πιθανό γονίδιο-στόχο του HIF-1 (Karagiota et al, 2021).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Η υποξία είναι μια κατάσταση όπου τα κύτταρα εκτίθενται σε μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου και αποτελεί χαρακτηριστικό του όγκου. Στην υποξία, η ενεργοποίηση των HIF οδηγεί στη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Μελέτες σε καρκινικές σειρές κυττάρων, έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των *AGPAT2* και *AGPAT4*, τα οποία είναι ενζυμα της οικογενείας των *AGPAT*, που καταλύουν το δευτερό βήμα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης TG, αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας. Παράλληλα ένα μεγάλο σύνολο μελέτων, υπέδειξαν την συσχέτιση της έκφρασης των ισομορφών *AGPAT* με διάφορους τύπους καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν να μελετηθεί η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας ενζύμων *AGPAT* στον καρκίνο και ειδικότερα η συσχέτισή της με τους ρυθμιζόμενους από την υποξία παράγοντες HIF, οι οποίοι συμμετέχουν στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξία).

Ειδικότερα α. μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας στη μεταγραφή του γονιδίου *AGPAT4*, σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών και β. έγινε ανάλυση δεδομένων από δημόσιες τράπεζες πληροφοριών, που αφορούσαν την έκφραση των γονιδίων *AGPAT1-5* και τη συσχέτισή τους με τους παράγοντες HIF και την επιβίωση των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΥΛΙΚΑ

B.1.1 Κυτταρικές Σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK293.

B.1.2 Βακτηριακά Στελέχη

Στα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E. Coli* Top10.

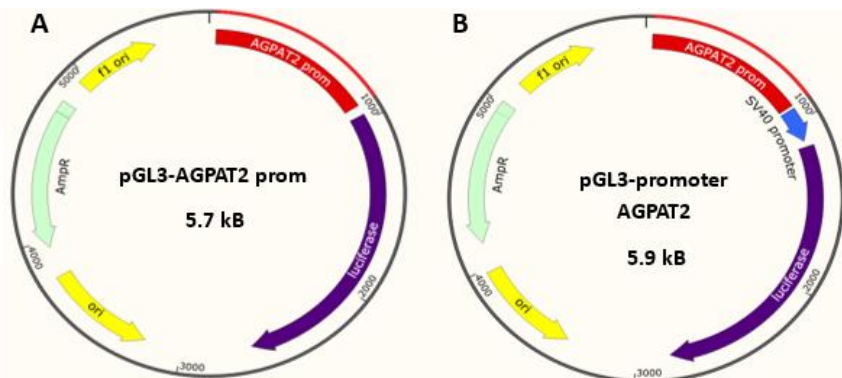
B.1.3 Πλασμιδιακοί Φορείς

- pGL3-AGPAT2 prom

Το πλασμίδιο pGL3-AGPAT2 prom περιέχει τμήμα του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT2* (περιοχή -1013 έως -140) και έχει κλωνοποιηθεί μπροστά από το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης, στη θέση *XhoI* στη περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης του φορέα pGL3-basic (Triantafyllou et al, 2018) **(Εικ.6)**.

- pGL3-prom AGPAT2

Το πλασμίδιο pGL3-prom AGPAT2 κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία. Προέκυψε με υποκλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT2* (περιοχή -1013 έως -140) από το πλασμίδιο pGL3-AGPAT2 prom στη θέση *XhoI* του φορέα pGL3-promoter **(Εικ.6)**.



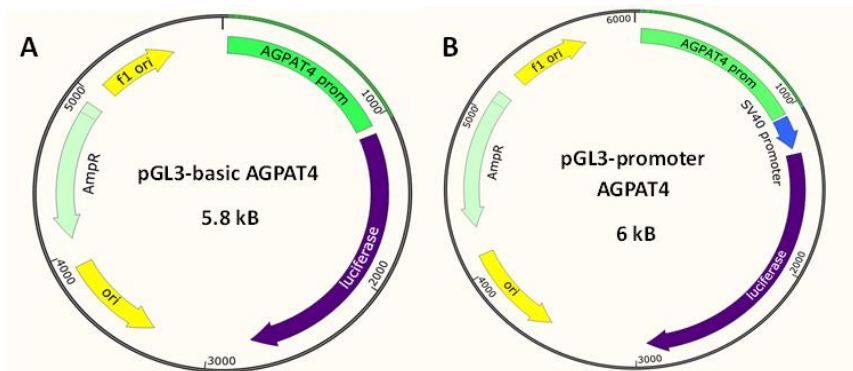
Εικ 6. Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων pGL3-AGPAT2 prom και pGL3-prom AGPAT2

- pGL3-basic-AGPAT4

Το πλασμίδιο pGL3-basic-AGPAT4 περιέχει τμήμα του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT4* (περιοχή -1101 έως -103) και έχει κλωνοποιηθεί μπροστά από το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης στη θέση *XhoI* στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (Karagiota et al, 2021) **(Εικ.7)**.

- pGL3-prom AGPAT4

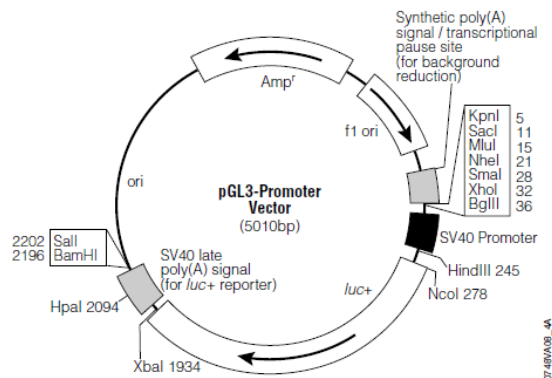
Το πλασμίδιο pGL3-prom AGPAT4 κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία. Προέκυψε με υποκλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT4* (περιοχή -1101 έως -103) από το πλασμίδιο pGL3-basic AGPAT4 στη θέση *XhoI* του φορέα pGL3-promoter (**Εικ.7**).



Εικ 7. Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων pGL3-basic-AGPAT4 prom και pGL3-prom-AGPAT4

- pGL3 -Promoter Luciferase Reporter Vector (5 Kb, Promega)

Το πλασμίδιο pGL3 -Promoter Luciferase Reporter Vector, περιέχει το γονίδιο λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*), ως γονίδιο αναφοράς, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα του ιού SV40. (**Εικ.8**).



Εικ 8. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Promoter (www.promega.com)

- pGL3-VEGF-5xHRE-Luc

Το πλασμίδιο pGL3-VEGF-5xHRE-Luc προέρχεται από τον πλασμιδικό φορέα pGL3-Basic. Εκφράζει τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο 5 στοιχείων απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs), του υποκινητή του VEGF (Dr. Giaccia, Department of Medicine, University of Stanford).

B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

B.2.1 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με θερμικό σοκ

Ο μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* Top10 έγινε με θερμικό σοκ. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 150 ng πλασμιδίου ή όλη η αντίδραση λιγάσης (20

μl) σε 50 μl βακτηρίων. Τα βακτήρια επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά και αμέσως μετά στους 42 °C για 1 λεπτό. Έπειτα προστέθηκαν 500 μl υγρού θρεπτικού μέσου LB (Luria Broth) και έγινε επώαση στους 37 °C για 45 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (3000 rpm για 2 λεπτά). Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 50 μl LB και επιστρώθηκε σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar (LB, 2% άγαρ), το οποίο έφερε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C, ώστε να σχηματιστούν οι αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Θρεπτικό μέσο LB	
bactotryptone	1%
bacto-yeast extract	0.5%
NaCl	0.5%

B.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη προστέθηκε 30 ml θρεπτικό υλικό LB και το αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη). Η κωνική εμβολιάστηκε με αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων Top10 E.coli, και επώαστηκε ολονύχτια στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (170 rpm). Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε (4000 rpm, 10 λεπτά) και το ίζημα των βακτηρίων επαναιωρήθηκε σε 500 μl διαλύματος επαναιώρησης A1, το οποίο περιέχει RNAase. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl διαλύματος λύσης A2, ήπια ανάδευση του διαλύματος και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 600 μl διαλύματος εξουδετέρωσης A3 και καλή ανάδευση, έως ότου εξουδετερωθεί το μπλε χρώμα του διαλύματος λύσης. Κατόπιν, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (11000 g για 10 λεπτά), το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στη, ειδική στήλη και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό σε 11000 g. Η στήλη, μετά την προσθήκη 500 μl διάλυμα πλύσης AW, φυγοκεντρήθηκε (11000g για 1 λεπτό) και το έκλουσμα απορρίφθηκε. Στο επόμενο βήμα έγινε πλύση της στήλης με 600 μl διαλύματος A4, απομάκρυνση του αδέσμευτου εκλουσματος, δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (11000 g για 1 λεπτό και 11000 g για 2 λεπτά), μεταφορά σε νέο Eppendorf, προσθήκη 50 μl διαλύματος έκλουσης AE, επώαση ενός λεπτού ώστε να ενυδατωθεί η στήλη και φυγοκέντρηση (11.000xg για 2 λεπτά), ώστε να εκλουστεί το πλασμιδιακό DNA.

B.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA, έγινε με χρήση του φωτόμετρου Nanodrop2000 (Thermo Scientific). Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε αυτόματα από το φωτόμετρο με βάση την οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm (A_{260}) και το νόμο Beer - Lambert.

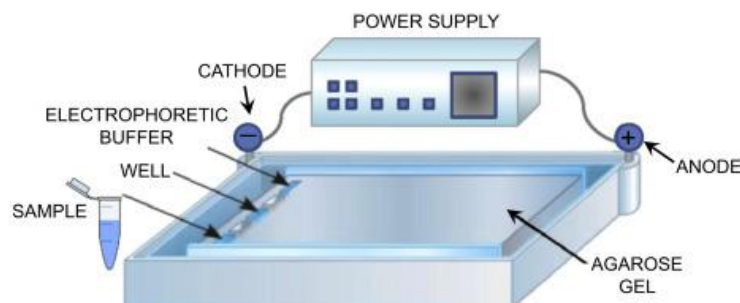
Έγινε επίσης αξιολόγηση του λόγου A_{260}/A_{280} , ο οποίος εκφράζει μια ένδειξη καθαρότητας του δείγματος.

B.2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια μέθοδο για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA, σύμφωνα με το μέγεθος.

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση αγαρόζης 1%, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE). Αρχικά η αγαρόζη διαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TAE, έπειτα από θέρμανση. Πριν το πολυμερισμό της αγαρόζης έγινε προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και μπορεί να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και να την εκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα, επιτρέποντας την οπτικοποίηση του DNA μέσα στην πηκτή. Έπειτα το μείγμα μεταφέρθηκε σε ανάλογο καλούπι και τοποθετήθηκε ειδική πλαστική “χτένα”, ώστε να στερεοποιηθεί το μείγμα και να δημιουργηθούν τα κατάλληλα “πηγαδάκια” στη πηκτή, όπου θα τοποθετηθούν τα προς ανάλυση δείγματα DNA. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής, αυτή μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστέθηκε διάλυμα TAE, ώστε να καλύπτει πλήρως το πήκτωμα. Στα δείγματα DNA, προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (Gel Loading Dye, Purple (6x), New England Biolabs). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των υπό μελέτη τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού μεγέθους 1kb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) (**Εικ.9**). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετήθηκε πάνω σε λυχνία UV (364nm) και φωτογραφήθηκε σε συσκευή απεικόνισης (UVitec Imager) .

TAE	
Tris-οξικό οξύ	4 mM
EDTA	0.1 mM



Εικ 9. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (Προσαρμογή: (Drabik et al, 2016))

B.2.5 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στην διπλή έλικα του DNA και “κόβουν” συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στην διπλή έλικα το DNA.

Μια αντίδραση πέψης αποτελείται από τον πλασμιδιακό DNA, το ένζυμο περιορισμού, το ρυθμιστικό διάλυμα για το ανάλογο ένζυμο περιορισμού και νερό (ddH₂O), ως εξής:

Συστατικά	Συγκεντρώσεις
Πλασμιδιακό DNA	0,5 - 1 μg
Ένζυμο περιορισμού (New England Biolabs)	2,5 – 5 Units
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	1X
H ₂ O	σε τελικό όγκο 20 - 50 μl

Επώαση στους 37 °C για 1-2 ώρες.

B.2.6 Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης

Το ένζυμο αυτό προκαλεί την αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων 5' άκρων του DNA. Στις αντιδράσεις επώασης του πλασμιδίου pGL3-promoter με την ενδονουκλεάση περιορισμού (50 μl), προστέθηκε το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (10 Units New England Biolabs), με σκοπό να αποφευχθεί η επανασύνδεση των άκρων του φορέα απουσία ενθέματος.

B.2.7 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των επιθυμητών τμημάτων DNA (μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού) από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης των αντιδράσεων πέψης σε πηκτή αγαρόζης, το επιθυμητό τμήμα DNA εντοπίστηκε με την βοήθεια λυχνίας UV, αποκόπηκε από την πηκτή και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, όπου προστέθηκε το διάλυμά πρόσδεσης NT1, σε αναλογία 200 μl/100 mg πηκτής. Ακολούθησε διαλυτοποίηση της πηκτής με θέρμανση για 10 λεπτά στους 50°C υπό έντονη ανάδευση, μεταφορά του διαλύματος σε ειδική στήλη και φυγοκέντρηση (11.000g, 30 δευτερόλεπτα), προκειμένου να συνδεθεί το DNA στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 700 μl διάλυμα NT3, και νέα φυγοκέντρηση (11.000g, 30 δευτερόλεπτα), ώστε να απομακρυνθούν οι προσμίξεις. Τυχόν υπολείμματα του διαλύματος NT3 απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση (11.000g, 1 λεπτό), έγινε έκλουση του DNA ύστερα από την προσθήκη 25μl διαλύματος έκλουσης NE και φυγοκέντρηση (11.000g, 30 δευτερόλεπτα).

B.2.8 Αντίδραση λιγάσης

Το πλασμίδιο και το κομμάτι του DNA-ενθέματος που έχουν επεξεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού και άρα φέρουν μεταξύ τους συμπληρωματικά άκρα, μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά μεταξύ τους ώστε να σχηματιστεί ένας νέος πλασμιδιακός φορέας με την βοήθεια του ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 3'-υδροξυλικών και 5'- φωσφορικών άκρων.

Για την αντίδραση λιγάσης, προστέθηκαν σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl, ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα σε αναλογία 1:3 αντίστοιχα (25 ng πλασμιδιακού φορέα και 75 ng ενθέματος), ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 1X, 5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/μl, New England Biolabs) (και ddH₂O, έως τελικού όγκου 20 μl). Η αντίδραση επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια ολονύχτια επώαση στους 16 °C.

B.2.9 Κυτταροκαλλιέργειες

B.2.9.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλοι οι χειρισμοί που αφορούσαν τα κύτταρα έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) της εταιρίας Biosera, το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Biochrom). Η επώαση των κυττάρων έγινε σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και σε 5% CO₂. Η επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας έγινε σε ειδικό θάλαμο υποξίας (INVIVO2 200 hypoxia workstation) (Ruskin Life Sciences) σε ατμόσφαιρα 1% O₂, 94% N₂ και 5% CO₂, όπως περιγράφεται.

B.2.9.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε όταν κάλυπταν περίπου το 80-100% της επιφάνειας του τρυβλίου. Η ανακαλλιέργεια των HEK293 κυττάρων πραγματοποιήθηκε με αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS (phosphate buffer saline), και προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM στα κύτταρα και επαναιώρηση τους.

PBS	
NaCl	127 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1.46 mM

B.2.9.3 Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HEK293

Ως διαμόλυνση χαρακτηρίζεται η διαδικασία εισαγωγής DNA ή RNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293 πραγματοποιήθηκε με

την μέθοδο της πολύ-αιθύλενο-ιμίνης (polyethylenimine , PEI). Η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) αποτελεί ένα σταθερό κατιονικό πολυμερές που έχει την ικανότητα να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το DNA λόγω του αρνητικού φωσφορικού σκελετού των νουκλεϊκών οξέων. Το σύμπλοκο PEI-DNA εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκύττωση και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν, έτσι ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να καλύπτουν το 60% περίπου της επιφάνειας των τριβλίων 24 θέσεων. Αρχικά σε 150 μl θρεπτικό υλικό DMEM απουσία αντιβιοτικών και ορού (DMEM -/-) έγινε προσθήκη του πλασμίδιου και του μέσο διαμόλυνσης (PEI) σε αναλογία 1:2 (1 μg DNA plasmid, 2 μl PEI) . Ακολούθησε εντόνη ανάδευση και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά. Εν συνεχεία, σε κάθε ένα από τα 24 πηγαδάκια του πιάτου με τα κύτταρα, προστέθηκαν 350 μl DMEM με 5% ορό, απουσία αντιβιοτικών και 150 μl από το μείγμα διαμόλυνσης. Έπειτα έγινε επώαση των κυττάρων για 4 ώρες στους 37 °C και 5% CO₂. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε σε αυτά πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM.

B.2.10 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας με χρήση του γονιδίου της λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς (Δοκιμασία λουσιφεράσης)

Η δοκιμασία λουσιφεράσης, είναι μια φωτομετρική μέθοδος και χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν μια πρωτεΐνη μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει την έκφραση ενός γονιδίου στόχου. Η λουσιφεράση ανήκει στην οικογένεια ενζύμων τα οποία καταλύουν οξειδωτικά τα υποστρώματα τους, παράγοντας φως, του οποίου η ένταση του μπορεί να μετρηθεί με την βοήθεια ειδικού οργάνου που ονομάζεται λουμινόμετρο.

Ως εκ τούτου, κύτταρα HEK293 επιστρώθηκαν σε πιάτα 24 θέσεων και επώαστηκαν παρουσία του παράγοντα διαμόλυνσης (PEI), με δύο πλασμίδια κάθε φορά το πλασμίδιο που εκφράζει τη λουσιφεράση υπό τον έλεγχο του κατάλληλου υποκινητή (pGL3-plasmid, 0,95 μg). και β. με το πλασμίδιο pCI-Renilla, το οποίο κωδικοποιεί τη Renilla λουσιφεράση και είναι το πλασμίδιο μάρτυρας της απόδοσης της διαμόλυνσης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Renilla plasmid, 0,05 μg).

Η μέτρηση της δράσης της λουσιφεράσης έγινε με την βοήθεια του αντιδραστηρίου Dual-Luciferase Reporter (DLR) Assay System της Promega. Στα κύτταρα που έγινε διαμόλυνση με τα πιο πάνω πλασμίδια και επώαστηκαν για 16 ώρες στο υποξικό θάλαμο ή σε συνθήκες νορμοξίας, προστέθηκαν 100 μl διαλύματος λύσης (Passive Lysis Buffer) και έγινε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Το λύμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε (14.000g, 1 λεπτό) και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, 20 μl από το υπερκείμενο αναμίχθηκαν με 20 μl του αντιδραστηρίου LAR II (Luciferase Assay Reagent II), το οποίο είναι το υπόστρωμα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και το παραγόμενο φως μετρήθηκε στο

λουμινόμετρο (TD-20/20, Luminometer, TURNER DESIGNS). Για τη μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα, στο ίδιο σωληνάκι προστέθηκαν 10 μl του αντιδραστηρίου Stop & Glo 1x, το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της Renilla λουσιφεράσης και το φώς που παράχθηκε μετρήθηκε ξανά. Ο λόγος ενεργότητας της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας προς την ενεργότητα της λουσιφεράσης Renilla, χρησιμοποιήθηκε για να γίνει κανονικοποίηση της μεταγραφική ενεργότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας.

B.2.11 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το προγράμμα GraphPad Prism ver.9. Οι τιμές εκφράζονται σε σχέση με το άδειο πλασμίδιο pGL3 και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο +/- την τυπική απόκλιση (SD) δύο πειραμάτων που έγιναν εις τριπλούν. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με t-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

B.2.12 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων της γονιδιακής έκφρασης δειγμάτων καρκινικών και φυσιολογικών ιστών (**Πίνακας 1**) και των κλινικοπαθολογικών στοιχείων των ασθενών, έγινε με χρήση του διακομιστή GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#general>). Ο διακομιστής GEPIA2 χρησιμοποιεί τις βάσεις δεδομένων (datasets) TCGA (The Cancer Genome Atlas) και GTEx (Genotype-Tissue Expression) για την ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης καρκινικών και φυσιολογικών ιστών και διαδραστικές αναλύσεις (Tang et al, 2019).

TCGA Tumor/ Συντομογραφίες και ολόκληρο όνομα τύπων καρκίνου	TCGA Normal	GTEX/ Φυσιολογικοί ιστοί
Καρκίνος επινεφριδίων (ACC Tumor)	-	Επινεφρίδια
Καρκίνος της ουροδόχου κύστης (BLCA Tumor)	BLCA Normal	Ουροδόχος κύστη
Καρκίνος του μαστού (BRCA Tumor)	BRCA Normal	Μαστός
Καρκίνος του τράχηλου (CESC Tumor)	CESC Normal	Τράχηλος
Χολαγγειοκαρκίνωμα (CHOL Tumor)	CHOL Normal	-
Καρκίνος παχέος εντέρου (COAD Tumor)	COAD Normal	Κόλον
Διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα Λέμφωμα (DLBC Tumor)	-	Αίμα
Καρκίνος οισοφάγου (ESCA Tumor)	ESCA Normal	Οισοφάγος
Γλοιοβλάστωμα (GBM Tumor)	-	Εγκέφαλος
Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού (HNSC Tumor)	HNSC Normal	-
Χρωμόφοβο καρκίνωμα των νεφρών (KICH Tumor)	KICH Normal	Νεφρός
Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα των νεφρών (KIRC Tumor)	KIRC Normal	Νεφρός
Θηλώδες καρκίνωμα των νεφρών (KIRP Tumor)	KIRP Normal	Νεφρός
Οξεία μυελογενής λευχαιμία (LAML Tumor)	-	-
Γλοίωμα (LGG Tumor)	-	Εγκέφαλος
Ηπατοκαρκίνωμα (LIHC Tumor)	LIHC Normal	Ήπαρ
Καρκίνος του πνεύμονα (LUAD Tumor)	LUAD Normal	Πνεύμονας
Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC Tumor)	LUSC Normal	Πνεύμονας
Μεσοθηλίωμα (MESO Tumor)	-	-
Καρκίνος ωοθηκών (OV Tumor)	-	Ωοθήκες
Καρκίνος Παγκρέατος (PAAD Tumor)	PAAD Normal	Πάγκρεας
Φαιοχρωμοκύττωμα και Παραγαγγλίωμα (PCPG Tumor)	PCPG Normal	-
Καρκίνος του προστάτη (PRAD Tumor)	PRAD Normal	Προστάτης
Καρκίνος ορθού (READ Tumor)	READ Normal	Κόλον
Σάρκωμα (SARC Tumor)	SARC Normal	-
Μελάνωμα (SKCM Tumor)	SKCM Normal	Δέρμα
Καρκίνος στομάχου (STAD Tumor)	STAD Normal	Στομάχι
Καρκίνος των όρχεων (όγκοι βλαστικών κυττάρων) (TGCT Tumor)	-	Όρχεις
Καρκίνος θυροειδή αδένος (THCA Tumor)	THCA Normal	Θυροειδής
Θύμωμα (THYM Tumor)	THYM Normal	Αίμα
Καρκίνος ενδομητρίου (UCEC Tumor)	UCEC Normal	Μήτρα
Σάρκωμα μήτρας (UCS Tumor)	-	Μήτρα
Ραγοειδές μελάνωμα(UVM Tumor)	-	-

Πίνακας 1. Τύποι καρκίνου και φυσιολογικοί ιστοί (Tang et al, 2019)

B.2.12.1 Ανάλυση προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Στην ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *AGPAT1-5* σε καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά (όπου υπάρχουν).

B.2.12.2 Ανάλυση επιβίωσης

Η ανάλυση επιβίωσης περιλαμβάνει τη δημιουργία χαρτών επιβίωσης (survival map) και διαγραμμάτων Kaplan-Meier.

Η μέθοδος survival map παρουσιάζει σε ένα θερμικό χάρτη (heatmap), το προγνωστικό αντίκτυπο της έκφρασης των *AGPAT1-5* σε κάθε τύπο καρκίνου, και εκτιμάται χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Mantel –Cox ($p < 0,05$). Παρουσιάζεται η συνολική επιβίωση (Overall Survival), με του μήνες ως μονάδες χρόνου επιβίωσης.

Στα διαγράμματα Kaplan-Meier παρουσιάζεται το αντίκτυπο της υψηλής ή χαμηλής έκφρασης των *AGPAT1-5* στο ποσοστό συνολικής επιβίωσης των ασθενών σε βάθος χρόνου. Γίνεται με την μέθοδο συνολικής επιβίωσης (Overall Survival), με του μήνες ως μονάδες χρόνου επιβίωσης, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Ο διαχωρισμός των δειγμάτων των ασθενών στις ομάδες της υψηλής ή χαμηλής έκφρασης των *AGPAT1-5* έγινε με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή (Median).

B.2.12.3 Ανάλυση συσχέτισης

Η ανάλυση συσχέτισης (Correlation analysis) της έκφρασης μεταξύ δύο γονιδίων ή μεταξύ της έκφρασης ενός γονιδίου και μιας ομάδας γονιδίων (γονιδιακή υπογραφή, gene signature) έγινε χρησιμοποιώντας την δοκιμή Pearson (Tang et al, 2019). Η έκφραση δύο γονιδίων ή ενός γονιδίου και μιας ομάδας γονιδίων έχουν θετική συσχέτιση, όταν ο συντελεστής συσχέτισης (R) είναι θετικός ($R > 0$, $p < 0,05$). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των *AGPAT1-5* με την έκφραση των *HIF1A*, *HIF2A* και μιας γονιδιακής υπογραφής που αποτελείται από 23 γονίδια, τα οποία επάγονται σε συνθήκες υποξίας (υποξική υπογραφή, hypoxic signature) (Koukoulas et al, 2021) **(Πίνακας 2)**.

Συντομογραφία γονιδίου	Όνομα Γονιδίου
ALDOA	Aldolase
BCL2	BCL2 apoptosis regulator
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CDKN1B	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENO1	Enolase 1
ENO2	Enolase 2
ENO3	Enolase 3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HK1	Hexokinase 1
HK2	Hexokinase 2
HMOX1	Heme oxygenase 1
IL6	Interleukin 6
LDHA	Lactate dehydrogenase A
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PFKL	Phosphofructokinase, liver type
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
PRKCA	Protein kinase C alpha
SERPINE1	Serpin family E member 1
SLC2A1	Solute carrier family 2 member 1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor

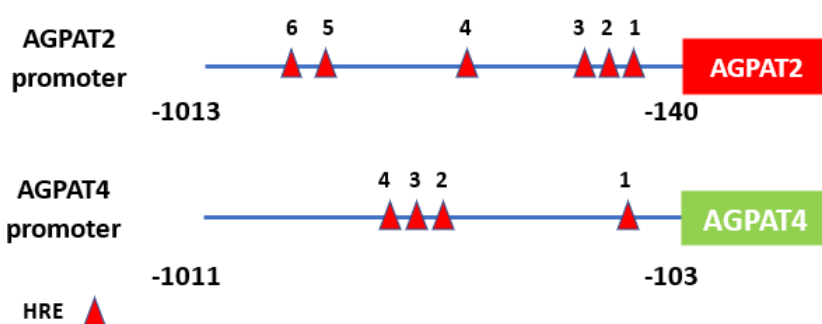
Πίνακας 2. Τα γονίδια που αποτελούν την υποξική γονιδιακή υπογραφή (Koukoulas et al 2021).

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Μελέτη της επίδρασης της υποξίας στην έκφραση του γονιδίου *AGPAT4*

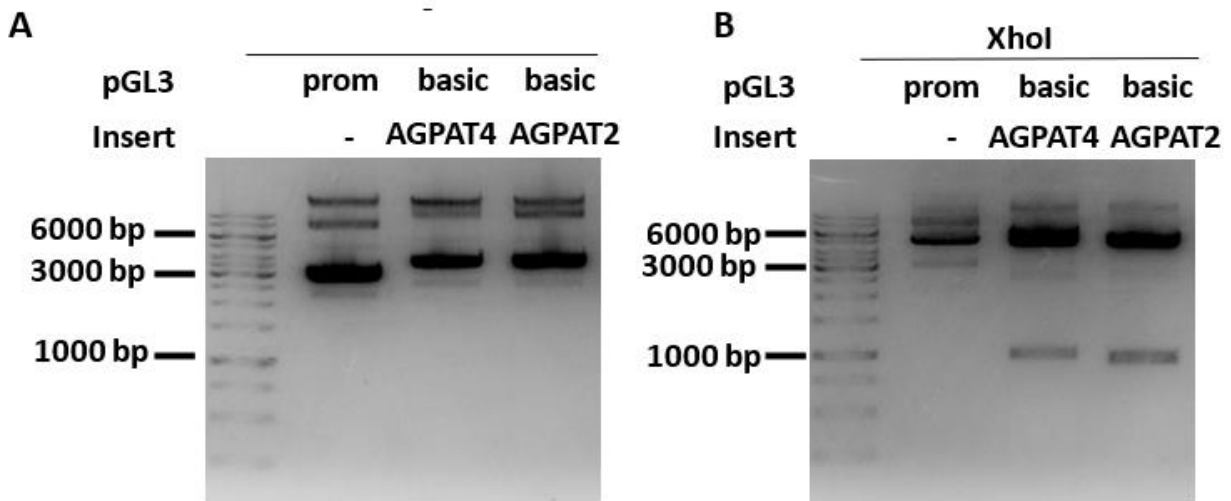
Γ.1.1 Υποκλωνοποίηση του υποκινητή των γονιδίων *AGPAT4* και *AGPAT2* στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-promoter

Με σκοπό να ελεγχθεί αν ο μεταγραφικός παράγοντας υποξίας (HIF-1) επάγει την μεταγραφή του γονιδίου *AGPAT4* σε συνθήκες υποξίας, έγινε υποκλωνοποίηση τμήματος του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT4* (περιοχή -1101 έως -103) ο οποίος φέρει 4 πιθανές αλληλουχίες HRE, από τον πλασμιδιακό φορέα pGL3-basic (Α. Καραγιώτα, αδημοσίευτα αποτελέσματα), στη θέση χ hoI της περιοχής κλωνοποίησης (multiclonic site, MCS), του πλασμιδιακού φορέα pGL3-promoter. Επιπλέον, έγινε αντίστοιχη υποκλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου *AGPAT2* προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας (**Εικ.9**).

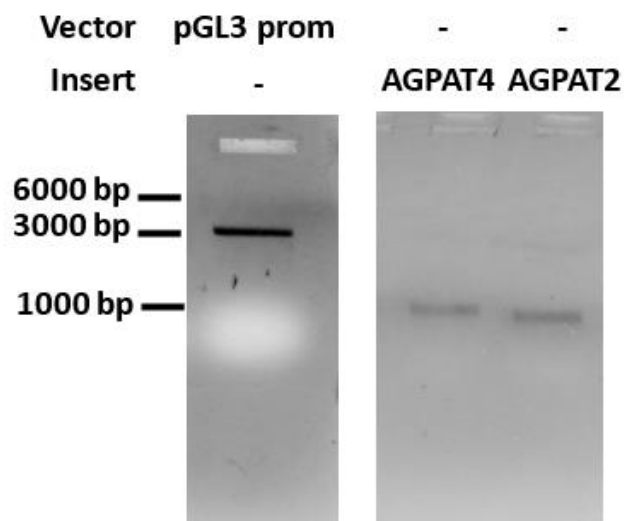


Εικ 9. Σχηματική απεικόνιση τμήματος των υποκινητών των γονιδίων *AGPAT2* και *AGPAT4*

Αρχικά έγινε πέψη των πλασμιδίων pGL3-AGPAT2-prom, pGL3-basic-AGPAT4 και pGL3-promoter με το ένζυμο περιορισμού χ hoI. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (**Εικ.10**). Τα αντίστοιχα τμήματα DNA αποκόπηκαν από την πηκτή, απομονώθηκαν και ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσής τους και εκ νέου ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (**Εικ.11**). Τα απομονωμένα τμήματα προστέθηκαν σε αντίδραση λιγάσης για την ένωση των DNA του φορέα και του ενθέματος. Για την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν 25ng πλασμιδιακού φορέα (pGL3-promoter) και 75ng ενθέματος (*AGPAT2* prom ή *AGPAT4* prom) . Ως αρνητικός μάρτυρας πραγματοποιήθηκε αντίδραση χωρίς την προσθήκη ενθέματος. Οι αντιδράσεις λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό Top10 *E.Coli* βακτηρίων.



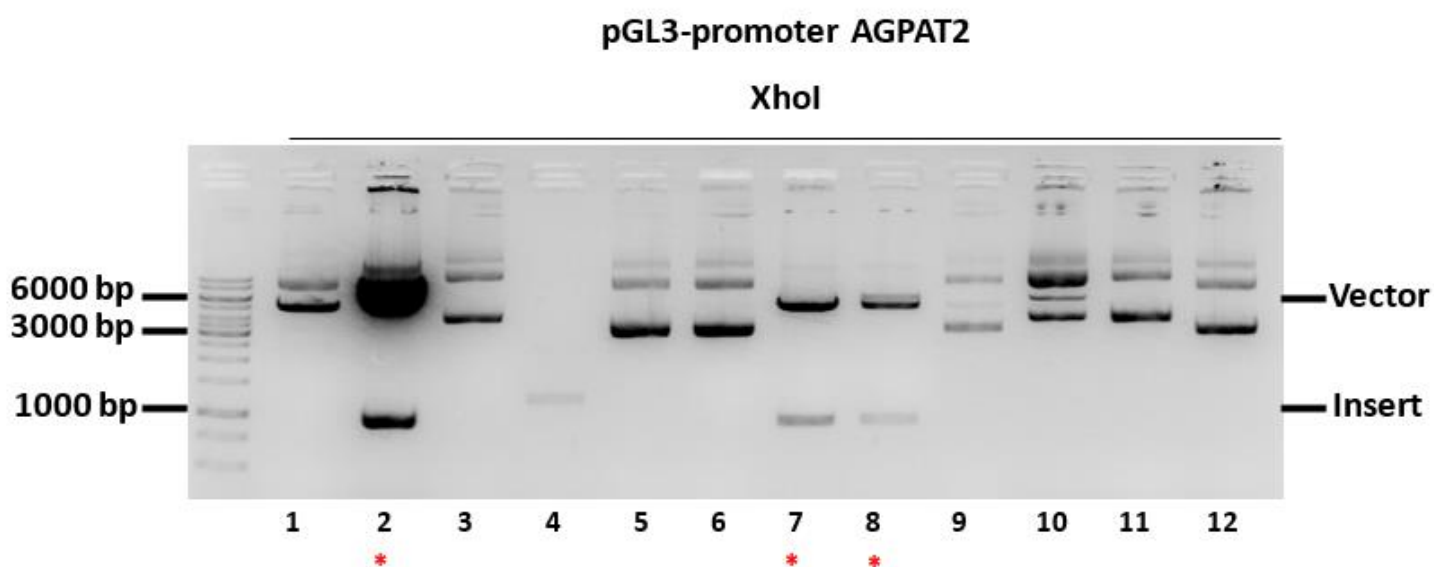
Εικ 10. Πέψη των πλασμιδίων pGL3-AGPAT2-prom, pGL3-basic-AGPAT4 και pGL3-promoter με το ένζυμο περιορισμού XhoI. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η αριστερή εικόνα (A) αντιστοιχεί στα τμήματα πλασμιδίων χωρίς πέψη με το ένζυμο περιορισμού ενώ η δεξιά (B) στα τμήματα DNA που προέκυψαν με πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI



Εικ 11. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA, που αποκόπηκαν από την πηκτή αγαρόζης (Εικ.11) και απομονώθηκαν με την χρήση του NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Macherey-Nagel)

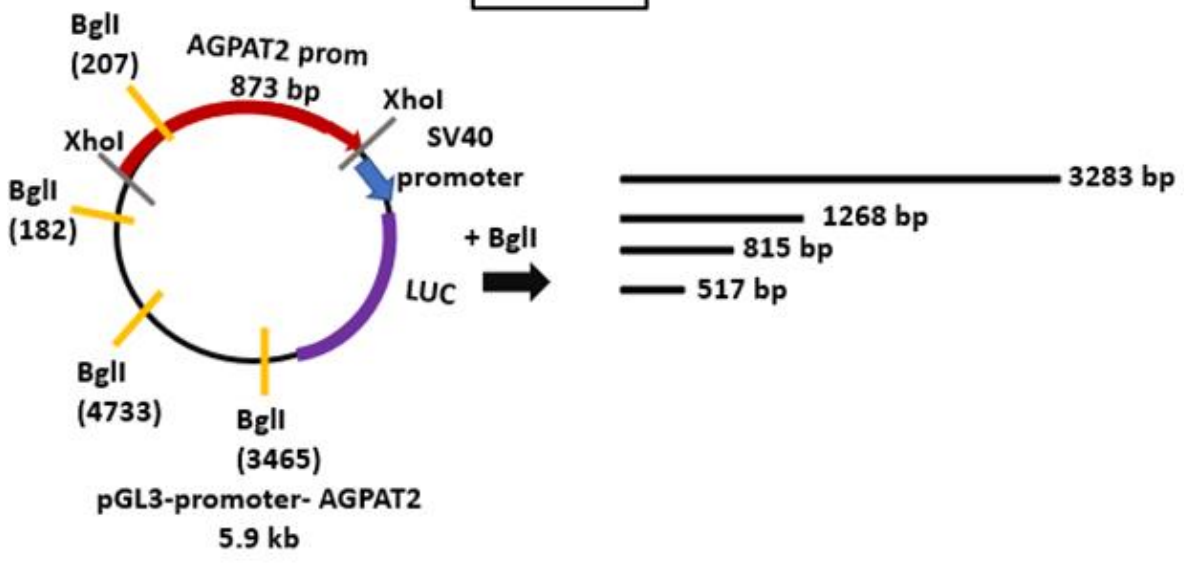
Οι αποικίες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στο τρυβλία, εμβολιάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες με υγρό θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικό και έγινε ολονύχτια επώαση τους στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (170 rpm). Την επόμενη μέρα έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας από κάθε κλώνο, ώστε να ελεγχθούν για την ορθότητα τους. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι κλώνοι περιείχαν το ένθεμα έγινε πέψη με το ένζυμο XhoI και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης.

Από την ανάλυση για την κατασκευή του φορέα pGL3-promoter-AGPAT2 prom (**Εικ.12**) προέκυψαν τρεις θετικοί κλώνοι (κλώνοι 2, 7 και 8), οι οποίοι αναλύθηκαν για τον σωστό προσανατολισμό του ενθέματος μέσα στο πλασμίδιο, με την ενδονουκλεάση περιορισμού BglI και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Οι δύο από του τρεις κλώνους (κλώνοι 2 και 7) έφεραν το ένθεμα στο σωστό προσανατολισμό (**Εικ.13, Εικ.14**).

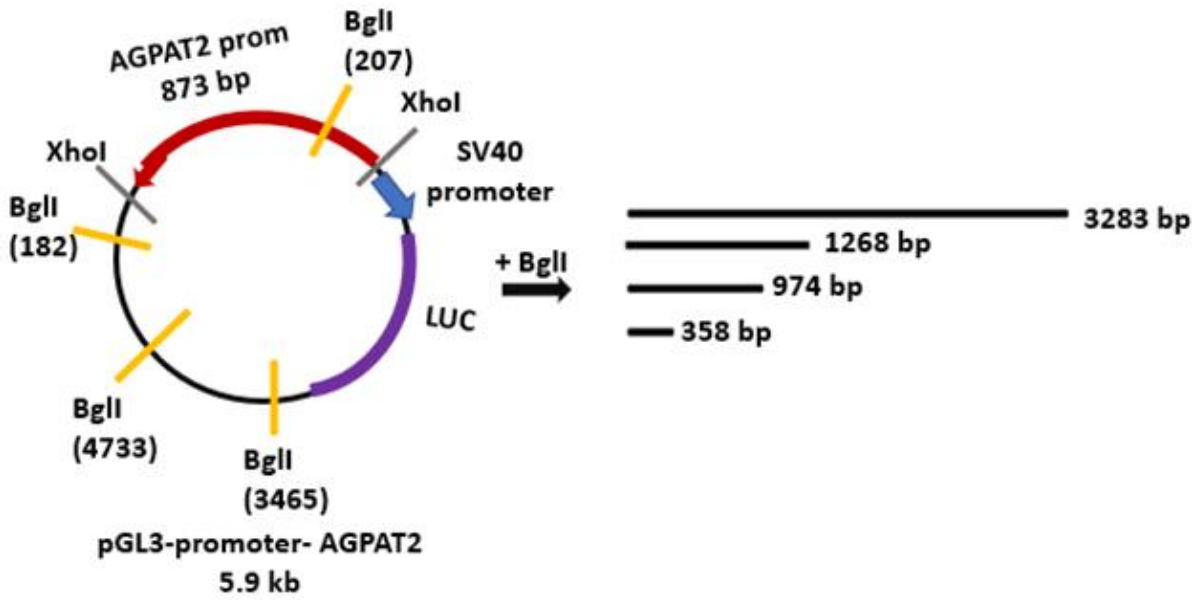


Εικ 12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για το έλεγχο ύπαρξης του ενθέματος (AGPAT2 prom), ύστερα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI. Οι θετικοί κλώνοι απεικονίζονται με αστερίσκο (*)

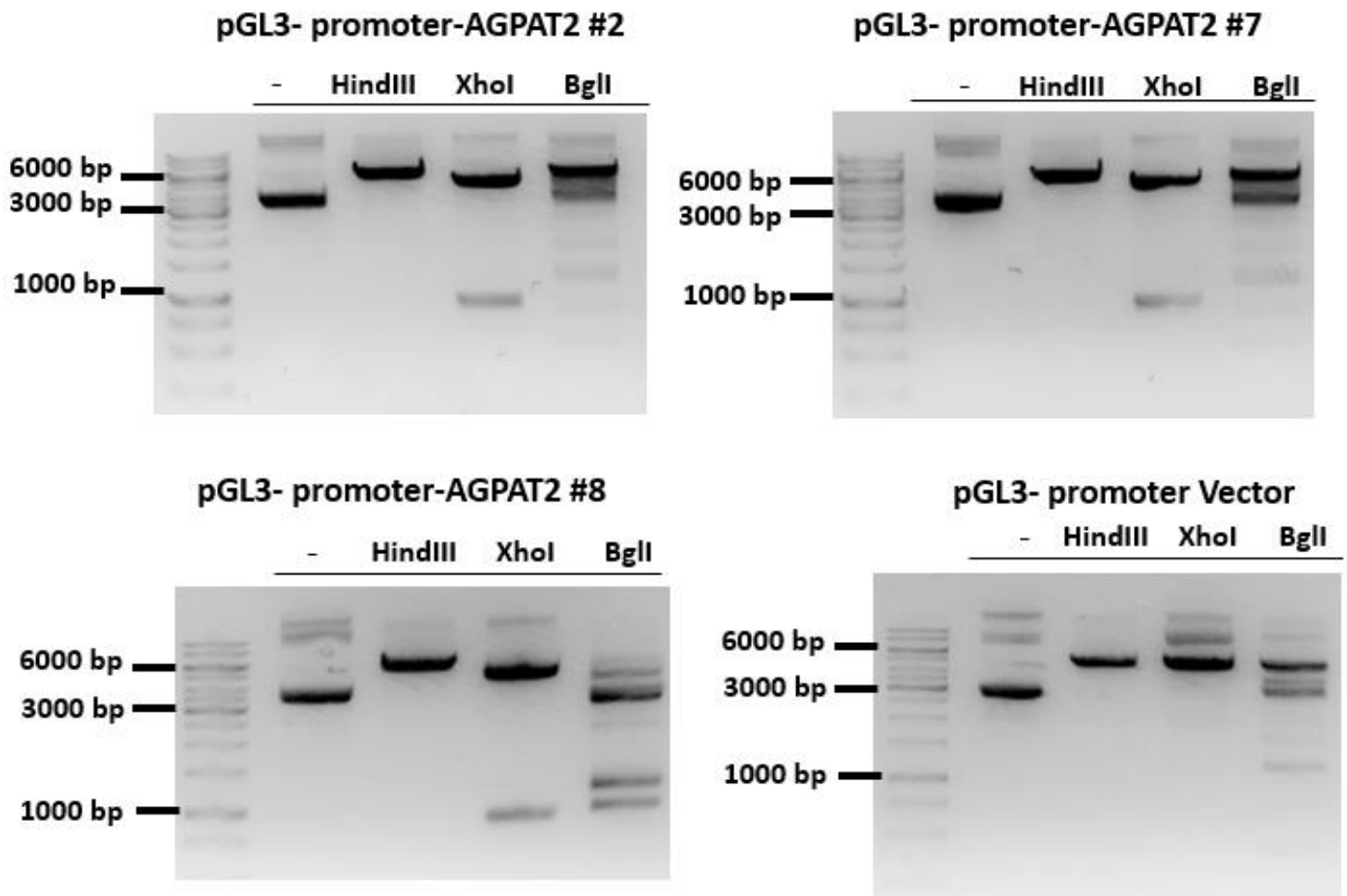
ΣΩΣΤΟΣ



ΛΑΘΟΣ

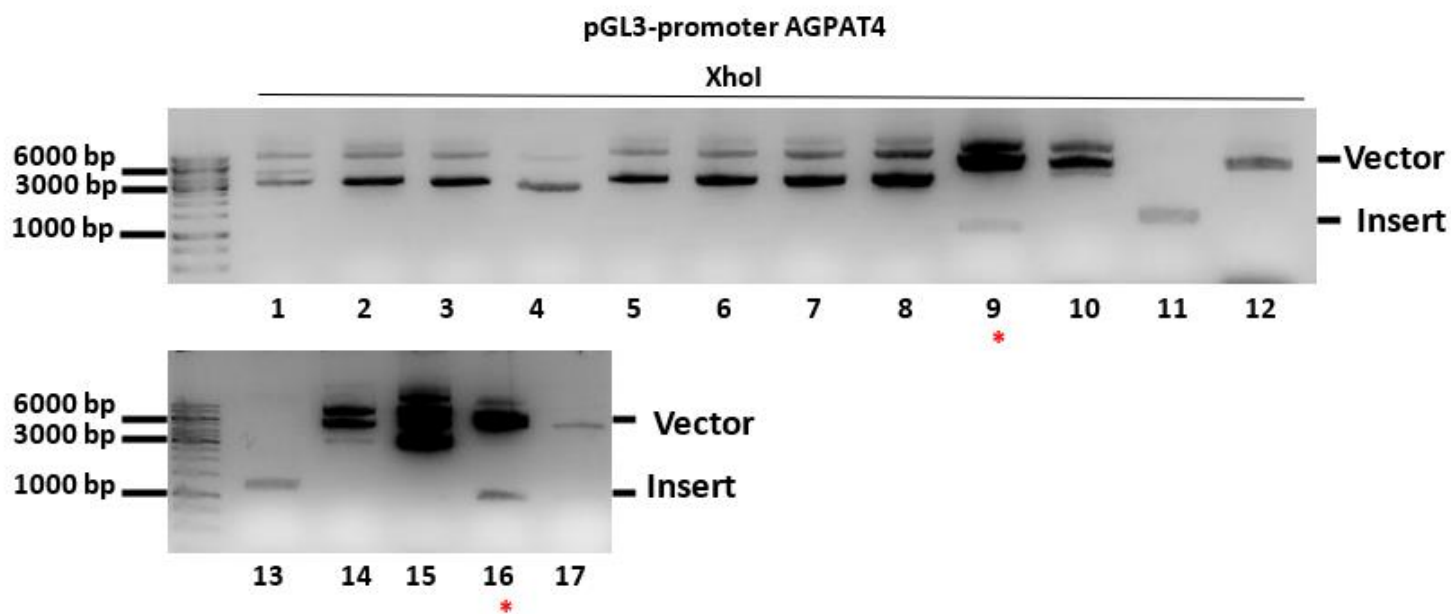


Εικ 13. Σχηματική απεικόνιση των θέσεων της αλληλουχίας που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού BglII στο πλασμιδίό pGL3-promoter-AGPAT2 και τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων DNA, που προκύπτουν από τον σωστό και λάθος προσανατολισμό του ενθέματος

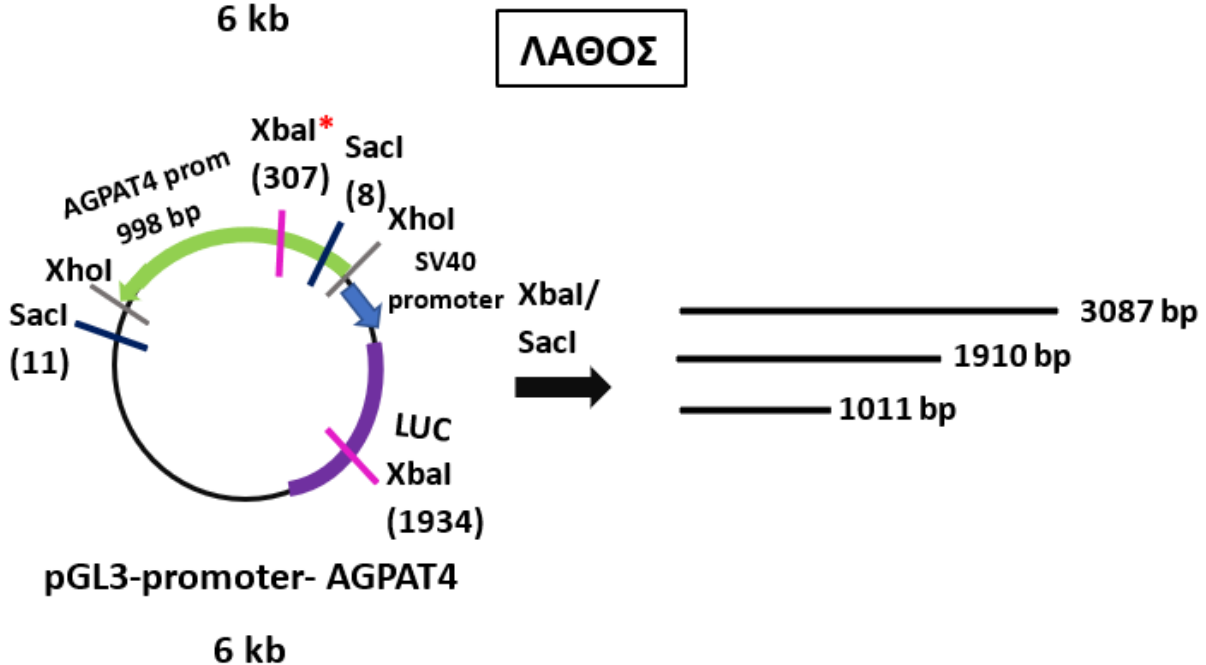
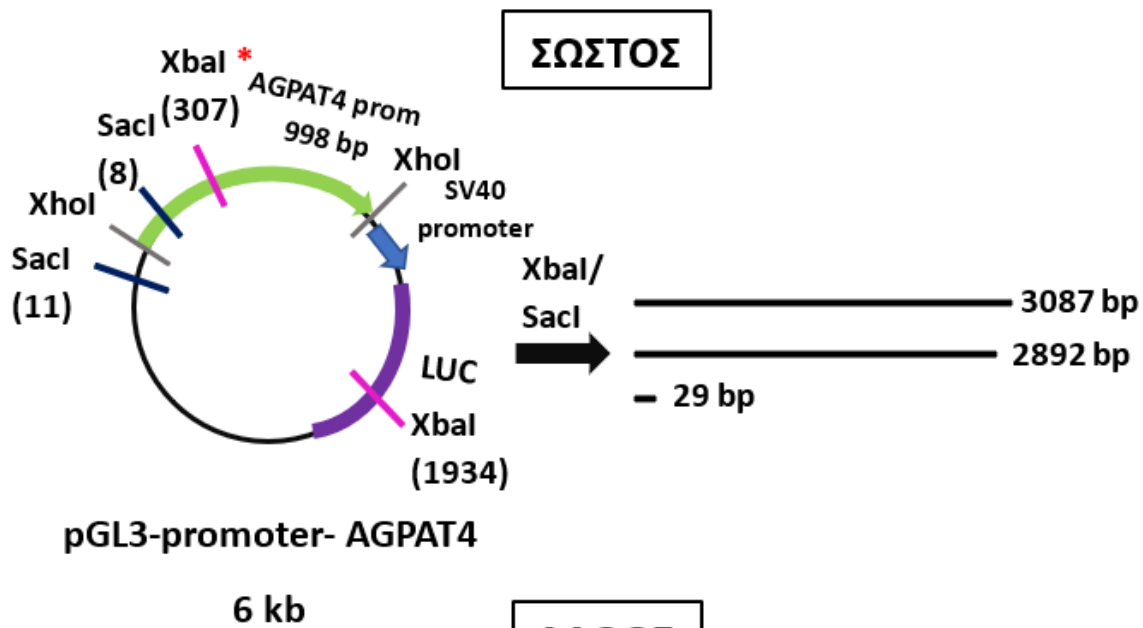


Εικ 14. Έλεγχος των θετικών κλώνων για σωστό προσανατολισμού του ενθέματος στο πλασμίδιο pGL3-promoter-AGPAT2. Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε πηκτική αγαρόζη για το έλεγχο του σωστού προσανατολισμού ενθέματος, μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BglI, (1^η στήλη: άκοπο πλασμίδιο, 2^η στήλη: γραμικό πλασμίδιο, 3^η στήλη: έλεγχος για ύπαρξη ενθέματος, 4^η στήλη: έλεγχος σωστού προσανατολισμού)

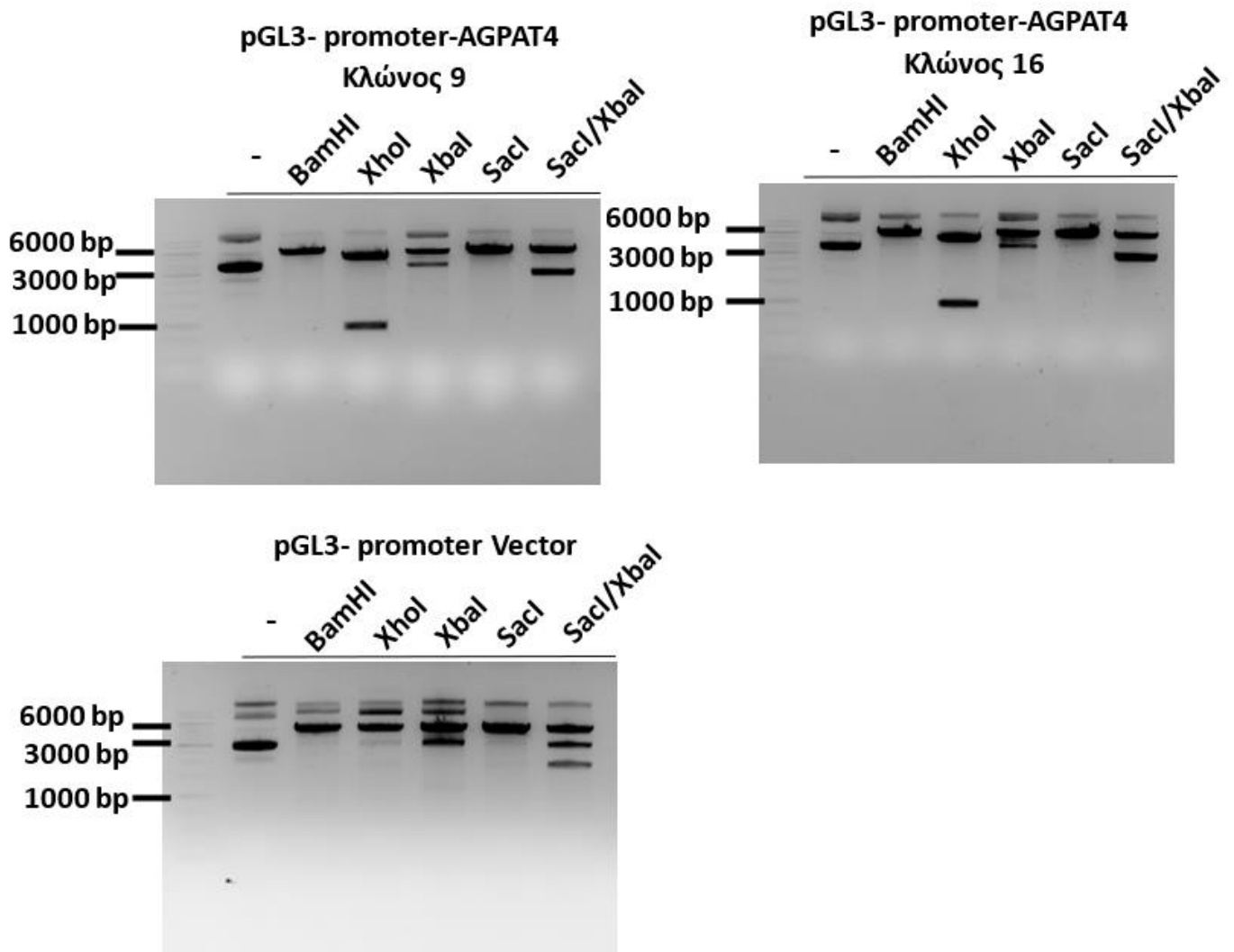
Αντίστοιχα, από την ανάλυση για την κατασκευή του φορέα pGL3-promoter-AGPAT4 prom προέκυψαν δύο θετικοί κλώνοι (κλώνοι 11 και 13) και παρουσιάζονται στην **Εικ.15**. Για τον έλεγχο του προσανατολισμού του ενθέματος, πραγματοποιήθηκε πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού SacI και XbaI , ανεξάρτητα και σε συνδυασμό, και ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε πηκτή αγαρόζη. Και οι δύο κλώνοι είχαν το ένθεμα στο σωστό προσανατολισμό (**Εικ.16, Εικ.17**).



Εικ 15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη για το έλεγχο ύπαρξης του ενθέματος (AGPAT4 prom), ύστερα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI. Οι θετικοί κλώνοι απεικονίζονται με αστερίσκο (*)



Εικ 16. Σχηματική απεικόνιση των θέσεων της αλληλουχίας που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού XbaI και SacI στο πλασμιδίο pGL3-promoter-AGPAT4 και τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων DNA, που προκύπτουν από τον σωστό και λάθος προσανατολισμό του ενθέματος. Ο αστερίσκος, *, συμβολίζει ότι η κυτοσίνη στη θέση 307, είναι μεθυλιωμένη και δεν πέπτεται από το ένζυμο XbaI



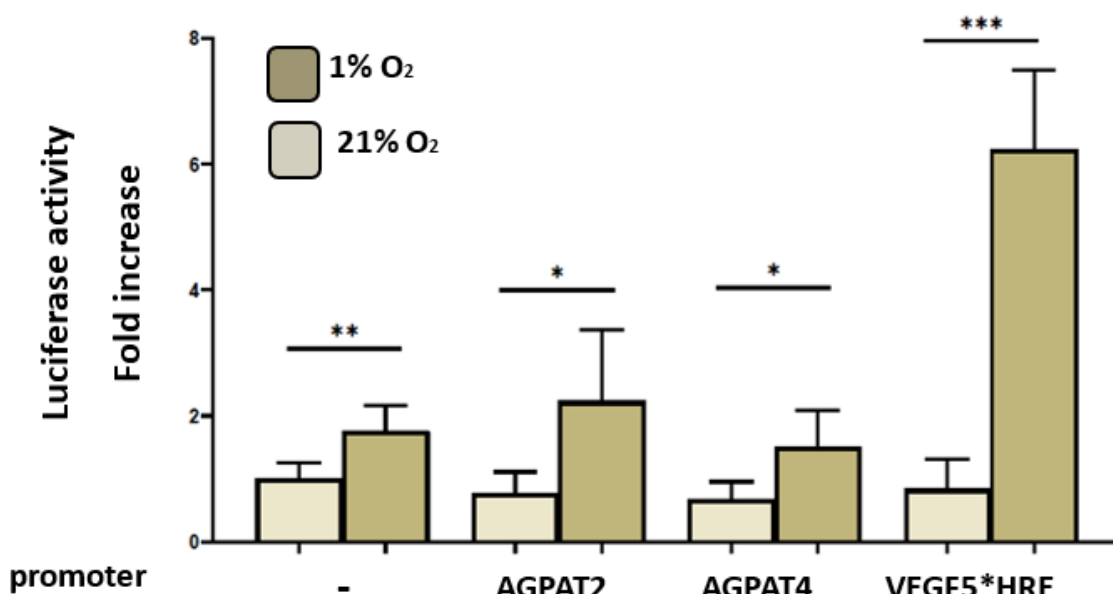
Εικ 17. Έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος στους θετικούς κλώνους pGL3-promoter-AGPAT4. Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε πηκτική αгарόζη για το έλεγχο του σωστού προσανατολισμού ενθέματος, μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XbaI και SacI, (1^η στήλη: άκοπο πλασμίδιο, 2^η στήλη: γραμικό πλασμίδιο, 3^η στήλη: έλεγχος για ύπαρξη ενθέματος, 6^η στήλη: έλεγχος σωστού προσανατολισμού)

Γ.1.2 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας της λουσιφεράσης

Για την δοκιμασία λουσιφεράσης, κύτταρα HEK293, αναπτύχθηκαν σε τρυβλία 24 θέσεων και κάλυπταν περίπου το 60% της επιφάνειας στο πηγαδάκι. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με ένα από τα πλασμίδια, pGL3- promoter-AGPAT4, pGL3-promoter-AGPAT2, ή pGL3-VEGF-5xHRE-Luc,(θετικό δείγμα ελέγχου) και τα πλασμίδια pGL3-promoter και pCI-Renilla. Μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂) για 16 ώρες και ακολούθησε λύση τους, προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Τα πειράματα της διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκαν δύο φορές εις τριπλούν.

Στη νορμοξία παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα δραστικότητας λουσιφεράσης σε όλες τις συνθήκες. Σε συνθήκες υποξίας, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα λουσιφεράσης, τόσο στα εκχυλίσματα κύτταρων που

διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο rGL3-VEGF-5xHRE-(θετικός μάρτυρας) ($p < 0.001$) όσο και στα εκχυλίσματα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια rGL3-promoter-AGPAT2 ($p < 0.05$) ή rGL3-promoter-AGPAT4 ($p < 0.05$). Ωστόσο, και στα εκχυλίσματα κύτταρων που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο rGL3-promoter (αρνητικός μάρτυρας), παρατηρείται παρόμοια αύξηση ($p < 0.01$) (Εικ.18).



Εικ 18. Προσδιορισμός της δράσης λουσιφεράσης σε εκχυλίσματα κυττάρων HEK293, τα οποία διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα rGL3 (-), ή τις πλασμιδιακές κατασκευές rGL3-prom-AGPAT2, rGL3-prom-AGPAT4, rGL3-VEGF-5xHRE-Luc και το rCI-Renilla και επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας για 16 ώρες

Γ.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων AGPAT με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής πλατφόρμας GEPIA2

Μελετήθηκε το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες AGPAT, σε διάφορους τύπους καρκίνου και η συσχέτιση της έκφρασης αυτής με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων HIF. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η βιοπληροφορική πλατφόρμα GEPIA2. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν α. τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AGPAT1-5* σε διάφορους τύπους καρκίνου, β. η επίδραση της τους στην επιβίωση των ασθενών με καρκίνο, και γ. η συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT1-5* με την έκφραση των γονιδίων *HIF1A-HIF2A* ή υποξική γονιδιακή υπογραφή στους διάφορους τύπους καρκίνου.

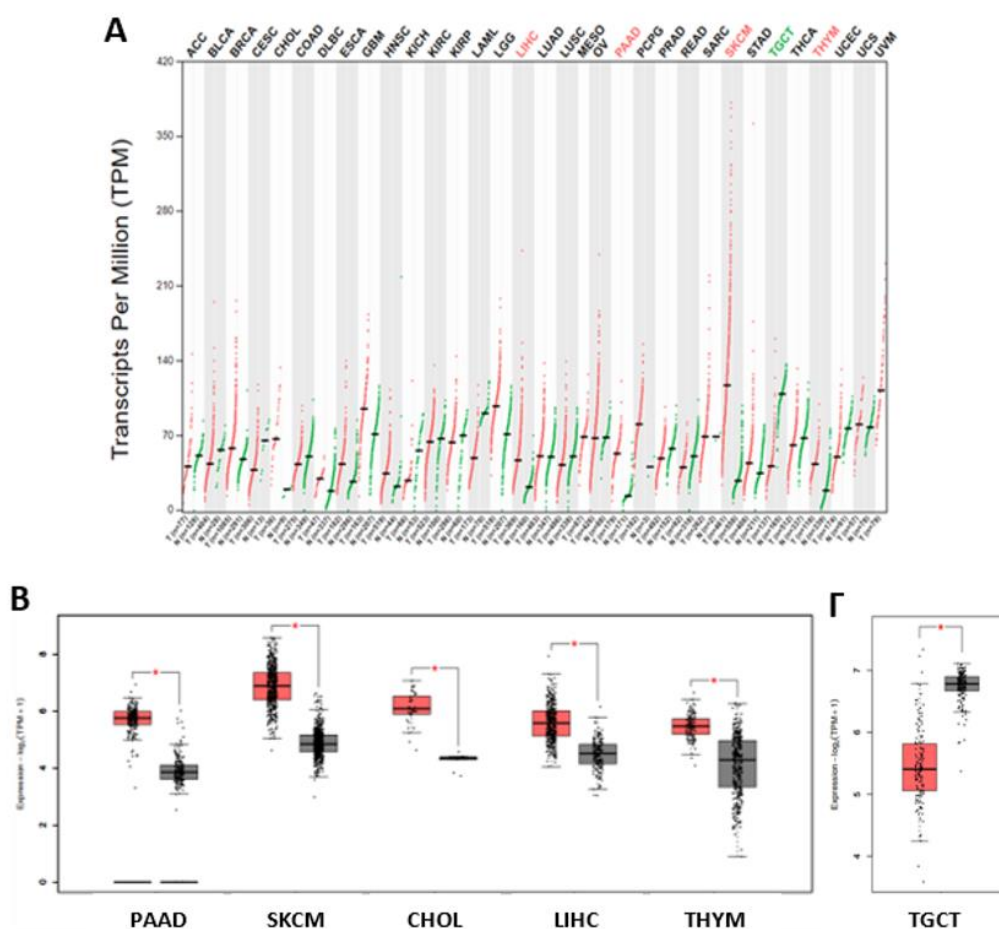
Γ.2.1 Ανάλυση *AGPAT1* με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2

Γ.2.1.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *AGPAT1* σε 33 τύπους καρκίνου, σύμφωνα με το διάγραμμα Dot Blot (Εικ.19A), έδειξε ότι η έκφραση του *AGPAT1* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών (κόκκινο) με καρκίνο του παγκρέατος (PAAD), μελάνωμα (SKCM), ηπατοκαρκίνωμα (LIHC) και

καρκίνο του θύμου αδένα (THYM). Επίσης, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT1* (σε σχέση με τα δείγματα υγιών ατόμων) σε δείγματα (πράσινο) ασθενών με καρκίνο των όρχεων (TGCT).

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT1* με Box plot, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του διαγράμματος Dot plot και έδειξε επιπλέον, ότι η έκφραση του *AGPAT1* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών χολαγγειοκαρκίνωμα (CHOL) (Εικ.19B, Εικ.19Γ).



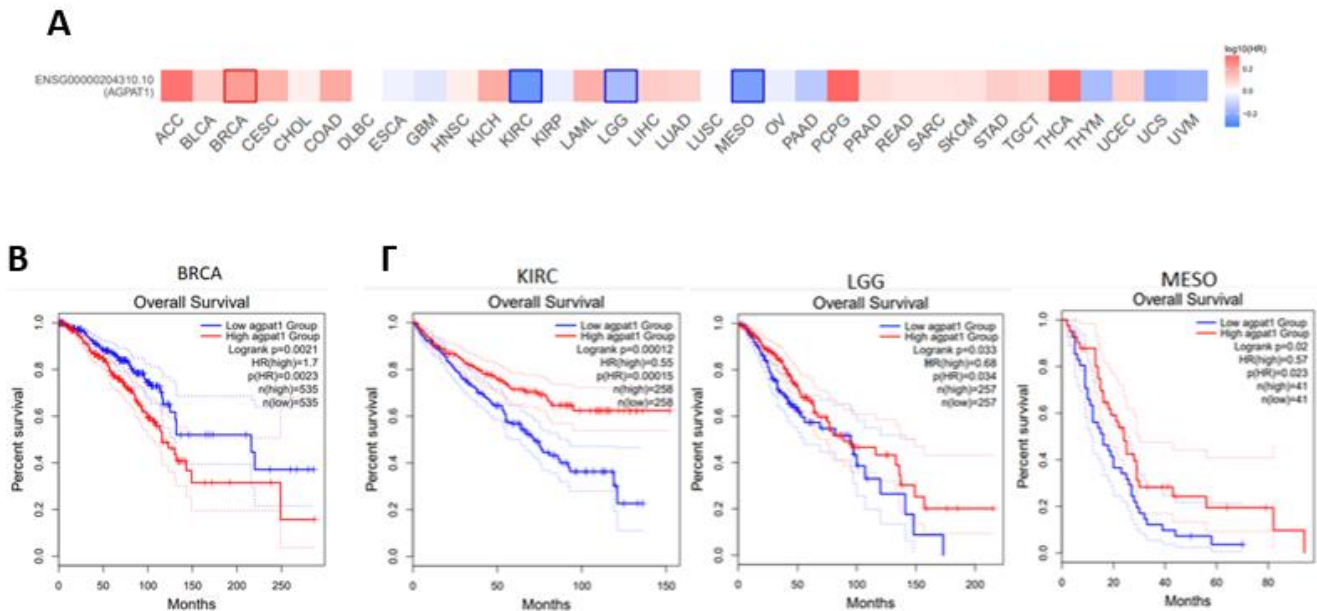
Εικ 19. Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT1*. Α). Διάγραμμα Dot plot. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με πράσινο σε δείγματα υγιών μαρτύρων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι τύποι καρκίνου με σημαντικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *AGPAT1* σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με πράσινο χρώμα οι τύποι καρκίνου με σημαντικά χαμηλή έκφραση. Β και Γ). Ανάλυση Box plot, σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με γκρι σε δείγματα υγιών μαρτύρων. (* $p=0.01$)

Γ.2.1.2 Ανάλυση Επιβίωσης

Στο χάρτη επιβίωσης (Survival map), παρατηρείται ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT1* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (BRCA). Ακόμη, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT1* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με νεφρικό διαυγές καρκίνωμα (KIRC), γλοίωμα (LGG), και μεσοθηλίωμα (MESO) (Εικ.20Α).

Από τα διαγράμματα Kaplan Meier, προκύπτει ότι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού (BRCA), οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα υψηλής έκφρασης *AGPAT1*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT1* ($p=0.0021$) (**Εικ.20B**). Αντιθέτως, ασθενείς με νεφρικό διαυγές καρκίνωμα (KIRC, $p=0.00012$), γλοίωμα (LGG, $p=0.033$), και μεσοθηλίωμα (MESO, $p=0.02$), που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης του *AGPAT1*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών υψηλής έκφρασης του *AGPAT1* (**Εικ.20Γ**).

Εικ 20. Επίδραση της γονιδιακής έκφρασης της *AGPAT1* στην πρόγνωση επιβίωσης ασθενών



με καρκίνο. Α). Ανάλυση Επιβίωσης με Survival map , Β και Γ). Ανάλυση επιβίωσης με διαγράμματα Kaplan Meier

Γ.2.1.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του *AGPAT1* και γονιδίων δεικτών της υποξίας

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT1* και *HIF1A* ή *HIF2A*, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p<0.05$, $R>0$) της έκφρασης *AGPAT1* και *HIF1A* σε 24 από τους 33 τύπους καρκίνου, της έκφρασης *AGPAT1* και *HIF2A* σε 20 από τις 33 τύπους καρκίνου, και της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT1* και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, σε 29 από τους 33 τύπους καρκίνου (**Πίνακας 3**).

AGPAT1			
TCGA Tumor	HIF1A (R)	HIF2A (R)	Υποξική Γονιδιακή Υπογραφή (R)
ACC	0.49 (p=6.7e⁻⁶)***	0.31 (p=0.0061)*	0.49 (p=6.1e⁻⁶)***
BCLA	0.16 (p=0.00093)**	-0.012 (p=0.81)	0.3 (p=4.2e⁻¹⁰)***
BRCA	0.12 (p=4.9e⁻⁵)***	-0.0034 (p=0.91)	0.35 (p=0)***
CESC	0.24 (p=2.2e⁻⁵)***	0.094 (p=0.1)	0.18 (p=0.0012)**
CHOL	0.24 (p=0.16)	-0.0088 (p=0.96)	-0.019 (p=0.91)
COAD	0.32 (p=5.4e⁻⁸)***	0.37 (p=2.9e⁻¹⁰)***	0.45 (p=4e⁻¹⁵)***
DLBC	0.58 (p=2.4e⁻⁵)***	0.28 (p=0.056)	0.5 (p=0.00039)***
ESCA	0.054 (p=0.47)	0.22 (p=0.0027)**	0.048 (p=0.52)
GBM	0.37 (p=1.3e⁻⁶)***	0.28 (p=3e⁻⁴)***	0.53 (p=2.9e⁻¹³)***
HNSC	0.11 (p=0.016)*	0.18 (p=2.4e⁻⁵)***	0.31 (p=5e⁻¹³)***
KICH	0.31 (p=0.012)*	0.32 (p=0.0094)*	0.5 (p=2.3e⁻⁵)***
KIRC	0.12 (p=0.005)**	0.52 (p=0)***	0.56 (p=0)***
KIRP	0.24 (p=4.1e⁻⁵)***	0.14 (p=0.02)*	0.41 (p=3.4e⁻¹³)***
LAML	0.13 (p=0.089)	0.3 (p=6.8e⁻⁵)***	0.54 (p=1.2e⁻¹⁴)***
LGG	0.065 (p=0.14)	0.028 (p=0.53)	0.2 (p=4.8e⁻⁶)***
LIHC	0.23 (p=9.2e⁻⁶)***	0.086(p=0.1)	0.31 (p=1.3e⁻⁹)***
LUAD	0.12 (p=0.011)*	0.21 (p=2.7e⁻⁶)***	0.36 (p=0)***
LUSC	0.12 (p=0.0066)*	0.18 (p=7.3e⁻⁵)***	0.24 (p=7.1e⁻⁸)***
MESO	-0.14 (p=0.19)	-0.24 (p=0.023)	-0.046 (p=0.67)
OV	0.44 (p=0)***	0.29 (p=9.4e⁻¹⁰)***	0.47 (p=0)***
PAAD	0.25 (p=0.00075)**	0.27 (p=2e⁻⁴)***	0.41 (p=1.9e⁻⁸)***
PCPG	0.21 (p=0.0038)**	0.13 (p=0.073)	0.35 (p=1.4e⁻⁶)***
PRAD	0.28 (p=2.5e⁻¹⁰)***	0.27 (p=1.5e⁻⁹)***	0 (p=0.43)
READ	0.39 (p=0.00012)***	0.33 (p=0.0016)**	0.4 (p=6.2e⁻⁵)***
SARC	0.17 (p=0.0073)*	0.025 (p=0.69)	0.11 (p=0.087)
SKCM	0.049 (p=0.092)	0.041 (p=0.38)	0.18 (p=0.00015)***
STAD	0.21 (p=1.5e⁻⁵)***	0.27 (p=5.1e⁻⁸)***	0.31 (p=2.5e⁻¹⁰)***
TGCT	0.43 (p=1.2e⁻⁷)***	0.59 (p=2.1e⁻¹⁴)***	0.23 (p=0.0067)*
THCA	0.2 (p=8.7e⁻⁶)***	0.53 (p=0)***	0.62 (p=0)***
THYM	0.91 (p=0.011)*	0.51 (p=2.5e⁻⁹)***	0.45 (p=3e⁻⁷)***
UCEC	-0.011 (p=0.89)	0.026 (p=0)***	0.17 (p=0.026)*
UCS	0.011 (p=0.94)	-0.15 (p=0.26)	0.33 (p=0.012)*
UVM	0.046 (p=0.68)	0.068 (p=0.55)	0.13 (p=0.25)

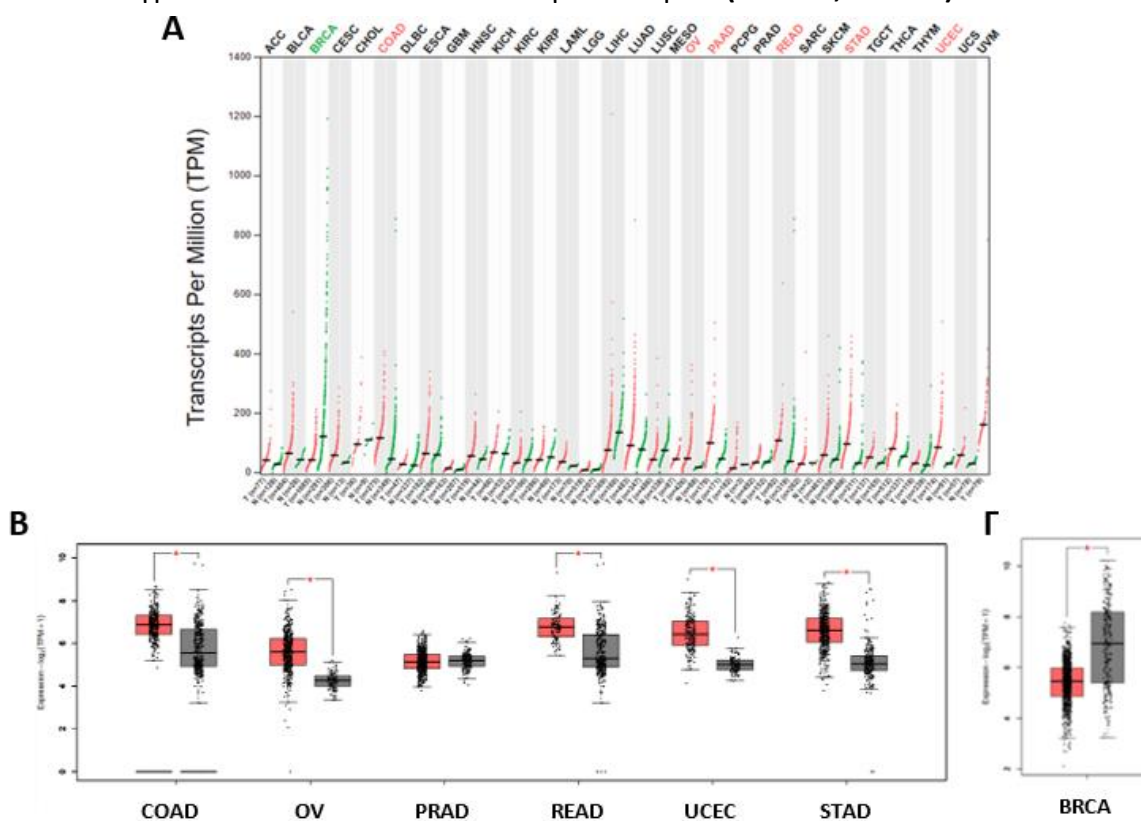
Πίνακας 3. Συσχέτισης της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT1* και της έκφρασης γονιδίων δεικτών της υποξίας (Με έντονο χρώμα παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (p<0.05, R>0) (*: p<0.05, **: p<0.05, ***: p<0.005)

Γ.2.2 Ανάλυση *AGPAT2* με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2

Γ.2.2.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *AGPAT2* σε 33 τύπους καρκίνου, σύμφωνα με το διάγραμμα Dot Blot (**Εικ.21A**), έδειξε ότι η έκφραση του *AGPAT2* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών (κόκκινο) με καρκίνο του παχέος εντέρου (COAD), καρκίνο των ωοθηκών (OV), καρκίνο του παγκρέατος (PAAD), καρκίνο του ορθού (READ) και καρκίνο του ενδομητρίου (UCEC) και καρκίνο του στομάχου (STAD). Ακόμα, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT2* (σε σχέση με τα δείγματα υγιών ατόμων) σε δείγματα (πράσινο) ασθενών με καρκίνο του μαστού (BRCA).

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT2* με Box plot, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του διαγράμματος Dot plot, ωστόσο σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος (PAAD) τα επίπεδα έκφρασης του *AGPAT2* είναι παρόμοια τόσο στα δείγματα ασθενών όσο και στην υγιών ατόμων (**Εικ.21B, Εικ.21Γ**).

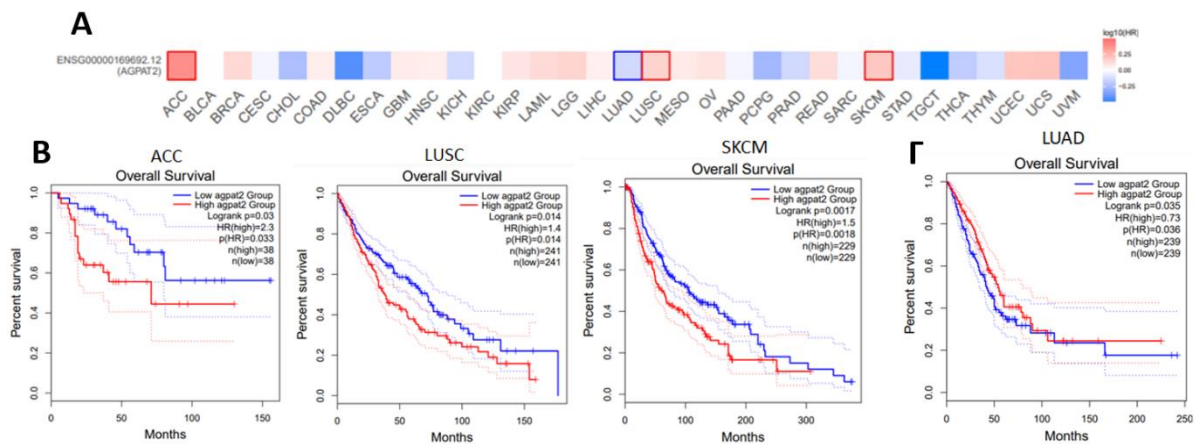


Εικ 21. Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT2*. Α). Διάγραμμα Dot plot. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα εκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με πράσινο σε δείγματα υγείων μαρτύρων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι τύποι καρκίνου με σημαντικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *AGPAT2* σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με πράσινο χρώμα οι τύποι καρκίνου με σημαντικά χαμηλή έκφραση. Β και Γ). Ανάλυση Box plot, σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα εκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με γκρι σε δείγματα υγείων μαρτύρων. (* $p=0.01$)

Γ.2.2.2 Ανάλυση Επιβίωσης

Στο χάρτη επιβίωσης (Survival map), παρατηρείται ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT2* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC) και μελάνωμα (SKCM). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT2* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (LUAD) (**Εικ.22Α**).

Από τα διαγράμματα Kaplan Meier, προκύπτει ότι οι ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC) και μελάνωμα (SKCM), οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα υψηλής έκφρασης *AGPAT2*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT2* (**Εικ.22Β**). Ενώ, ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (LUAD), που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης του *AGPAT2*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών υψηλής έκφρασης του *AGPAT2* ($p < 0.05$) (**Εικ.22Γ**).



Εικ 22. Επίδραση της γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT2* στην πρόγνωση επιβίωσης ασθενών με καρκίνο. Α). Ανάλυση Επιβίωσης με Survival map , Β και Γ). Ανάλυση επιβίωσης με διαγράμματα Kaplan Meier

Γ.2.2.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του *AGPAT2* και γονιδίων δεικτών της υποξίας

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT2* και *HIF1A* ή *HIF2A*, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p < 0.05$, $R > 0$) της έκφρασης *AGPAT2* και *HIF1A* μόνο σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (GBM Tumor), της έκφρασης *AGPAT2* και *HIF2A* σε 10 από τις 33 τύπους καρκίνου, και της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT2* και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, σε 9 από τους 33 τύπους καρκίνου (**Πίνακας 4**).

AGPAT2			
TCGA Tumor	HIF1A (R)	HIF2A (R)	Υποξική Γονιδιακή Υπογραφή (R)
ACC	0.073 (p=0.53)	0.33 (p=0.003)**	0.18 (p=0.11)
BCLA	-0.17 (p=0.00082)	0.15 (p=0.0022)**	-0.09 (p=0.072)
BRCA	-0.13 (p=2.4e ⁻⁵)	0.055 (p=0.072)	-0.068 (p=0.025)
CESC	-0.12 (p=0.03)	-0.14 (p=0.012)	-0.22 (p=7.9e ⁻⁵)
CHOL	0.18 (p=-0.23)	-0.16 (p=0.34)	-0.3 (p=0.074)
COAD	0.14 (p=-0.088)	0.0047 (p=0.94)	0.16 (p=0.0076)*
DLBC	-0.26 (p=0.079)	-0.19 (p=0.21)	-0.2 (p=0.18)
ESCA	-0.25 (p=0.00075)	0.015 (p=0.84)	-0.095 (p=0.2)
GBM	0.2 (p=0.01)*	0.19 (p=0.017)*	0.28 (p=0.00026)***
HNSC	-0.097 (p=0.027)	-0.12 (p=0.0056)	-0.13 (p=0.0038)
KICH	-0.14 (p=0.25)	-0.14 (p=0.28)	-0.18 (p=0.15)
KIRC	-0.23 (p=1.2e ⁻⁷)	-0.22 (p=0.0083)	-0.17 (p=7.9e ⁻⁵)
KIRP	-0.12 (p=0.038)	0.21 (p=0.00044)***	0.1 (p=0.081)
LAML	0.13 (p=0.089)	-0.12 (p=0.11)	0.5 (p=1.6e⁻¹²)***
LGG	0.055 (p=0.21)	-0.21 (p=1e ⁻⁶)	0.22 (p=6.6e⁻⁷)***
LIHC	0.057 (p=0.27)	0.06 (p=0.25)	0.15 (p=0.0036)**
LUAD	-0.097 (p=0.034)	0.098 (p=0.031)*	-0.045 (p=0.33)
LUSC	-0.017 (p=0.71)	0.062 (p=0.17)	0.051 (p=0.26)
MESO	-0.13 (p=0.24)	0.0074 (p=0.95)	0.018 (p=0.87)
OV	0.14 (p=0.073)	0.095 (p=0.05)*	0.15 (p=0.0025)**
PAAD	-0.25 (p=0.00059)	-0.27 (p=0.00023)	0.14 (p=0.055)*
PCPG	-0.018 (p=0.81)	0.36 (p=7.2e⁻⁷)***	0.5 (p=1.2e⁻¹²)***
PRAD	-0.28 (p=9.4e ⁻⁹)	-0.052 (p=0.25)	-0.18 (p=6.7e ⁻⁵)
READ	-0.28 (p=0.0062)	-0.18 (p=0.093)	-0.28 (p=0.0064)
SARC	-0.22 (p=0.00027)	-0.14 (p=0.022)	-0.33 (p=7.2e ⁻⁸)
SKCM	-0.3 (p=2.8e ⁻¹¹)	-0.098 (p=0.036)	-0.2 (p=1.7e ⁻⁵)
STAD	-0.039 (p=0.44)	-0.022 (p=0.65)	0.23 (p=1.7e⁻⁶)***
TGCT	-0.064 (p=0.46)	-0.22 (p=0.01)	0.11 (p=0.21)
THCA	-0.12 (p=0.0053)	-0.041 (p=0.36)	-0.086 (p=0.052)
THYM	-0.12 (p=0.19)	0.39 (p=1.1e⁻⁵)***	-0.12 (p=0.21)
UCEC	-0.11 (p=0.16)	0.078 (p=0.31)	0.088 (p=0.25)
UCS	-0.15 (p=0.27)	-0.061 (p=0.65)	-0.13 (p=0.34)
UVM	-0.33 (p=0.0035)	-0.0093 (p=0.94)	-0.24 (p=0.035)

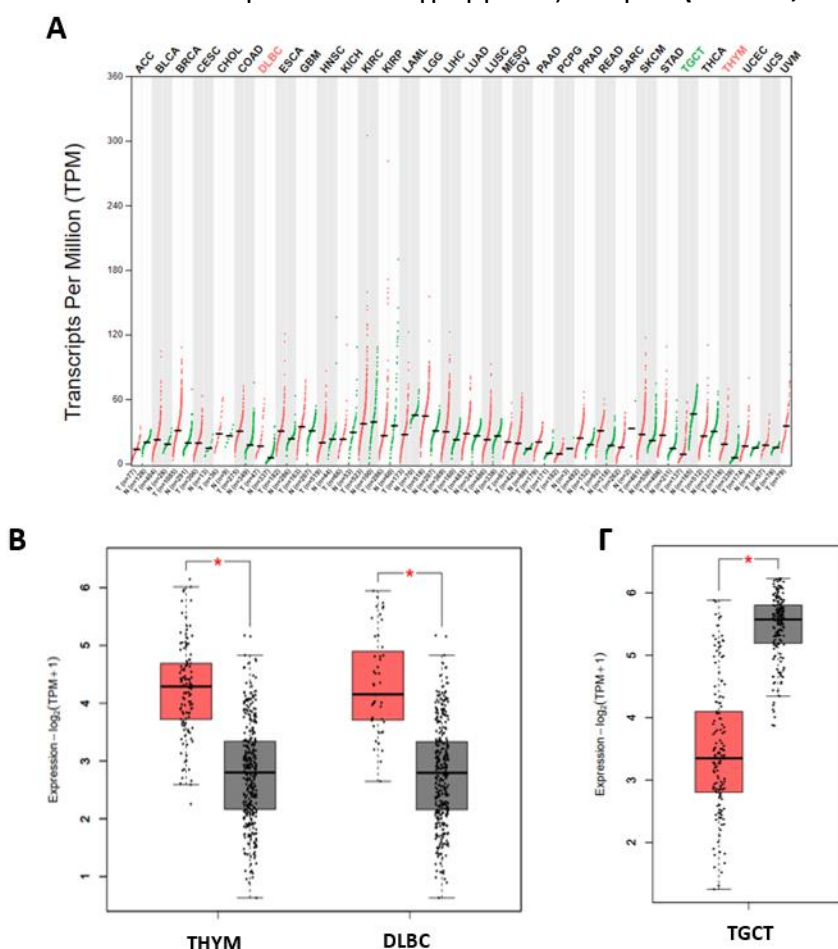
Πίνακας 4. Συσχέτισης της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT2* και της έκφρασης γονιδίων δεικτών της υποξίας (Με έντονο χρώμα παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (p<0.05, R>0) (*: p<0.05, **: p<0.05, ***: p<0.005)

Γ.2.3 Ανάλυση *AGPAT3* με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2

Γ.2.3.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *AGPAT3* σε 33 τύπους καρκίνου, σύμφωνα με το διάγραμμα Dot Blot (**Εικ.23A**), έδειξε ότι η έκφραση του *AGPAT3* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών (κόκκινο) με διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα λέμφωμα (DLBC) και θύμωμα (THYM). Ακόμα, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT3* (σε σχέση με τα δείγματα υγίων ατόμων) σε δείγματα (πράσινο) ασθενών με καρκίνο των όρχεων (TGCT).

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT3* με Box plot, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του διαγράμματος Dot plot (**Εικ.23B, Εικ.23Γ**).



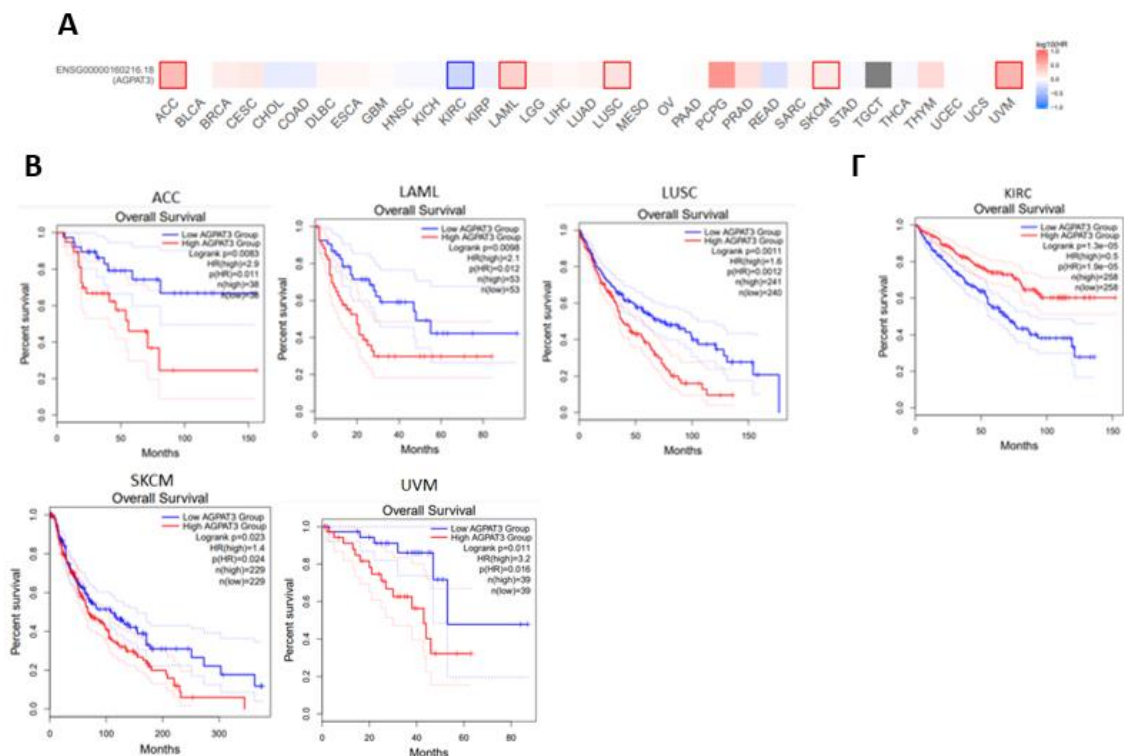
Εικ 23. Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT3*. Α). Διάγραμμα Dot plot. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα εκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με πράσινο σε δείγματα υγείων μαρτύρων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι τύποι καρκίνου με σημαντικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *AGPAT3* σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με πράσινο χρώμα οι τύποι καρκίνου με σημαντικά χαμηλή έκφραση. Β και Γ). Ανάλυση Box plot, σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα εκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με γκρι σε δείγματα υγείων μαρτύρων. (* $p=0.01$)

Γ.2.3.2 Ανάλυση Επιβίωσης

Στο χάρτη επιβίωσης (Survival map), παρατηρείται ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT3* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με

καρκίνο επινεφριδίων (ACC), οξεία μυελογενής λευχαιμία (LAML) , πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC), μελάνωμα (SKCM) και ραγοειδές μελάνωμα (UVM). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT3* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα των νεφρών (KIRC) (**Εικ.24Α**).

Από τα διαγράμματα Kaplan Meier, προκύπτει ότι οι ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), οξεία μυελογενής λευχαιμία (LAML), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC), μελάνωμα (SKCM) και ραγοειδές μελάνωμα (UVM), οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα υψηλής έκφρασης *AGPAT3*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT3* (**Εικ.24Β**). Ενώ, ασθενείς διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα των νεφρών (KIRC), που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης του *AGPAT3*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών υψηλής έκφρασης του *AGPAT3* (**Εικ.24Γ**) ($p < 0.05$).



Εικ 24. Επίδραση της γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT3* στην πρόγνωση επιβίωσης ασθενών με καρκίνο. Α). Ανάλυση Επιβίωσης με Survival map , Β και Γ). Ανάλυση επιβίωσης με διαγράμματα Kaplan Meier

Γ.2.3.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του *AGPAT3* και γονιδίων δεικτών της υποξίας

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT3* και *HIF1A* ή *HIF2A*, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p < 0.05$, $R > 0$) της έκφρασης *AGPAT3* και *HIF1A* σε 31 από τους 33 τύπους καρκίνου, της έκφρασης *AGPAT3* και *HIF2A* σε 28 από τις 33 τύπους καρκίνου, και της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT3* και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, σε 29 από τις 33 τύπους καρκίνου (**Πίνακας 5**).

AGPAT3			
TCGA Tumor	HIF1A (R)	HIF2A (R)	Υποξική Γονιδιακή Υπογραφή (R)
ACC	0.58 (p=2.9e ⁻⁸)***	0.4 (p=0.00028)***	0.57 (p=5.8e ⁻⁸)***
BCLA	0.19 (p=8.8e ⁻⁵)***	0.17 (p=0.00065)**	0.31 (p=1.9e ⁻¹⁰)***
BRCA	0.19 (p=2.5e ⁻¹⁰)***	0.078 (p=0.011)*	0.4 (p=0)***
CESC	0.3 (p=6.7e ⁻⁸)***	0.046 (p=0.42)	0.44 (p=1.1e ⁻¹⁵)***
CHOL	0.39 (p=0.018)*	0.22 (p=0.19)	0.32 (p=0.058)
COAD	0.12 (p=0.04)*	0.2 (p=0.0011)**	0.41 (p=1.9e ⁻¹²)***
DLBC	0.65 (p=8.6e ⁻⁷)***	0.53 (p=0.00014)***	0.78 (p=1e ⁻¹⁰)***
ESCA	0.014 (p=0.85)	0.15 (p=0.047)*	0.11 (p=0.12)
GBM	0.33 (p=2.1e ⁻⁵)***	0.28 (p=0.00031)***	0.43 (p=7.5e ⁻⁹)***
HNSC	0.14 (p=0.0015)**	0.31 (p=3.3e ⁻¹³)***	0.33 (p=2.6e ⁻¹⁴)***
KICH	0.42 (p=0.00041)***	0.072 (p=0.57)	0.35 (p=0.0044)**
KIRC	0.15 (p=0.00035)***	0.27 (p=2.2e ⁻¹⁰)***	0.28 (p=6.5e ⁻¹¹)***
KIRP	0.26 (p=5.8e ⁻⁶)***	0.21 (p=0.00044)***	0.29 (p=3.9e ⁻⁷)***
LAML	0.31 (p=3e ⁻⁵)***	0.3 (p=6.8e ⁻⁵)***	0.47 (p=8.3e ⁻¹¹)***
LGG	0.11 (p=0.01)*	0.16 (p=0.00018)***	0.4 (p=0)***
LIHC	0.18 (p=0.00056)**	0.34 (p=1.8e ⁻¹¹)***	0.32 (p=5.2e ⁻¹⁰)***
LUAD	0.22 (p=1.5e ⁻⁶)***	0.15 (p=0.00064)**	0.39 (p=0)***
LUSC	0.19 (p=1.5e ⁻⁵)***	0.14 (p=0.0028)**	0.27 (p=1.2e ⁻⁹)***
MESO	0.9 (p=-0.014)*	0.051 (p=0.64)	0.35 (p=0.00099)**
OV	0.5 (p=0)***	0.42 (p=0)***	0.57 (p=0)***
PAAD	0.4 (p=3.9e ⁻⁸)***	0.26 (p=0.00046)***	0.45 (p=1.7e ⁻¹⁰)***
PCPG	0.58 (p=0)***	0.19 (p=0.0092)*	0.49 (p=2e ⁻¹²)***
PRAD	0.54 (p=0)***	0.13 (p=0.0029)**	0.56 (p=0)***
READ	0.31 (p=0.0022)**	0.44 (p=1.2e ⁻⁵)***	0.51 (p=2.6e ⁻⁷)***
SARC	0.23 (p=0.00017)***	-0.054 (p=0.39)	0.47 (p=8.9e ⁻¹⁶)***
SKCM	0.14 (p=0.0027)**	0.22 (p=2.1e ⁻⁶)***	0.3 (p=6.3e ⁻¹¹)***
STAD	0.19 (p=9.4e ⁻⁵)***	0.33 (p=1.1e ⁻¹¹)***	0.47 (p=0)***
TGCT	0.42 (p=3.6e ⁻⁷)***	0.79 (p=0)***	0.35 (p=3e ⁻⁵)***
THCA	0.4 (p=0)***	0.38 (p=0)***	0.61 (p=0)***
THYM	0.37 (p=4.3e ⁻⁵)***	0.35 (p=8.4e ⁻⁵)***	0.68 (p=0)***
UCEC	0.45 (p=5.3e ⁻¹⁰)***	0.29 (p=1e ⁻⁴)***	0.53 (p=7e ⁻¹⁴)***
UCS	0.34 (p=0.01)*	0.21 (p=0.12)	0.33 (p=0.013)*
UVM	0.41 (p=0.00016)***	0.5 (p=2.4e ⁻⁶)***	0.56 (p=1.1e ⁻⁷)***

Πίνακας 5. Συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT3* και της έκφρασης γονιδίων δεικτών της υποξίας (Με έντονο χρώμα παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (p<0.05, R>0) (*: p<0.05, **: p<0.05, ***: p<0.005)

Γ.2.4 Ανάλυση *AGPAT4* με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2

Γ.2.4.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *AGPAT4* σε 33 τύπους καρκίνου, σύμφωνα με το διάγραμμα Dot Blot (**Εικ.25A**), έδειξε ότι η έκφραση του *AGPAT4* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών (κόκκινο) με καρκίνο του παγκρέατος (PAAD). Ακόμα, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT4* (σε σχέση με τα δείγματα υγιών ατόμων) σε δείγματα (πράσινο) ασθενών με καρκίνο του τραχήλου (CESC), καρκίνου του παχέος εντέρου (COAD), χρωμόφοβο καρκίνωμα των νεφρών (KICH), καρκίνο του πνεύμονα (LUAD), Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC), καρκίνο των ωοθηκών (OV), καρκίνο του προστάτη (PRAD), καρκίνο του ορθού (READ), καρκίνο του θυροειδή αδένος (THCA) και καρκίνο του ενδομητρίου (UCEC).

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT4* με Box plot, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του διαγράμματος Dot plot (**Εικ.25B, Εικ.25Γ**).

Γ.2.4.2 Ανάλυση Επιβίωσης

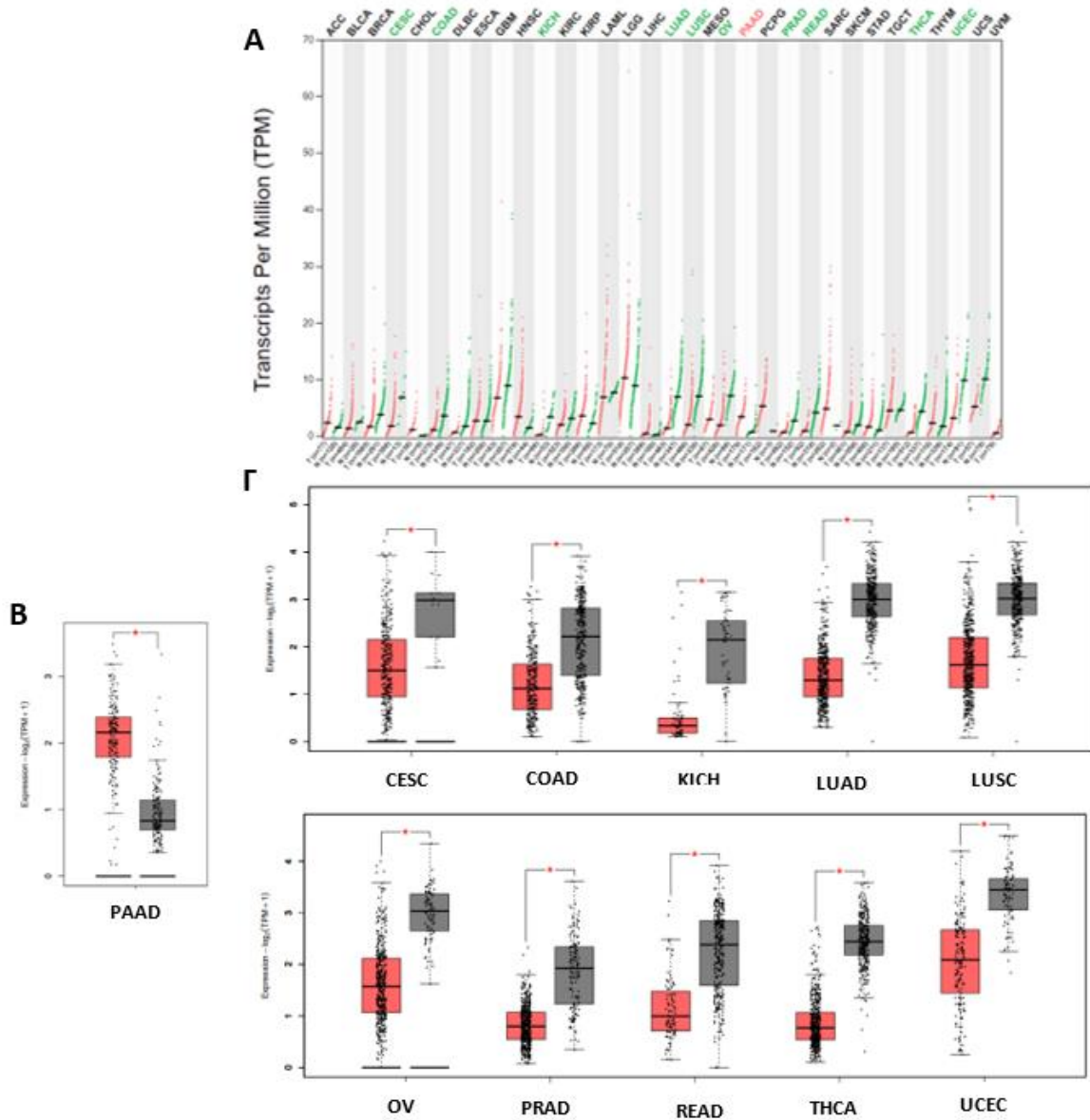
Στο χάρτη επιβίωσης (Survival map), παρατηρείται ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT4* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), καρκίνο του τραχήλου (CESC), καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού (HNSC), ηπατοκαρκίνωμα (LIHC), μεσοθηλίωμα (MESO), καρκίνο των ωοθηκών (OV), μελάνωμα (SKCM), καρκίνο του θυροειδή αδένος (THCA) και ραγοειδές μελάνωμα (UVM). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT4* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με γλοίωμα (LGG) (**Εικ.26A**).

Από τα διαγράμματα Kaplan Meier, προκύπτει ότι οι ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), καρκίνο του τραχήλου (CESC), καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού (HNSC), ηπατοκαρκίνωμα (LIHC), μεσοθηλίωμα (MESO), καρκίνο των ωοθηκών (OV), μελάνωμα (SKCM), καρκίνο του θυροειδή αδένος (THCA) και ραγοειδές μελάνωμα (UVM), οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα υψηλής έκφρασης *AGPAT4*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT4* (**Εικ.26B**). Ενώ, ασθενείς με γλοίωμα (LGG), που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης του *AGPAT4*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών υψηλής έκφρασης του *AGPAT4* (**Εικ.26Γ**) ($p < 0.05$).

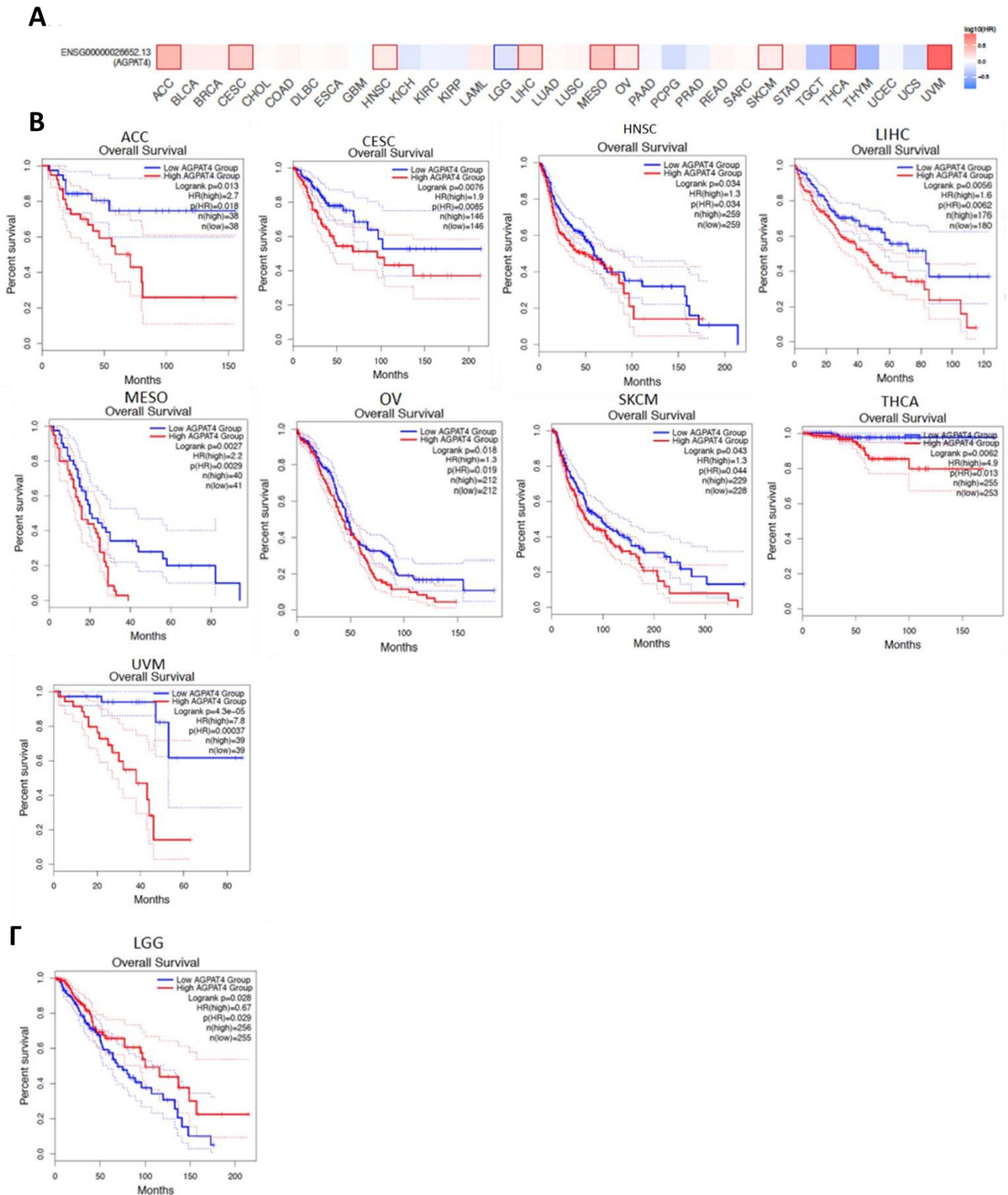
Γ.2.4.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του *AGPAT4* και γονιδίων δεικτών της υποξίας

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT4* και *HIF1A* ή *HIF2A*, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p < 0.05$, $R > 0$) της έκφρασης *AGPAT4* και *HIF1A* σε 26 από τους 33 τύπους καρκίνου, της έκφρασης *AGPAT4* και *HIF2A* σε 24 από τις 33 τύπους καρκίνου, και της έκφρασης

του γονιδίου *AGPAT4* και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, σε 29 από τις 33 τύπους καρκίνου (Πίνακας 6).



Εικ 25. Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT4*. Α). Διάγραμμα Dot plot. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με πράσινο σε δείγματα υγείων μαρτύρων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι τύποι καρκίνου με σημαντικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *AGPAT4* σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με πράσινο χρώμα οι τύποι καρκίνου με σημαντικά χαμηλή έκφραση. Β και Γ). Ανάλυση Box plot, σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με γκρι σε δείγματα υγείων μαρτύρων. (* $p=0.01$)



Εικ 26. Επίδραση της γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT4* στην πρόγνωση επιβίωσης ασθενών με καρκίνο. Α). Ανάλυση Επιβίωσης με Survival map , Β και Γ). Ανάλυση επιβίωσης με διαγράμματα Kaplan Meier

AGPAT4			
TCGA Tumor	HIF1A (R)	HIF2A (R)	Υποξική Γονιδιακή Υπογραφή (R)
ACC	0.095 (p=0.41)	0.021 (p=0.86)	0.29 (p=0.011)*
BCLA	0.35 (p=6.7e⁻¹³***)	-0.093 (p=0.061)	0.36 (p=4.5e⁻¹⁴***)
BRCA	0.28 (p=0)***	0.22 (p=2.1e⁻¹³***)	0.27 (p=0)***
CESC	0.25 (p=8.9e⁻⁶***)	0.11 (p=0.058)	0.28 (p=5e⁻⁷***)
CHOL	0.34 (p=0.04)*	0.33 (p=0.053)	0.45 (p=0.0057)*
COAD	0.59 (p=0)***	0.41 (p=1.3e⁻¹²***)	0.45 (p=3.1e⁻¹⁵***)
DLBC	0.38(p=0.0076)*	0.38 (p=0.0079)*	0.5 (p=0.00038)***
ESCA	0.3 (p=4.3e⁻⁵***)	0.28 (p=1e⁻⁴***)	0.37 (p=3.8e⁻⁷***)
GBM	0.087 (p=0.27)	0.1 (p=0.18)	0.2 (p=0.013)*
HNSC	0.3 (p=3.1e⁻¹²***)	0.23 (p=8.2e⁻⁸***)	0.22 (p=5.9e⁻⁷***)
KICH	0.24 (p=0.053)	0.29 (p=0.017)*	0.44 (p=0.00019)***
KIRC	0.41 (p=0)***	0.42 (p=0)***	0.39 (p=0)***
KIRP	0.25 (p=2.1e⁻⁵***)	-0.11 (p=0.071)	0.29 (p=3.9e⁻⁷***)
LAML	0.29 (p=9.1e⁻⁵***)	0.24 (p=0.0015)**	0.33 (p=1.1e⁻⁵***)
LGG	0.0066 (p=0.88)	0.072 (p=0.1)	0.057 (p=0.19)
LIHC	0.21 (p=5.5e⁻⁵***)	0.14 (p=0.0059)*	0.36 (p=1.2e⁻¹²***)
LUAD	0.24 (p=7.3e⁻⁸***)	0.12 (p=0.007)*	0.25 (p=1.3e⁻⁸***)
LUSC	0.64 (p=0.38)	0.16 (p=6e⁻⁴***)	0.06 (p=0.18)
MESO	0.39 (p=0.00015)***	0.21 (p=0.049)*	0.38 (p=0.00025)***
OV	0.32 (p=7.9e⁻¹²***)	0.23 (p=1.4e⁻⁶***)	0.88 (p=4.4e⁻¹⁶***)
PAAD	0.49 (p=5.3e⁻¹²***)	0.29 (p=6.8e⁻⁵***)	0.48 (p=8.5e⁻¹²***)
PCPG	0.38 (p=1.4e⁻⁷***)	0.14 (p=0.057)	0.44 (p=3.5e⁻¹⁰***)
PRAD	0.17 (p=0.00019)***	0.42 (p=0)***	0.5 (p=0)***
READ	0.62 (p=3.1e⁻¹¹***)	0.42 (p=3.8e⁻⁵***)	0.42 (p=3.8e⁻⁵***)
SARC	0.067 (p=0.28)	-0.11 (p=0.069)	0.11(p=0.076)
SKCM	0.25 (p=9.3e⁻⁸***)	0.19 (p=6.1e⁻⁵***)	0.29 (p=3.4e⁻¹⁰***)
STAD	0.38 (p=3.8e⁻¹⁵***)	0.37 (p=9.5e⁻¹⁵***)	0.37 (p=1.8e⁻¹⁴***)
TGCT	0.43 (p=1.8e⁻⁷***)	0.2 (p=0.017)*	-0.051 (p=0.56)
THCA	0.076 (p=0.074)	0.35 (p=0)***	0.34 (p=1.1e⁻¹⁵***)
THYM	-0.015 (p=0.87)	0.58 (p=4.7e⁻¹²***)	0.39 (p=1.7e⁻⁵***)
UCEC	0.2 (p=0.0092)*	0.18 (p=0.016)*	0.21 (p=0.0052)*
UCS	0.34 (p=0.01)*	0.41 (p=0.0017)**	0.3 (p=0.024)*
UVM	0.36 (p=0.0011)**	0.31 (p=0.0056)*	0.65 (p=8.2e⁻¹¹***)

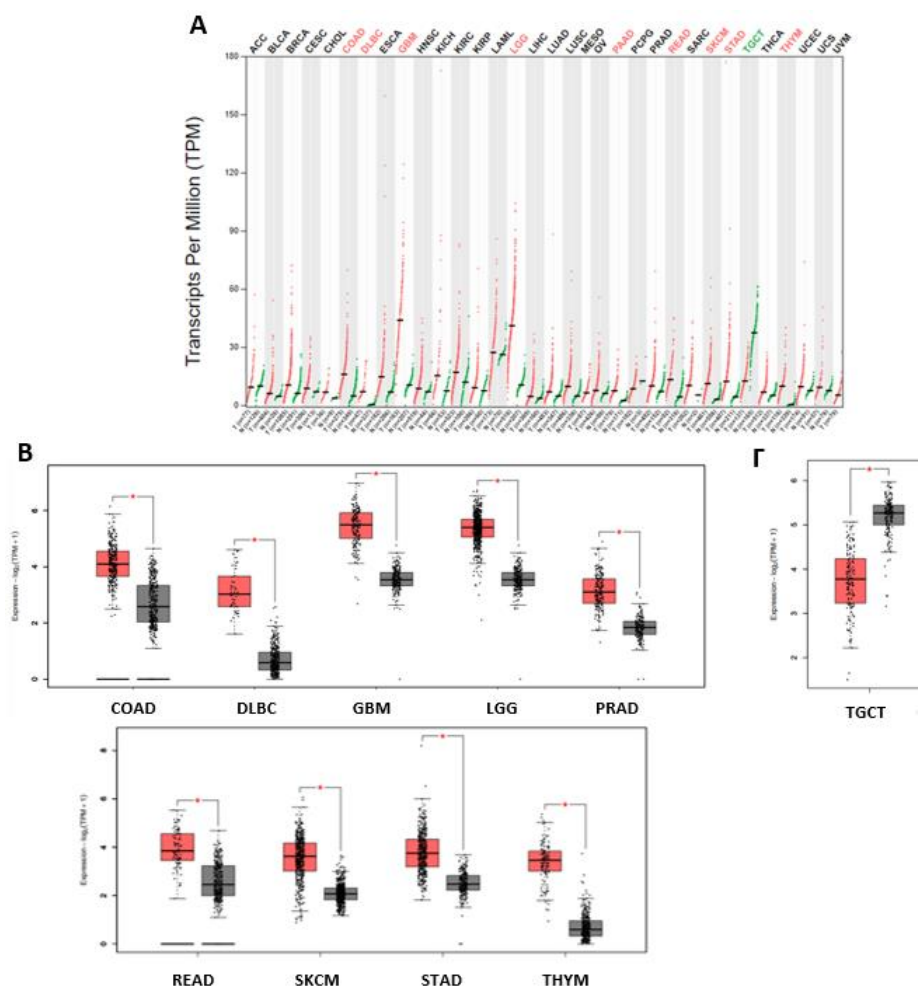
Πίνακας 6. Συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT4* και της έκφρασης γονιδίων δεικτών της υποξίας. (Με έντονο χρώμα παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (p<0.05, R>0) (*: p<0.05, **: p<0.05, ***: p<0.005)

Γ2.5 Ανάλυση *AGPAT5* με το βιοπληροφορικό εργαλείο GEPIA2

Γ2.5.1 Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *AGPAT5* σε 33 τύπους καρκίνου, σύμφωνα με το διάγραμμα Dot Blot (**Εικ.27A**), έδειξε ότι η έκφραση του *AGPAT5* εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη σε δείγματα ασθενών (κόκκινο) με καρκίνο του παχέος εντέρου (COAD), Διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα Λέμφωμα (DLBC), Γλοιοβλάστωμα (GBM), καρκίνο του παγκρέατος (PAAD), καρκίνο ορθού (READ), Μελάνωμα (SKCM), καρκίνο στομάχου (STAD) και Θύμωμα (THYM). Ακόμα, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT5* (σε σχέση με τα δείγματα υγιών ατόμων) σε δείγματα (πράσινο) ασθενών με καρκίνο των όρχεων (όγκοι βλαστικών κυττάρων) (TGCT).

Η ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT5* με Box plot, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα του διαγράμματος Dot plot (**Εικ.27B, Εικ.27Γ**).

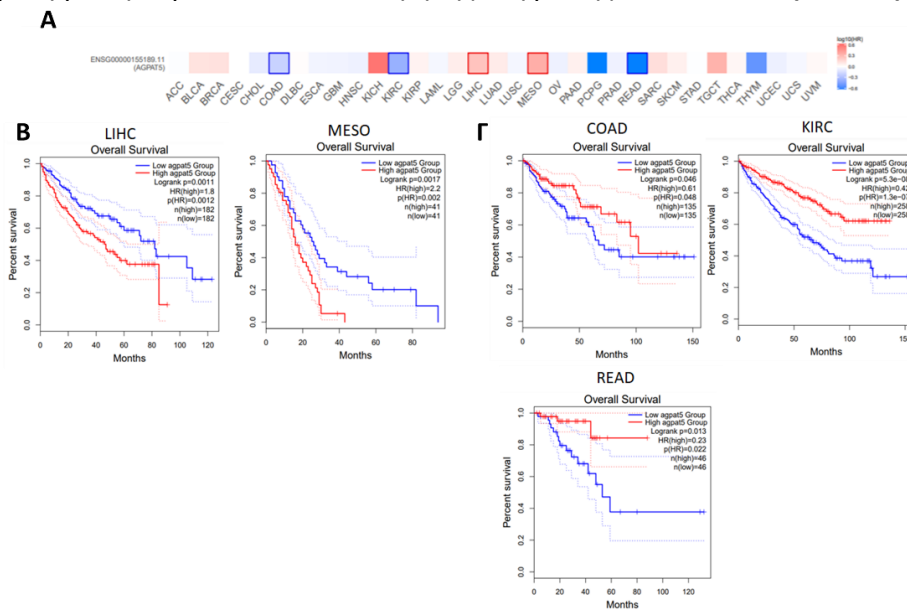


Εικ 27. Ανάλυση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT5*. Α). Διάγραμμα Dot plot. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με πράσινο σε δείγματα υγιών μαρτύρων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι τύποι καρκίνου με σημαντικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *AGPAT5* σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ με πράσινο χρώμα οι τύποι καρκίνου με σημαντικά χαμηλή έκφραση. Β και Γ). Ανάλυση Box plot, σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του διακομιστή. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα ασθενών με καρκίνο, ενώ με γκρι σε δείγματα υγιών μαρτύρων. (* $p=0.01$)

Γ2.5.2 Ανάλυση Επιβίωσης

Στο χάρτη επιβίωσης (Survival map), παρατηρείται ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT5* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με ηπατοκαρκίνωμα (LIHC) και μεσοθηλίωμα (MESO). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT5* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (COAD), με διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα των νεφρών (KIRC) και με καρκίνο ορθού (READ) (**Εικ.28Α**).

Από τα διαγράμματα Kaplan Meier, προκύπτει ότι οι ασθενείς με Χρωμόφοβο καρκίνωμα των νεφρών (KICH), ηπατοκαρκίνωμα (LIHC) και μεσοθηλίωμα (MESO), οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα υψηλής έκφρασης *AGPAT5*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *AGPAT5* (**Εικ.28Β**). Ενώ, ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (COAD), Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα των νεφρών (KIRC), καρκίνο του προστάτη (PRAD) και με καρκίνο ορθού (READ), που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης του *AGPAT5*, είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών υψηλής έκφρασης του *AGPAT5* (**Εικ.28Γ**) ($p < 0.05$).



Εικ 28. Επίδραση της γονιδιακής έκφρασης του *AGPAT5* στην πρόγνωση επιβίωσης ασθενών με καρκίνο. Α). Ανάλυση Επιβίωσης με Survival map , Β και Γ). Ανάλυση επιβίωσης με διαγράμματα Kaplan Meier

Γ2.5.3 Ανάλυση Συσχέτισης της έκφρασης του *AGPAT5* και γονιδίων δεικτών της υποξίας

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων *AGPAT5* και *HIF1A* ή *HIF2A*, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ($p < 0.05$, $R > 0$) της έκφρασης *AGPAT5* και *HIF1A* σε 31 από τους 33 τύπους καρκίνου, της έκφρασης *AGPAT5* και *HIF2A* σε 17 από τις 33 τύπους καρκίνου, και της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT5* και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, σε 30 από τις 33 τύπους καρκίνου (**Πίνακας 7**).

AGPAT5			
TCGA Tumor	HIF1A (R)	HIF2A (R)	Υποξική Γονιδιακή Υπογραφή (R)
ACC	0.42 (p=0.00016)***	-0.043 (p=0.71)	0.41 (p=0.00024)***
BCLA	0.27 (p=2.1e⁻⁸)***	0.013 (p=0.79)	0.34 (p=1.7e⁻¹²)***
BRCA	0.29 (p=0)***	0.03 (p=0.32)	0.3 (p=0)***
CESC	0.2 (p=0.00036)***	-0.049 (p=0.39)	0.38 (p=1e⁻¹¹)***
CHOL	0.63 (p=3.2e⁻⁵)***	0.27 (p=0.11)	0.47 (p=0.0037)**
COAD	0.18 (p=0.0032)**	-0.058 (p=0.34)	0.18 (p=0.0028)**
DLBC	0.65(p=6e⁻⁷)***	0.43 (p=0.0024)**	0.64 (p=1.5e⁻⁶)
ESCA	-0.11 (p=0.15)	-0.0043 (p=0.95)	-0.026 (p=0.73)
GBM	0.42 (p=1.6e⁻⁸)***	0.3 (p=7.8e⁻⁵)***	0.4 (p=1.3e⁻⁷)***
HNSC	0.22 (p=7.6e⁻⁷)***	0.091 (p=0.038)*	0.32 (p=1.5e⁻¹³)***
KICH	0.23 (p=0.061)	0.29 (p=0.017)*	0.19 (p=0.13)
KIRC	0.41 (p=0)***	0.33 (p=1.6e⁻¹⁴)***	0.32 (p=1.4e⁻¹³)***
KIRP	0.28 (p=2.1e⁻⁶)***	0.16 (p=0.0074)*	0.38 (p=4.8e⁻¹¹)***
LAML	0.23 (p=0.0019)**	0.3 (p=7.1e⁻⁵)***	0.074 (p=0.33)
LGG	0.23 (p=7.3e⁻⁸)***	0.15 (p=0.00086)**	0.38 (p=0)***
LIHC	0.23 (p=9.4e⁻⁶)***	0.28 (p=7.9e⁻⁸)***	0.27 (p=1.8e⁻⁷)***
LUAD	0.26 (p=4.4e⁻⁹)***	0.058 (p=0.2)	0.32 (p=3.9e⁻¹³)***
LUSC	0.15 (p=0.001)**	0.11 (p=0.019)*	0.21 (p=3.3e⁻⁶)***
MESO	0.33 (p=0.002)**	0.055 (p=0.61)	0.34 (p=0.0013)**
OV	0.26 (p=4e⁻⁸)***	0.16 (p=0.00085)**	0.31 (p=3.4e⁻¹¹)***
PAAD	0.3 (p=3.4e⁻⁵)***	0.17 (p=0.024)*	0.28 (p=0.00014)***
PCPG	0.43 (p=1.7e⁻⁹)***	0.11 (p=0.13)	0.54 (p=3.5e⁻¹⁵)***
PRAD	0.51 (p=0)***	0.094 (p=0.037)*	0.43 (p=0)***
READ	0.29 (p=0.0056)*	0.15 (p=0.14)	0.37 (p=0.00023)***
SARC	0.51 (p=0)***	0.069 (p=0.26)	0.33 (p=4.6e⁻⁸)***
SKCM	0.4 (p=0)***	0.049 (p=0.29)	0.4 (p=0)***
STAD	0.12 (p=0.012)*	0.0053 (p=0.91)	0.21 (p=2.4e⁻⁵)***
TGCT	0.71 (p=0)***	0.25 (p=0.0038)**	0.25 (p=0.035)*
THCA	0.3 (p=7.8e⁻¹²)***	0.42 (p=0)***	0.54 (p=0)***
THYM	0.44 (p=8.5e⁻⁷)***	0.44 (p=5.1e⁻⁷)***	0.64 (p=5.3e⁻¹⁵)***
UCEC	0.42 (p=9.5e⁻⁹)***	0.27 (p=0.00029)***	0.56 (p=8.9e⁻¹⁶)***
UCS	0.29 (p=0.029)*	-0.055 (p=0.69)	0.35 (p=0.0077)*
UVM	0.71 (p=3.1e⁻¹³)***	0.3 (p=0.0068)*	0.61 (p=2.2e⁻⁹)***

Πίνακας 7. Συσχέτισης της έκφρασης του γονιδίου *AGPAT5* και της έκφρασης γονιδίων δεικτών της υποξίας. (Με έντονο χρώμα παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (p<0.05, R>0) (*: p<0.05, **: p<0.05, ***: p<0.005)

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF, οι οποίοι επάγονται σε συνθήκες υποξίας, επηρεάζουν πολλαπλές μεταβολικές οδούς, και προωθούν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Με τη μεσολάβηση των HIF, τα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς, τροποποιούν το μεταβολισμό των λιπιδίων, τα οποία χρησιμοποιούν ως αποθήκη ενέργειας και ως συστατικά για τη δημιουργία κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης η ενισχυμένη παραγωγή τριακυλογλυκερολών και η αποθήκευση τους σε λιποσταγονίδια, προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την τοξικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, καθώς και από τις ελεύθερες ριζές (ROS) που παράγονται στο υποξικό μικροπεριβάλλον του όγκου (Mylonis et al, 2019).

Σε πολλούς τύπους καρκίνου, η αποσιώπηση των HIF ή των γονιδίων-στόχων τους, που απαιτούνται για τη συσσώρευση λιπιδίων, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού πολλαπλασιασμού και της χημειοαντοχής του όγκου. Αντίστοιχα, η υπερέκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται από τους HIF και εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων έχει συσχετιστεί με κακοήθεις τύπους καρκίνου και κακή πρόγνωση. Η παρέμβαση στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των λιπιδίων που εξαρτάται από τους HIF μπορεί πράγματι να καταστείλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Mylonis et al, 2019).

Μελέτες έδειξαν ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7 και HeLa, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της AGPAT2 αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας και μειώνονται έπειτα από σίγηση του HIF-1α, καθιστώντας την AGPAT2 γονίδιο στόχο του HIF-1α. Ακόμη η αποσιώπηση της AGPAT2, επηρέασε τον σχηματισμό LD, την βιωσιμότητα και την χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων, υπογραμμίζοντας τη σημασία της AGPAT2 στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό τους (Triantafyllou et al, 2018). Επιπλέον πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, Huh7, MCF7, A549 και H1299, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της AGPAT4 ήταν αυξημένα σε συνθήκες υποξίας (Karagiota et al, 2021). Έτσι η AGPAT4 πιθανόν να είναι γονίδιο-στόχος του HIF-1.

Τα πειράματα που έγιναν με στόχο να μελετηθεί η επίδραση της υποξίας στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου AGPAT4, έδειξαν ότι η δράση του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης, αυξήθηκε σημαντικά σε συνθήκες υποξίας (Εικ.18). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που φέρει τμήμα του υποκινητή του γονιδίου AGPAT2, γονιδίου στόχου του HIF-1, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Ωστόσο, σε συνθήκες υποξίας, υπάρχει επίσης αύξηση στα επίπεδα δραστηριότητας της λουσιφεράσης στα εκχυλίσματα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα pGL3-promoter. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η υποξία επάγει την παραγωγή λουσιφεράσης από τον pGL3-promoter, ανεξάρτητα από την παρουσία των υποκινητών AGPAT2 ή AGPAT4. Δεν είναι εφικτό λοιπόν, να αποσαφηνιστεί αν το τμήμα του υποκινητή της

AGPAT4 που κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGL3-promoter, μεσολαβεί την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου AGPAT4 σε συνθήκες υποξίας. Επομένως χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, με τη χρήση διαφορετικού πλασμιδίου αναφοράς, ώστε να διαλευκανθεί το ερώτημα εάν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο AGPAT4 και επάγεται σε συνθήκες υποξίας αποτελεί γονίδιο-στόχο του HIF-1.

Η ανάλυση δεδομένων από δημόσιες τράπεζες πληροφοριών, που αφορούσαν την έκφραση των γονιδίων *AGPAT1-5*, επιβεβαιώνουν μελέτες που έχουν αποδείξει την σχέση των AGPAT και διαφόρων τύπων καρκίνου. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης υποστηρίζουν το ότι τα επίπεδα έκφρασης των AGPAT σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Επίσης αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των AGPAT επηρεάζουν την συνολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο.

Από την βιβλιογραφία, γίνεται αντιληπτό ότι τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT1 είναι αυξημένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) και μειωμένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (Lee et al, 2012). Επίσης τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της AGPAT1, σχετίζονται με μικρότερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με CRC (Fernández et al, 2017), (Ren et al, 2020). Με βάση τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT1 είναι επίσης αυξημένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (PAAD), μελάνωμα (SKCM), ηπατοκαρκίνωμα (LIHC) και καρκίνο του θύμου αδένα (THYM). Ακόμη από την ανάλυση επιβίωσης βρέθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT1* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης αλλά σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (BRCA).

Όσον αφορά την AGPAT2, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα έκφρασής της είναι αυξημένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (Niesporek et al, 2005), οστεοσάρκωμα (Song et al, 2016) και αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (Li et al, 2011). Επιπλέον η σίγηση της AGPAT2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7), αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας (HeLa) (Triantafyllou et al, 2018) καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος (Blaskovich et al, 2013) επηρέασε τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους. Άπο την βιοπληροφορική ανάλυση, προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT2 είναι αυξημένα σε δείγματα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (OV) και καρκίνο του στομάχου (STAD), το οποίο συμφωνεί με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT2 εμφανίζονται αυξημένα και σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (COAD), καρκίνο του παγκρέατος (PAAD), καρκίνο του ορθού (READ) και καρκίνο του ενδομητρίου (UCEC). Ακόμη από την ανάλυση επιβίωσης βρέθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *AGPAT1* σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης όμως σε ασθενείς με καρκίνο επινεφριδίων (ACC), πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC) και μελάνωμα (SKCM) και τα χαμηλά σχετίζονται με μειωμένο ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (LUAD).

Για την AGPAT4, μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Dória et al, 2014), καρκίνο του παχέος εντέρου (Zhang et al, 2020), μελάνωμα (Sumantran et al, 2015) και καρκίνο της στοματικής κοιλότητας (Huang et al, 2021).. Από την βιοπληροφορική ανάλυση, βρέθηκε ότι η έκφραση του AGPAT4 επίσης εμφανίζεται αυξημένη και σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (PAAD). Ενώ, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης της AGPAT4 σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου (CESC), χρωμόφοβο καρκίνωμα των νεφρών (KICH), καρκίνο του πνεύμονα (LUAD), Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (LUSC), καρκίνο των ωοθηκών (OV), καρκίνο του προστάτη (PRAD), καρκίνο του ορθού (READ), καρκίνο του θυροειδή αδένα (THCA), καρκίνο του ενδομητρίου (UCEC) και τέλος καρκίνου του παχέος εντέρου (COAD), κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες που έγιναν. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης της AGPAT4 επηρεάζουν την βιωσιμότητα των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Όσον αφορά τις AGPAT3 και AGPAT5, δεν υπάρχουν μελέτες από την βιβλιογραφία που να τις συσχετίζουν με κάποιο τύπο καρκίνου. Ωστόσο, με βάση τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης τους σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Ακόμη τα επίπεδα έκφρασης AGPAT3 και AGPAT5 επηρεάζουν τα επίπεδα επιβίωσης των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Τέλος φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των AGPAT, με την έκφραση των HIF-1α ή/και HIF-2α, καθώς και με την υποξική γονιδιακή υπογραφή σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των AGPAT και των HIF, ενισχύει την πιθανότητα η έκφραση των AGPAT να επάγεται από τους HIF. Παράλληλα επειδή οι HIF ρυθμίζονται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ένας άλλος τρόπος για να δούμε εάν η έκφραση των AGPAT επάγεται από τους HIF, είναι η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ των AGPAT και της υποξικής γονιδιακής υπογραφής, που είναι μια λίστα από 23 γονίδια στόχοι των HIF.

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

- Adem B, Vieira PF, Melo SA. (2020). Decoding the Biology of Exosomes in Metastasis. *Trends in Cancer*. doi: 10.1016/j.trecan.2019.11.007.
- Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A. (2002). AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng880.
- Agarwal AK, Sukumaran S, Cortés VA, Tunison K, Mizrachi D, Sankella S, Gerard RD, Horton JD, Garg A. (2011). Human 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase isoforms 1 and 2: biochemical characterization and inability to rescue hepatic steatosis in Agpat2(-/-) gene lipodystrophic mice. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M111.250449.
- Agarwal AK. (2012). Lysophospholipid acyltransferases: 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases. From discovery to disease. *Current Opinion in Lipidology*. doi:10.1097/MOL.0b013e328354fcf4
- Agarwal AK, Tunison K, Dalal JS, Nagamma SS, Hamra FK, Sankella S, Shao X, Auchus RJ, Garg A. (2017). Metabolic, Reproductive, and Neurologic Abnormalities in Agpat1-Null Mice. *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2017-00511.
- Blaskovich MA, Yendluri V, Lawrence HR, Lawrence NJ, Sebti SM, Springett GM. (2013). Lysophosphatidic acid acyltransferase beta regulates mTOR signaling. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.00
- Bradley RM, Mardian EB, Bloemberg D, Aristizabal Henao JJ, Mitchell AS, Marvyn PM, Moes KA, Stark KD. (2017). Quadrilatero J, Duncan RE. Mice Deficient in lysophosphatidic acid acyltransferase delta (Lpaatδ)/acylglycerophosphate acyltransferase 4 (Agpat4) Have Impaired Learning and Memory. *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/MCB.00245-7.
- Coleman RA, Mashek DG. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chemical Reviews*. doi: 10.1021/cr100404w.
- Cortés VA, Curtis DE, Sukumaran S, Shao X, Parameswara V, Rashid S, Smith AR, Ren J, Esser V, Hammer RE, Agarwal AK, Horton JD, Garg A. (2009). Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy. *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.002
- DeFrates KG, Franco D, Heber-Katz E, Messersmith PB. (2021). Unlocking mammalian regeneration through hypoxia inducible factor one alpha signaling. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120646.
- Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.3109/10409238.2013.838205.
- Dória ML, Ribeiro AS, Wang J, Cotrim CZ, Domingues P, Williams C, Domingues MR, Helguero LA. (2014). Fatty acid and phospholipid biosynthetic pathways are

regulated throughout mammary epithelial cell differentiation and correlate to breast cancer survival. *The FASEB Journal*. doi: 10.1096/fj.14-249672.

- Drabik A, Bodzoń-Kuśakowska A, Silberring J. (2016). “7-Gel Electrophoresis”. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry. p 115-143. 2nd Edition. *The Crossroads*.
- Fernández LP, Ramos-Ruiz R, Herranz J, Martín-Hernández R, Vargas T, Mendiola M, Guerra L, Reglero G, Feliu J, Ramírez de Molina A. (2017) The transcriptional and mutational landscapes of lipid metabolism-related genes in colon cancer. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.23592.
- Huang ZD, Yao YY, Chen TY, Zhao YF, Zhang C, Niu YM. (2021). Construction of Prognostic Risk Prediction Model of Oral Squamous Cell Carcinoma Based on Nine Survival-Associated Metabolic Genes. *Frontiers in Physiology*. doi:10.3389/fphys.2021.609770.
- Ikeda H, Kakeya H. (2021). Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with natural products toward cancer chemotherapy. *The Journal of Antibiotics*. doi:10.1038/s41429-021-00451-0.
- Karagiota A, Paraskeva K, Arseni C, Mylonis I, Simos G, Chachami G, Paraskeva E. (2021). Expression of the glycerophospholipid and triacylglyceride synthesis enzyme AGPAT4 is upregulated in cancer cells under hypoxic conditions. *71st National Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology*, 26-28 November 2021, Athens. Abstracts, P76, p.134.
- Karagiota A, Chachami G, Paraskeva E. (2022). Lipid Metabolism in Cancer: The Role of Acylglycerolphosphate Acyltransferases (AGPATs). *Cancers*. doi: 10.3390/cancers14010228.
- Keith B, Johnson RS, Simon MC. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc3183
- Kietzmann T, M ennerich D, Dimova EY. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.3389/fcell.2016.00011.
- Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, Mylonis I. (2021). ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Molecular Oncology*. doi: 10.1002/1878-0261.13080.
- Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. (2018) Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Science*. doi: 10.1111/cas.13483.
- Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, Tokarska-Schlattner M, Aasum E, Bogdanova A, Perriard E, Perriard JC, Larsen T, Pedrazzini T, Krek W. (2009). Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2009.05.005.

- Lee D, Miwa Y, Kunimi H, Ibuki M, Shoda C, Nakai A, Kurihara T. (2021). HIF Inhibition Therapy in Ocular Diseases. *The Keio Journal of Medicine*. doi:10.2302/kjm.2021-0004-IR.
- Lee YH, Kim JH, Zhou H, Kim BW, Wong DT. (2012). Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*. doi: 10.1007/s00109-011-0829-0.
- Li M, Zhao ZW, Zhang Y, Xin Y. (2011). Over-expression of Ephb4 is associated with carcinogenesis of gastric cancer. *Digestive Diseases and Sciences* . doi: 10.1007/s10620-010-1346-7.
- Mandl M, Depping R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 β): is it a rare exception? *Molecular Medicine*. doi:10.2119/molmed.2014.00032.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
- Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M605058200.
- Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M803081200.
- Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. (2012). Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.106682.
- Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. (2019). Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*. doi:10.3390/cells8030214.
- Niesporek S, Denkert C, Weichert W, Köbel M, Noske A, Sehouli J, Singer JW, Dietel M, Hauptmann S. (2005). Expression of lysophosphatidic acid acyltransferase beta (LPAAT-beta) in ovarian carcinoma: correlation with tumour grading and prognosis. *British Journal of Cancer*. doi: 10.1038/sj.bjc.6602528.
- Ravenna L, Salvatori L, Russo MA. (2016). HIF3 α : the little we know. *FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.13572.
- Ren J, Feng J, Song W, Wang C, Ge Y, Fu T. (2020). Development and validation of a metabolic gene signature for predicting overall survival in patients with colon cancer. *Clinical and Experimental Medicine*. doi: 10.1007/s10238-020-00652-1.
- Sanchez R, Mackenzie SA. (2020). Integrative Network Analysis of Differentially Methylated and Expressed Genes for Biomarker Identification in Leukemia. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-020-58123-2.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. (2005). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.111.

- Schödel J, Ratcliffe PJ. (2019). Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nature Reviews Nephrology*. doi: 10.1038/s41581-019-0182-z.
- Semenza GL. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
- Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Takahashi Y, Hishikawa D, Iizuka-Hishikawa Y, Tokumasu F, Noguchi H, Watanabe S, Sasaki T, Shimizu T. (2017). Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M117.790568.
- Song L, Duan P, Gan Y, Li P, Zhao C, Xu J, Zhang Z, Zhou Q. (2016). Silencing LPAAT β inhibits tumor growth of cisplatin-resistant human osteosarcoma in vivo and in vitro. *International Journal of Oncology*. doi: 10.3892/ijo.2016.3820.
- Sumantran VN, Mishra P, Sudhakar N. (2015). Microarray analysis of differentially expressed genes regulating lipid metabolism during melanoma progression. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*.
- Takeuchi K, Reue K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1152/ajpendo.90958.2008.
- Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkz430.
- Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. (2018). Expression of AGPAT2, (2018) an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.06.015.
- Wang H, Airola MV, Reue K. (2017). How lipid droplets "TAG" along: Glycerolipid synthetic enzymes and lipid storage. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.06.010.
- Wigerup C, Pählman S, Bexell D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.009.
- Yamashita A, Hayashi Y, Matsumoto N, Nemoto-Sasaki Y, Oka S, Tanikawa T, Sugiura T. (2014). Glycerophosphate/Acylglycerophosphate acyltransferases. *Biology*. doi: 10.3390/biology3040801
- Zhang D, Shi R, Xiang W, Kang X, Tang B, Li C, Gao L, Zhang X, Zhang L, Dai R, Miao H. (2020). The Agpat4/LPA axis in colorectal cancer cells regulates antitumor responses via p38/p65 signaling in macrophages. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. doi: 10.1038/s41392-020-0117-y.
- Zhukovsky MA, Filograna A, Luini A, Corda D, Valente C. (2019). The Structure and Function of Acylglycerophosphate Acyltransferase 4/ Lysophosphatidic Acid

Acyltransferase Delta (AGPAT4/LPAAT δ). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi:10.3389/fcell.2019.00147.