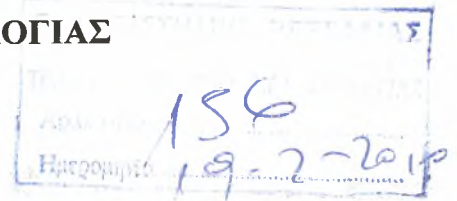


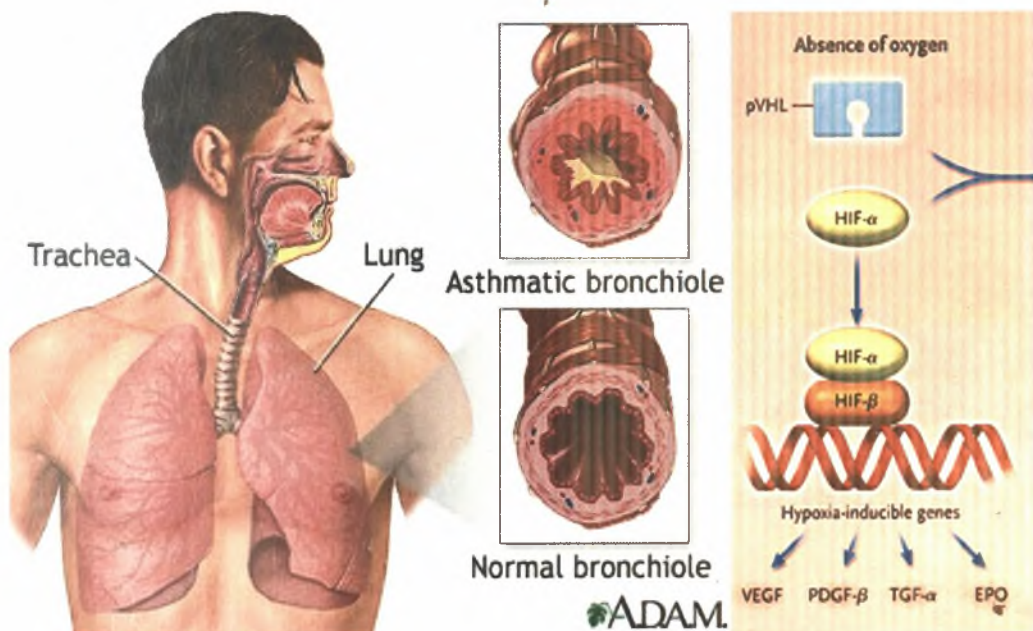
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ «ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-1α» (HIF-1α) ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΛΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ



ΜΠΕΛΤΣΙΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8167/1

Ημερ. Εισ.: 19-04-2010

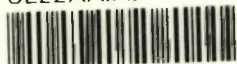
Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

ΜΠΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087099

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ «ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-
1α» (HIF-1α) ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΛΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ
ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Παρασκευά Ευφροσύνη

Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Παρασκευά Ευφροσύνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας,

Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας), Τμήμα

Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας &

Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου, Καθηγητή κ.Μολυβδά, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Παρασκευά Ευφροσύνη για την πολύτιμη βοήθειά της, το συνεχές ενδιαφέρον της, καθώς και την άψογη συνεργασία της που συνέβαλε καθοριστικά στην αποτελεσματική διεκπεραίωση της εργασίας μου. Με ιδιαίτερη χαρά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σταματίνα Τσαπουρνιώτη για την πολύτιμη βοήθειά της καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής για τη σύνθεση ενός ευχάριστου και δημιουργικού περιβάλλοντος εργασίας. Δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την αγαπημένη φίλη και διδάκτορα Βιοχημείας Οικονόμου Γεωργία, που με παρέπεμψε στο συγκεκριμένο τμήμα για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κα Ζίφα Αιμιλία και κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την ανάγνωση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών και η αναδιαμόρφωσή τους.....	11
1.2 Μηχανισμός συστολής και πρωτεΐνες που την ελέγχουν.....	15
1.2.1 Διάλυτοι TRPC (Canonical Transient Receptor Potential channels).....	16
1.3 Αναδιαμόρφωση και νόσοι του αναπνευστικού κατά την υποξία.....	20
1.4 Απόκριση στην υποξία – Ο ρόλος του «επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1» (Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF1).....	20
1.5 Ο παράγοντας HIF-1	22
1.5.1 Ο HIF-1β	25
1.5.2 Ο HIF-1α	25
1.5.3 Η εμπλοκή του HIF-1 σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες.....	26
1.6 Η ρύθμιση του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου.....	27
1.7 Η ανεξάρτητη από τα επίπεδα του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1.....	31
1.8 Ο HIF-1 και τα ΛΜΚ του αναπνευστικού.....	33
1.8.1 Η επαγωγή του HIF-1 σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου.....	33
1.8.2 Ο HIF-1 και τα ΛΜΚ πνευμονικής αρτηρίας και τραχείας κουνελιού.....	34
1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 Πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων.....	37
2.2 Πάγωμα κυττάρων.....	37
2.3 Ξεπάγωμα κυττάρων.....	38
2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια	38
2.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	38
2.6 Κατεργασία κυττάρων - Μελέτη της επαγωγής του HIF-1α.....	40
2.6.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης λείων μυϊκών κυττάρων....	40

2.6.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων (Μέθοδος Bradford)	41
2.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ.....	42
2.7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού μέσου (SDS PAGE).....	42
2.7.1.1 Προετοιμασία Δειγμάτων	42
2.7.1.2 Προετοιμασία των πηκτών.....	42
2.7.1.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων.....	45
2.8 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blotting).....	45
2.8.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	45
2.8.2 Χρώση με Ponceau S.....	47
2.8.3 Αντίδραση των πρωτεϊνών με το εξειδικευμένο αντίσωμα.....	47
2.9 ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (Chemiluminescence - ECL).....	49
2.10 Απομόνωση RNA από ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) (Human Bronchial Smooth Muscle Cells, HBSMC).....	50
2.10.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA με φωτομέτρηση των δειγμάτων.....	51
2.11 Αντίδραση σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	51
2.11.1 Προετοιμασία του Master-Mix διαλύματος (preparation Master-Mix) και των αντιδράσεων για τη σύνθεση cDNA.....	51
2.12 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - πραγματικού χρόνου RT-qPCR (quantitative Real -Time Polymerase Chain Reaction).....	52
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
3.1 Ταυτοποίηση των κυττάρων της καλλιέργειας.....	56
3.2 Επαγωγή του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ, από κοβάλτιο και ορό εμβρύου βοός	57
3.3 Επαγωγή και ενδοκυττάριος εντοπισμός του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ανθρώπινα ΛΜΚΒ.....	59
3.4 Μελέτη της επαγωγής του TRPC1 και της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των λείων μυϊκών κυττάρων σε ΛΜΚΒ ανθρώπου , υπό την επίδραση κοβαλτίου, ορού εμβρύου βοός και συνδυασμού και των δύο με τη βοήθεια	

της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western	60
3.5 Μελέτη της επαγωγής των TRPC1 και TRPC6 σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ, υπό την επίδραση κοβαλτίου, ορού εμβρύου βοός και συνδυασμού και των δύο με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	63
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην αναπνευστική οδό, τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) καλύπτουν το εσωτερικό των αεραγωγών και ρυθμίζουν τη διάμετρό τους, ελέγχοντας έτσι το οξυγόνο που φθάνει στους πνεύμονες. Τα ΛΜΚ παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και επιτελούν μια σειρά λειτουργιών, σημαντικότερη από τις οποίες είναι η σύσπαση, η οποία εξαρτάται από την έκφραση πλήθους συσταλτών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

Πρόσφατα έχειδειχθεί ότι, η απομάκρυνση του ορού εμβρύου βοός (FBS) από το θρεπτικό μέσο πρωτογενών καλλιέργειών ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, επάγει την εμφάνιση ενός διαφοροποιημένου συσταλτού φαινοτύπου των κυττάρων, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την έκφραση δεικτών ειδικών για τα ΛΜΚ. Στους ειδικούς αυτούς δείκτες ανήκουν μεταξύ άλλων, η α -ακτίνη των λείων μυών και η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης των ΛΜΚ (SM-MHC).

Ο κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου στους ιστούς είναι ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF-1). Ο HIF-1 είναι μία ετεροδιμερής πρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο υπομονάδες : την υπομονάδα α (HIF-1 α), η οποία υπόκειται σε ρύθμιση και την υπομονάδα β (HIF-1 β ή ARNT), η οποία εκφράζεται συνεχώς. Μελέτες που έγιναν τόσο σε πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, όσο και σε πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚΒ ανθρώπου, παρουσία ορού, έδειξαν ότι ο HIF-1 α επάγεται σε συνθήκες υποξίας, αλλά και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου μετά από προσθήκη CoCl_2 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Επίσης, η προσθήκη CoCl_2 και FBS σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού προκάλεσε υπερεπαγωγή του HIF-1 α και αύξησε την ανταποκρισιμότητά τους στην ακετυλοχολίνη.

Στη παρούσα εργασία αρχικά μελετήθηκε αν το CoCl_2 , ο FBS και ο συνδυασμός τους, προκαλούν επαγωγή του HIF-1 α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι ο HIF-1 α επάγεται κυρίως από το CoCl_2 και ακόμη περισσότερο από τον συνδυασμό FBS+ CoCl_2 , υποδηλώνοντας ότι οι δύο παράγοντες δρουν συνεργιστικά αυξάνοντας την επαγωγή του HIF-1 α , ο οποίος είναι συγκεντρωμένος στον πυρήνα των κυττάρων, σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου.

Επιπλέον, μελετάται αν η επαγωγή του HIF-1α στις παραπάνω συνθήκες, επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών και mRNA γονιδίων που σχετίζονται με την συσταλτικότητα των ΛΜΚΒ ανθρώπου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών των TRPC1 και SM-MHC με τη χρήση των μεθόδων SDS-PAGE και Western Blotting και των γονιδίων TRPC1 και TRPC6 με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR). Τα αποτελέσματα που πήραμε, δείχνουν ότι έκφραση της πρωτεΐνης της SM-MHC δεν επηρεάστηκε στις συνθήκες επαγωγής του HIF-1α, ενώ έκφραση των πρωτεϊνών του TRPC1 φαίνεται να επηρεάστηκε οριακά. Αντίθετα, η μεταγραφή του γονιδίου TRPC1 επάγεται από το CoCl_2 και επηρεάζεται όταν τα κύτταρα κατεργάζονται με FBS ή FBS + CoCl_2 . Η μεταγραφή του γονιδίου TRPC6 βρέθηκε να επάγεται και στις τρεις πειραματικές συνθήκες και κυρίως στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με FBS. Η επαγωγή των γονιδίων αυτών πιθανόν να επηρεάζει τη συσταλτικότητα των ΛΜΚΒ ανθρώπου.

ABSTRACT

In the respiratory tract, the smooth muscle cells (SMC) cover the interior of the airways and regulate their diameter, thus controlling the oxygen reaching the lungs. The SMC exhibit a high degree of plasticity and perform a series of functions, the most important of which is contraction, which depends on the expression of contractile and regulatory proteins.

The removal of fetal bovine serum (FBS) from the nutrient medium of primary cultures of SMC of rabbit trachea, induces the appearance of a differentiated contractile phenotype of the cells, which is characterized by the expression of special SMCs markers, including SM- α -actin and the SMs myosin heavy chain (SM-MHC).

“Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF-1” is the main regulator of the homeostasis of oxygen in the tissues. HIF-1 is a hetero-dimeric protein that comprises two subunits: subunit α (HIF-1 α), which is submitted to regulation and the β subunit (HIF-1 β or ARNT), which is continuously expressed. Studies in primary SMC cultures of rabbit trachea, as well as in primary cultures of human bronchial SM, in the presence of FBS, showed that HIF-1 α is induced in hypoxic conditions, but also in normal oxygen concentrations after exposure of cells to CoCl₂. The addition of CoCl₂ and FBS to the nutrient medium of the culture in the differentiated rabbit trachea SMC cultures caused hyperproduction of HIF-1 α and increased their responsiveness to acetylcholine.

In the present work it was studied initially if CoCl₂, FBS and their combination cause induction of HIF-1 α in differentiated human bronchial SMC.

The results showed that HIF-1 α is induced mainly by CoCl₂ and even more by the combination of FBS+CoCl₂, suggesting that the two factors act synergistically increasing the induction of HIF-1 α , which is concentrated in the nucleus of the cells.

Furthermore, it was studied if the induction of HIF-1 α in the above mentioned conditions affected the expression of proteins and mRNA genes related with the contraction of human SMCs. In particular, the protein expression of TRPC1 and SM-MHC was studied with the use of the SDS-PAGE and Western Blotting methods and the expression of TRPC1 and TRPC6 genes was studied with the method of quantitative polymerase chain reaction in real time (RT-qPCR). The results show that the expression of the SM-MHC protein was not affected by the induction conditions

of HIF-1 α and the expression of the TRPC1 protein was marginally affected. To the contrary, the transcription of the TRPC1 gene is induced by CoCl₂ and affected when the cells are processed with FBS or FBS + CoCl₂. The transcription of the TRPC6 gene was found to be induced in all three experimental conditions and mainly in the case of cell process with FBS. The induction of these genes might possibly affect the contractibility of human bronchial SMCs.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών και η αναδιαμόρφωσή τους

Στην αναπνευστική οδό, τα λεία μυϊκά κύτταρα καλύπτουν το εσωτερικό των αεραγωγών. Τα λεία μυϊκά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και δεν υφίστανται τελική διαφοροποίηση. Η κυριότερη λειτουργία τους είναι η σύσπαση, διατηρούν όμως και μια σειρά άλλων πολυλειτουργικών ικανοτήτων όπως είναι η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η σύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (ECM- extracellular matrix) και η έκκριση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Αυτά τα χαρακτηριστικά, δίνουν την δυνατότητα στα λεία μυϊκά κύτταρα να ρυθμίζουν τη διάμετρο των αεραγωγών, διαμέσου παροδικής συστολής, ενώ χρόνια, διαμέσου δομικής αναδιαμόρφωσης, να συμμετέχουν σε παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού καθώς εμπλέκονται στη δημιουργία ίνωσης και στη συσσώρευση μυϊκής μάζας (Halayko and Solway, 2001).

Οι λειτουργίες των λείων μυϊκών κυττάρων συσχετίζονται άμεσα με την φαινοτυπική και μηχανική πλαστικότητά τους, η οποία ελέγχεται από μια σειρά μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και την παροδική αναδιαμόρφωση των ινιδίων ακτίνης - μυοσίνης. Η φαινοτυπική πλαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων επιφέρει, ως απόκριση στις αλλαγές των απαιτήσεων του περιβάλλοντος και των λειτουργικών αναγκών, την εμφάνιση ενός εύρους δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων, που συνιστούν για τα λεία μυϊκά κύτταρα, δύο εν δυνάμει διακριτούς φαινότυπους, τον συνθετικό (synthetic) και τον συσταλτό (contractile) φαινότυπο. Τα λεία μυϊκά κύτταρα οργανώνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς τόσο μέσα στο ίδιο το όργανο, όσο και μεταξύ διαφορετικών οργάνων. Η φαινοτυπική διαφορά αντιστοιχεί κατ'επέκταση και σε λειτουργική διαφορά (Halayko and Solway, 2001) (εικ.1).

Οι δύο αυτοί φαινότυποι, χαρακτηρίζονται από την έκφραση ενός μοναδικού συνδυασμού από δομικές πρωτεΐνες, συσταλτές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες-υποδοχείς, πρωτεΐνες-κανάλια καθώς και ισομορφών τους που σχετίζονται με διαφορετικά μοτίβα γονιδιακής έκφρασης. Νεότερες έρευνες ταυτοποίησαν σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες (όπως RhoA GTPase/ROCK, γνωστή ως Rho κινάση και παράγοντας απόκρισης στον ορό) που ρυθμίζουν την μεταγραφική ενεργότητα πρωτεϊνών που κωδικοούνται από γονίδια και σχετίζονται με τον

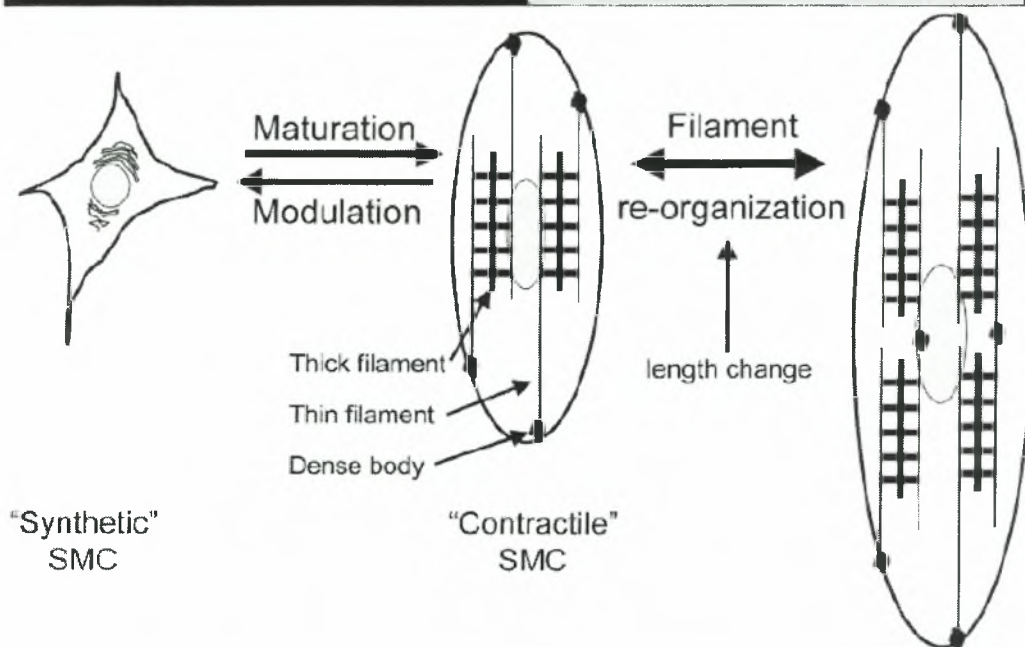
συσταλτικό μηχανισμό των λείων μυικών κυττάρων. Η σύσπαση των λείων μυικών κυττάρων εξαρτάται από την έκφραση πλήθους διαφορετικών συσταλών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι παρούσες στα κύτταρα σε αυστηρά ελεγχόμενες συγκεντρώσεις (Horowitz et al, 1996).

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες, τα λεία μυικά κύτταρα υφίστανται γρήγορη φαινοτυπική διαμόρφωση. Όταν το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας είναι πλούσιο σε ορό (fetal serum), τα ώριμα μυικά κύτταρα εμφανίζουν έναν μη διαφοροποιημένο φαινότυπο, τον συνθετικό φαινότυπο, ο οποίος περιλαμβάνει μια πληθώρα οργανιδίων για τη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων, καθώς και μια πληθώρα μιτοχονδρίων, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κατάλληλου υπόβαθρου για πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά, έλλειψη συσταλών μυονηματίων καθώς και των σχετιζόμενων με αυτά πρωτεϊνών (συσταλτές, ρυθμιστικές πρωτεΐνες) (Halayko and Solway, 2001).

Στις καλλιέργειες, η ωρίμανση των λείων μυικών κυττάρων συμβαίνει όταν επέρχεται κορεσμός της επιφάνειας της φλάσκας ή του τρυβλίου με τα κύτταρα και απομακρυνθεί από το θρεπτικό μέσο ο ορός (fetal serum) ή οι μιτογόνοι παράγοντες. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μερική διαφοροποίηση της πρωτογενούς καλλιέργειας στο συσταλώ φαινότυπο. Έχει δειχθεί ότι αν αφαιρεθεί ο ορός από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, τα λεία μυικά κύτταρα ανακτούν τον διαφοροποιημένο συσταλώ φαινότυπο. Ο συσταλτός φαινότυπος είναι το αποτέλεσμα διαφοροποίησης των λείων μυικών κυττάρων, την οποία εργαστηριακά επιτυγχάνουμε με αφαίρεση του ορού (fetal serum) από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Τα λεία μυικά κύτταρα με συνθετικό φαινότυπο εκφράζουν λίγες συσταλτές πρωτεΐνες και συνθέτουν μεμβρανικές πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες. Η διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ρύθμιση της σύσπασης, προκαλούν την ετερογένεια των λείων μυικών κυττάρων (Halayko and Solway, 2001)

Phenotypic plasticity

Mechanical plasticity

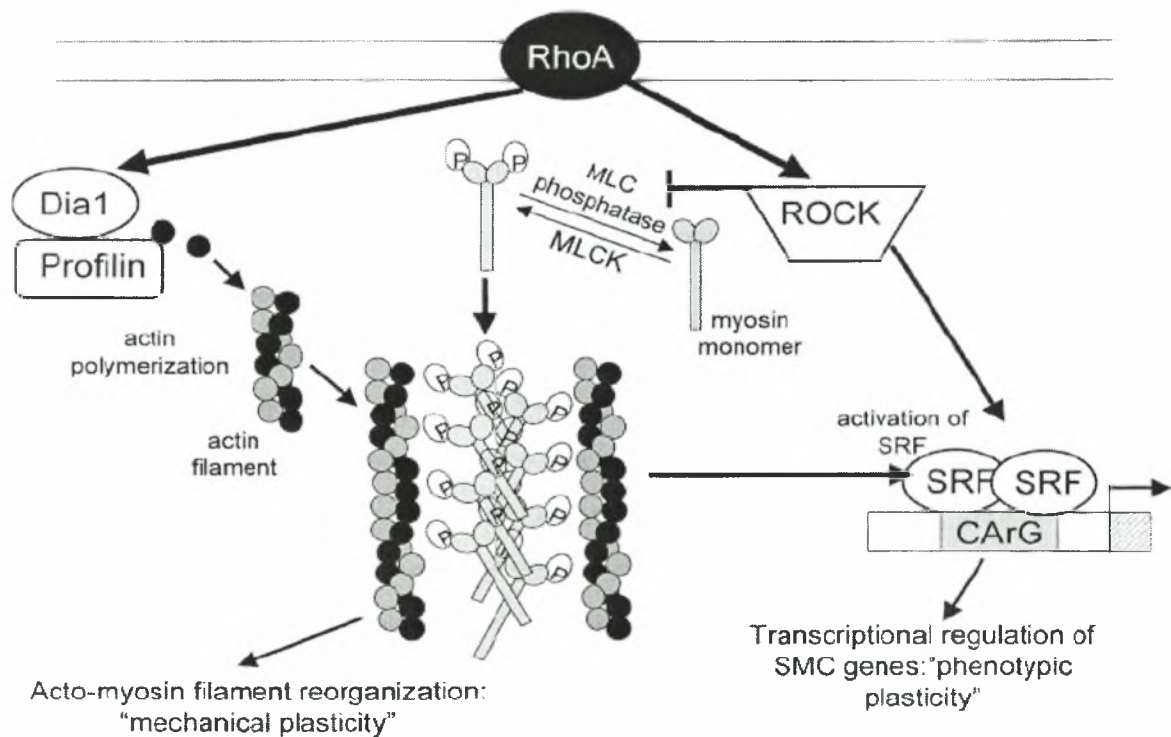


Εικ. 1 : Σχηματική αναπαράσταση της συσχέτισης φαινοτυπικής και μηχανικής πλαστικότητας των λείων μυών. Η φαινοτυπική πλαστικότητα προέρχεται από την αντιστρέψιμη διαμόρφωση και ωρίμανση των λείων μυικών κυττάρων ανάμεσα στην συνθετική και συσταλή κατάσταση. Η μηχανική πλαστικότητα εμφανίζεται στα συσταλά μυοκύτταρα ως το αποτέλεσμα της χρονοεξαρτώμενης υποκυτταρικής αναδιοργάνωσης της συσκευής συστολής ως απόκριση στις αλλαγές του μήκους των μυών. (Andrew J. Halayko and Julian Solway, Department of Physiology and Section of Respiratory Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada R3A 1R8; and 2Departments of Medicine and Pediatrics, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637, Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle, Invited Review: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells, *J Appl Physiol* 90: 358–368, 2001)

Η μηχανική πλαστικότητα φαίνεται να είναι απαραίτητη χαρακτηριστική ιδιότητα των λείων μυών, επειδή η μηχανική δύναμη που παράγεται στους μύες, οι οποίοι περιβάλλουν όργανα όπως οι αεραγωγοί και οι αρτηρίες, είναι χρονικά και ποικιλοτρόπως κυμαινόμενη. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη μηχανική προσαρμοστικότητα στο νέο μήκος των λείων μυικών κυττάρων δεν είναι ξεκάθαροι, αλλά υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι η πλαστική αναδιαμόρφωση του συσταλού φαινοτύπου των λείων μυικών κυττάρων και η συσχέτισή της με τον κυτταροσκελετό, μπορεί να είναι ανταποκρίσιμη στις αλλαγές του μήκους. Έχει παρατηρηθεί μηχανική προσαρμοστικότητα σε μύες διαφορετικού μήκους, όταν ο μυς

διεγείρεται για περιοδική σύσπαση, τη στιγμή αμέσως μετά από την αλλαγή του μήκους του μύος (Halayko and Solway, 2001).

Πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι θα μπορούσαν να ρυθμίσουν και να ολοκληρώσουν την μηχανική και την φαινοτυπική πλαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων βρίσκονται υπό έρευνα. Έχει προταθεί ωστόσο, ένα μοντέλο για την ολοκληρωμένη ρύθμιση της φαινοτυπικής και της μηχανικής πλαστικότητας των λείων μυών, όπου εμπλέκεται η Rho κινάση με τρόπο κατά τον οποίο από τη μια, πραγματοποιείται πολυμερισμός των ινιδίων της ακτίνης και της μυοσίνης και τελικά αναδιαμόρφωσή τους, πράγμα που συνεπάγεται μηχανική πλαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων, και από την άλλη, ρυθμίζεται η έκφραση των ειδικών για τα λεία μυϊκά κύτταρα γονιδίων, γεγονός που σχετίζεται με τη φαινοτυπική πλαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων. (Εικ.2.) (Halayko and Solway, 2001)



Εικ.2. Προτεινόμενο μοντέλο για την ολοκληρωμένη ρύθμιση της φαινοτυπικής και μηχανικής πλαστικότητας των λείων μυών, μέσω ρύθμισης, μέσω της RhoA, του πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης – μυοσίνης και της συγκρότησης των ινιδίων μετά από κατάσταση stress. (Halayko, Andrew J., and Julian Solway. Invited Review: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 90: 358–368, 2001.)

1.2 Μηχανισμός συστολής και πρωτεΐνες που την ελέγχουν

Η συσταλτική συσκευή των ΛΜΚ των αγγείων αποτελείται από λεπτά και παχιά νημάτια. Τα λεπτά νημάτια περιέχουν ακτίνη, τροπομυοσίνη και καλδεσμόνη. Η δράση της τροπομυοσίνης και της καλδεσμόνης ελέγχεται από την Ca^{2+} -εξαρτώμενη δράση ρυθμιστικών μορίων. Τα παχιά νημάτια περιέχουν μυοσίνη II που συντίθεται από δύο πολυπεπτιδικές βαριές και τέσσερις ελαφρές αλυσίδες. Στενά συσχετιζόμενες με την συσταλτική συσκευή πρωτεΐνες είναι και η α -ακτίνη καθώς και η καλμοδουλίνη.

Οι μοριακοί και βιοχημικοί παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να εμπλέκονται στην ετερογένεια των ΛΜΚΒ, περιλαμβάνουν την έκφραση σε διαφορετικά επίπεδα υποδοχέων και πρωτεϊνών ιοντικών διαύλων (όπως είναι οι διάυλοι TRPC) και πρωτεϊνών του συσταλτού φαινότυπου, οι οποίες σχετίζονται με την ρύθμιση της συστολής. Όταν τα ΛΜΚ των αγγείων ωριμάσουν, αποκτούν έναν συσταλτό, διαφοροποιημένο φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την έκφραση δεικτών ειδικών για τα ΛΜΚ συμπεριλαμβανομένων της α -ακτίνης των λείων μυών, της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των ΛΜΚ (smMHC), της SM22, της τροπομυοσίνης (tropomyosin), της καλδεσμόνης (h-caldesmon) και της καλπονίνης (calponin). Η ετερογένεια των ΛΜΚΒ φαίνεται να σχετίζεται με διαφορές στην έκφραση της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των ΛΜΚ (smooth muscle myosin heavy chain (smMHC) (Halayko and Solway, 2001).

Για τη ρύθμιση της φαινοτυπικής και μηχανικής πλαστικότητας των λείων μυών, έχει προταθεί ένα μοντέλο μέσω ρύθμισης, μέσω της RhoA, του πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης – μυοσίνης και της συγκρότησης των ινιδίων μετά από κατάσταση stress. Η έκφραση των περισσότερων γονιδίων-δεικτών που έχουν χαρακτηριστεί, εξαρτάται από πολλαπλά CArG ρυθμιστικά στοιχεία που εντοπίζονται στις περιοχές των υποκινητών και ενισχυτών τους (promoter-enhancer regions). Το γενικό πρότυπο της ακολουθίας των CArG στοιχείων είναι το CC(A/T-rich)6GG και ο παράγοντας που προσδέεται σε αυτά είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SRF (serum response factor- παράγοντας απόκρισης στον ορό). Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του ειδικού για τα λεία μυικά κύτταρα γονιδίου (SMC-γονίδιο) ολοκληρώνεται με την σύνδεση των SRF διμερών παραγόντων στο 5' άκρο των υποκινητών των CArG στοιχείων (CArG boxes). Ο παράγοντας SRF ενεργοποιείται και επάγεται η μετατόπιση από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα τόσο

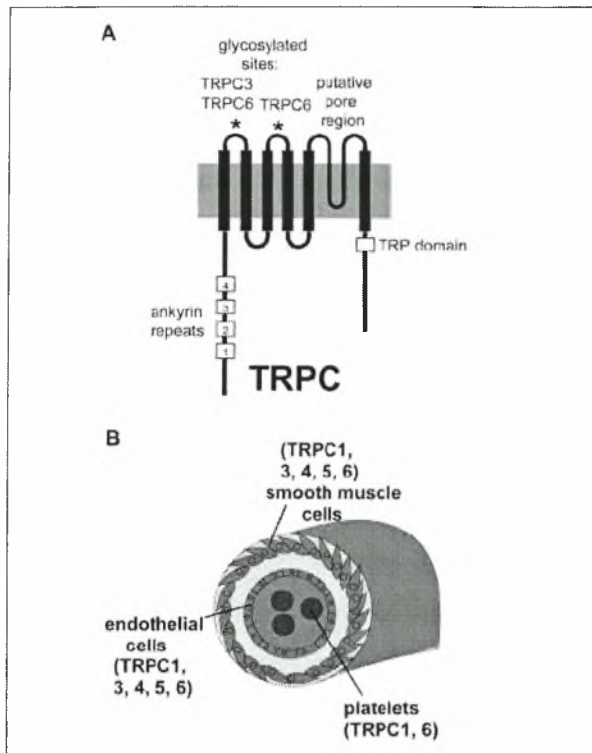
από την Rho-κινάση (ROCK), όσο και από αλλαγές στην δυναμική των ινιδίων υπό συνθήκες stress. Επιπλέον η Rho-κινάση (ROCK) αναστέλλει την φωσφατάση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης (myosin light-chain (MLC) phosphatase) με τέτοιο τρόπο ώστε να οδηγεί αμέσως σε αύξηση της φωσφορυλίωσης των μονομερών της μυοσίνης, από την κινάση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης (myosin light-chain kinase - MLCK), γεγονός που οδηγεί στον πολυμερισμό των ινιδίων της μυοσίνης. Η RhoA επίσης ενεργοποιεί την Dia1/profilin, προνηματίνη, στα θηλαστικά, πράγμα που προκαλεί την εκκίνηση του πολυμερισμού της ακτίνης και την συγχρονισμένη ένωση των επιμέρους «δεματίων» των ινιδίων του συσταλού φαινοτύπου. Αυτό συνεπάγεται μηχανική πλαστικότητα και ρυθμίζει την έκφραση των ειδικών για τα λεία μυικά κύτταρα, γονιδίων (Halayko and Solway, 2001) (εικ.2).

1.2.1 Δίαυλοι TRPC (Canonical Transient Receptor Potential channels)

Οι διάυλοι TRPC ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των TRP (Transient Receptor Potential ion channel) διαύλων, η οποία περιλαμβάνει 7 κατηγορίες ιοντικών διαύλων. Οι οικογένειες των TRP διαύλων, μοιράζονται μόνο δύο χαρακτηριστικά: έχουν 6 διαμεμβρανικές πολυπεπτιδικές περιοχές (6TM) και επιτρέπουν μόνο σε κατιόντα να διαπεράσουν τον πόρο. Οι 6 διαμεμβρανικές περιοχές διαμορφώνουν τον πόρο του διαύλου στο κέντρο του οποίου βρίσκονται οι διαμεμβρανικές περιοχές 5 και 6. Το αμινο-τελικό και το καρβοξυ-τελικό άκρο των αλυσίδων των TRP, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (εικ.3). Η κατανόηση των μηχανισμών ενεργοποίησής τους είναι ακόμη υπό έρευνα. Έχει βρεθεί ωστόσο, ότι οι περισσότεροι από αυτούς δεν είναι επιλεκτικοί ως προς το ποια ιόντα θα επιτραπεί να διαπεράσουν τους πόρους. Έτσι, γίνεται δυνατή τη διέλευση ιόντων Na^+ , K^+ , ή Ca^{2+} . Στοιχεία δείχνουν, ότι υπάρχει μία δομική περιοχή, η οποία απαρτίζεται από ένα μοτίβο αποτελούμενο από 25 αμινοξέα (TRP domain) και περιέχει την αλληλουχία EWKFAR (TRP box) στο καρβοξυ-τελικό άκρο μετά την έκτη διαμεμβρανική περιοχή. Η TRP domain υπάρχει σε όλα τα γονίδια των TRPC διαύλων. Στους ιοντικούς διαύλους TRPC, η αμινο-τελική περιοχή (η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα) περιέχει επαναλήψεις αγκυρίνης, ενώ υπάρχουν περιοχές πλούσιες σε προλίνη στην περιοχή η οποία βρίσκεται ανάμεσα στην καρβοξυ-τελική περιοχή, την πλησιέστερη προς την έκτη υπομονάδα της 6TM περιοχής (David E. Clapham et al., 2002) (εικ.3).

Η οικογένεια των TRPC ιοντικών διαύλων, μπορεί να διαχωριστεί σε 4 υποοικογένειες (TRPC1, TRPC4,5, TRPC3,6,7 και TRPC2) με βάση την ομολογία των αλληλουχιών τους καθώς και με βάση τις λειτουργικές τους ομοιότητες. Η TRPC1 ήταν το πρώτο διαδεδομένο μέλος των TRP διαύλων στα θηλαστικά, το οποίο βρέθηκε πως σχημάτιζε ιοντικό διάυλο. Δεδομένης της ευρείας έκφρασης και της ικανότητάς της να σχηματίζει λειτουργικά συμπλέγματα, ομο- και ετερο- τετραμερή με δύο ορισμένες άλλες TRPC υπομονάδες (TRPC1/4/5 και TRPC3/6/7, όχι όμως την TRPC2 η οποία φαίνεται να υπάρχει ως μη λειτουργικό ψευδογονίδιο στους ανθρώπους), η TRPC1 μπορεί να είναι ένα συστατικό διαφορετικών ετερομερών TRP συμπλεγμάτων, όμως δεν έχει βρεθεί ακόμη το πότε συμβαίνει αυτό.

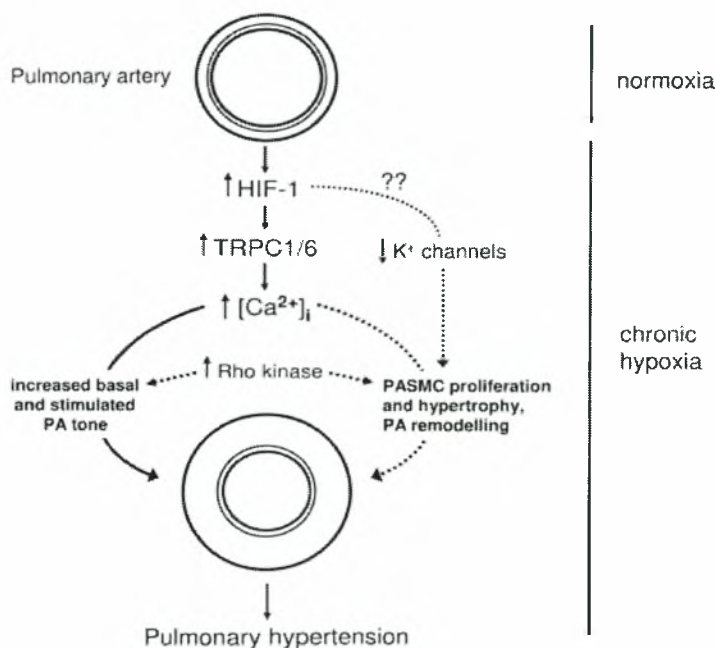
Σχεδόν όλα τα μέλη της οικογένειας των TRPC εκφράζονται στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και μπορούν να ανιχνευτούν μέσω των mRNA τους με την μέθοδο της RT-PCR. Ενώ η TRPC1 και η TRPC2 είναι σχεδόν μοναδικές, οι TRPC4 και TRPC5 παρουσιάζουν ομολογία έως και κατά 65% περίπου. Η υποοικογένεια των TRPC3, TRPC6 και TRPC7 παρουσιάζουν ομοιότητα κατά 75% περίπου σε επίπεδο αμινοξέων καθώς και ως προς την ενεργοποίησή τους από την διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία είναι ένα προϊόν του καταβολισμού της διφωσφορικής 4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης - $PI(4,5)P_2$ που ενεργοποιείται από την φωσφολιπάση C (PLC). Αυτοί οι ιοντικοί διάυλοι είναι ευαίσθητοι στο ενδοκυττάριο Ca^{2+} (Dietrich A. et al., 2009)



Εικ.3 : Η τοπολογία στην πλασματική μεμβράνη (A) και η έκφραση των TRPC καναλιών στα αγγεία των οργάνων (B). A: Τα μέλη των TRPC καναλιών μοιράζονται το συντηρημένο TRP box, 4 επαναλήψεις αγκυρίνης και μια περιοχή που σχηματίζει πόρο. Τα TRPC3 κανάλια είναι μονο-γλυκοσυλιωμένα, ενώ τα TRPC6 δι-γλυκοσυλιωμένα (Dietrich A, et al. 2002). B: Στην εικόνα αναφέρονται οι τρεις διαφορετικοί τύποι κυττάρων των αγγείων και σε παρένθεση δίνονται οι κατηγορίες των TRPC καναλιών που εκφράζονται κυρίως σε κάθε έναν από τους τύπους κυττάρων. Λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια (Dietrich, Kalwa, Gudermann, TRPC channels in vascular cell function, Thrombosis and Haemostasis 103.1/2010, Schattauer, USA, 2009)

Η εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, είναι πιθανό να αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{+2} με το να προάγει την ρυθμιζόμενη - από την IP_3 απελευθέρωση των ιόντων Ca^{+2} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες Ca^{+2} . Παρόλο που συμβαίνει αυτό, φαίνεται να υπάρχει αυξημένη έκφραση ιοντικών διαύλων που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες των TRPC1 και TRPC6. Αυτό το γεγονός δείχνει να είναι υπεύθυνο κατά ένα μεγάλο βαθμό για την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca^{+2} στα λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας (pulmonary arterial smooth muscle cell - PASMC) κατά τη χρόνια υποξία (chronic hypoxia -CH) και να συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αγγείων. Έχει βρεθεί ότι πολλές ισομορφές των πρωτεϊνών των TRP διαύλων και κυρίως της TRPC οικογένειας, εκφράζονται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και εμπλέκονται στην εισροή των ιόντων Ca^{+2} διαμέσου μη-τασεο-εξαρτώμενων διαύλων ιόντων Ca^{+2} , οι οποίοι

διεγείρονται από την ενεργοποίηση υποδοχέων, το άδειασμα των αποθηκών ιόντων Ca^{+2} και την έκταση του κυττάρου. Επίσης σημαντικό ρόλο στη χρόνια υποξία (CH), φαίνεται να παίζει το σύστημα των κινασών RhoA-Rho-κινάση με τρόπο που δεν είναι ακόμη κατανοητός. Η CH στην πνευμονική αρτηρία (pulmonary artery– PA) , έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει θετικά την έκφραση της Rho-κινάσης, αλλά όχι της RhoA. Το αντίθετο κάνει ο HIF-1 (τουλάχιστον σε ινοβλάστες), πράγμα που υποδεικνύει πιθανό ρόλο του στον έλεγχο της έκφρασης του συστήματος των κινασών RhoA-Rho-κινάση στην PA κατά τη χρόνια υποξία (εικ.4) (Aaronson PI et al, 2006, Wang J et al., 2004).



Εικ.4 : Πιθανό μοντέλο του ρόλου του HIF-1 στην ανάπτυξη της δευτερογενούς πνευμονικής υπέρτασης (Secondary Pulmonary Hypertension –SPH). (Philip I. Aaronson, TRPC Channel Upregulation in Chronically Hypoxic Pulmonary Arteries: The HIF-1 Bandwagon Gathers Steam, *Circ. Res.*;98;1465-1467,2006).

Η πορεία του κυτταρικού κύκλου είναι Ca^{+2} -εξαρτώμενη, καθώς Ca^{+2} -εξαρτώμενη είναι και η δραστηριότητα πολλών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται. Ο πολλαπλασιασμός των PASM C ‘s κυττάρων φαίνεται να αναστέλλεται όταν παρεμποδίζεται η εισροή ιόντων Ca^{+2} καθώς και η απελευθέρωσή

τους από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Ειδικότερα οι TRPC1 δίαυλοι, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παροχή ιόντων Ca^{+2} για την ανάπτυξη των PASMC 's κυττάρων. Η θετική ρύθμιση των TRPC1 ίσως συμβάλλει στην αύξηση του βασικού τόνου των πνευμονικών αρτηριών, στην υπερπλασία και στην υπερτροφία που προκαλείται από την χρόνια υποξία, την ίδια στιγμή που μια αύξηση στην έκφραση των TRPC6 ίσως θα σήμαινε μεγαλύτερη απόκριση σε αγγειοσυσταλτικούς παράγοντες που επίσης υπάρχουν (Dietrich et al., 2009).

1.3 Αναδιαμόρφωση και νόσοι του αναπνευστικού κατά την υποξία

Η χρόνια υποξία προκαλεί αγγειοσυστολή, εξαιτίας της αυξημένης σύσπασης και του πολλαπλασιασμού των λείων μυικών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας. Σε ποντικούς και αρουραίους με CH, έχει δειχθεί, ότι στα PASMC 's κύτταρα η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου Ca^{+2} ήταν αυξημένη, λόγω της εισροής ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) διαμέσου μονοπατιών, διαφορετικών από τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια ασβεστίου (L-type Ca^{+2} channels) και ότι, η ανάπτυξη της υποξικής πνευμονικής υπέρτασης, απαιτεί την πλήρη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Η παρατεταμένη έκθεση των πνευμονικών αγγείων στην υποξία, προκαλεί δομικές και λειτουργικές αλλαγές στις πνευμονικές αρτηρίες (pulmonary arteries – PAs), συμπεριλαμβανομένων υπερτροφία και υπερπλασία των PASMC 's κυττάρων, γεγονός το οποίο οδηγεί στην πάχυνση των τοιχωμάτων των PAs και κατά επέκταση, σε δευτερογενή πνευμονική υπέρταση. Σε κυτταρικό επίπεδο, η CH προκαλεί αποπόλωση της μεμβράνης, η οποία σχετίζεται με μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών ιόντων καλίου K^{+} (voltage-gated K^{+} channels). Αυτό το γεγονός πιθανολογείται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των PASMC 's κυττάρων, με το να προκαλείται μια αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων καλίου K^{+} (το ίδιο έχει αναφερθεί και για το Ca^{+2}) καθώς και με το να παρεμποδίζεται η απόπτωση των κυττάρων αυτών (Wang J. et al., 2006)

1.4 Απόκριση στην υποξία – Ο ρόλος του «επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα 1» (Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF-1)

Οι περισσότεροι οργανισμοί προκειμένου να επιβιώσουν απαιτούν οξυγόνο. Από αυτούς, οι πολυκύτταροι οργανισμοί, στην πλειοψηφία τους, διαθέτουν ειδικά

όργανα για την πρόσληψη, τη μεταφορά και την διανομή του οξυγόνου στους ιστούς τους. Ο κύριος λειτουργικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου, είναι η μερική πίεση του οξυγόνου σε τοπικό επίπεδο. Η αυτόνομη ρύθμιση του οξυγόνου έχει τα πλεονεκτήματά της, διότι παρέχει ένα υψηλό επίπεδο πλαστικότητας στη λειτουργία των οργάνων αυτών, σε αλλαγές της μερικής πίεσης οξυγόνου ή κατά τη διάρκεια επούλωσης τραυμάτων (Roland H. Wegner, 2002).

Η μείωση των φυσιολογικών επιπέδων οξυγόνου στους ιστούς, αντιπροσωπεύει το φαινόμενο της υποξίας. Η υποξία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια παραμονής σε υψηλό υψόμετρο ή κατά τη διάρκεια επούλωσης τραυμάτων, χρόνιων ή οξείων αγγειακών παθήσεων, πνευμονικών νόσων καθώς και στον καρκίνο. Το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα διαδραματίζουν τον κύριο ρόλο στην ομοιόσταση του οξυγόνου. Όταν η διανομή του οξυγόνου είναι ανεπαρκής, ενεργοποιούνται ομοιοστατικοί μηχανισμοί στα δύο αυτά συστήματα και στην περίπτωση που η υποξία διαρκέσει περισσότερο από λίγα λεπτά, προκαλούνται αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων (Gregg L. Semenza, 2003).

Η προσαρμογή στην υποξία περιλαμβάνει την αύξηση του ρυθμού της αναπνοής και την αύξηση της διανομής του οξυγόνου στους ιστούς, μέσω της αυξημένης παραγωγής ερυθροκυττάρων (ερυθροποίηση), της αύξησης του σχηματισμού νέων αγγείων (αγγειογένεση) και της αγγειοδιαστολής, καθώς και της ενεργοποίησης της γλυκόλυσης (A.Zarkóska and Dulak, 2004). Σε κυτταρικό επίπεδο, η υποξία διαμορφώνει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, τα οποία μεσολαβούν στην φυσιολογική και προσαρμοστική απόκριση και αφορούν λειτουργίες όπως η μεταφορά του οξυγόνου, ο μεταβολισμός του σιδήρου, η αγγειογένεση, ο τόνος των λείων μυών, ο αερισμός και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Πολλές από τις διεργασίες που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του οξυγόνου, ρυθμίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες επαγόμενους από την υποξία (HIFs), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν έναν «σύνδεσμο» μεταξύ αισθητήρων του οξυγόνου και τελεστών τόσο σε κυτταρικό, τοπικό όσο και σε επίπεδο συστήματος. Ο καλύτερα μελετημένος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου είναι ο **«επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF-1)** (Wenger R.H., 2002).

1.5 Ο παράγοντας HIF-1

Ο HIF-1 είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων των οποίων η έκφραση εξαρτάται από το οξυγόνο. Πολλά από τα γονίδια-στόχους του HIF-1 είναι γνωστά και περιλαμβάνουν γονίδια, των οποίων τα προϊόντα συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου, όσο και στην προσαρμογή του οργανισμού στις αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Τα γονίδια αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γονίδια των οποίων τα προϊόντα επάγουν την ερυθροποίηση, όπως είναι η ερυθροποιητίνη (EPO, erythropoietin) καθώς και γονίδια, των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στη μεταφορά του σιδήρου. Ο HIF-1 προκαλεί την θετική ρύθμιση του γονιδίου της σερουλοπλασμίνης (ceruloplasmin), της τρανσφερρίνης και του υποδοχέα της (transferrin, transferrin receptor), που διευκολύνουν την πρόσληψη σιδήρου από τους ερυθροποιητικούς ιστούς. Στη δεύτερη ομάδα συγκαταλέγονται γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος, τα οποία είτε προωθούν την αγγειογένεση, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (vascular endothelium growth factor) και ο υποδοχέας του Flt-1 (VEGF-receptor 1), είτε διαμορφώνουν τον αγγειακό τόνο, όπως η ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1). Η τρίτη ομάδα αποτελείται από γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στην πρόσληψη και στον μεταβολισμό της γλυκόζης κατά την αναερόβια γλυκόλυση. Στην τέταρτη ομάδα βρίσκονται γονίδια, των οποίων τα προϊόντα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα του κυττάρου, καθώς και άλλα γονίδια τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου σε ακραία ερεθίσματα (stresses). Στον πίνακα 1 παρατίθεται μια σειρά γονιδίων, των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από τον HIF-1. (Πιν.1) (Wenger R.H., 2002).

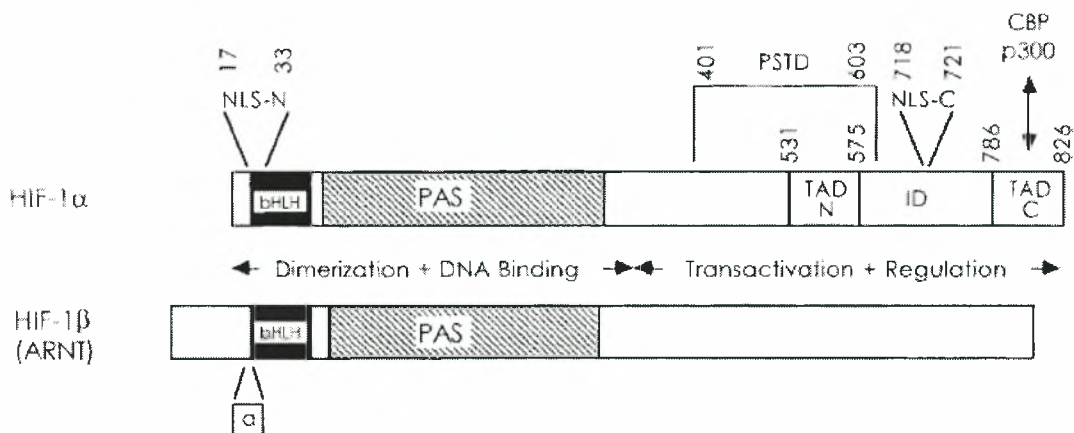
Γονίδια-στόχοι του HIF-1, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τα επίπεδα του οξυγόνου.
Μεταφορά οξυγόνου : Ερυθροποίηση και μεταβολισμός σιδήρου
Ερυθροποιητίνη (EPO-erythropoietin)
Σερουλοπλασμίνη (ceruloplasmin)
Τρανσφερρίνη (transferrin)
Υποδοχέας της Τρανσφερρίνης (transferrin receptor)
Ανάπτυξη και λειτουργικότητα αγγειακού συστήματος :
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (vascular endothelium growth factor)
Υποδοχέας του VEGF (Flt-1 - VEGF-receptor 1)
Ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1)
i-NOS
Αναερόβιος μεταβολισμός : πρόσληψη και μεταβολισμός γλυκόζης κατά την αναερόβια γλυκόλυση
Μεταφορέας γλυκόζης-1 (glucose transporter-1)
Φωσφοφρουκτοκινάση -L (phosphofructokinase L)
Ενολάση -1 (enolase-1)
Αλδολάση A (aldolase A)
Διάφορα
p35srj (HIF-1 feedback regulation)
ETS-1 (μεταγραφικός παράγοντας)
IGFBP-1 (αυξητικός παράγοντας)

Πίνακας1 : Γονίδια-στόχοι του HIF-1, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τα επίπεδα του οξυγόνου.(Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151–1162 , 2002).

Ο HIF-1 είναι μία ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες : τον HIF-1α και τον HIF-1β. Το ανθρώπινο γονίδιο για τον HIF-1α έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 14 (14q21-q24), ενώ το γονίδιο για τον HIF-1β στο χρωμόσωμα 21 (1q21). Οι δύο υπομονάδες του HIF-1 φαίνεται να είναι αρκετά συνηρημένες, καθώς έχει βρεθεί ότι υπάρχει 90% ομοιότητα για αυτές ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο (Wenger R.H. et al., 1996). Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1 συνδέεται στο DNA κυττάρων που βρίσκονται σε υποξία, ενώ όχι σε αυτό κυττάρων που βρίσκονται κάτω από φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε επίπεδο mRNA και οι δύο υπομονάδες του HIF-1 εκφράζονται συνεχώς.

Ωστόσο, σε επίπεδο πρωτεΐνης μόνο η υπομονάδα HIF-1α έχει βρεθεί να εκφράζεται στα υποξικά κύτταρα, σε αντίθεση με την υπομονάδα HIF-1β, η οποία εκφράζεται συνεχώς (Zhu et al., 2002).

Η κάθε υπομονάδα του HIF-1 περιλαμβάνει δύο χαρακτηριστικές δομές: τη δομή bHLH (basic helix-loop-helix) και τη δομή PAS (per-AHR-ARNT-Sim) (Wang et al., 1995) (εικ.5). Η δομή PAS περιλαμβάνει δύο επαναλήψεις A και B και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του HIF-1 με άλλες πρωτεΐνες. Η αλληλουχία αυτή ταυτοποιεί μία υπερικογένεια πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί σε πολλά είδη οργανισμών (συμπεριλαμβανομένων και προκαρυωτών), γεγονός που υποδεικνύει την συντήρησή τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Wang et al., 1995). Η δομή bHLH είναι απαραίτητη τόσο για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA, όσο και για τον διμερισμό με την HIF-1α υπομονάδα. Ο παράγοντας HIF-1 για να καταστεί ενεργός και να μπορέσει να δράσει, πρέπει πρώτα η υπομονάδα HIF-1α να διμεριστεί με την HIF-1β υπομονάδα και τότε ο HIF-1 να συνδεθεί στην HRE περιοχή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου. Η περιοχή HRE (hypoxia response element) είναι μία ειδική περιοχή με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3', η οποία έχει βρεθεί στους υποκινητές όλων των γονιδίων-στόχων του HIF-1 (Semenza GL, 2005).



Εικ.5 : Σχηματική παράσταση της πρωτεϊνικής δομής των δύο υπομονάδων του «επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα-1» HIF-1. Ο HIF-1α είναι ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 826 αμινοξικά κατάλοιπα, σε αντίθεση με τον HIF-1β που εκφράζεται σαν ένα πολυπεπτίδιο των 774-789 αμινοξικών καταλοίπων σαν αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος ενός εξωνίου, το οποίο κωδικεύει 15 αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται αμέσως πριν την δομή bHLH (basic helix-loop-helix). Αναπαρίστανται οι βασικές λειτουργικές περιοχές των δύο υπομονάδων, καθώς και οι περιοχές πρόσδεσης διάφορων συμπαραγόντων. (Semenza, Gregg L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88: 1474–1480, 2000)

1.5.1 Ο HIF-1β

Ο HIF-1β είναι μία πρωτεΐνη 91-94kD που αποτελείται από 774- 789 αμινοξέα και εκφράζεται συνεχώς. Είναι επίσης γνωστός ως πυρηνικός μεταφορέας του υποδοχέα των αρυλ-υδρογονανθράκων (Aryl Hydrocarbon Receptor Translocator – ARNT). Ο ARNT ονομάζεται έτσι, εξαιτίας της ικανότητάς του να διμερίζεται με τον υποδοχέα των αρυλ-υδρογονανθράκων με τον οποίο δημιουργούν τον λειτουργικό υποδοχέα διοξίνης. Στην αλληλουχία του έχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal – NLS) και μία βασική περιοχή με δομή bHLH (basic helix-loop-helix). Έχουν βρεθεί και δύο επιπλέον ισομορφές για τον HIF-1β, η πρωτεΐνη ARNT2 και η πρωτεΐνη ARNT3 (BMAL1/MOP3), οι οποίες διαφέρουν με τον HIF-1β στο ότι η έκφρασή τους είναι ιστο-ειδική (Semenza G.L. et al, 2000).

1.5.2 Ο HIF-1α

Ο HIF-1α είναι μία πρωτεΐνη 120kD και αποτελείται από 826 αμινοξέα. Όπως και ο HIF-1β, έτσι και ο HIF-1α, έχει τις περιοχές NLS, bHLH και PAS αλλά και κάποιες μοναδικές χαρακτηριστικές περιοχές. Περιέχει δύο περιοχές trans ενεργοποίησης (transactivation domain- TAD), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του HIF-1, καθώς και για την πρόσδεση των συνενεργοποιητών όπως ο p300/CBP, που είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1. Επίσης, ο HIF-1α περιέχει στο καρβοξυτελικό του άκρο, μία περιοχή γνωστή ως περιοχή αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο (oxygen-dependent degradation domain- ODD), η οποία είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α και για την αποικοδόμησή του σε συνθήκες νορμοξίας. Η περιοχή ODD περιλαμβάνει με τη σειρά της δύο μοτίβα PEST-like, τα οποία είναι αλληλουχίες πλούσιες σε κατάλοιπα προλίνης (P), γλουταμινικού οξέος (E),σερίνης (S) και θρεονίνης (T),ο ρόλος των οποίων θα περιγραφεί στη συνέχεια. (A. Zagórska and J. Dulak, 2004)

Έχουν βρεθεί δύο επιπλέον ισομορφές για τον HIF-1α, ο HIF-2α και ο HIF-3α, γνωστός και ως ενδοθηλιακή περιοχή (endothelial PAS domain protein 1 – EPAS). Ο HIF-2α παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον HIF-1α ως προς την πρωτεϊνική του δομή καθώς και ως προς τον τρόπο ρύθμισης της έκφρασής του με

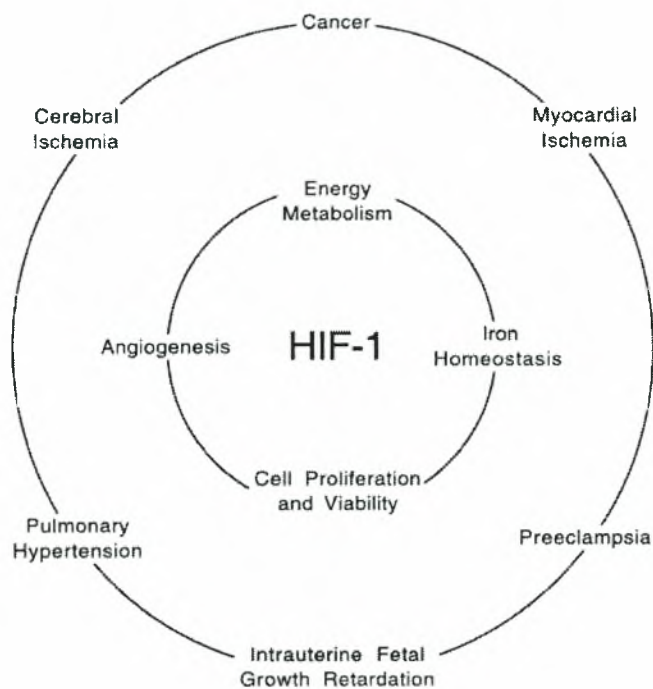
βάση τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Ο HIF-3α παρουσιάζει και αυτός ομολογία με τον HIF-1α, δεν περιέχει όμως τις περιοχές TAD και είναι πιθανόν να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από την υποξία έκφρασης των γονιδίων. Η αρνητική αυτή ρύθμιση, είναι πιθανόν να οφείλεται στη δράση της πρωτεΐνης της PAS περιοχής (inhibitory PAS protein – IPAS), η οποία αποτελεί ένα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α. Έχει επίσης βρεθεί ότι η IPAS πρωτεΐνη λειτουργεί ως ανταγωνιστής του HIF-1α, λόγω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με τον ARNT, παρεμποδίζοντας έτσι τον διμερισμό του με τον HIF-1α και επιπλέον παρεμποδίζει την πρόσδεση του HIF-1α στις περιοχές HREs (Semenza, 2004).

1.5.3 Η εμπλοκή του HIF-1 σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες

Ο HIF-1 φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση του αγγειοσυσταλτικού παράγοντα ενδοθηλίνη-1 στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (η ενδοθηλίνη-1 διαμορφώνει τον αγγειακό τόνο), ενώ η αγγειοτενσίνη II επάγει την έκφραση του HIF-1 στα λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας. Πιθανολογείται έτσι, η εμπλοκή και ο ρόλος του HIF-1 στην παθογένεια της αναδιαμόρφωσης της πνευμονικής αρτηρίας. Επιπλέον, λόγω του μεγάλου εύρους των γονιδίων-στόχων του, ο HIF-1 φαίνεται να εμπλέκεται εκτός από τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Παθοφυσιολογικά, εμπλέκεται στην ανάπτυξη ισχαιμικών καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών, πνευμονικής υπέρτασης, ανωμαλιών κατά την κύηση (προεκλαμψία, καθυστέρηση στην ανάπτυξη του εμβρύου) και καρκίνου (Semenza G., 2000) (εικ.6).

Ο HIF-1α βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε κοινούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου. Η εμπλοκή του HIF-1 στην πρόοδο του καρκίνου, αλλά και η συμμετοχή διαφόρων φυσιολογικών και γενετικών μηχανισμών, οδηγούν στην υπερέκφραση του HIF-1α. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στον καρκίνο, η έκφραση του HIF-1α είναι δραματικά αυξημένη και οδηγεί στην επίσης αυξημένη παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelium growth factor-VEGF) ο οποίος προωθεί την αγγειογένεση, καθώς και σε παρακρινή ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, στην περίπτωση του καρκίνου, ο HIF-1 συμμετέχει στην ενεργοποίηση και άλλων αυτοκρινών σηματοδοτικών μονοπατιών (TGF- α /endothelial growth factor receptor,

IGF-2/IGF-1R) τα οποία προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Semenza G. 2005).



Εικ.6: Εμπλοκή του HIF-1 σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Ο HIF-1 συμμετέχει σε φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες (εσωτερικός κύκλος) με την trans-ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων, που συμβάλλει σε προστατευτικές ή παθολογικές αποκρίσεις σε καταστάσεις νόσου (εξωτερικός κύκλος) (Gregg L Semenza, HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes Dev. 14:1983-1991, 2000)

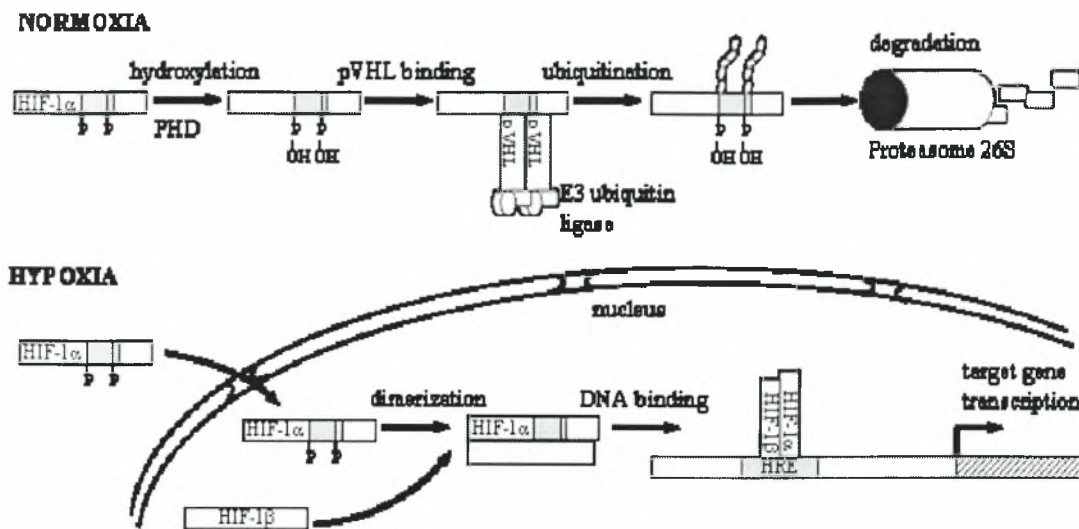
1.6 Η ρύθμιση του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου

Κατά τη νορμοξία, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στην περιοχή αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο ODD και συγκεκριμένα στα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564 (Pro402, Pro564). Η υδροξυλίωση αυτή προηγείται και είναι απαραίτητη, καθώς ρυθμίζει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL) και τον HIF-1α για την περαιτέρω επεξεργασία και τελική αποικοδόμηση του HIF-1α. Η πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL) είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά απευθείας με τον υδροξυλιωμένο στην περιοχή ODD HIF-1α και δρα ως υπόστρωμα, το οποίο αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικουτίνης. Η λιγάση αυτή, μετά την πρόσδεση του HIF-1α, οδηγεί στη στρατολόγηση ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών του μηχανισμού της ουβικουτινίωσης

οι οποίες με αυτόν τον τρόπο, οδηγούν τον HIF-1α στο πρωτεόσωμα 26S για αποικοδόμηση (Semenza G.L., 2001) (εικ.7)

Η εν λόγω υδροξυλίωση, πραγματοποιείται από μία οικογένεια οξυγονο-εξαρτώμενων προλύλ-υδροξυλασών (prolyl-hydroxylases – PHDs), οι οποίες είναι διοξυγενάσες που περιέχουν αίμη και ως υποστρώματά τους έχουν το οξυγόνο και το 2-κετογλουταρικό. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν ένα άτομο οξυγόνου στο κατάλοιπο προλίνης της περιοχής ODD, το οποίο και υδροξυλιώνουν, ενώ ένα δεύτερο άτομο οξυγόνου αντιδρά με το 2-κετογλουταρικό οξύ, παράγοντας ηλεκτρικό οξύ (Semenza, 2001). Για την ενζυματική υδροξυλίωση του HIF-1α από τις προλύλ-υδροξυλάσες, είναι απαραίτητη η παρουσία σιδήρου, οξυγόνου και 2-κετογλουταρικού οξέος (Semenza, 2009). Έχουν βρεθεί τρεις παρόμοιες προλύλ-υδροξυλάσες οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδροξυλιώνουν τον HIF-1α. Αυτές είναι οι PHD1, PHD2, PHD3. Και οι τρεις εξαρτώνται από το 2-κετογλουταρικό, απαιτούν μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα και είναι ικανές για την υδροξυλίωση του καταλοίπου προλίνης 564 (Pro564). Μόνο όμως οι PHD1 και PHD2 μπορούν να υδροξυλιώσουν το κατάλοιπο προλίνης 402 (Pro402). Με αυτόν τον τρόπο δρουν σαν αισθητήρες οξυγόνου, καθώς συνδέουν τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου με τη ρύθμιση του HIF-1α. Η διαφορά τους έγκειται κυρίως στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, όπου: Η PHD1 ανιχνεύεται αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD2 στο κυτόπλασμα, ενώ η PHD3 ανιχνεύεται και στον πυρήνα αλλά και στο κυτόπλασμα (Zagórska A. and Dulak J., 2004).

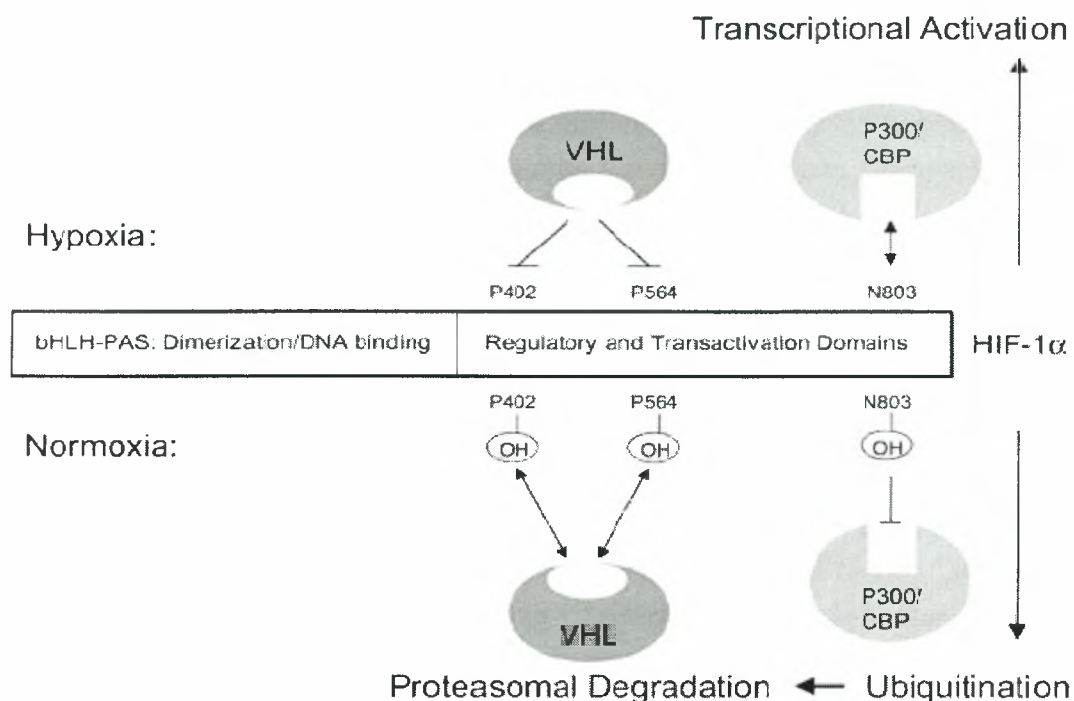
Σε συνθήκες νορμοξίας, εκτός από την υδροξυλίωση αυτή, σημαντική είναι και η ακετυλίωση ενός καταλοίπου λυσίνης (Lys532) από την ARD-1 ακετυλο-τρανσφεράση. Η εν λόγω ακετυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του HIF-1α, με το να καθιστά πιο αποτελεσματική την πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης pVHL στον HIF-1α (Jeong et al., 2002). Ο «παράγοντας που αναστέλλει τον HIF-1» (factor inhibiting HIF-1 – FIH), συνδέεται στον HIF-1α και υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στη θέση 803 (Asn803) της περιοχής TAD-C. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η αλληλεπίδραση HIF-1α με τον συμπαράγοντα p300/CBP, γεγονός που συνεπάγεται αναστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του HIF-1 (Lando D. et al., 2002, Mahon P.C. et al., 2001). Ο FIH είναι μία διοξυγενάση, όπως και οι προλύλ-υδροξυλάσες, και έχει ως υπόστρωμα τον σίδηρο Fe^{+2} και το 2-κετογλουταρικό οξύ.



Εικ.7 : Ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, οι προλύλ-υδροξυλάσες (PHDs) υδροξυλιώνουν τα κατάλοιπα προλίνης 402 και 564 (Pro402, Pro564), τα οποία βρίσκονται στην περιοχή αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο ODD του HIF-1α. Εν συνέχεια, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL), προσδένεται στην περιοχή ODD και οδηγεί στη στρατολόγηση του συμπλέγματος της λιγάσης της ουβικουιτίνης E3. Με αυτόν τον τρόπο ο HIF-1α, ουβικουιτινιώνεται και στη συνέχεια αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα 26S. Σε συνθήκες υποξίας, οι προλύλ-υδροξυλάσες(PHDs) καθίστανται ανενεργές και έτσι εμποδίζεται η πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau (pVHL) στην περιοχή ODD του HIF-1α. Έτσι, ο HIF-1α αποφεύγει την ουβικουιτινίωση και την αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα και μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί στον πυρήνα, όπου αφού διμεριστεί με τον HIF-1β, προσδένεται στην περιοχή HRE (hypoxia response element) του υποκινητή του γονιδίου και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. (Anna Zagórska and Józef Dulak, HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochemica Polonica* 51 (3) : 563-585, 2004)

Σε συνθήκες υποξίας όπου η διαθεσιμότητα του μοριακού οξυγόνου είναι περιορισμένη, οι προλύλ-υδροξυλάσες καθίστανται ανενεργές, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η υδροξυλίωση του HIF-1α και η ακετυλίωση στο κατάλοιπο λυσίνης να υπόκειται σε κατιούσα ρύθμιση. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau (pVHL) στην περιοχή ODD του HIF-1α δεν είναι δυνατή και έτσι η πρωτεΐνη σταθεροποιείται. Στη συνέχεια ο HIF-1α συνδέεται με τον HIF-1β και σχηματίζεται το μεταγραφικό ετεροδιμερές HIF-1 στον πυρήνα, όπου προσδένεται στην περιοχή απόκρισης στην υποξία HRE (hypoxia response element) του υποκινητή του γονιδίου και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Semenza, 1996, Wegner, 2000). Επίσης, ο παράγοντας F1H δεν μπορεί να δράσει, πράγμα που συνεπάγεται την

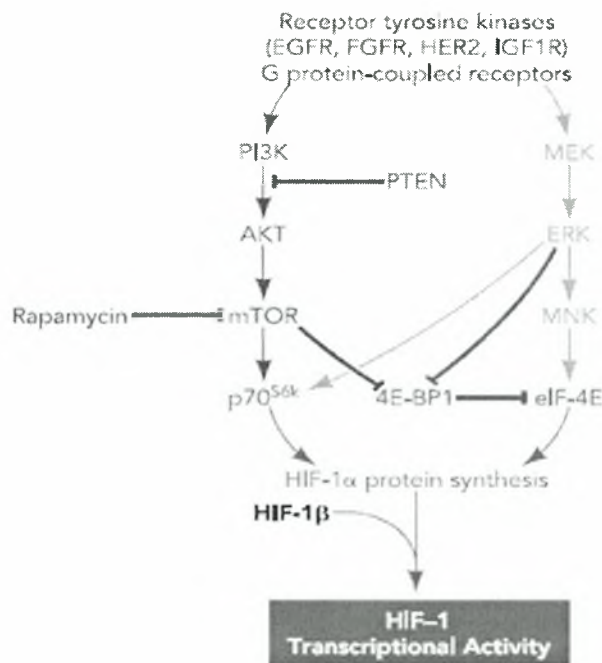
πρόσδεση του συμπαραγόντα p300/CBP στην TAD περιοχή και την επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1. (εικ.8)



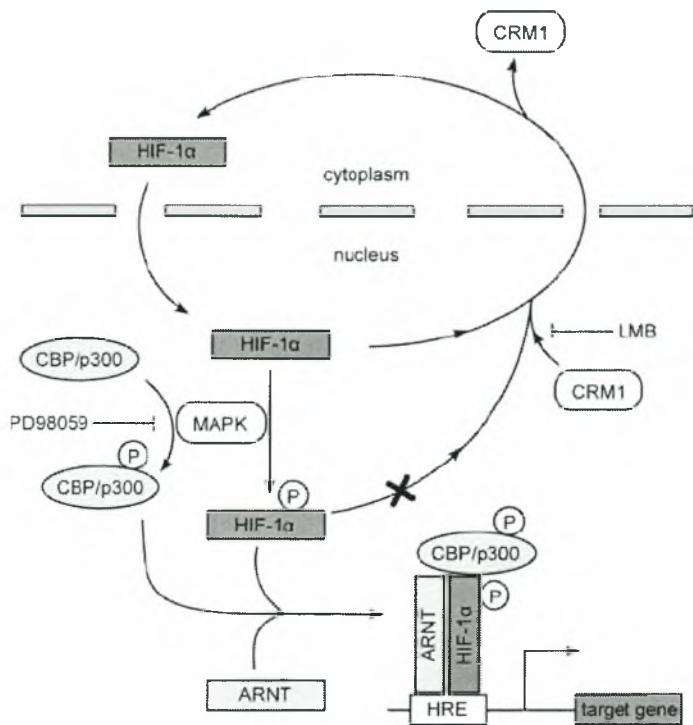
Εικ.8 : Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης HIF-1α και της μεταγραφικής της ενεργότητας. Η αμινο-τελική περιοχή της HIF-1α περιλαμβάνει την βασική δομή bHLH, καθώς και τις ομόλογες δομικές περιοχές PAS-A και PAS-B, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον διμερισμό της HIF-1α με την HIF-1β και για την πρόσδεση στο DNA. Η καρβοξυ-τελική περιοχή της HIF-1α περιλαμβάνει τις περιοχές οι οποίες ρυθμίζουν την σταθερότητα της πρωτεΐνης, καθώς και την μεταγραφική της ενεργότητα (περιοχές trans ενεργοποίησης N-TAD, C-TAD και η περιοχή αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο ODD). Υπό συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης Pro 402, Pro564 (P402 και P564) καθώς και στο κατάλοιπο ασπαραγίνης Asn803 (N803). Η υδροξυλίωση των Pro402 και Pro564 είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL, για την στρατολόγηση του συμπλέγματος της λιγάσης της ουβικουιτίνης E3, η οποία οδηγεί τον HIF-1α σε ουβικουιτινώση και επακόλουθη αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα 26S. Η υδροξυλίωση του Asn803, εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους συμπαραγόντες p300/CBP. Αντιθέτως, υπό συνθήκες υποξίας, ο HIF-1α σταθεροποιείται και επάγεται η μεταγραφική του ενεργότητα (Semenza, Gregg L. O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* 96: 1173–1177, 2004; 10.1152/jappphysiol.00770.2003)

1.7 Η ανεξάρτητη από τα επίπεδα του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1

Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α καθώς και η μεταγραφική του ενεργότητα ελέγχονται επίσης και από κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου. Τέτοια είναι το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) και το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (MAPK - mitogen activated protein kinase), τα οποία επάγονται από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες καθώς και από ογκογονίδια. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α (Bernardi et al., 2006), ενώ το μονοπάτι των MAPK προάγει κυρίως την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, μέσω της φωσφορυλίωσης της p300, η οποία είναι μεταγραφικός συμπαράγοντας του HIF-1α (Mylonis I. et al., 2006, Semenza et al., 2009) (εικ.9).



Εικ.9 : Απεικονίζεται η ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1 μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K-AKT-mTOR (αριστερά) και των MAPK (δεξιά), τα οποία ρυθμίζουν την φωσφορυλίωση των κρίσιμων ρυθμιστικών παραγόντων της μετάφρασης (κόκκινο χρώμα). Τα απλά βέλη αντιπροσωπεύουν ενεργοποίηση, ενώ τα «παρεμποδισμένα» βέλη, αναστολή (Gregg L. Semenza. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1, Physiology 24:97-106, 2009).



Εικ.10 : Προτεινόμενο μοντέλο για τη ρύθμιση της υποκυτταρικής κατανομής και ενεργοποίησης του HIF-1α από έναν εξαρτώμενο-από-MAPK και - CRM1 μηχανισμό. Ο HIF-1α που εισέρχεται στον πυρήνα μετά από σταθεροποίησή του, εξέρχεται γρήγορα πίσω στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενο από την CRM1. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK προκαλεί φωσφορυλίωση του HIF-1α στα κατάλοιπα σερίνης Ser641 και Ser643 από τις p42/44 MAPK και αναστολή της εξόδου του. Έτσι, ο HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα, διμερίζεται με την υπομονάδα HIF-1β (ARNT), προσδένεται στις HRE αλληλουχίες του υποκινητή του γονιδίου-στόχου και προάγει την μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασής του με τους CBP-p300 συμπαραγόντες του. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί εν συνεχεία να γίνει εντονότερη μέσω της φωσφορυλίωσης της CBP-p300 από το μονοπάτι των MAPK. (Ilias Mylonis, Georgia Chachami, Martina Samiotaki, George Panayotou, Efrosini Paraskeva, Alkmini Kalousi, Eleni Georgatsou, Sofia Bonanou, and George Simos, Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1, *J. Biol. Chem.*, 281,44,33095–33106, 2006)

Έχειδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα σερίνης Ser641 και Ser643 του HIF-1α από τις p44/p42 MAPK (ERK1/2), επάγει την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα καθώς και την μεταγραφική ενεργότητά του, με το να παρεμποδίζεται η εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM-1, έξοδος του HIF-1α από τον πυρήνα. Ο βαθμός της συσσώρευσης μιας πρωτεΐνης στον πυρήνα, εξαρτάται από τον σχετικό

βαθμό της εισόδου και εξόδου της, προς και από τον πυρήνα αντίστοιχα. Έρευνες έδειξαν ότι ένα κλάσμα του HIF-1α (αμινοξέα 616-658), περιέχει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal- NES) και αποτελεί περιοχή-στόχο των MAPK. Η διάσπαση της περιοχής NES, φαίνεται να συμβάλλει στην αποκατάσταση του πυρηνικού εντοπισμού και της ενεργότητας του μη-φωσφορυλιωμένου HIF-1α και να του προσδίδει αντοχή στην αναστολή μέσω των MAPK. Η περιοχή NES πιθανόν αλληλεπιδρά με την εξπορτίνη CRM-1 με έναν τρόπο όπου εμπλέκεται φωσφορυλίωση. Πρόσφατα έχει προταθεί, ότι ο έλεγχος της μετακίνησης του HIF-1α εντός και εκτός του πυρήνα, αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό εξαρτώμενο από το μονοπάτι των MAPK. (Mylonis I. et al., 2006 , Mylonis I. et al., 2008) (εικ.10)

1.8. Ο HIF-1 και τα ΔΜΚ του αναπνευστικού

1.8.1 Η επαγωγή του HIF-1 σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου

Η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 μπορεί να πραγματοποιηθεί και υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, από διάφορους παράγοντες οι οποίοι μιμούνται την υποξία. Τέτοιοι παράγοντες «μιμητές της υποξίας» θεωρούνται μόρια τα οποία αντικαθιστούν το σίδηρο (Co^{2+} , Ni^{2+}) και μόρια που είναι ανάλογα του 2-οξυγλουταρικού. Στους παράγοντες που έχουν την ικανότητα να επάγουν τον HIF-1α σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, συγκαταλέγονται διάφορες ορμόνες καθώς και αυξητικοί παράγοντες. Τέτοιοι είναι κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 1β και πολλοί αυξητικοί παράγοντες όπως η θρομβίνη, η ινσουλίνη, η αγγειοτενσίνη II, ο ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (IGF1, insulin-like growth factor-1) , ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- β1 (TGF-β1, transforming growth factor- β1), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, epidermal growth factor) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 2 (FGF2, fibroblast growth factor). Σε συνθήκες νορμοξίας, οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν την σύνθεση του HIF-1α, η οποία υπερσχύει της αποικοδόμησής του (Gregg L. Semenza, 2005).

Το κοβάλτιο πιθανόν δρα σαν «μιμητής της υποξίας» εμποδίζοντας τη δράση των προλυλ-υδροξυλασών, μέσω αντικατάσταση του σιδήρου τους, με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται ο HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Για το κοβάλτιο έχει προταθεί

επίσης, ότι είναι πιθανόν να δρα και μέσω άλλων μηχανισμών. Ένας μηχανισμός προτείνει ότι πιθανόν να αλληλεπιδρά απευθείας με τον HIF-1α, εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή του με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL και κατ'επέκταση εμποδίζοντας την ουβικουιτινίωση και την περαιτέρω πρωτεοσωμική αποικοδόμησή του. Ένας τρίτος μηχανισμός δράσης για την επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο σε συνθήκες νορμοξίας, προτείνει την μεταφραστική ρύθμιση της σύνθεσης του HIF-1α μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K) (Wang G. Et al., 1995, Chachami et al., 2004).

Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος δρα σαν «μιμητής της υποξίας» σε συνθήκες νορμοξίας, είναι η δεσφεριοξαμίνη (DFO). Η DFO είναι ένας χηλικός παράγοντας σιδήρου που εμποδίζει τη δράση των προλυλ-υδροξυλασών, μέσω της δέσμευσης του σιδήρου που βρίσκεται στις καταλυτικές τους περιοχές. Έτσι εμποδίζεται η ουβικουιτινίωση και η πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του HIF-1α και επάγεται η έκφρασή του (Wang et al., 1993). Μελέτες έχουν δείξει ότι και η ακετυλοχολίνη (Ach) μπορεί να προκαλέσει επαγωγή του HIF-1α, μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τη δράση των NO. Η Ach, μέσω της πρόσδεσής της σε ειδικούς υποδοχείς, οδηγεί στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο μειώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της pVHL και του HIF-1α, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την ουβικουιτινίωση και την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του HIF-1α (Kiichi et al., 2004).

1.8.2 Ο HIF-1 και τα ΛΜΚ πνευμονικής αρτηρίας και τραχείας κουνελιού

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το κοβάλτιο προκαλεί επαγωγή του HIF-1α σε καλλιέργειες αδιαφοροποίητων ΛΜΚΒ ανθρώπου (Μελέτη της επαγωγής του «Επαγομένου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα -1» (HIF-1) σε ανθρώπινα λεία μυικά κύτταρα βρόγχων», 2006, Μπουτουρέλη Χριστίνα, Διπλωματική Εργασία).

Μελέτη που έγινε σε πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, έδειξε ότι όταν τα κύτταρα αυτά εκτίθενται σε υποξία, προκαλείται επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α. Επιπλέον, προσθήκη CoCl_2 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των αδιαφοροποίητων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, είχε επίσης ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α (Chachami et al. 2004).

Έχει δειχθεί ακόμη, ότι η έκθεση διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού σε ορό εμβρύου βοός (FBS), αυξάνει τα επίπεδα πρωτεΐνης και ενεργότητας του HIF-1α. Ο FBS δεν σταθεροποιεί τον HIF-1α, αλλά επάγει τη σύνθεσή του HIF-1α καθώς και την απόκριση των αεραγωγών στην Ach. Η προσθήκη ορού και CoCl₂ στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, οδηγεί σε αυξημένη επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α, προτείνοντας ότι ο FBS δρα συνεργιστικά με το CoCl₂ αυξάνοντας σημαντικά την επαγωγή του HIF-1α στα κύτταρα αυτά. Επίσης, η κατεργασία των εν λόγω κυττάρων με FBS+CoCl₂, φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση της συσταλτικής απόκρισης των αεραγωγών στην Ach, υποθέτοντας έτσι, ότι ο HIF-1α ίσως εμπλέκεται στην υπερ-συσταλτότητα των αεραγωγών (Chachami et al. 2007).

Επιπλέον, η κατεργασία διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού με CoCl₂ ή FBS για 24 ώρες, καθώς και με συνδυασμό τους (FBS+CoCl₂), δεν έδειξε κάποια σημαντική αλλαγή στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει χρώση για παρατήρηση της SM-MHC. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν, ότι η επαγωγή του HIF-1α δεν σχετίζεται με την έκφραση της SM-MHC σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες *in vitro* διαφοροποίησης (Chachami et al. 2007).

1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σε προηγούμενες μελέτες, έχει βρεθεί ότι η κατεργασία διαφοροποιημένων λείων μυικών κυττάρων τραχείας κουνελιού με τους παράγοντες CoCl_2 , FBS και $\text{FBS}+\text{CoCl}_2$, οδηγεί σε επαγωγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι ο FBS δρα συνεργιστικά με το CoCl_2 αυξάνοντας την επαγωγή του HIF-1α στα κύτταρα αυτά. Η συνεργιστική αυτή επαγωγή πιθανόν να εμπλέκεται στην αύξηση της συσταλτότητας των διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού. Ωστόσο, η κατεργασία των κυττάρων αυτών με CoCl_2 ή FBS για 24 ώρες, καθώς και με συνδυασμό τους ($\text{FBS}+\text{CoCl}_2$), δεν έδειξε κάποια σημαντική αλλαγή στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει χρώση για την SM-MHC. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν, ότι η επαγωγή του HIF-1α δεν σχετίζεται με την έκφραση της SM-MHC σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες *in vitro* διαφοροποίησης (Chachami et al. 2007).

Επίσης έχει δειχθεί, ότι η αυξημένη έκφραση των TRPC1 και TRPC6 σε λεία μυικά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας (pulmonary arterial smooth muscle cell – PASMC) κατά την χρόνια υποξία σε ποντίκια και αρουραίους, ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 και είναι υπεύθυνη για την πρόκληση πνευμονικής υπέρτασης (Philip I. Aaronson, 2006).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετηθεί αν το CoCl_2 , ο FBS και ο συνδυασμός τους, προκαλούν επαγωγή του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚB ανθρώπου. Επίσης μελετάται, αν η επαγωγή του HIF-1α στις παραπάνω συνθήκες επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών και mRNA γονιδίων που σχετίζονται με την συσταλτότητα των εν λόγω κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε να μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων των TRPC1, TRPC6 και SM-MHC.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων

Χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) της εταιρείας Clonetics (Human Bronchial Smooth Muscle Cells, HBSMC). Τα ΛΜΚΒ καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium – Ham's F12) το οποίο περιέχει 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum – FBS) καθώς και αντιβιοτικά 100U/ml πενικιλίνη και 0,1 mg/ml στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin – PS), σε υγρανόμενο επωαστικό κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Αλλαγή του θρεπτικού μέσου της φλάσκας γινόταν κάθε 48-72 ώρες. Ο έλεγχος των κυττάρων γινόταν με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, ξέπλυμα των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline – PBS) και επώαση με 0,25% τρυψίνη-EDTA σε PBS στους 37°C για 5 min. Μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, προστίθεται στα ΛΜΚΒ θρεπτικό διάλυμα DMEM-F12 που περιέχει 10% FBS καθώς και αντιβιοτικά PS και τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία Petri ή φλάσκες, όπου θα πραγματοποιηθούν οι περαιτέρω διαδικασίες.

2.2 Πάγωμα κυττάρων

Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και του ξεπλύματος των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline – PBS), προστίθεται διάλυμα 0,25% τρυψίνη-EDTA σε PBS. Ακολουθεί επώαση για 5 min στους 37°C παρουσία 5% CO₂ στον κλίβανο και στη συνέχεια προσθήκη θρεπτικού μέσου που περιέχει 10% DMSO (dimethyl-sulfoxide- DMSO). Τα κύτταρα επαναιωρούνται και μεταφέρονται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης, τα οποία τοποθετούνται στους -80 °C, ώστε η θερμοκρασία τους να μειωθεί σταδιακά. Τα κύτταρα που μεταφέρονται σε υγρό άζωτο μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

2.3 Ξεπάγωμα κυττάρων

Το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται τοποθετώντας γρήγορα τα ειδικά σωληνάρια κατάψυξης σε νερό θερμοκρασίας 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε καθαρό πλαστικό σωλήνα, όπου προστίθεται σταγόνα - σταγόνα 10ml θρεπτικού μέσου DMEM-F12 το οποίο περιέχει 10% FBS καθώς και αντιβιοτικά PS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 3min στις 800rpm. Αποχύνεται με προσοχή το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα, στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα, επαναιωρείται σε 10ml θρεπτικού μέσου DMEM-F12 το οποίο περιέχει 10% FBS και PS. Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα, συμπληρώνοντας με το θρεπτικό μέσο έως τα 15ml και την τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση στους 37°C παρουσία 5% CO₂.

2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια

Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί αρκετά ώστε να καλύψουν την επιφάνεια του τρυβλίου (παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο), αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, γίνεται ξέπλυμα δυο φορές με 8ml PBS ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το FBS, αφαιρείται καλά το PBS και προστίθεται καινούριο θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει 100U/ml πενικιλίνη, 0,1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 5μg/ml ινσουλίνη καθώς και 5μg/ml τρανσφερίνη και 5ng/ml σελήνιο (insulin – transferrin – selenium – ITS), απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στους 37°C για 72 ώρες πριν υποστούν περαιτέρω επεξεργασία.

2.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Αρχικά τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία Petri, όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες (διαμέτρου 12mm). Τα κύτταρα προσκολλώνται στις καλυπτρίδες και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα βήματα.

Μετά την κατεργασία κυττάρων όπως αναφέρεται παρακάτω (2.6 Κατεργασία κυττάρων), οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε πιάτο 24 θέσεων όπου, η κάθε καλυπτρίδα τοποθετείται στην επιθυμητή θέση με τρόπο κατά τον οποίο, η επιφάνειά της όπου βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα, να είναι προς τα επάνω.

Οι καλυπτρίδες ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Εν συνεχεία πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων, με προσθήκη διαλύματος 3% φορμαλδεΰδης σε PBS, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το διάλυμα αυτό και γίνεται ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα PBS δύο φορές για 5min τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνεται τελείως η φορμαλδεΰδη. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε διάλυμα PBS-1% Triton X-100 για 15 min στους 4 °C ώστε η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 3% αλβουμίνη για 1-18 ώρες στους 4 °C προς αποφυγή της μη-ειδικής σύνδεσης του αντισώματος, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται προσεκτικά σε ένα καθαρό πιάτο 24 θέσεων, σε υγρό περιβάλλον και πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων με το πρώτο μονοκλωνικό αντισωμα α-ακτίνης των λείων μυών του ανθρώπου (anti-SM-a-actin SigmaA) (αραίωση 1:400 σε διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 1% BSA) είτε με το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIF-1 (αραίωση 1:100 σε διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 1% αλβουμίνη ορού βοός - BSA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 1% BSA, 10 min την κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε νέες θέσεις και επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα κατά της IgG του ποντικού συζευγμένο με τη φθορίζουσα ομάδα FITC (goat anti-mouse -FITC), αραιωμένο 1:50 σε διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 1% BSA, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS- 0,1% Tween 20 – 1% BSA, τρεις φορές για 10min την κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια κάθε καλυπτρίδα εμβαπτίζεται σε απεσταγμένο νερό και την στεγνώνεται. Η κάθε καλυπτρίδα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία προηγουμένως έχει τοποθετηθεί μια σταγόνα 1μl Vectashield. Το Vectashield περιέχει DAPI (4,6διαμιδο-2φαινυλ-ινδόλη) σε συγκέντρωση 1,5μg/ml για χρώση του DNA.

Γίνεται παρατήρηση των καλυπτρίδων σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 και πραγματοποιείται λήψη φωτογραφιών με το σύστημα κάμερας UFX-DX (Nikon).

2.6 Κατεργασία κυττάρων - Μελέτη της επαγωγής του HIF-1α

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί για 3 ημέρες. Η διαφοροποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια) και είχε διάρκεια τριών ημερών. Την ημέρα του πειράματος και προτού πραγματοποιηθεί η κατεργασία των κυττάρων, έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου στα τρυβλία και επώαση στον κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO₂, για 1 ώρα. Για τα αδιαφοροποίητα κύτταρα το θρεπτικό ήταν DMEM-F12 με 10% FBS και αντιβιοτικά PS, ενώ για τα διαφοροποιημένα κύτταρα DMEM-F12 το οποίο περιείχε PS και ITS. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οι παράγοντες οι οποίοι παρέμειναν για 24 ώρες. Η επίδραση των επαγωγέων του HIF-1α στα ανθρώπινα ΛΜΚΒ, έγινε ως εξής :

1. Υποξία (για 24h) : Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο υποξίας : 1% O₂, 5% CO₂, N₂.
2. Κοβάλτιο (Co²⁺) : Στο θρεπτικό μέσο του τρυβλίου προστέθηκε κοβάλτιο σε τελική συγκέντρωση 100μM.
3. FBS (ορός εμβρύου βοός - fetal bovine serum) : Στο θρεπτικό μέσο του τρυβλίου προστέθηκε 10% FBS.
4. Ορός εμβρύου βοός και Κοβάλτιο (FBS + Co²⁺) : Στο θρεπτικό μέσο του τρυβλίου προστέθηκαν 10% FBS και 100μM κοβάλτιο.

2.6.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης λείων μυϊκών κυττάρων

Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται ξέπλυμα με 1x PBS το οποίο περιέχει 100μg/ml φθορο-φαινυλ-μεθυλ-σουλφίδιο (phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF). Κατόπιν, τοποθετούνται 100μl διαλύματος λύσης (lysis buffer) στο κέντρο του τρυβλίου με το οποίο και αποκολλώνται (scrape) τα κύτταρα από το τρυβλίο, τα οποία τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια (τύπου erpendorf) για 10min στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 30min στους 4 °C.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάρια. Συγκεκριμένα, κρατήθηκαν 100μl από το υπερκείμενο όπου προστέθηκαν 33μl 4x διάλυμα φόρτωσης του δείγματος (4x sample loading buffer). Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95 °C για

3min και είναι έτοιμα για ανάλυση κατά Western. (Μπορούν να διατηρηθούν στους -20 °C)

ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Lysis Buffer)

20mM Tris-HCl pH 8.0

150mM NaCl

1% Triton X-100

100μg/ml φθορο-φαινυλ-μεθυλ-σουλφίδιο (PMSF)

1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

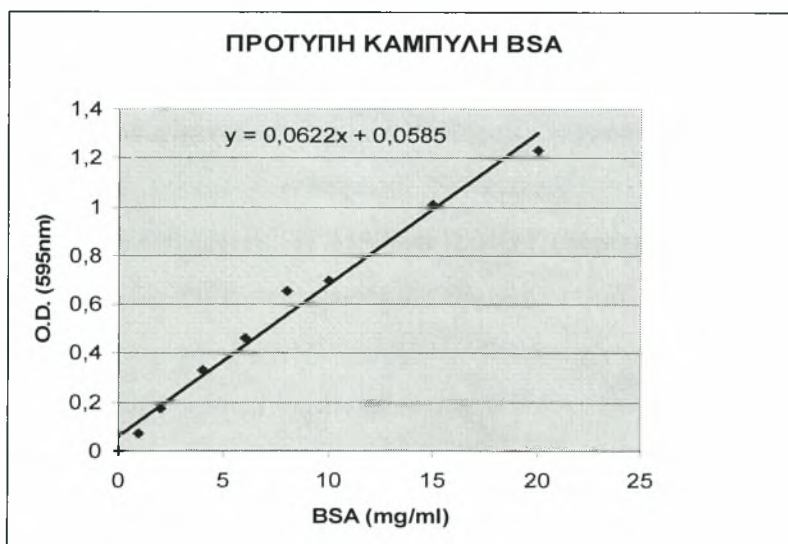
1mM Na₃VO₄

10Mm β-glycerolphosphate

2.6.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων (Μέθοδος Bradford)

Χρησιμοποιήθηκαν 5μl από το υπερκείμενο για τη μέτρηση των πρωτεϊνών του δείγματος με τη φωτομετρική μέθοδο κατά Bradford , όπου και προστέθηκαν 795μl H₂O και 200μl διαλύματος της εταιρείας BioRad. Γίνεται επώαση για 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για σταθεροποίηση του χρώματος και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη, η οποία προκύπτει από φωτομέτρηση πρότυπων διαλυμάτων (γνωστών συγκεντρώσεων) αλβουμίνης ορού βοός (BSA).

BSA (μg/ml)	OD (595nm)
0	0
1	0,07
2	0,175
4	0,331
6	0,464
8	0,655
10	0,698
15	1,007
20	1,231



Εικόνα 11. Πρότυπη καμπύλη πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατά Bradford

2.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

2.7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού μέσου (SDS PAGE)

2.7.1.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν 100μl (ή 3 όγκοι) από το υπερκείμενο και προστέθηκαν 33μl (ή 1 όγκος) 4x διάλυμα φόρτωσης του δείγματος (4x sample loading buffer) όπως προαναφέρθηκε (2.6.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων ολικής πρωτεΐνης λείων μυϊκών κυττάρων).

4x SAMPLE LOADING BUFFER

250mM Tris-HCl pH 6,8

9,2% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

40% γλυκερόλη

0,2% (w/v) κυανό της βρωμοφαινόλης

100mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται στους 95 °C για 3min. Τα δείγματα είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση. (Η μπορούν να διατηρηθούν στους -20 °C)

2.7.1.2 Προετοιμασία των πηκτών

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (Separating Buffer)

1,5M Tris-HCl pH 8,8

8mM EDTA

0,4% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

H₂O

ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (Separating gel)

30% Acrylamide

4x separating buffer

H₂O

10% Υπερθεικό Αμμώνιο (APS)

N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλ-διαμίνη (TEMED)

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (Stacking Buffer)

0,5M Tris-HCl pH 6,8

8mM EDTA

0,4% δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)

H₂O

ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (Stacking gel)

30% Acrylamide

4x stacking Buffer

H₂O

10% Υπερθεικό Αμμώνιο (APS)

N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλ-διαμίνη (TEMED)

Για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού μέσου (SDS), απαιτείται η χρησιμοποίηση δύο ειδών πηκτών, της πηκτής διαχωρισμού (separating gel) και της πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel).

Η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται πρώτη, ενώ η πηκτή επιστοίβαξης ακολουθεί και τοποθετείται πάνω στην πηκτή διαχωρισμού. Αυτό γίνεται, προκειμένου να συσσωρευτούν οι πρωτεΐνες των δειγμάτων σε μικρό όγκο με τη βοήθεια της πηκτής επιστοίβαξης και να ακολουθήσει ο διαχωρισμός τους στην πηκτή διαχωρισμού, ο οποίος γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος (οι πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος κινούνται πιο γρήγορα από εκείνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους).

Τα διαλύματα των πηκτών θα τοποθετηθούνε ανάμεσα σε ειδικές γυάλινες πλάκες οι οποίες τοποθετούνται κατάλληλα στην ειδική συσκευή.

- Προετοιμασία 10ml διαλύματος για 2 πηκτές διαχωρισμού, διαστάσεων 10cm x 5cm :

Πηκτή περιεκτικότητας 8% σε ακρυλαμίδιο:

2,7ml 30% ακρυλαμίδιο

2,5ml 4x separating buffer

4,85ml H₂O

40μl 10% APS

20μl TEMED

Αρχικά, αναμιγνύεται καλά το ακρυλαμίδιο, το ρυθμιστικό διάλυμα (separating buffer) και το νερό. Στη συνέχεια προστίθεται πρώτα το APS, το διάλυμα αναμιγνύεται, και μετά προστίθεται το TEMED. Το διάλυμα αναμιγνύεται καλά, για σύντομο χρονικό διάστημα, διότι όταν προστίθενται στο διάλυμα το APS και το TEMED αρχίζει ο πολυμερισμός της πηκτής μέχρι που τελικά σταθεροποιείται. Στη συνέχεια, τοποθετείται το διάλυμα της πηκτής ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες, αφήνοντας όμως ένα χώρο περίπου 2cm από την κορυφή. Ο επιπλέον χώρος πληρώνεται με απεσταγμένο νερό, χωρίς να προκληθεί ανατάραξη της επιφάνειας της πηκτής.

Μετά τον πολυμερισμό το νερό αποχύνεται και το υπόλοιπο απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί.

- Προετοιμασία 8ml διαλύματος για 2 πηκτές επιστοιβάξης, διαστάσεων 10cm x 2cm :

Πηκτή επιστοιβάξης :

1,2ml 30% ακρυλαμίδιο

2ml 4x stacking buffer

4,7ml H₂O

50μl 10% APS

50μl TEMED

Αναμιγνύονται τα επιμέρους διαλύματα με την σειρά που προαναφέρθηκε, προσθέτοντας στο τέλος το APS και το TEMED. Το διάλυμα της πηκτής

επιστοιίβαξης τοποθετείται επάνω στην ήδη πολυμερισμένη πηκτή διαχωρισμού, γεμίζοντας το χώρο ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα ειδικά «χτενάκια», με τα οποία θα δημιουργηθούν οι χώροι όπου θα τοποθετηθούν αργότερα τα δείγματα. Μετά τον πολυμερισμό, τα «χτενάκια» απομακρύνονται προσεκτικά και τα πηγαδάκια ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό.

2.7.1.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Οι πηκτές τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN® 3 Cell της εταιρείας BioRad. Το εσωτερικό και το εξωτερικό διαμέρισμα της συσκευής πληρώνονται με 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running (electrode) buffer). Πραγματοποιείται «φόρτωση» των δειγμάτων στα πηγαδάκια (μέγιστη χωρητικότητα στα πηγαδάκια 35μl), κατάλληλη συναρμολόγηση των υπολοίπων τμημάτων της συσκευής ηλεκτροφόρησης και σωστή τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Ακολούθως, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες με σταθερή τάση 100V, στα 400mA για 1h περίπου. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν η μπλε χρωστική του κυανού της βρωμοφαινόλης φτάσει το τέλος της πηκτής διαχωρισμού.

1x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ (Running (electrode) buffer)

50mM Tris

0,38M Γλυκίνη (Glycine)

0,1% SDS

2mM EDTA

2.8 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western Blotting)

2.8.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ (Transferring Buffer)

48mM Tris

39mM Glycine

1,3mM SDS (0,0375%)

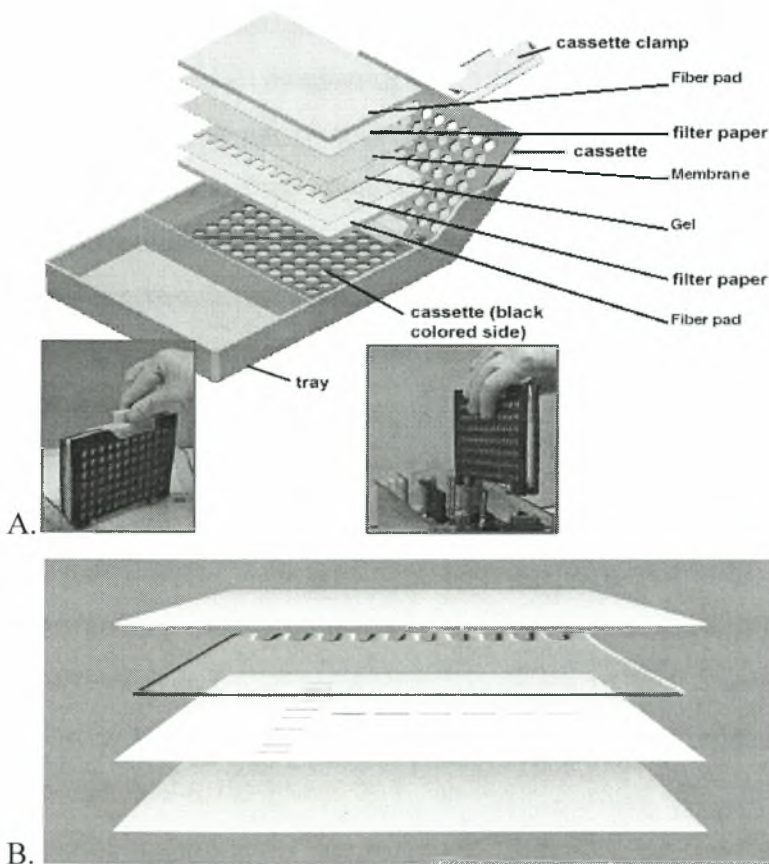
20% Μεθανόλη

pH 9,2

Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές μεταφέρονται για εξισορρόπηση, σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer).

Στη συνέχεια, η κάθε πηκτή τοποθετείται σε ειδική διάταξη, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω (εικ.12), η οποία έχει ήδη προετοιμαστεί ως εξής:

Στην ειδική θήκη τοποθετούνται διαδοχικά: ένα σφουγγαράκι, τρία κομμάτια διηθητικού χαρτιού τύπου whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τρία ακόμη κομμάτια διηθητικού χαρτιού τύπου whatman και το δεύτερο σφουγγαράκι, τα οποία έχουν προηγουμένως εμβαπτιστεί και αυτά για εξισορρόπηση, σε διάλυμα μεταφοράς. Η παραπάνω διάταξη τοποθετείται κατάλληλα σε ειδική συσκευή μεταφοράς, κατά τρόπο ώστε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να γειτνιάζει με τον θετικό πόλο, ενώ η πηκτή πολυακρυλαμιδίου να βρίσκεται πιο κοντά στον αρνητικό πόλο. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες (όντας αρνητικά φορτισμένες) παρουσία SDS μεταφέρονται από την πηκτή στην μεμβράνη. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται κατάλληλα και η συσκευή ρυθμίζεται στα 100V, στα 400mA, όπου θα γίνεται η μεταφορά για περίπου 1h.



Εικ.12: Α. Σχηματική απεικόνιση της ειδικής διάταξης που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Β. Απεικόνιση των πρωτεϊνών οι οποίες έχουν μεταφερθεί από την πηκτή στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

2.8.2 Χρώση με Ponceau S

Μετά το τέλος της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό και προστίθεται χρωστική Ponceau S 0,2% σε τριχλωρο-οξικό οξύ (trichloroacetic acid – TCA) (Serva) η οποία αφήνεται για 1-2min. Οι ζώνες των πρωτεϊνών βάφονται κόκκινες. Ακολουθεί ξέπλυμα, πρώτα με απεσταγμένο νερό (σε αυτή τη φάση οι ζώνες στην μεμβράνη μπορούν να φωτογραφηθούνε) και εν συνεχεία με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 για να απομακρυνθεί η χρωστική.

2.8.3 Αντίδραση των πρωτεϊνών με το εξειδικευμένο αντίσωμα

Αρχικά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 30min με διάλυμα κορεσμού (blocking buffer), το οποίο αποτελείται από 5% άπαχο γάλα σε PBS-0,1% Tween 20. Με αυτόν τον τρόπο, το γάλα δεσμεύεται στις μη-ειδικές θέσεις για το αντίσωμα έτσι ώστε, όταν γίνει η επώαση με το εξειδικευμένο αντίσωμα, αυτό, να δεσμευτεί στις ειδικές του θέσεις. Ακολούθως η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 και τοποθετείται το πρώτο αντίσωμα. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα πραγματοποιείται καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight), στους 4°C, έχοντας την μεμβράνη τοποθετημένη κατάλληλα ώστε να γίνεται συνεχής ανάδευση. Εναλλακτικά, η επώαση πραγματοποιείται για 2h σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση.

Για πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήσαμε :

- Πολυκλωνικό anti-HIF (anti-rabbit BD Biosciences), σε αραιώση 1:2000, αραιωμένο με PBS-0,1% Tween 20 και περιεκτικότητα σε άπαχο γάλα 3%.
- Πολυκλωνικό anti-TRPC1 (anti-rabbit Sigma), σε αραιώση 1:250, αραιωμένο με PBS-0,1% Tween 20 και περιεκτικότητα σε άπαχο γάλα 1%.
- Μονοκλωνικό anti- α -actin (anti-mouse Sigma), σε αραιώση 1:1000, αραιωμένο με PBS-0,1% Tween 20
- Μονοκλωνικό anti-b-actin (anti-mouse Sigma), σε αραιώση 1:5000, αραιωμένο με PBS-0,1% Tween 20

- Μονοκλωνικό anti-SM-MHC (anti-mouse Sigma), σε αραιώση 1:1000, αραιωμένο με PBS-0,1% Tween 20

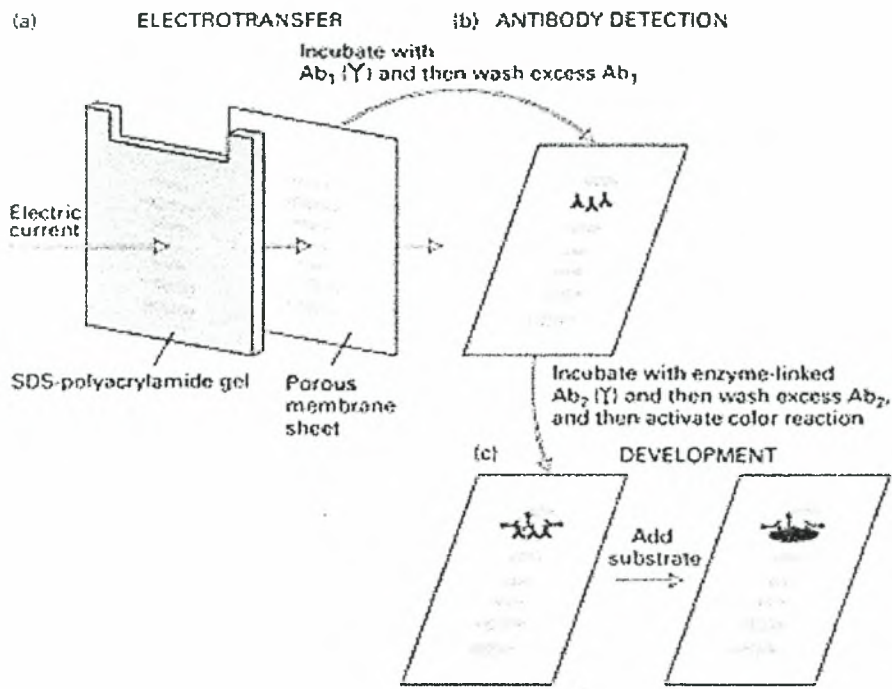
Όταν τελειώσει ο χρόνος επώασης με το πρώτο αντίσωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται 3 φορές με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 για 10min τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου (υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση). Στη συνέχεια προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχές «τραμπάλισμα». Το δεύτερο αντίσωμα έχει παραχθεί ειδικά κατά του τύπου του πρώτου αντισώματος.

Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιούνται, εφόσον εξαρτώνται από τον τύπο των αντίστοιχων πρώτων αντισωμάτων, διαφέρουν. Επομένως:

- Για τα μονοκλωνικά αντισώματα (που αναφέρονται παραπάνω), ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε: ανοσοσφαιρίνη αίγας κατά της IgG ανοσοσφαιρίνης του ποντικού (goat anti-mouse), σε αραιώση 1:3000, αραιωμένο σε διάλυμα PBS-0,1% Tween 20
- Για τα πολυκλωνικά αντισώματα (που αναφέρονται παραπάνω), ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε: ανοσοσφαιρίνη anti-rabbit HRP, σε αραιώση 1:3000, αραιωμένο σε διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 και περιεκτικότητα σε άπαχο γάλα 3%.

Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση HRP (Horse-Raddish-Peroxidase).

Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης, 3 φορές, με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 για 10min τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου (υπό συνεχή ελαφρά ανάδευση).

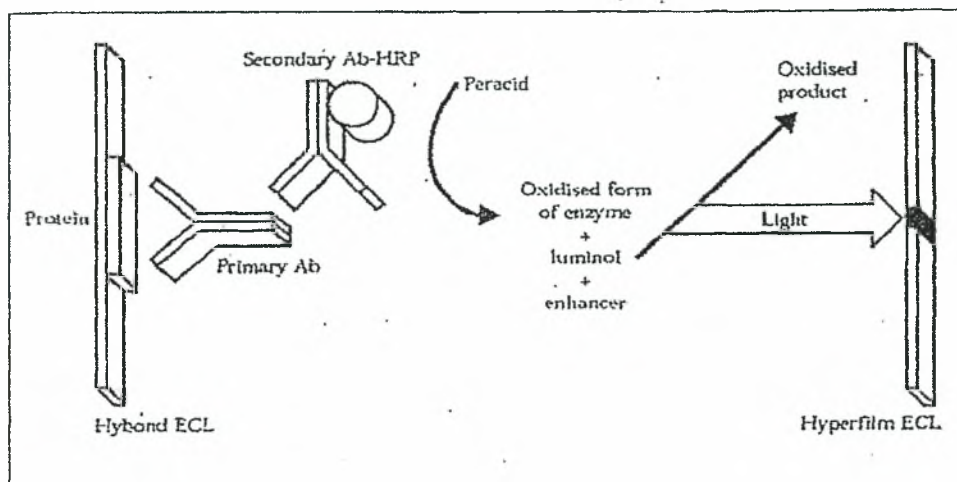


Εικ. 13 : Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της ανοσοαποτύπωσης. α) Μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. β) Αντίδραση πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το εξειδικευμένο αντίσωμα.

2.9 ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (Chemiluminescence - ECL)

Μετά το τέλος της ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting) πραγματοποιείται η ανίχνευση της θέσης δέσμευσης των αντισωμάτων με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, η οποία λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο. Αρχικά η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 1-2min σε διάλυμα το οποίο αποτελείται από λουμινόλη 1.25mM, 0.1M Tris pH 8.5, κουμαρικό οξύ 6,8mM και 3% H_2O_2 .

Ακολούθως η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ χημειοφωταύγειας (εικ.14). Στη συνέχεια, το φιλμ μεταφέρεται αρχικά σε υγρό εμφάνισης (developer) για περίπου 3min και ακολούθως σε υγρό σταθεροποίησης (fixer) της AGFA.



Εικ.14 : Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου της χημειοφωταύγειας. Το πρώτο αντίσωμα, ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, συνδέεται με αυτή. Το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP, είναι ειδικό ως προς το πρώτο αντίσωμα και συνδέεται με αυτό. Το H_2O_2 προκαλεί οξείδωση του ενζύμου HRP, το οποίο παρουσία λουμινόλης και κουμαρικού οξέος (ενισχυτής) δίνει ένα οξειδωμένο προϊόν, το οποίο εκπέμπει φως. Η ένταση του φωτός αποτυπώνεται στο φιλμ.

2.10 Απομόνωση RNA από ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) (Human Bronchial Smooth Muscle Cells, HBSMC)

Η απομόνωση ολικού RNA από ΛΜΚΒ έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Purezol (BioRad). Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο που περιέχεται σε κάθε πιάτο διαμέτρου 10cm, προστίθεται 1ml Purezol και τα κύτταρα αποκολλούνται (scrape) από το τρυβλίο. Το λύμα των κυττάρων μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάρια (τύπου erpendorf). Ακολουθεί επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 12000xg για 10min σε θερμοκρασία 2-8 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια και εκεί, προστίθενται 0,2ml χλωροφόρμιο (chloroform) για κάθε ml Purezol. Τα σωληνάρια κλείνουν και ανακινούνται ζωηρά με το χέρι για περίπου 15sec. Αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 12000xg για 15min σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο είναι

δυνατή η παρατήρηση τριών φάσεων που έχουν σχηματιστεί, οι οποίες από το κάτω μέρος του σωληναρίου προς το επάνω μέρος είναι : η οργανική φάση, η (λευκή) μεσόφαση, όπου συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες και η υδατική φάση, όπου βρίσκεται το RNA. Επομένως εν συνεχεία, συλλέγεται προσεκτικά η υδατική φάση και τοποθετείται σε νέα καθαρά σωληνάρια. Από το 1ml Purezol, είναι δυνατή η ανάκτηση περίπου των 600μl.

Στην υδατική φάση προστίθενται 0,5ml ισοπροπανόλη (ή 0,75ml αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Εν συνεχεία πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12000xg για 10min σε θερμοκρασία 4 °C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml 75% αιθανόλης. Τα σωληνάρια ανακινούνται καλά, φυγοκεντρώνονται στις 7500g για 5min σε θερμοκρασία 4 °C και στη συνέχεια αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, αφήνεται το ίζημα RNA να στεγνώσει αβίαστα σε θερμοκρασία δωματίου (air dry the pellet).

Όταν το RNA στεγνώσει, γίνεται επαναιώρηση σε 25-30μl αποστειρωμένου και ελεύθερου RNAσών H₂O. Τα δείγματα RNA αποθηκεύονται στους -80 °C.

2.10.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA με φωτομέτρηση των δειγμάτων.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA γίνεται με βάση τον τύπο :
 $OD_{260nm} = 1$ αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA 40μg/ml, ενώ η καθαρότητα του δείγματος εκτιμάται από τον λόγο των απορροφήσεων OD_{260nm} / OD_{280nm} του κάθε δείγματος, ο οποίος θα πρέπει να ισούται περίπου με 1,9.

2.11 Αντίδραση σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA)

2.11.1 Προετοιμασία του Master-Mix διαλύματος (preparation Master-Mix) και των αντιδράσεων για τη σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA γίνεται με τη χρήση του ενζύμου ανάστροφη τρανσκριπτάση σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ως εκμαγείο 1μg RNA. Κάθε αντίδραση όγκου 20μl περιέχει 1μg RNA, 10μl MasterMix (η σύσταση του οποίου αναλύεται παρακάτω) και H₂O ως τον τελικό όγκο των 20μl.

MASTER MIX	1x (μl)	1x (μl) -RT
10x Ρυθμιστικό διάλυμα ανάστροφης τρανσκριπτάσης	2.0	2.0
25x dNTP Μίγμα (100mM)	0.8	0.8
10x Τυχαία ολιγονουκλεοτίδια	2.0	2.0
MultiScribe™ Ανάστροφη τρανσκριπτάση	1.0	-
H ₂ O	4.2	5.2
Ολικός όγκος αντίδρασης	10.0	10.0

Εκτός από τον αριθμό των RNA δειγμάτων, υπολογίζονται και 2 επιπλέον αντιδράσεις, μία κατά την οποία ως δείγμα χρησιμοποιούνται 10μl από το σύνολο όλων των δειγμάτων (RNA mix) και στην οποία θα πραγματοποιηθεί σύνθεση cDNA καθώς και μία ακόμη αντίδραση με δείγμα πάλι 10μl από το σύνολο όλων των δειγμάτων (RNA mix), αλλά χωρίς προσθήκη ανάστροφης τρανσκριπτάσης (-RT), η οποία χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή και επωάζονται ως εξής:

Αντίδραση cDNA

25°C για 10min

37°C για 120min (2h)

85°C για 5sec

4°C

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, σε κάθε δείγμα προστίθεται 80μl H₂O (αποστειρωμένο) έτσι ώστε να έχουνε τελικό όγκο 100μl και ακολούθως τοποθετούνται στην κατάψυξη (-20 °C).

2.12 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - πραγματικού χρόνου

RT-qPCR (quantitative Real -Time Polymerase Chain Reaction)

Η PCR είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες στην μοριακή βιολογία. Με τη χρήση της, συγκεκριμένες αλληλουχίες, με εκμαγείο DNA ή cDNA, μπορούν να ενισχυθούν εκθετικά σε πολύ μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Στην ποσοτική real-time PCR (RT-qPCR) το ποσό του PCR προϊόντος μετράται μετά από κάθε κύκλο και μας προσφέρει την δυνατότητα να παρακολουθούμε την αντίδραση κατά τη διάρκεια της εκθετικής της φάσης, όπως επίσης να προσδιορίσουμε την

αρχική ποσότητα του στόχου με σχετικά μεγάλη ακρίβεια. Η ποσότητα του DNA μετράται μετά από κάθε κύκλο, με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών – δεικτών (markers), που είναι ενσωματωμένοι στο PCR προϊόν. Η αύξηση του σήματος που δίνει η φθορίζουσα ουσία, είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των μορίων του PCR προϊόντος που παράγεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Οι φθορίζουσες ουσίες αναφοράς που χρησιμοποιούνται, περιλαμβάνουν χρωστικές που προσδέονται στο δίκλωνο DNA (dsDNA) ή μόρια-χρωστικές συνδεδεμένα με τους PCR εκκινητές ή ανιχνευτές (probes) οι οποίοι ενσωματώνονται στο προϊόν της PCR κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης της αλληλουχίας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του SBRG - Green Supermix (BIORAD).

Ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν, υπολογίζεται η ποσότητα του MasterMix διαλύματος. Το κάθε δείγμα χρησιμοποιείται δύο φορές (in duplicates) για μεγαλύτερη σιγουριά για την έκβαση των αποτελεσμάτων. Για κάθε γονίδιο, φτιάχνεται ένα διάλυμα MasterMix, χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους για το γονίδιο εκκινητές (πιν.2). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη, είναι ειδικοί για να «πηγαίνουν» κοντά στα ιντρόνια, έτσι ώστε εάν στο δείγμα μας υπάρχει και γενωμικό DNA, να μην ευνοηθεί η ενίσχυσή του.

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20μl εκ των οποίων τα 5μl είναι από το αντίστοιχο δείγμα και τα υπόλοιπα 15μl από το MasterMix διάλυμα, η σύσταση του οποίου αναλύεται παρακάτω. Το MasterMix τοποθετείται στον πάγο (όπως και όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια) και το αναδεύεται απαλά και προσεκτικά με τη βοήθεια μιας πιπέτας.

(Για κάθε αντίδραση : 5μl sample + 15μl MasterMix)

MASTER MIX

H₂O (αποστειρωμένο)

Primer F (forward) (0,5pMol/ul)

Primer R (reverse) (0,5pMol/ul)

Syber Green mix (φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιούμε και εμπεριέχεται στο kit από την εταιρία BioRad – εμπεριέχει την πολυμεράση)

Primers
TRPC1
F : AGCTTCTTTTGGACTACGGTTG
R : TGATCGTTTTGGTTCGATGATT
TRPC6
F : GCTGCCTTGCTACGGCTA
R : CGGTGAGCCAGTCTGTTGT
Actin
F : CCAACCGCGAGAAGATGA
R : CCAGAGGCGTACAGGGATAG
VEGF
F : CCCACTGAGGAGTCCAACATC
R : GGCCTTGGTGAGGTTTGATC

Πίν.2 : Αλληλουχίες των εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

Εκτός από τον αριθμό των cDNA δειγμάτων, υπολογίζονται και 2 επιπλέον αντιδράσεις που θα πραγματοποιηθούν για κάθε σειρά αντιδράσεων ανά γονίδιο. Μία αντίδραση NTC (No template control) κατά την οποία ως δείγμα χρησιμοποιούνται 5μl H₂O (αποστειρωμένο) - αυτό δείχνει αν υπάρχει κάποια επιμόλυνση από εξωγενές DNA στα συστατικά στοιχεία των αντιδράσεών μας, πέραν των δειγμάτων cDNA - και μία ακόμη αντίδραση (-RT) με δείγμα 5μl από το σύνολο όλων των δειγμάτων (RNA mix), το οποίο δεν περιείχε ανάστροφη τρανσκριπτάση (-RT) - αυτό δείχνει εάν στο δείγμα μας υπάρχει και γενωμικό DNA, θα πρέπει λοιπόν να βγει αρνητικό - . Η αντίδραση ποσοτικής PRC πραγματικού χρόνου έγινε στη συσκευή MiniJOption της Biorad και το λογισμικό Biorad CFX Manager Version 1.5 σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

50°C για 2min

95°C για 10min

95°C για 15sec

60°C για 1 min

Μέτρηση

Επανάληψη του κύκλου της αντίδρασης για 39 φορές

Καμπύλη Αποδιάταξης (Melting curve - τα αποτελέσματα της οποίας δείχνουν εάν υπάρχουν παραπροϊόντα στα δείγματα)

Ο υπολογισμός της αποδοτικότητας των εκκινήτων έγινε επίσης με το λογισμικό Biorad CFX Manager Version 1.5, ενώ η σχετική ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με το λογισμικό REST-MCS.

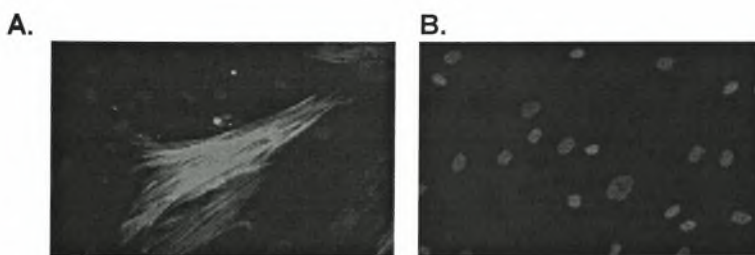
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση των κυττάρων της καλλιέργειας

Για τη μελέτη της συσταλτότητας διαφοροποιημένων ΛΜΚΒ ανθρώπου, χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) (Human Bronchial Smooth Muscle Cells, HBSMC), της εταιρίας Clonetics (BSMC, Clonetics). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα κύτταρα της καλλιέργειάς μας ήταν λεία μυϊκά, προχωρήσαμε στην ταυτοποίησή τους με τη βοήθεια της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού με μονοκλωνικό αντίσωμα της α-ακτίνης των λείων μυών του ανθρώπου (anti-SM-a-actin). Έχει δειχθεί ότι η α-ακτίνη είναι μια από τις στενά συσχετιζόμενες με την συσταλτική συσκευή των ΛΜΚ πρωτεΐνη και αποτελεί ειδικό δείκτη, του οποίου η έκφραση χαρακτηρίζει τον συσταλτό φαινότυπο που είναι το αποτέλεσμα διαφοροποίησης των ΛΜΚ (Halayko and Solway, 2001).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri, όπου τοποθετήθηκαν γυάλινες καλυπτρίδες. Στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4 (2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια), για τρεις ημέρες. Τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις καλυπτρίδες και έτσι χρησιμοποιήθηκαν μετά από μονιμοποίησή τους, στα επόμενα βήματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Ακολούθησε επώαση με το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της α-ακτίνης των λείων μυών του ανθρώπου (anti-SM-a-actin) και στη συνέχεια επώαση με το δεύτερο αντίσωμα κατά της ανοσοσφαιρίνης IgG του ποντικού, το οποίο ήταν συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ομάδα FITC (φλουορεσκεΐνη).

anti-SM-a-actin



Εικ.15: Α. Ανοσοφθορισμός διαφοροποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της α-ακτίνης των λείων μυών του ανθρώπου (anti-SM-a-actin). Πάνω από το 95% των κυττάρων χρωματίστηκαν θετικά για την συσταλτή πρωτεΐνη των λείων μυϊκών κυττάρων α-ακτίνη. Β. Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται ορατή μετά από χρώση με 4,6διαμιδο-2φαινυλ-ινδόλη (DAPI).

Σε μικροσκόπιο φθορισμού Optiphot-2 παρατηρήθηκε ότι πάνω από το 95% των κυττάρων εκφράζουν τη συστατική πρωτεΐνη των λείων μυϊκών κυττάρων του ανθρώπου α -ακτίνη. Μάλιστα σε κάποια από αυτά η ένταση του σήματος φθορισμού ήταν πολύ μεγάλη. Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται ορατή μετά από χρώση με DAPI (4,6διαμιδο-2φαινυλ-ινδόλη).

3.2 Επαγωγή του HIF-1 α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ, από κοβάλτιο και ορό εμβρύου βοός

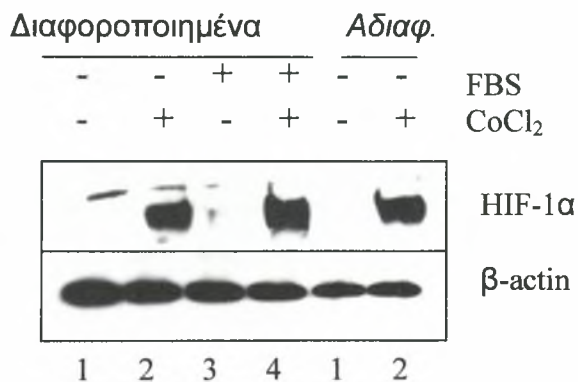
Από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι το κοβάλτιο προκαλεί επαγωγή του HIF-1 α σε καλλιέργειες αδιαφοροποίητων ΛΜΚΒ ανθρώπου (Μελέτη της επαγωγής του «Επαγομένου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα -1» (HIF-1) σε ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων», 2006, Μπουτουρέλη Χριστίνα, Διπλωματική Εργασία). Σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ τραχειάς κουνελιού, μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη FBS προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης του HIF-1 α αλλά και αύξηση της επαγωγής του από το κοβάλτιο, υποδηλώνοντας συνεργιστική δράση των δυο παραγόντων (Chachami et al., 2007).

Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος, τα ΛΜΚΒ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri, σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12, το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum – FBS) καθώς και αντιβιοτικά 100U/ml πενικιλίνη και 0,1 mg/ml στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin – PS). Η επώαση έγινε σε υγρανόμενο επωαστικό κλίβανο στους 37°C παρουσία 5% CO₂. Ακολούθησε διαφοροποίηση των κυττάρων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4 (2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια.) Η διαφοροποίηση διήρκεσε τρεις ημέρες. Εν συνεχεία έγινε η προσθήκη των παραγόντων και συγκεκριμένα: κοβάλτιο σε τελική συγκέντρωση 100 μ M και 10% FBS. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο (στους 37°C παρουσία 5% CO₂) με τους παραπάνω παράγοντες, για 24 ώρες. Ταυτόχρονα, στις ίδιες συνθήκες, τοποθετήθηκε ένα τρυβλίο Petri, στο οποίο τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μόνο υπό την παρουσία του θρεπτικού μέσου, χωρίς να γίνει προσθήκη κανενός από τους παράγοντες (δείγμα control/μάρτυρας).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη χρήση των κατάλληλων διαλυμάτων και ανάλυση των εκχυλισμάτων που πήραμε με τη μέθοδο Bradford προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης.

Ακολούθως, 35μg από κάθε δείγμα, αναλύθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Εν συνεχεία έγινε ο προσδιορισμός των επιπέδων του HIF-1α με τη βοήθεια της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρωματίστηκε με Ponceau S, ώστε να γίνουν ορατές οι μπάντες που αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε Western Blotting, χρησιμοποιώντας αντίσωμα της β-ακτίνης των λείων μυικών κυττάρων, ως μάρτυρα για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων μας (b-actin) (εικ.16).

Western Blotting - HIF-1α



Εικ.16 : Μελέτη της επαγωγής του HIF-1α μετά από επίδραση για 24 ώρες με CoCl₂, FBS και συνδυασμό τους σε διαφοροποιημένα και με CoCl₂ σε αδιαφοροποίητα ΛΜΚΒ ανθρώπου. Η β-ακτίνη εκφράζεται σε κάθε περίπτωση.

Η έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης του HIF-1α στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου στα οποία δεν έγινε προσθήκη παράγοντα, ήταν πολύ χαμηλή. Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν στο κοβάλτιο, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν κατά πολύ. Μετά από κατεργασία των εν λόγω κυττάρων με FBS παρατηρείται μικρή επαγωγή του HIF-1α, ενώ όταν τα κύτταρα κατεργάζονται με FBS + CoCl₂ η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α δείχνει να αυξάνεται σημαντικά. Στα αδιαφοροποίητα ΛΜΚΒ ανθρώπου, στα οποία δεν έγινε προσθήκη παράγοντα, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή του HIF-1α, ενώ μετά από κατεργασία τους με κοβάλτιο παρατηρείται επαγωγή του HIF-1α, όπως ήταν αναμενόμενο.

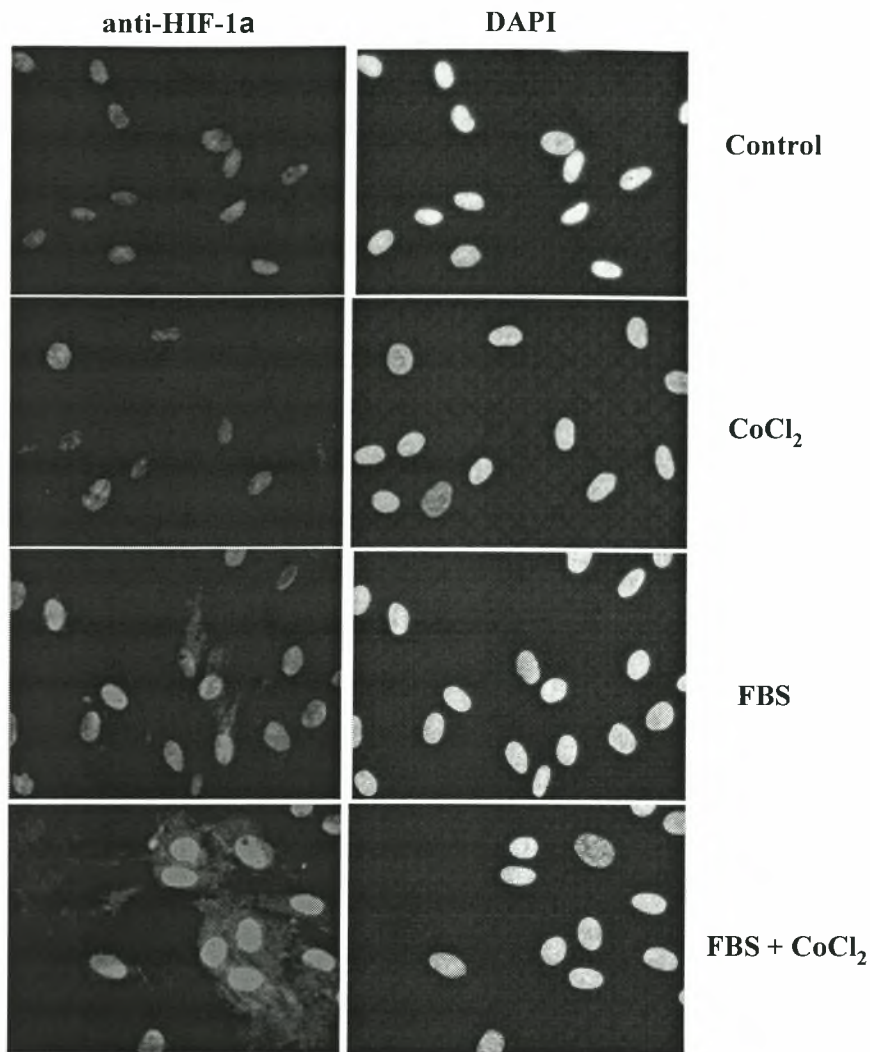
Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το κοβάλτιο επάγει τον HIF-1α, ο ορός εμβρύου βοός (FBS) επίσης, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό, ενώ ο συνδυασμός και των δύο παραγόντων (FBS+CoCl₂) φαίνεται να επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό τον HIF-1α, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο παράγοντες δρουν συνεργιστικά για την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου.

3.3 Επαγωγή και ενδοκυττάριος εντοπισμός του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ανθρώπινα ΛΜΚΒ

Η επαγωγή και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α στα διαφοροποιημένα ανθρώπινα ΛΜΚΒ, μελετήθηκε και με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri, τα στα οποία είχαν τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες (διαμέτρου 12mm). Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 85% περίπου της επιφάνειας του τρυβλίου, και αφότου τα διαφοροποιήσαμε για τρεις ημέρες (παράγραφος 2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια), έγινε η προσθήκη των παραγόντων : κοβάλτιο σε συγκέντρωση, 10% FBS και συνδυασμός τους (10% FBS+100μΜ κοβάλτιο). Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο (στους 37°C παρουσία 5% CO₂) με τους παραπάνω παράγοντες, για 24 ώρες. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HIF-1 και στη συνέχεια με το δεύτερο αντίσωμα κατά της ανοσοσφαιρίνης IgG του ποντικού, το οποίο ήτανε συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ομάδα FITC (φλουορεσκεΐνη). Η φθορίζουσα ομάδα FITC, του δεύτερου αντισώματος χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό του HIF-1α (εικ.17).

Στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου που επεξεργάστηκαν με κοβάλτιο, παρατηρήσαμε μικρή επαγωγή του HIF-1α, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε κάποιον από τους παράγοντες. Τα επίπεδα του HIF-1α στα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με FBS, έδειξαν μια μικρή επαγωγή του HIF-1α, ενώ στα κύτταρα που επεξεργάστηκαν με FBS+κοβάλτιο παρατηρήσαμε εμφανή επαγωγή του HIF-1α, ο οποίος είναι συγκεντρωμένος στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικ.17 : Ανοσοφθορισμός διαφοροποιημένων ΛΜΚΒ ανθρώπου με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά του HIF-1a. Παρουσία επαγωγέων, όπως το κοβάλτιο, ο ορός εμβρύου βοός (FBS) και συνδυασμός και των δύο (FBS+κοβάλτιο), ο HIF-1a επάγεται σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Η θέση των πυρήνων των κυττάρων γίνεται ορατή μετά από χρώση με 4,6διαμιδο-2φαινυλ-ινδόλη (DAPI).

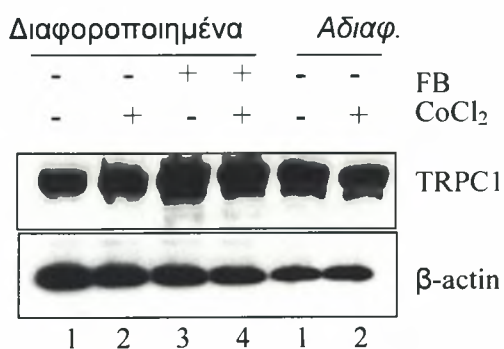
3.4 Μελέτη της επαγωγής του TRPC1 και της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των λείων μυικών κυττάρων σε ΛΜΚΒ ανθρώπου , υπό την επίδραση κοβαλτίου, ορού εμβρύου βοός και συνδυασμού και των δύο με τη βοήθεια της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν στις συνθήκες επαγωγής του HIF-1a και κυρίως κατά την αυξημένη επαγωγή του από τον συνδυασμό CoCl₂ και FBS, αλλάζει η έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τη συστολή των ΛΜΚ. Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών TRPC1 και SM-MHC.

Τα ΛΜΚΒ καλλιεργήθηκαν για τρεις ημέρες σε τρυβλία Petri (εδάφιο 3.2 των αποτελεσμάτων). Ακολούθως προχωρήσαμε στη διαφοροποίηση κάποιων από αυτά, η οποία διήρκεσε τρεις ημέρες. Στη συνέχεια, έγινε η προσθήκη των παραγόντων και συγκεκριμένα: στα διαφοροποιημένα κύτταρα προστέθηκε κοβάλτιο σε τελική συγκέντρωση 100μΜ, 10% FBS και συνδυασμός και των δύο, ενώ στα αδιαφοροποίητα προστέθηκε μόνο το κοβάλτιο. Ταυτόχρονα, στις ίδιες συνθήκες, τοποθετήθηκαν δύο τρυβλία Petri, ένα με αδιαφοροποίητα και ένα με διαφοροποιημένα κύτταρα, στα οποία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μόνο υπό την παρουσία του θρεπτικού μέσου, χωρίς να γίνει προσθήκη κανενός από τους παράγοντες (δείγμα control/μάρτυρας). Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο (στους 37°C παρουσία 5% CO₂) με τους παραπάνω παράγοντες, για 24 ώρες.

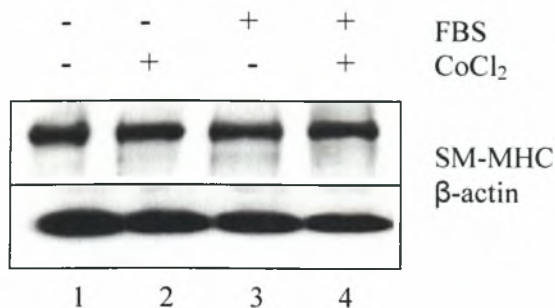
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη χρήση των κατάλληλων διαλυμάτων και η ανάλυση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Ακολούθως, 35μg από κάθε δείγμα, αναλύθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Στη συνέχεια τα επίπεδα της έκφρασης των πρωτεϊνών του TRPC1 και της SM-MHC προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting).

Western Blotting - TRPC1



Εικ.18 : Μελέτη της επαγωγής του TRPC1 μετά από επίδραση για 24 ώρες με CoCl₂, FBS και συνδυασμό τους σε διαφοροποιημένα και με CoCl₂ σε αδιαφοροποίητα ΛΜΚΒ ανθρώπου. Η β-ακτίνη εκφράζεται σε κάθε περίπτωση.

Western Blotting - SM-MHC



Εικ.19 : Μελέτη της επαγωγής της SM-MHC μετά από επίδραση για 24 ώρες με CoCl₂, FBS και συνδυασμό τους σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου. Η β-ακτίνη εκφράζεται σε κάθε περίπτωση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η επαγωγή του HIF-1α στις πειραματικές συνθήκες που μελετήσαμε, φαίνεται να επηρεάζει οριακά την έκφραση του TRPC1 σε επίπεδο πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι το CoCl₂ και ο συνδυασμός FBS + CoCl₂, φαίνεται να οδηγούν σε επαγωγή της έκφρασης του TRPC1 με την ίδια περίπου ένταση, ενώ στην περίπτωση που τα διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου κατεργαστούν με FBS, η επαγωγή της έκφρασης του TRPC1 φαίνεται να δείχνει μία μικρή αύξηση.

Αντιθέτως, η επαγωγή του HIF-1α στα αδιαφοροποίητα ΛΜΚΒ ανθρώπου μετά από προσθήκη CoCl₂, έδειξε ότι η επίδραση του κοβαλτίου πιθανόν να μειώνει σε μικρό βαθμό την έκφραση του TRPC1 σε επίπεδο πρωτεΐνης, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρα. Ωστόσο, τα εν λόγω αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα και απαιτείται επανάληψή τους με περισσότερα δείγματα.

Η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης των λείων μυών (SM-MHC) φαίνεται να εκφράζεται με την ίδια ένταση στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου, σε κάθε πειραματική συνθήκη. Από το γεγονός αυτό, συμπεραίνουμε ότι η επαγωγή του HIF-1α στις παραπάνω συνθήκες δεν επηρεάζει την έκφραση της SM-MHC σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου.

3.5 Μελέτη της επαγωγής των TRPC1 και TRPC6 σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ, υπό την επίδραση κοβαλτίου, ορού εμβρύου βοός και συνδυασμού και των δύο με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Προκειμένου να ελεγχθεί αν σε συνθήκες επαγωγής του HIF-1α επάγεται η μεταγραφή γονιδίων που επηρεάζουν τη συστολή των ΛΜΚ, μελετήθηκε η έκφραση των TRPC1 και TRPC6 mRNA με τη μέθοδο της ποσοτικής PRC πραγματικού χρόνου. Τα γονίδια των οποίων την έκφραση μελετήσαμε με αυτή τη μέθοδο, είναι τα γονίδια για τους TRPC1 και TRPC6 ιοντικούς διαύλους. Ως θετικό μάρτυρα, χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο για τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF (vascular endothelium growth factor), για του οποίου την επαγωγή στις συνθήκες που μελετάμε, γνωρίζουμε. Επίσης, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, το γονίδιο της β-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων, του οποίου η έκφραση δεν μεταβάλλεται στις συνθήκες που μελετάμε.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος, αρχικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διαφοροποιήθηκαν για τρεις ημέρες όπως περιγράφεται παραπάνω (εδάφιο 2.4 Διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε πρωτογενή καλλιέργεια, Υλικά και Μέθοδοι και εδάφιο 3.2 των αποτελεσμάτων). Ακολούθησε η προσθήκη των παραγόντων: κοβάλτιο σε τελική συγκέντρωση 100μM, 10% FBS και συνδυασμός και των δύο και επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (στους 37°C παρουσία 5% CO₂), για 24 ώρες. Ταυτόχρονα, στις ίδιες συνθήκες, τοποθετήθηκε ένα τρυβλίο Petri, στο οποίο τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μόνο υπό την παρουσία του θρεπτικού μέσου, χωρίς να γίνει προσθήκη κανενός από τους παράγοντες (δείγμα control/μάρτυρας). Στη συνέχεια αφού πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από τα ανθρώπινα ΛΜΚΒ και υπολογίστηκε η συγκέντρωση RNA των δειγμάτων (εδάφιο 2.10 Απομόνωση RNA από ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων, Υλικά και Μέθοδοι), προχωρήσαμε στη σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας 1μg RNA για κάθε αντίδραση. Εκτός από τον αριθμό των cDNA δειγμάτων που έχουμε, πραγματοποιούμε και μία ακόμη αντίδραση (-RT) με δείγμα πάλι 5μl από το σύνολο όλων των δειγμάτων (RNA mix), στο οποίο δεν προσθέτουμε ανάστροφη τρανσκριπτάση (-RT). Η πραγματοποίηση των RT-qPCR αντιδράσεων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο

(εδάφιο 2.12 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - πραγματικού χρόνου, Υλικά και Μέθοδοι).

Υπολογισμός της αποδοτικότητας των εκκινητών (efficiency of primers)

Πριν την πραγματοποίηση των αντιδράσεων για τα cDNA δείγματα, υπολογίστηκε η αποδοτικότητα των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-qPCR με συγκεκριμένης αναλογίας αυξανόμενη ποσότητα cDNA, τα αποτελέσματα των οποίων αναλύθηκαν από το λογισμικό Biorad CFX Manager Version 1.5 της λογισμικό BioRad.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και με βάση τα παραπάνω, η αποδοτικότητα των εκκινητών ήταν:

- **actin** : efficiency = 2,553
- **VEGF** : efficiency = 1,888
- **TRPC1** : efficiency = 2,07
- **TRPC6** : efficiency = 1,941

(Ιδανικά, η efficiency των εκκινητών πρέπει να είναι περίπου ίση με 2,0).

Οι παραπάνω τιμές είναι αποδεκτές και χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των RT-qPCR που ακολουθούν.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις RT-qPCR των δειγμάτων μας. Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, ως δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν η αποδοτικότητα των εκκινητών και τα αποτελέσματα της RT-qPCR των δειγμάτων (Threshold Cycle (C(t)) που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (πιν.3).

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο κύκλος ουδός. Ο αριθμός Ct (threshold cycle) είναι ο αριθμός του κύκλου στον οποίο το φθορίζον σήμα της αντίδρασης τέμνει την ουδό (threshold). Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του αριθμού των αρχικών αντιγράφων του DNA, επειδή η τιμή του Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου. Η ουδός (threshold) μιας αντίδρασης κατά την ποσοτική real-time PCR, είναι το επίπεδο του σήματος που αντικατοπτρίζει μια στατιστικά σημαντική αύξηση πάνω από το σήμα που έχει υπολογιστεί ως βάση (baseline signal) και σκοπός του είναι να διακρίνει ένα σήμα που ενισχύεται.

	ACTIN	VEGF	TRPC1	TRPC6
Sample	Threshold Cycle (C(t))			
1.control	13,78	21,16	24,93	22,78
2.control	12,84	20,32	24,18	21,9
2.control	12,64	20,28	24,49	22,63
3.control	13,52	21,97	26,13	23,16
3.control	12,79	20,46	26,84	23,71
4.Cobalt	13,85	20,42	25,49	23,58
4.Cobalt	13,42	20,89	24,24	22,16
5.Cobalt	13,6	20,6	24,21	22,08
5.Cobalt	12,7	21,31	24,05	22,7
6.Cobalt	12,77	19,85	26,06	21,93
6.Cobalt	12,49	19,18	25,71	23,08
7.FBS	12,88	20,14	24,68	21,66
7.FBS	12,59	20,68	25,35	21,26
8.FBS	12,62	20,02	25,12	22,68
8.FBS	13,6	20,09	24,84	23,31
9.FBS+cobalt	13,14	20,01	24,7	21,31
9.FBS+cobalt	12,97	21,06	24,77	23,62
10.FBS+cobalt	12,35	20,09	25,7	22,58
10.FBS+cobalt	12,24	21,31	26,81	22,39
11.FBS+cobalt	13,7	20,14	25,98	22,41
11.FBS+cobalt	14,36	20,57	26,74	23,25

Πίν.3 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν (με ενδεικτική αρίθμηση) και τα αποτελέσματα της RT-qPCR για κάθε ένα από τα γονίδια που αναγράφονται.

Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Relative Expression Software Tool - Multiple Condition Solver

REST-MCS © - version 2, το οποίο πραγματοποιεί τους υπολογισμούς σύμφωνα με τον τύπο:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{target}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Cp}_{\text{ref}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}$$

όπου : R = Σχετική έκφραση γονιδίου

E_{target} = Αποδοτικότητα του γονιδίου-στόχου

E_{ref} = Αποδοτικότητα του γονιδίου αναφοράς

$\Delta\text{Cp}_{\text{target}}$ = Διαφορά Ct γονιδίου-στόχου

$\Delta\text{Cp}_{\text{ref}}$ = Διαφορά Ct γονιδίου αναφοράς

MEAN control = Μέσος όρος της συνθήκης μάρτυρα (control)

MEAN sample = Μέσος όρος της συνθήκης δείγματος

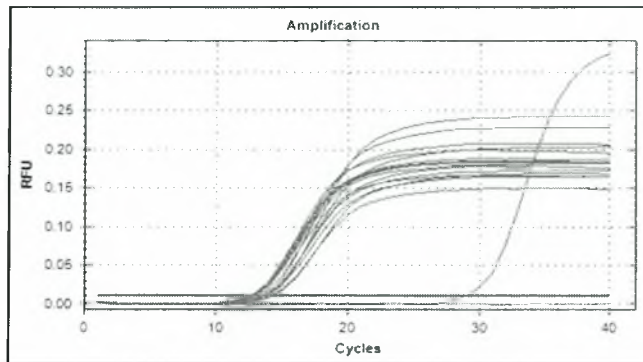
Τα αποτελέσματα που πήραμε μετά τον υπολογισμό αυτό, ήταν :

	Μάρτυρας	CoCl₂	FBS	FBS+CoCl₂
Αναλογία VEGF / β-ακτίνη mRNA	1	1,402	1,332	1,249
Αναλογία TRPC1 / β-ακτίνη mRNA	1	1,3	1,091	0,729
Αναλογία TRPC6 / β-ακτίνη mRNA	1	1,207	1,335	1,194

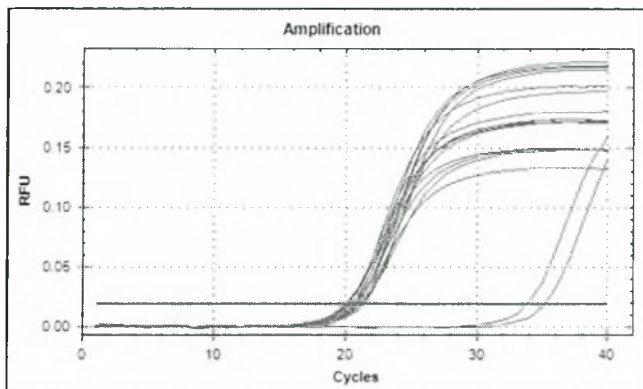
Πίν.4 : Σχετική έκφραση των VEGF, TRPC1 και TRPC6 mRNA στις διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης των αντιδράσεων της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής με τη βοήθεια του λογισμικού Biorad CFX Manager Version 1.5 της BioRad, υπολόγιζε την αντίστοιχη αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης των δειγμάτων. Με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η παρακολούθηση της εξέλιξης του πειράματος κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησής του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα δειγμάτων, όπου το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε εις διπλούν (in duplex). Η αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης, μετά την ολοκλήρωση του κάθε πειράματος ήταν:

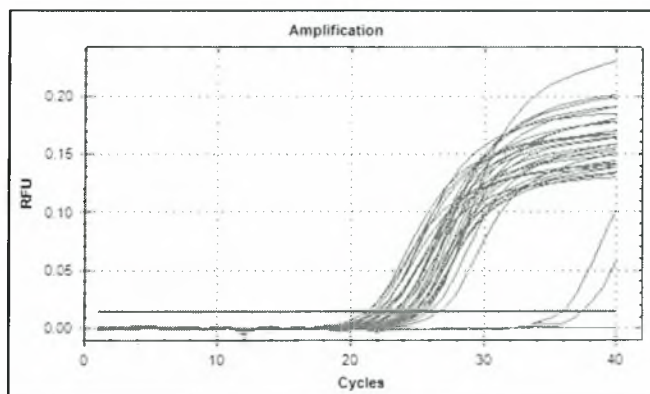
A.



B.



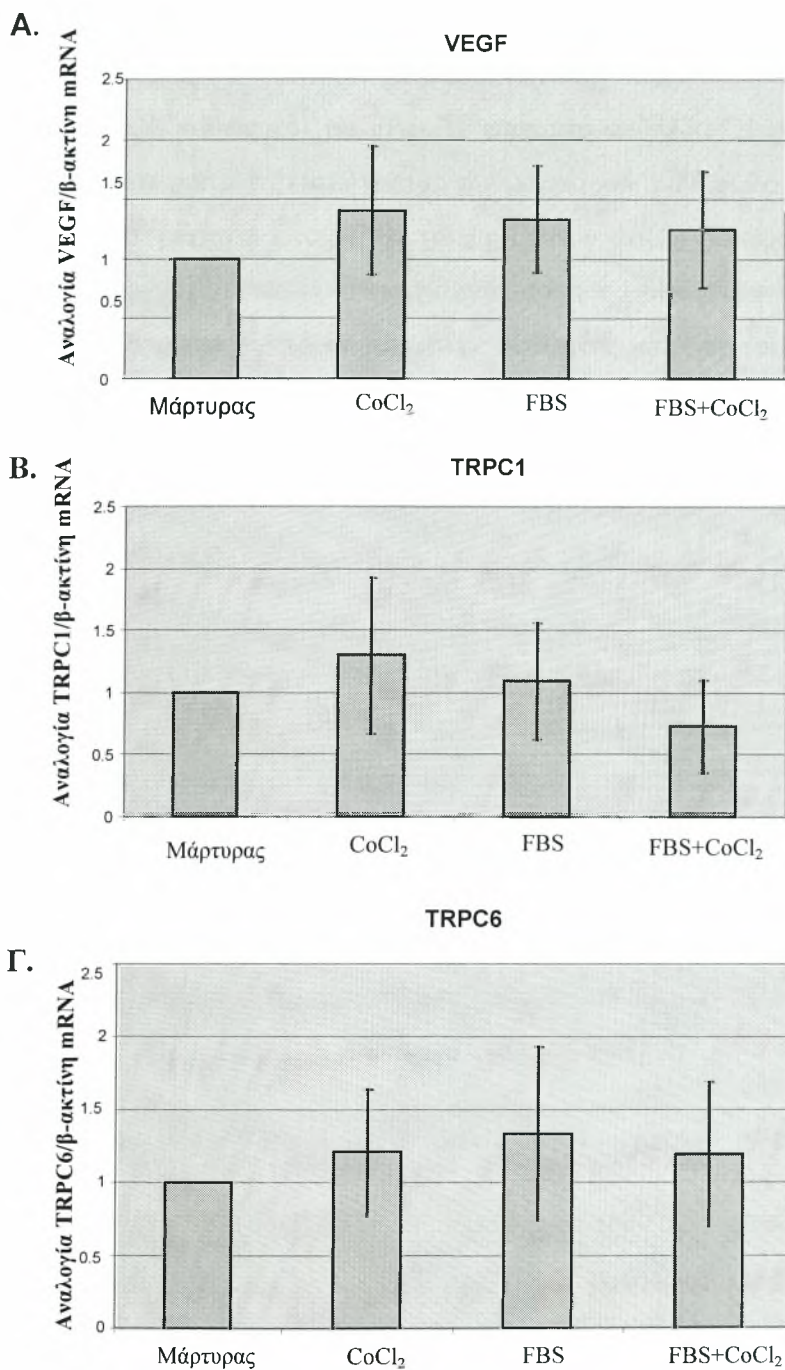
Γ.



Καμπύλες ενίσχυσης: A. Αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης του mRNA της β-ακτίνης στις διάφορες πειραματικές συνθήκες. B. Αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης του mRNA του VEGF στις διάφορες πειραματικές συνθήκες. Γ. Αντιπροσωπευτική καμπύλη ενίσχυσης των mRNA των TRPC1 και TRPC6 στις διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Μετά την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων πειραμάτων και την επεξεργασία των τιμών των αποτελεσμάτων τους (με τη βοήθεια του λογισμικού REST-MCS), κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα γραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Γράφημα A,B,Γ) όπου στον άξονα των x, τοποθετήθηκαν οι τιμές των μέσων όρων των αποτελεσμάτων για τις συνθήκες στις οποίες μελετάται η έκφραση

των γονιδίων και στον άξονα των y, η αναλογία της έκφρασης του κάθε γονιδίου προς μελέτη, σε σχέση με αυτή της β-ακτίνης.



Γράφημα Α.: Σχετική έκφραση του VEGF mRNA

Γράφημα Β.: Σχετική έκφραση του TRPC1 mRNA

Γράφημα Γ.: Σχετική έκφραση του TRPC6 mRNA.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της β-ακτίνης.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, συμπεραίνουμε ότι η μεταγραφή του παράγοντα VEGF επάγεται με την ίδια περίπου ένταση και στις τρεις πειραματικές συνθήκες (CoCl₂, FBS, FBS + CoCl₂) (Γράφημα Α), ενώ η μεταγραφή του γονιδίου του TRPC1 φαίνεται να επάγεται στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με CoCl₂ καθώς και με FBS. Η επαγωγή του TRPC1 φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με CoCl₂, ενώ φαίνεται να μειώνεται όταν τα κύτταρα κατεργάζονται με FBS + CoCl₂ (Γράφημα Β). Από την παρατήρηση του γραφήματος Γ, συμπεραίνουμε ότι η μεταγραφή του γονιδίου του TRPC6 επάγεται και στις τρεις πειραματικές συνθήκες και φαίνεται να είναι κάπως μεγαλύτερη στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με FBS.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι περισσότεροι οργανισμοί απαιτούν για την επιβίωσή τους οξυγόνο. Από αυτούς, οι πολυκύτταροι οργανισμοί στην πλειοψηφία τους διαθέτουν ειδικά όργανα για την πρόσληψη, τη μεταφορά και την διανομή του οξυγόνου στους ιστούς. Για την επίτευξη των λειτουργιών αυτών, καθώς και για την ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου, η ανώτερη αναπνευστική οδός έχει αναπτύξει μια σειρά φυσιολογικών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία, προκειμένου να επαναφέρει την ισορροπία μεταξύ αερισμού και διανομή του οξυγόνου στους ιστούς. Ο καλύτερα μελετημένος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου είναι ο «επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1» (Hypoxia-Inducible Factor 1 – HIF-1), ο οποίος επάγεται και υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, από διάφορες ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες, καθώς και από παράγοντες που μιμούνται την υποξία, όπως το κοβάλτιο (CoCl_2) (Wenger R.H., 2002).

Στην αναπνευστική οδό, τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) καλύπτουν το εσωτερικό των αεραγωγών. Παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πλαστικότητας και επιτελούν μια σειρά λειτουργιών, σημαντικότερη από τις οποίες είναι η σύσπαση, η οποία εξαρτάται από την έκφραση πλήθους συσταλτών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Τα ΛΜΚ ρυθμίζοντας τη διάμετρο των αεραγωγών, ρυθμίζουν το οξυγόνο που φθάνει στους πνεύμονες. Μελέτες έχουν δείξει, ότι τα ΛΜΚ τραχείας σε πρωτογενείς καλλιέργειες παρουσία ορού εμβρύου βοός (FBS) στο θρεπτικό μέσο, εμφανίζουν τον συνθετικό φαινότυπο (Halayko and Solway, 2001). Η προσθήκη CoCl_2 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ΛΜΚ παρουσία ορού, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α, τόσο σε ΛΜΚ τραχείας κουνελιού (Chachami et al. 2004), όσο και σε ΛΜΚ βρόγχων ανθρώπου (Μελέτη της επαγωγής του «Επαγομένου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα -1» (HIF-1) σε ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων», 2006, Μπουτουρέλη Χριστίνα, Διπλωματική Εργασία).

Έχει δειχθεί επίσης ότι, η απομάκρυνση του FBS από το θρεπτικό μέσο πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, επάγει την εμφάνιση του διαφοροποιημένου συσταλτού φαινοτύπου των κυττάρων. Ο διαφοροποιημένος φαινότυπος των ΛΜΚ χαρακτηρίζεται από την έκφραση δεικτών ειδικών για τα ΛΜΚ συμπεριλαμβανομένων της α-ακτίνης των λείων μυών και της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης των ΛΜΚ (SM-MHC). Η ετερογένεια των ΛΜΚΒ φαίνεται

να σχετίζεται με διαφορές στην έκφραση της SM-MHC. Επιπλέον, η έκφραση σε διαφορετικά επίπεδα, υποδοχέων και πρωτεϊνών ιοντικών διαύλων, όπως είναι οι διαυλοι TRPC, καθώς και πρωτεϊνών του συσταλτού φαινοτύπου οι οποίες σχετίζονται με την ρύθμιση της συστολής, φαίνεται να εμπλέκονται στην ετερογένεια των ΛΜΚΒ (Halayko and Solway, 2001).

Η κατεργασία διαφοροποιημένων ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, με CoCl_2 , FBS και συνδυασμό τους, οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι ο FBS δρα συνεργιστικά με το CoCl_2 αυξάνοντας την επαγωγή του HIF-1α στα κύτταρα αυτά (Chachami et al. 2007).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί αρχικά, αν η προσθήκη CoCl_2 , FBS και συνδυασμού τους, επάγει την έκφραση του HIF-1α σε διαφοροποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) ανθρώπου, με τη χρήση των μεθόδων της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting). Η μελέτη της επαγωγής και του ενδοκυττάριου εντοπισμού του HIF-1α στα κύτταρα αυτά, έγινε και με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12, το οποίο περιείχε FBS και αντιβιοτικά PS, ενώ στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν για τρεις ημέρες (θρεπτικό μέσο DMEM-F12 το οποίο περιείχε PS και ITS). Ακολούθησε προσθήκη των παραγόντων (CoCl_2 , 10% FBS και συνδυασμός τους) και επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (στους 37°C παρουσία 5% CO_2), για 24 ώρες.

Από τη μελέτη της επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α υπό την επίδραση CoCl_2 , 10% FBS και συνδυασμού τους, σε διαφοροποιημένα για τρεις ημέρες λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (ΛΜΚΒ) ανθρώπου, προκύπτει ότι το CoCl_2 επάγει τον HIF-1α, ο ορός εμβρύου βοός (FBS) επίσης, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό, ενώ παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός τους (FBS+ CoCl_2) επάγει σε αρκετά μεγαλύτερο βαθμό την έκφραση του HIF-1α. Παρόμοια αποτελέσματα πήραμε και με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι οι δύο παράγοντες (FBS+ CoCl_2) δρουν συνεργιστικά αυξάνοντας την επαγωγή του HIF-1α, ο οποίος είναι συγκεντρωμένος στον πυρήνα των κυττάρων, σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου.

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν στις παραπάνω συνθήκες επαγωγής του HIF-1α και κυρίως κατά την αυξημένη επαγωγή του από τον συνδυασμό CoCl_2 και FBS, αλλάζει η έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν τη συστολή των ΛΜΚΒ ανθρώπου.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η επαγωγή του HIF-1α δεν σχετίζεται με την έκφραση της SM-MHC σε διαφοροποιημένα ΛΜΚ τραχείας κουνελιού, διότι η κατεργασία τους με CoCl_2 ή FBS για 24 ώρες, καθώς και με συνδυασμό τους (FBS+ CoCl_2), δεν έδειξε κάποια σημαντική αλλαγή στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει χρώση για την SM-MHC (Chachami et al. 2007).

Επίσης έχει δειχθεί, ότι η αυξημένη έκφραση των TRPC1 και TRPC6 σε λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας (pulmonary arterial smooth muscle cell – PASM) κατά την χρόνια υποξία σε ποντίκια και αρουραίους, ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 και είναι υπεύθυνη για την πρόκληση πνευμονικής υπέρτασης (Philip I. Aaronson, 2006).

Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών TRPC1 και SM-MHC με τη χρήση των μεθόδων της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting).

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η επαγωγή του HIF-1α στις πειραματικές συνθήκες που μελετήσαμε (προσθήκη CoCl_2 , 10% FBS και συνδυασμός τους σε διαφοροποιημένα για 3 ημέρες ΛΜΚΒ ανθρώπου) δεν επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης της SM-MHC, ενώ φαίνεται να επηρεάζει οριακά την έκφραση των πρωτεϊνών του TRPC1. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι το κοβάλτιο και ο συνδυασμός FBS + CoCl_2 , φαίνεται να επάγουν την έκφραση του TRPC1 με την ίδια περίπου ένταση, ενώ στην περίπτωση που τα διαφοροποιημένα ΛΜΚΒ ανθρώπου κατεργαστούν με FBS, η επαγωγή της έκφρασης του TRPC1 φαίνεται να δείχνει μία μικρή αύξηση. Αντιθέτως, η επαγωγή του HIF-1α στα αδιαφοροποίητα ΛΜΚΒ ανθρώπου μετά από προσθήκη CoCl_2 , έδειξε ότι η επίδραση του κοβαλτίου πιθανόν να μειώνει σε μικρό βαθμό την έκφραση του TRPC1 σε επίπεδο πρωτεΐνης , σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρα. Ωστόσο, τα εν λόγω αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα, καθώς απαιτείται η πολλαπλή επανάληψή τους προκειμένου να είμαστε σίγουροι για την εγκυρότητά τους.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε αν σε συνθήκες επαγωγής του HIF-1α επάγεται η μεταγραφή γονιδίων που επηρεάζουν τη συστολή των ΛΜΚ και συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των TRPC1 και TRPC6 mRNA με τη μέθοδο της ποσοτικής

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο για τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF (vascular endothelium growth factor), ενώ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, το γονίδιο της β-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων, του οποίου η έκφραση δεν μεταβάλλεται στις συνθήκες που μελετάμε.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταγραφή του παράγοντα VEGF επάγεται με την ίδια περίπου ένταση και στις τρεις πειραματικές συνθήκες επαγωγής του HIF-1α (CoCl₂, FBS, FBS + CoCl₂), όπως αναμενόταν. Η μεταγραφή του γονιδίου του TRPC1 φαίνεται να επάγεται στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με CoCl₂ ή FBS, αλλά να μειώνεται όταν τα κύτταρα κατεργάζονται με FBS + CoCl₂. Η μεταγραφή του γονιδίου του TRPC6 έδειξε να επάγεται και στις τρεις πειραματικές συνθήκες και φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση κατεργασίας των κυττάρων με FBS.

Η παρούσα εργασία, έδειξε ότι η προσθήκη CoCl₂, FBS και συνδυασμού τους σε καλλιέργεια διαφοροποιημένων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων (ΛΜΚΒ) ανθρώπου, επάγει την έκφραση του HIF-1α και προτείνει, ότι οι δύο παράγοντες (FBS+CoCl₂) δρουν συνεργιστικά αυξάνοντας την επαγωγή του HIF-1α στα κύτταρα αυτά. Η συνεργιστική αυτή επαγωγή, εμπλέκεται στην αύξηση της συσταλτότητας των διαφοροποιημένων ΛΜΚΒ ανθρώπου με το να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη συστολή των κυττάρων αυτών. Δείξαμε ότι η επαγωγή του HIF-1α στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν, δε επηρεάζει την έκφραση της SM-MHC, ωστόσο, πιθανόν επηρεάζει την έκφραση των TRPC1 και TRPC6 γονιδίων, τα διαφορετικά επίπεδα της οποίας, εμπλέκονται στην ετερογένεια των ΛΜΚΒ.

Μελλοντικά, η επανάληψη των πειραμάτων RT-qPCR που πραγματοποιήσαμε, αλλά με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, θα βοηθούσε στην διευκρίνιση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, η οποία έγινε με σκοπό να μελετήσουμε αν η επαγωγή του HIF-1α στις παραπάνω συνθήκες, επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών και mRNA γονιδίων που σχετίζονται με την συσταλτότητα των ΛΜΚΒ ανθρώπου, και συγκεκριμένα των γονιδίων των TRPC1 και TRPC6.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaronson P. I., TRPC Channel Upregulation in Chronically Hypoxic Pulmonary Arteries: The HIF-1 Bandwagon Gathers Steam, *Circ. Res.*;98:1465-1467, 2006

Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *J Physiol.*;570:53–58, 2006

Beech DJ. Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*;32:597– 603, 2005

Chachami G, Hatziefthimiou A, Liakos P, Ioannou MG, Koukoulis GK, Bonanou S, Molyvdas P-A, Simos G, Paraskeva E. Exposure of differentiated airway smooth muscle cells to serum stimulates both induction of hypoxia-inducible factor-1 α and airway responsiveness to ACh. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L913–L922, 2007.

Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3Kdependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 544–551, 2004.

David E. Clapham, Craig Montell, Gunther Schultz, and David Julius, The TRP Ion Channel Family, *IUPHAR Compendium, TRP Channels* July 10, 2002

Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, et al. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther*; 112: 744–760, 2006

Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, et al. N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*, 278: 47842–47852, 2003

Dietrich, Kalwa, Gudermann, TRPC channels in vascular cell function, *Thrombosis and Haemostasis* 103.1/2010,USA, Schattauer, 2009

Durmowicz A. G., Kurt R. Stenmark, Mechanisms of Structural Remodeling in Chronic Pulmonary Hypertension, *Pediatr. Rev.* 1999;20;91, 1999

Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX. Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;280:H746–H755, 2001

Greijer AE, van der GP, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, van de Wiel MA, Belien JA, van Diest PJ, van der WE. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol.*;206:291–304, 2005

Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME, Hershenson MB, and Solway J. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L197–L206, 1999.

Halayko, Andrew J., and Julian Solway. Invited Review: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 90: 358–368, 2001.

Horowitz, A., C. B. Mecine, R. Laporte, and K. G. Morgan. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76 : 967-1003, 1996

Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodeling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol*;547(pt 1):133–145,2003

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe

PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel- Lindau ubiquitylation complex by O²-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472, 2001

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.*; 274: 6519–25, 1999

Kiichi Hirota, Ryo Fukuda, Satoshi Takabuchi, Shinae Kizana-Kondoh, Takehiko Adachi, Kazuhiko Fukuda, Semenza G L, Induction of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity by Muscarinic Acetylcholine Receptor Signaling. *J. Biol. Chem*, 279, 40:41521-41528, 2004

Kurt R. Stenmark, Karen A. Fagan and Maria G. Frid, Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling: Cellular and Molecular Mechanisms, *Circ. Res*;99:675-691, 2006

Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JS., Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptoroperated Ca⁺² channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res.* 95:496 –505, 2004

Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.*; 414: 550–4, 2001

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig- Burgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.*; 116: 1319–26, 2003a

Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell.*; 14: 3470–81, 2003b

Mitchell RW, Halayko AJ, Kahraman S, Solway J, and Wylam ME. Induction of M3 muscarinic receptor gene expression and acetylcholine responsiveness in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1091–L1100, 2000

Mylonis Ilias, Georgia Chachami, Martina Samiotaki, George Panayotou, Efrosini Paraskeva, Alkmini Kalousi, Eleni Georgatsou, Sofia Bonanou, and George Simos, Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1, *J. Biol. Chem.*,281,44,33095–33106, 2006

Mylonis Ilias, Georgia Chachami, Efrosini Paraskeva, George Simos, Atypical CRM1-dependent Nuclear Export Signal Mediates Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α by MAPK, *JBC M803081200*, 2008

Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75: 487–517, 1995.

Owens GK., M.S. Vernon, and C.S. Madsen. Molecular regulation of smooth muscle differentiation. *J. Hypertens.* 4,Suppl. 5 : S55-S64, 1996

Richard, D. E., E. Berra, and J. Pouyssegur.. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275:26765–26771, 2000

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

Semenza G. L. , HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14:1983-1991, 2000

Semenza G. L. , MD, PhD Involvement of Hypoxia- Inducible Factor 1 in Pulmonary Pathophysiology, *Chest* 2005;128:592-594, 2005

Semenza G. L. , Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1, *Physiology* 24:97-106, 2009

Semenza G. L., Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease, *Respir Res* 2000, 1:159–162, 2000

Semenza, Gregg L. O²-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* 96: 1173–1177, 2004

Shimoda LA, Sham JS, Shimoda TH, Sylvester JT. L-type Ca²⁺ channels, resting [Ca²⁺]_i, and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*;279: L884–L894, 2000

Shimoda, Larissa A., Dominador J. Manalo, James S. K. Sham, Gregg L. Semenza, and J. T. Sylvester. Partial HIF-1a deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L202–L208, 2001

Smirnov SV, Robertson TP, Ward JP, Aaronson PI. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary artery muscle cells. *Am J Physiol.*;266:H365–H370, 1994

Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX. Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca⁺² entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L144 – L155, 2002

Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int. Rev. Cytol.* 169 : 183-265, 1996

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O² tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510–5514, 1995

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic HLH-PAS heterodimer regulated by cellular oxygen tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510–5514, 2005

Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ, Yuan XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.*100:2347–2353, 1997

Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*;286: L848–L858, 2004

Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 98: 1528–1537, 2006

Wang J., Letitia Weigand, Wenju Lu, J.T. Sylvester, Gregg L. Semenza, Larissa A. Shimoda, Hypoxia Inducible Factor 1 Mediates Hypoxia-Induced TRPC Expression and Elevated Intracellular Ca²⁺ in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells, *Circ Res.*;98:1528-1537, 2006.

Wang L, Pare PD, and Seow CY. Effects of length oscillation on the subsequent force development in swine tracheal smooth muscle. *J Appl Physiol* 88: 2246–2250, 2000

Wegner, R.H. Cellular adaption to hypoxia : O²-sensing protein hydroxylases, hypoxia inducible transcription factors and O²-regulated gene expression. *FASEB J.* 16 :1151-1162, 2002

Yu F, White SB, Zhao Q, and Lee FS. HIF-1 binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9630–9635, 2001.

Zagórska Anna, Józef Dulak, HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochemica Polonica* 51 (3) : 563-585, 2004

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1_ Ca²⁺ expression by the epidermal growth factor/ phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/ AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60: 1541–1545, 2000.

Zhu, Tim Jackson and H. Franklin Bunn. Detecting and responding to hypoxia, *Nephrol Dial Transplant* , 17 [Suppl 1]: 3–7, 2002

Zitt, C. et al. Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16, 1189-1196, 1996.