



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος



Διδακτορική Διατριβή

"ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ"

υπό

ΧΡΙΣΤΙΝΑΣ Δ. ΜΠΕΦΑΝΗ

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

© 2013 Χριστίνα Μπεφάνη

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (6η/ 11-07-2012ΓΣΕΣ):
:

1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων) Δρ. Παναγιώτης **Λιάκος**
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής Δρ. Γεώργιος **Σίμος**
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής Δρ. Ελένη **Γεωργιάτσου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής Δρ. Πασχάλης-Αδάμ **Μολυβδάς**
Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής Δρ. Χρήστος **Παπανδρέου**
Καθηγητής Παθολογία-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής Δρ. Νικόλαος **Σακελλαρίδης**
Καθηγητής Φαρμακευτικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής Δρ. Ηλίας **Μυλωνής**
Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στους γονείς μου

Στον σύζυγό μου Κώστα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Π. Λιάκο, στο διάστημα 2009-2013. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Λιάκο για όλη τη συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης, για την ανάθεση της διατριβής, για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της διατριβής αλλά και για την υπομονή και επιμονή του. Πάνω από όλα όμως τον ευχαριστώ για το συνεχές ενδιαφέρον του, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν πραγματικά δίπλα μου όχι μόνο ως καθηγητής αλλά και ως άνθρωπος.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Γ. Σίμο, για τις συμβουλές και επισημάνσεις του καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής οι οποίες υπήρξαν υπερπολύτιμες. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Ε. Γεωργάτσου για την άψογη συνεργασία και τα εποικοδομητικά της σχόλια κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Π.Α. Μολυβδά, και κ. Ν. Σακελλαρίδη, μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου και για τις εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις.

Οφείλω επίσης ειλικρινείς ευχαριστίες στον Καθηγητή Ογκολογίας και μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Χ. Παπανδρέου, για την άριστη συνεργασία και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του στη μελέτη του καρκίνου του προστάτη.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερος το Λέκτορα Βιοχημείας και μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Ηλία Μυλωνή για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και για την υπομονή του στην επίλυση όλων των αποριών μου τόσο σε τεχνικά όσο και σε θεωρητικά ζητήματα.

Ακόμη, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Χημείας κ. Α. Τσακάλωφ για την άψογη συνεργασία και τις χρήσιμες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Ωστόσο, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την πρώην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη για το ενδιαφέρον της στη διεξαγωγή της διατριβής μου και τα πάντα καλοπροαίρετα σχόλια της.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και ιδιαιτέρως τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αγγελική Λυμπεροπούλου για τις πολύτιμες συμβουλές της και τη στήριξή της στις δύσκολες στιγμές μου, καθώς και τους Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Εύα Πάγγου, Μαρία Κούρτη και Σωτηρία Δρακούλη για την άψογη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε.

Οφείλω πολλά ευχαριστώ και σε παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Καλούση Αλκμήνη και Χαχάμη Γεωργία και τη διδάκτορα Αχιλλεία Λάκκα και την Ειδικευόμενη ιατρό Μπαντέκα Μαρίνα για τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, για την άριστη συνεργασία και το φιλικό κλίμα μεταξύ μας.

Επιπλέον, ευχαριστώ για τη άριστη συνεργασία τη Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας κ. Παρασκευά Ευφροσύνη, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Σταματίου Ροδόπη και την υποψήφια διδάκτορα Τσαπουρνιώτη Ματίνα από το εργαστήριο Φυσιολογίας καθώς και την Ελεάνα Χατζηδάκη και Παναγιώτη Βλαχοστέργιο από το εργαστήριο Ογκολογίας του ΠΓΝΣ.

Ευχαριστώ θερμά τους λίγους πραγματικούς φίλους που μου στάθηκαν και μου συμπαραστάθηκαν.

Πάνω από όλα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τις αδερφές μου, που έχουν αποτελέσει το πιο σημαντικό ψυχικό και υλικό στήριγμά μου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου και των σπουδών μου.

Τέλος, τις πιο θερμές ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω στον σύζυγό μου Κώστα για την ατέλειωτη υπομονή, κατανόηση και την ενθάρρυνσή του σε δύσκολες στιγμές. Χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή του η παρούσα μελέτη δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: **Μπεφάνη**

Όνομα : **Χριστίνα**

Όνομα πατρός: Δημήτριος

Ημερομηνία γέννησης: 03-11-1981

Email: chbefani@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Μεταπτυχιακές Σπουδές:

- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Π. Λιάκου, Επίκουρου Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας με θέμα: « Η διερεύνηση του ρόλου του HIF-2α στην κυτταρική ομοιοστασία». Περίοδος: Ιανουάριος 2009-2013
- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Π.Μ.Σ του Τμήματος Χημείας με ειδίκευση στην Βιοχημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Περίοδος: Σεπτέμβριος 2006- Σεπτέμβριος 2008, Βαθμός πτυχίου: Άριστα 9,17

Προπτυχιακές Σπουδές:

- Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Περίοδος: 2001-2005, Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς 7,75

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- **Ιανουάριος 2009-σήμερα:** Απασχόληση ως Βιολόγος με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Βιοχημικών Αναλύσεων, του τμήματος Ιατρικής Λάρισας. Αντικείμενο: παραλαβή βιολογικών δειγμάτων, επεξεργασία και βιοχημικές-μοριακές αναλύσεις. Επιστημονικός υπεύθυνος: Επ.καθ. Λιάκος Παναγιώτης
- **Ιανουάριος 2007-Αύγουστος 2008:** Απασχόληση ως Βιολόγος στην ιδιωτική εταιρία βιοτεχνολογίας BIOHELLENIKA ΑΕ (Θεσσαλονίκη). Αντικείμενο: επίβλεψη, προετοιμασία, εφαρμογή υλοποίηση και έλεγχο εργαστηριακών τεχνικών και μοριακών μεθόδων και την διενέργεια κυτταρικών καλλιιεργειών.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Ερευνητική εμπειρία

- **Ιανουάριος 2009-σήμερα:** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα: « Η διερεύνηση του ρόλου του HIF-2α στην κυτταρική ομοιοστασία» στο Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Π. Λιάκου, Επίκουρου Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας
- **Σεπτέμβριος 2007- Σεπτέμβριος 2008:** Εκπόνηση Μεταπτυχιακής Εργασίας με θέμα: «Προσκόλληση των ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων - μετά από επώαση με την *Helicobacter pylori* Neutrophil Activating Protein (HPNAP) και των τμημάτων της - σε ενδοθηλιακά κύτταρα και επίδραση των Αραβινογαλακτανών (AGP) πρωτεϊνών της μαστίχας της Χίου» (Βαθμός:10) στο Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Επιβλέπων: Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Τμήματος Χημείας, Α.Π.Θ.
- **Δεκέμβριος 2005-Δεκέμβριος 2006:** Απασχόληση ως Βιολόγος-Ερευνήτρια με σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II Τίτλος: «Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εξέλιξη του αποφολιδωτικού συνδρόμου και της μετάπτωσής του σε αποφολιδωτικό γλαύκωμα» Επιστημονικός υπεύθυνος: Αν.Καθ. Κώνστας Αναστάσιος.
- **Δεκέμβριος 2005-Αύγουστος 2006:** Απασχόληση ως Βιολόγος-Ερευνήτρια με σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ I Τίτλος: «Πρόληψη της ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης στον διαβήτη» Επιστημονικός υπεύθυνος: Αν.Καθ. Κολιάκος Γεώργιος
- **Μάιος 2005-Ιούνιος 2005:** Συμμετοχή σε έργο Πρακτικής Άσκησης Φοιτητών Τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας Α΄ Παθολογικής Κλινικής Α.Π.Θ. του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Θέμα: Σύστημα Ιστοσυμβατότητας HLA εξετάσεις τυποποίησης των γονιδίων HLA-A, -B, -C και HLA-DRB1* με την μέθοδο της PCR και διασταύρωσης T- και B-λεμφοκυττάρων (cross-match) Υπεύθυνος: Μ. Δανηλίδης Αν.καθ. Παθολογίας-Ανοσολογίας Επιβλέπων: Γιάγκος Μηνάς Επ.Καθηγητής Βιολογίας
- **Σεπτέμβριος 2004-Σεπτέμβριος 2005:** Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας με θέμα: «Επίδραση της ενδοθηλίνης στον αντιμεταφορέα Na⁺/H⁺ στα μονοκύτταρα ανθρώπου και στις αθηρογόνες ιδιότητες των μονοκυττάρων». (Βαθμός:10) στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ. Επιβλέποντες: Καλογιάννη-Δημητριάδη Μάρθα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Σχολή θετικών Επιστημών, ΑΠΘ. Κολιάκος Γεώργιος, Αν.Καθηγητής Βιοχημείας, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά με κριτές

1. **Befani C**, Georgoulas P, Simos G, Liakos P. “Differential effect of true and chemical hypoxia on HIF-2-dependent erythropoietin gene expression and secretion in hepatoma cells.” 2012 Submitted for publication.
2. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, **Befani C**, Liakos P, Simos G and Georgatsou E. “MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization.” Accepted for publication in BBA - Molecular Cell Research 2013.
3. **Befani CD**, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Patrikidou A, Bonanou S, Simos G, Papandreou CN, Liakos P. “Bortezomib represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells.” J Mol Med (Berl). 2012 Jan;90(1):45-54. *Impact factor 5.192*
4. Mylonis I, Sembongi H, **Befani C**, Liakos P, Siniosoglou S, Simos G. “Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression.” J Cell Sci. 2012 Jul 15 125:3485-93 *Impact factor 6,1*
5. Vassilaki N, Kalliampakou KI, Kotta-Loizou I, **Befani C**, Liakos P, Simos G, Mentis AF, Kalliaropoulos A, Doumba PP, Smirlis D, Foka P, Bauhofer O, Poenisch M, Windisch MP, Lee ME, Koskinas J, Bartenschlager R, Mavromara P. “Low Oxygen Tension Enhances Hepatitis C Virus Replication.” J Virol. 2012
6. Tsapakidis K, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, **Befani CD**, Patrikidou A, Hatzidaki E, Daliani DD, Moutzouris G, Liakos P, Papandreou CN. “Bortezomib reverses the proliferative and antiapoptotic effect of neuropeptides on prostate cancer cells.” Int J Urol. 2012 Jun;19(6):565-74. *Impact factor 1,74*
7. Malakasioti G, Alexopoulos E, **Befani C**, Tanou K, Varlami V, Ziogas D, Liakos P, Gourgoulianis K, Kaditis AG. Oxidative stress and inflammatory markers in the exhaled breath condensate of children with OSA. Sleep Breath. 2012 Sep;16(3):703-8
8. Xanthis A, Hatzitolios A, Fidani S, **Befani C**, Giannakoulas G, Koliakos G. “Receptor of Advanced Glycation End Products (RAGE) Positively Regulates CD36 Expression and Reactive Oxygen Species Production in Human Monocytes in Diabetes.” Angiology. 2009 Dec-2010 Jan;60(6):772-9. *Impact Factor: 0.625*
9. Pikilidou MI, **Befani CD**, Sarafidis PA, Nilsson PM, Koliakos GG, Tziolas IM, Kazakos KA, Yovos JG, Lasaridis AN. “Oral Calcium Supplementation Ambulatory Blood Pressure and Relation to Changes in Intracellular Ions and Sodium-Hydrogen Exchange.” Am J Hypertens. 2009 Dec;22(12):1263-9 *Impact Factor 3.122*
10. Kottakis F., **Befani C.**, Asiminas A., Kontou M., Koliakos G. and Choli-Papadopoulou T. “The C-terminal region of HPNAP activates neutrophils and

- promotes their adhesion to endothelial cells” *Helicobacter*. 2009 Jun;14(3):177-9. *Impact Factor: 2.423*
11. Ordoudi SA, **Befani CD**, Nenadis N, Koliakos GG, Tsimidou MZ. “Further Examination of Antiradical Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract Rich in Crocins” *J Agric Food Chem*. 2009 Apr 22;57(8):3080-6 *Impact Factor: 2.532*
 12. Pikilidou MI, Lasaridis AN, Sarafidis PA, **Befani CD**, Koliakos GG, Tziolas IM, Kazakos KA, Yovos JG, Nilsson PM. “Insulin sensitivity increase after calcium supplementation and change in intraplatelet calcium and sodium-hydrogen exchange in hypertensive patients with Type 2 diabetes.” *Diabetic Medicine*. 2009 Mar;26(3):211-9 *Impact Factor: 2.970*
 13. Koliakos GG, **Befani CD**, Mikropoulos D, Ziakas NG, Konstas AG. “Prooxidants-antioxidants balance, peroxides and catalase activity in the aqueous humour and serum of patients with exfoliation syndrome or exfoliative glaucoma”. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*.2008 Oct;246(10):1477-83 *Impact Factor: 1.59*
 14. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, **Befani C**, Koliakos G. “A novel assay for evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients.” *Clinical Biochemistry*. 2007 Feb; 40(3-4):248-54. *Impact Factor: 2.072*
 15. Koliakos G, **Befani C**, Paletas K, Kaloyianni M. “Effect of endothelin on sodium/hydrogen exchanger (NHE) activity of human monocytes and atherosclerosis-related functions.” *Annals of New York Academy of Science*. 2007 Jan;1095:274-91. *Impact Factor: 1.731*

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Διεθνή Συνέδρια

1. Mylonis I, Sembongi H, **Befani C**, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia induces triglyceride accumulation by stimulating expression of lipin 1 in a HIF-1-dependent manner. (Oral Presentation) HypoxiaNet, COST ACTION TD0901 Sensing Hypoxia in the Cell and the Organism, September 20-23, 2012, Essen, Germany
2. Kottakis F., Papadopoulos G., **Befani C**, Asiminas A., Koliakos G. and Choli-Papadopoulou T “New approaches for developing therapeutic drugs against neutrophil activation by HPNAP from *Helicobacter pylori*.” *17th Meeting of Methods in protein Structure Analysis, MPSA 2008 Αύγουστος 26-29, 2008, Sapporo, Japan*
3. **Befani C.**, Koliakos G. and Konstas A. “Aqueous humor and serum altered oxidant-antioxidant balance in exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma.”

(Poster Presentation) 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference 28 Ιουνίου- 3 Ιουλίου, 2008, Αθήνα, Ελλάδα FEBS Journal Volume 275 Supplement 1 (2008) p.263

4. Xanthis A., Hatzitolios A., Fidani S., **Befani C.**, Koliakos G.. “Receptor for advanced glycation end products (RAGE) positively regulates CD36 expression and ROS production in human monocytes in diabetes.” (Poster Presentation) 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference 28 Ιουνίου- 3 Ιουλίου, 2008 Αθήνα, Ελλάδα FEBS Journal Volume 275 Supplement 1 (2008) p.328
5. Xanthis A., Hatzitolios A., **Befani C.**, Koliakos G.. “Soluble receptor of advanced glycation end products is inversely related to coronary atheromatosis in diabetics.” (Poster Presentation) 77th Congress of the European Atherosclerosis Society
6. Koliakos G., **Befani C.**, Kaloyianni M. “NHE-1: a molecular target for signalling and cell – matrix interactions.” (Oral Presentation) FEBS Advanced Lecture Course – Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets 21-26 Μάιος, 2007 Πάτρα, Ελλάδα
7. Paletas K., Hamidi Alamdari D., Sarigianni M., Tsapas A., **Befani C.**, Koliakos G. “Prooxidant antioxidant balance in obese diabetic 2 patients.” (Poster Presentation) 15th European Congress on Obesity (ECO) Απρίλιος 22-25, 2007, Budapest, Hungary
8. Koliakos G., **Befani C.**, Paletas K., Kaloyianni M. “Effect of endothelin on sodium/hydrogen exchanger (NHE) activity of human monocytes and atherosclerosis-related functions.” (Poster Presentation) Cell Signaling World 2006. Ιανουάριος 25-28, 2006 Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Luxembourg
9. Koliakos G., **Befani C.**, Paletas K., Kaloyianni M. “Effect of endothelin on sodium/hydrogen exchanger (NHE) activity of human monocytes and atherosclerosis-related functions.” (Poster Presentation) 9th International Conference on Endothelin (ET-9) Σεπτέμβριος 11-14, 2005, Utah, USA

Ελληνικά Συνέδρια

1. **Befani C.**, Mylonis I., Georgoulas P., Simos G. and Liakos P. “MAPK and CK1 are critical modulators of HIF-2 specific target gene activation in hepatoma cells.” (Παρουσίαση poster) 63rd Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, VOLUME 58, 2012, Ηράκλειο, Κρήτη
2. Lyberopoulou A., Mylonis I., Papachristos G., Sagris D., Kalousi A., **Befani C.**, Liakos P., Simos G. and Georgatsou E. “MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity in an oxygen-independent manner blocking its dimerization.” (Προφορική Παρουσίαση) 63rd Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, VOLUME 58, 2012, Ηράκλειο, Κρήτη

3. Vassilaki N., Kalliampakou K.I., Kotta-Loizou I., **Befani C.**, Liakos P., Simos G., Mentis A.F., Kalliaropoulos A., Doumba P.P., Smirlis D., Bauhofer O., Poenisch M., Windisch M.P., Lee M.E., Koskinas J., Bartenschlager R. and Mavromara P. “Low Oxygen Tension Enhances Hepatitis C Virus Replication” (Παρουσίαση poster) 63rd Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, VOLUME 58, 2012, Ηράκλειο, Κρήτη
4. **Befani C.**, Vlachostergios P, Hatzidaki E, Bonanou S, Simos G, Papandreou C, Liakos P. “The proteasome inhibitor, Bortezomib, represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells.” Προφορική παρουσίαση 62nd Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2011 Αθήνα
5. **Befani C.**, Simos G, Georgoulis P, Liakos P. “The effects of cobalt and hypoxia on the induction of HIF-2 α and transactivation of its specific target genes in hepatoma cells.” (Προφορική παρουσίαση) 61st Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 2010 Αλεξανδρούπολη
6. **Befani C.**, Simos G, Liakos P. “Regulation of expression and activity of hypoxia inducible factor 2 α (HIF-2 α) by hypoxia, desferrioxamine and cobalt in Huh-7 hepatoma cells.” 60th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology ,2009, Αθήνα
7. Μαλλίνη Π., **Μπεφάνη Χ.**, Εμπεσλίδης Θ, Κώνστας Α.Γ., Κολιάκο Γ. «Σχέση οξειδωτικού στρες και παραγόντων φλεγμονής σε καλλιέργειες κυττάρων δικτυωτού σώματος του οφθαλμού.» (Προφορική Παρουσίαση) 6^o Πανελλήνιο συνέδριο Ελευθέρων ριζών και Οξειδωτικού Στρες Σεπτέμβριος 18-21, 2008 Πράμαντα Ιωαννίνων
8. **Befani C.**, Konstas A., Koliakos G. “Evaluation of catalase activity peroxides and oxidants-antioxidants balance in aqueous humor and serum from patients with exfoliation syndrome and exfoliative glaucoma”. (Παρουσίαση poster) 59th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology Δεκέμβριος ,2007, Αθήνα
9. **Μπεφάνη Χ.**, Κολιάκος Γ., Hamidi Alamdari Daryoush, Κώνστας Α. «Ενζυμική ενεργότητα της καταλάσης στο υδατοειδές υγρό και στο πλάσμα και δείκτες οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σύνδρομο αποφολίδωσης/ γλαύκωμα αποφολίδωσης.» (Παρουσίαση poster) 29ο Επιστημονικό Συνέδριο, Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών Μάιος 17-19, 2007, Καβάλα
10. **Befani C.**, Paletas K, Koliakos G, Kaloyianni M. “ET-1 induces a signalling pathway with the involvement of PKC, MAPK, PI3K, NADPH oxidase where NHE1 plays a key role.” (Παρουσίαση poster) 58th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology Νοέμβριος 9-11, 2006 Πάτρα
11. Hamidi Alamdari D., Παλέτας Κ, Πέγιου Θ, Σαρηγιάννη Μ, **Μπεφάνη Χ.**, Κολιάκος Γ. «Μία νέα μέθοδος για τη μέτρηση της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών.» (Παρουσίαση poster) 5ο Πανελλήνιο

Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών Και Οξειδωτικού Στρες 28 Σεπτεμβρίου 1
Οκτωβρίου 2006 Καρδαμύλη Μεσσηνίας

12. Konstantinidis D., **Befani C.**, Sailer X., Kaloyianni M. and Koliakos G. “Effects of leptin, endothelin and angiotensin on monocyte laminin adhesion and migration.” (Προφορική Παρουσίαση) 8th Annual meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology Απρίλιος 14-15, 2006 Ηράκλειο Κρήτης
13. **Μπεράνη Χ.**, Κολιάκος Γ., Παλέτας Κ., Καλογιάννη Μ. «Επίδραση ενδοθηλίνης στην έκφραση του «ρακοσυλλέκτη» CD36 υποδοχέα και στον αντιμεταφορέα Na^+ - H^+ στα μονοκύτταρα ανθρώπου» 27^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Μάιος 12-14, 2005 Ναύπλιο

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Άριστη γνώση Αγγλικών, πτυχίο Proficiency του πανεπιστημίου του Michigan
- Καλή γνώση Η/Υ (Microsoft office, προγράμματα Βιοπληροφορικής)

ΛΟΙΠΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

- Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ "

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΜΠΕΦΑΝΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**, *Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων),*
2. **Δρ. Γεώργιος Σίμος**, *Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
3. **Δρ. Ελένη Γεωργιάτσου**, *Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία, HIF-1α και HIF-2α, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Ο HIF-1α είναι καλά χαρακτηρισμένος, ενώ ο HIF-2α και οι διαφορές του με τον HIF-1α δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Έτσι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης και ενεργοποίησης του HIF-2α και συγκρίθηκαν με εκείνους του HIF-1α.

Αρχικά, διερευνήθηκε ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία «μιμητών της υποξίας», όπως το κοβάλτιο, η δεσφερριόξαμίνη και το DMOG. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι τόσο η υποξία, όσο και οι «μιμητές της υποξίας» επάγουν την έκφραση του HIF-2α. Η υποξία και το κοβάλτιο, σε αντίθεση με τη δεσφερριόξαμίνη και το DMOG, δρουν επάγοντας τη μετάφραση του HIF-2α. Η υποξία επάγει τον HIF-2α με τη συμμετοχή του μονοπατιού της PI3K και των ROS, ενώ το κοβάλτιο χρησιμοποιεί επιπλέον το μονοπάτι των ERK. Παρόλο που ο HIF-2α εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα παρουσία κοβαλτίου, δεν είναι μεταγραφικά ενεργός, σε αντίθεση με την υποξία, τη δεσφερριόξαμίνη και το DMOG, στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά βρέθηκε ότι το κοβάλτιο δεν επάγει τα ειδικά γονίδια στόχους του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, όπως τη μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2*, τα επίπεδα του mRNA και τα εκκρινόμενα επίπεδα της EPO. Ωστόσο, το κοβάλτιο επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε μη ηπατικά καρκινικά κύτταρα και επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο μηχανισμός μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του HIF-2α και διαπιστώθηκε ότι εμπλέκεται η κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) και η κινάση ERK1/2. Βρέθηκε ότι η CK1 επηρεάζει αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση του, πιθανόν μέσω φωσφορυλίωσης του στη Ser 249, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Αυτό επιβεβαιώθηκε με πειράματα χημικής αναστολής της CK1 και αποσιώπησής της με siRNA, με υπερέκφραση της ενεργής μορφής της CK1δ καθώς και υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α Ser²⁴⁹ σε Ala (S249A), η οποία εμποδίζει τη φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1, καθώς και της «φωσφομιμητικής» μετάλλαξης Ser²⁴⁹ σε Asp (S247D). Όσον αφορά την ERK1/2, διαπιστώθηκε ότι η ERK1/2 ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, χωρίς να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, αλλά αναστέλλοντας το μηχανισμό εξόδου του HIF-2α από τον

πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την διατήρηση του στον πυρήνα. Επίσης, βρέθηκε για πρώτη φορά ότι η αμινοξική περιοχή 366-542 του HIF-2α πιθανόν να περιέχει ένα ή περισσότερα σήματα πυρηνικής εξαγωγής τα οποία επηρεάζονται άμεσα ή έμμεσα από τη δράση της ERK1/2.

Επόμενο στόχο της διατριβής αποτέλεσε η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην επαγωγή του HIF-1α σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη και του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Βρέθηκε ότι η βορτεζομίδη μειώνει την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1α μέσω απενεργοποίησης του μονοπατιού PI3k/Akt. Επίσης μειώνει και την επαγόμενη από την υποξία μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω αναστολής των ERK1/2 και μείωσης του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-1α σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη. Ωστόσο, η δράση της βορτεζομίδης στον HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, φαίνεται να είναι διαφορετική. Η βορτεζομίδη δεν επηρεάζει την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-2α αλλά μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

Τα αποτελέσματα αυτά συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης και δράσης του HIF-2α και αναδεικνύουν και υπογραμμίζουν τις διαφορές απόκρισης των HIF-1α και HIF-2α στην υποξία ή παρουσία «μιμητών της υποξίας» αντικατοπτρίζοντας τον διακριτό τους ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία.

ABSTRACT

The hypoxia inducible transcription factors, HIF-1 α and HIF-2 α , play central roles in the cellular response to hypoxia. In the present thesis, the molecular mechanisms of HIF-2 α expression and regulation were investigated.

First, the mechanism of HIF-2 α induction under hypoxia or in the presence of the “hypoxia mimetics”, cobalt, DFO and DMOG, was examined in hepatoma cells. The results of this study show that hypoxia and “hypoxia mimetics” induce HIF-2 α expression. Hypoxia and cobalt, unlike desferrioxamine (DFO) and DMOG, require ongoing protein synthesis. Hypoxia induces HIF-2 α protein expression by a reactive oxygen species (ROS) - and PI3K-dependent mechanism, while cobalt induces HIF-2 α protein expression by a ROS-, PI3K- and ERK1/2-dependent mechanism. However, cobalt, unlike hypoxia, does not induce the transcriptional activity of HIF-2. Specifically, it was shown for the first time that cobalt cannot activate the HIF-2 α dependent *SOD2* promoter, *EPO* mRNA synthesis or EPO secretion. This negative effect of cobalt was cell type specific and was not observed for HIF-1.

Second, mechanisms of HIF-2 α post-translational regulation were studied and it was found that they involve kinases CK1 and ERK1/2. CK1 affects negatively the transcriptional activity of HIF-2, without affecting HIF-2 α protein expression levels, possibly by phosphorylating Ser 249 of HIF-2 α in hepatoma cells. This result was obtained by inhibition of CK1, silencing of CK1 δ by siRNA, overexpression of the active form of CK1 δ and overexpression of the mutant S249A form of HIF-2 α or the HIF-2 α mutant S249D carrying the ‘phosphomimetic’ mutation. On the other hand, ERK1/2 enhanced HIF-2 transcriptional activity, also without affecting HIF-2 α protein expression levels but by inhibiting HIF-2 α nuclear export and stimulating its nuclear accumulation in hepatoma cells. Deletion studies suggest the HIF-2 α amino acid region 366-542 contains a nuclear export signal which is controlled by ERK1/2-dependent phosphorylation.

The third aim of the thesis was the investigation of the effect of proteasome inhibitor bortezomib on induction of HIF-1 α in prostate cancer cells and HIF-2 α in hepatoma cells. Under hypoxia, bortezomib inhibited HIF-1 α protein synthesis by impairing the PI3K/Akt/mTOR pathway and decreased HIF-1 α nuclear accumulation and transcriptional activity by interfering with the ERK1/2 pathway in PCa cells. The effect of bortezomib on HIF-2 α expression and activity in hepatoma cells was identical.

Bortezomib does not affect the hypoxic induction of HIF-2 α , but represses its transcriptional activity in hepatoma cells.

These results contribute to the elucidation of the mechanisms of HIF-2 α induction or activation and to understanding the differences in the regulation of HIF-1 α and HIF-2 α by hypoxia and cobalt that may reflect their discrete role in cellular homeostasis.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ActD: Ακτινομυκίνη D

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

bHLH: Βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας

BSA: Αλβουμίνη ορού βοδιού

Chx: Κυκλοεξιμίδιο

CIP: Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού

cDNA: Συμπληρωματικό DNA

CK1: Κινάση καζεΐνης 1

DAPI: 4', 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο

DFO: Δεσφερριοξαμίνη

DMOG: Διμεθυλοξαλλο-γλυκίνη

DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DTT: Διθειοθρεϊτόλη

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EPO: Ερυθροποιητίνη

FBS: Ορός εμβρύου βοός

FITC: Ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη

GFP: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GST: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης

HEPES: N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ

HIF-1α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α

HIF-2α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2α

HRE: Στοιχείο απόκρισης στην υποξία

HRP: Υπεροξειδάση του αγριοραδικιού

IPTG: Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο

LB: Luria Broth

MAPK: Κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα

MCS: Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης

NAC = N-ακετυλο-L-κυστεΐνη

mTOR: Στόχος της ραπαμκίνης

PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PGK: Κινάση του φωσφορογλυκερινικού οξέος

PHD: Πρόλυλο-υδροξυλάση

PI3K: Κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης

PMSF: Φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

ROS: Ενεργές ρίζες οξυγόνου

SDS: Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο

SOD2: Δισμουτάση του υπεροξειδίου

SV40: Simian Virus 40

TEMED: N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

Tris: Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

VEGF: Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF	27
1.1.1 HIF-1α.....	28
1.1.2 HIF-2α.....	29
1.1.3. HIF-3α.....	31
1.1.4 HIF-1β ή ARNT.....	31
1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ	32
1.2.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση..... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	32
1.2.1.1 Υδροξυλίωση των HIF-1/2α.....	32
1.2.1.2 Ρύθμιση των HIF-1/2α από τα μιτοχόνδρια και τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)	37
1.2.1.3 Ρύθμιση των HIF-1/2α από τη διακοπτόμενη υποξία.....	39
1.2.2 Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση	39
1.2.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής	39
1.2.2.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης.....	40
1.2.2.3 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σταθερότητας.....	43
Ενώσεις που «μιμούνται» την υποξία	43
Αναστολείς πρωτεασώματος.....	44
Άλλες πρωτεΐνες.....	48
1.2.2.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	49
Φωσφορυλίωση.....	49
Ακετυλίωση.....	52
Σουμοϋλίωση.....	53
Άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις.....	54
1.2.2.5 Μεταφορά των HIF-1/2α στον πυρήνα, ετεροδιμερισμός με τον ARNT και σύνδεση με το DNA	54
1.3 ΚΟΙΝΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ HIFs	56
1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	59
1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ.....	60
1.5.1 Γενικά.....	60
1.5.2 Ο ρόλος του HIF-2α στην παραγωγή της ερυθροποιητίνης.....	62

1.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	65
1.6.1 HIF-2 και καρκίνος.....	65
1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	70
1.7 ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ.....	71
1.7.1 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1).....	71
1.7.2 Η οικογένεια των κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK).....	72
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	74
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	75
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	75
2.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	75
2.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	75
2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	75
2.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA)	79
2.1.5 Αλληλούχηση (sequencing)	81
2.1.6 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια	81
2.1.7 Υλικά μοριακής βιολογίας	81
2.1.8 Αντισώματα.....	81
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	82
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	82
2.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών	83
2.2.3 Μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α.....	83
2.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα.....	84
2.2.5 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα.....	84
2.2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	85
2.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	85
2.2.8 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	86
2.2.9 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού	88
2.2.10 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια pEGFP και pCDNA3 ..	89
2.2.11 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA	89
2.2.12 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α.....	90
2.2.13 Προσδιορισμός της πρωτεασωματικής δραστηριότητας.....	91

2.2.14 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων VEGF σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών	92
2.2.15 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων ερυθροποιητίνης σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών	92
2.2.16 Απομόνωση ολικού κυτταροπλασματικού RNA.....	93
2.2.17 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA, Φασματο- φωτομέτρηση RNA.....	93
2.2.18 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR).....	94
2.2.19 Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-2α με PCR	97
2.2.20 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	98
2.2.21 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση (Site-directed mutagenesis)	99
2.2.22 Κλωνοποίηση του HIF-2α και τμημάτων του σε πλασμιδιακούς φορείς	101
2.2.23 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός E.coli Top10 και E.coli BL21RIL	102
2.2.24 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)	103
2.2.25 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)	103
2.2.26 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουλεάσες.....	104
2.2.27 Επαγωγή της έκφρασης των GST-πρωτεϊνών σε κύτταρα E.coli BL21RIL με IPTG ..	104
2.2.28 Λύση των κυττάρων E.coli με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος ..	105
2.2.29 Καθαρισμός των GST-πρωτεϊνών με χρωματογραφία αχιστείας σε στήλη GSH-Sepharose	105
2.2.30 Διαπίδυση	106
2.2.31 Καθαρισμός αντισώματος με τη χρήση πρωτεΐνης ακινητοποιημένης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	107
2.2.32 Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2α με προγράμματα βιοπληροφορικής	107
2.2.33 Στατιστική ανάλυση.....	108
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	109
3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ HIF-2α	109
3.1.1. Κατασκευή ανασυνδυασμένου HIF-2α.....	109
3.1.2. Παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του ανθρώπινου HIF-2α από ορό κουνελιού.	110
3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-2α	117

3.2.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΙΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7	117
3.2.1.1. Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7.	117
3.2.1.2. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7.....	119
3.2.1.3. Ο ρόλος της μεταγραφής στην επαγωγή του HIF-2α.	119
3.2.1.4. Ρόλος της πρωτεϊνσύνθεσης στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.....	121
3.2.1.5. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2 στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.	123
3.2.1.6. Ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.	124
3.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΟΥ HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Huh7.....	126
3.2.2.1. Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.	126
3.2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Huh7.....	127
3.2.3.1. Εύρεση ειδικών μεταγραφικών στόχων για τον HIF-2 και τον HIF-1 σε κύτταρα Huh7.	127
3.2.3.2. Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων του υποξικού στρες στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.....	132
3.2.3.3. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης.....	134
3.2.3.4. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην HIF-1 εξαρτώμενη μεταγραφή του γονιδίου του PGK.....	136
3.2.3.5. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της ερυθροποιητίνης.....	138
3.2.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΟΒΑΛΤΙΟ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.	141
3.2.4.1. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην έκφραση του HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα HepG2, Saos2 και Hep2.....	141

3.2.4.2. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και του HIF-2.....	142
3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α.....	147
3.3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1 (CK1).....	147
3.3.1.1. Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης 1 (CK1) στην έκφραση και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.....	148
3.3.1.2. Επίδραση της υπερέκφρασης της CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.....	151
3.3.1.3. Επίδραση των μεταλλάξεων S249A και S249D στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.....	152
3.3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.....	155
3.3.2.1. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.....	155
3.3.2.2. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 156
3.3.2.3. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 σε κύτταρα Huh7.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 159
3.3.2.4. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό τμημάτων του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.....	162
3.3.2.5. Ανάλυση της περιοχής 366-542 με προγράμματα βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη πιθανών NES και πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2.....	167
3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ.....	169
3.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.....	169
3.4.1.1. Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας στην έκφραση των HIF-2α και HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.	169
3.4.1.2. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt/mTOR και ERK1/2 στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.	170

3.4.1.3. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3.	172
3.4.1.4. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος, βορτεζομίδη, στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.....	173
3.4.1.5. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος, βορτεζομίδη, στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3.	176
3.4.1.6. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.	179
3.4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7.	181
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	185
4.1 Μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α από την υποξία ή τους «μιμητέν» της υποξίας σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7	186
4.2. Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας και των «μιμητών» της υποξίας στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.	191
4.3. Μελέτη της μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του HIF-2α.....	197
4.3.1. Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζεΐνης 1 (CK1). 197	
4.3.1. Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τις κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK1/2).....	199
4.3. Μελέτη της επίδρασης της αναστολής του πρωτεασώματος στην επαγωγή των HIF-1 και HIF-2.....	204
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	210

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οξυγόνο (O_2) άρχισε να συσσωρεύεται στην ατμόσφαιρα της γης πριν 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια. Η αυξημένη διαθεσιμότητα του ατμοσφαιρικού O_2 οδήγησε στην εξέλιξη ενός εξαιρετικά αποδοτικού συστήματος, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στην οποία το O_2 είναι αποδέκτης ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας των κυττάρων με τη μορφή ATP, και μετάβαλε μια σειρά από βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Κατά την εξέλιξη, οι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου σε επίπεδο κυττάρων και συστημάτων, οι οποίοι δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης οξυγόνου, όπως στην αύξηση των επιπέδων του (υπεροξία) ή στη μείωση (υποξία). Η υπεροξία μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου και οξειδωτικές βλάβες. Η υποξία σε φυσιολογικές καταστάσεις αποτελεί το απαραίτητο εξωκυττάριο ερέθισμα για την ομαλή εμβρυογένεση και την διατήρηση της πολυδυναμίας των στελεχιαίων κυττάρων. Αντίθετα, σε παθολογικές καταστάσεις η υποξία είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο σε οξείες και χρόνιες ισχαιμίες και συμπαγείς καρκινικούς όγκους. Οι υποξικές αυτές συνθήκες αναπτύσσονται σε περιοχές όπου σχηματίζονται ατελή αγγεία και δημιουργείται ελλιπή αιματική ροή, ενώ μπορούν προκαλέσουν μεταβολικές διαταραχές και νέκρωση ιστών.

Τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά κύτταρα αποκρίνονται στην υποξία με αλλαγές της έκφρασης γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων βοηθούν στην προσαρμογή των κυττάρων, προάγοντας τον αναερόβιο μεταβολισμό, την ερυθροποίηση, την αγγειοδιαστολή, την αγγειογένεση, την απόπτωση και την μετάσταση. Η επαγωγή από την υποξία των διαφορετικών αυτών γονιδίων, ορισμένα από τα οποία εκφράζονται γενικά και ορισμένα ιστοειδικά, φαίνεται ότι εξαρτάται από ένα κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor HIFs).

1.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

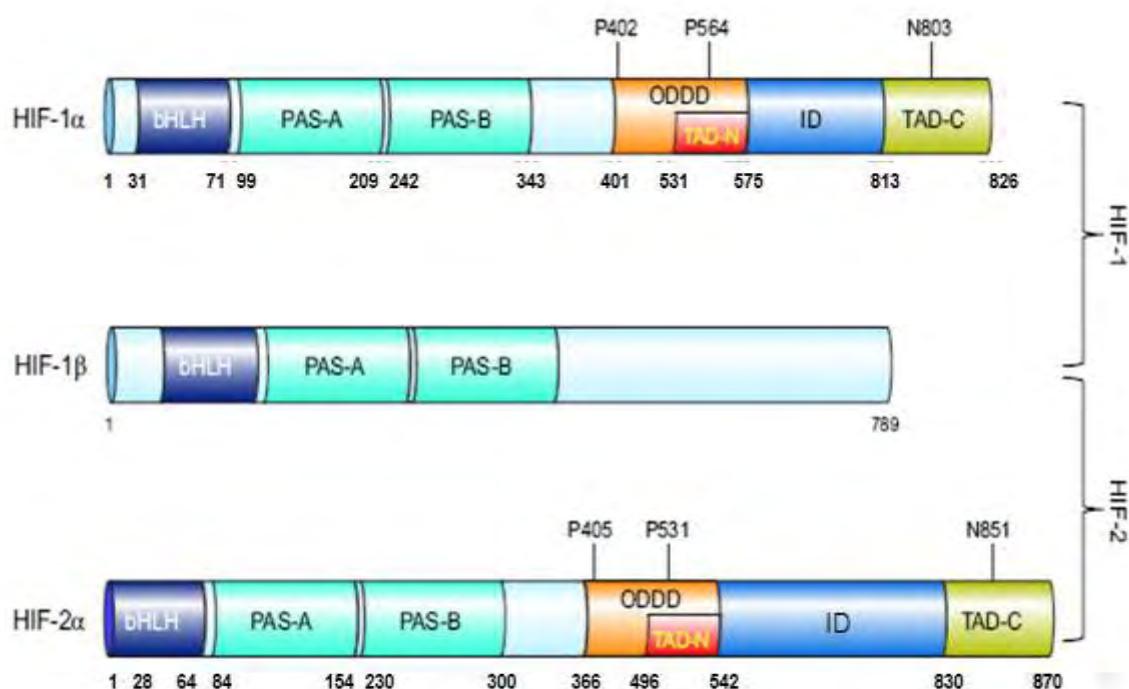
Οι επαγόμενοι από την υποξία HIFs ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM, bHLH/PAS). Οι bHLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό και την σύνδεση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Το όνομα της περιοχής PAS προήλθε από τα πρώτα γνωστά μέλη της οικογένειας: των γονιδίων period (Per) και single-minded (Sim) της *Drosophila* και των γονιδίων aryl hydrocarbon receptor (AHR) και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) των θηλαστικών. Η περιοχή PAS περιέχει δύο εσωτερικές ομόλογες υποπεριοχές τις A και B που έχουν βασικά αμινοξέα και οι οποίες εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών (Wang, GL et al., 1995).

Οι πρωτεΐνες HIFs είναι ετεροδιμερείς, αποτελούμενες από δυο υπομονάδες, την α-υπομονάδα, η οποία είναι οξυγονοεξαρτώμενη και παρουσιάζει 3 ισομορφές (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) και τη β-υπομονάδα (ARNT) η οποία έχει σταθερή έκφραση και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση οξυγόνου. Η α και η β υπομονάδες σχηματίζουν ένα ενεργό σύμπλοκο HIF-α/ARNT στον πυρήνα του κυττάρου, προσδένονται σε ειδική αλληλουχία του DNA των γονιδίων στόχων και επάγουν τη μεταγραφή τους (Semenza, GL 2007, 2009).

1.1.1 HIF-1α

Ο HIF-1 ανακαλύφθηκε το 1992 μέσω της ανάλυσης των μοριακών μηχανισμών επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) (Semenza, GL and Wang, GL 1992, Semenza, GL 2007, Weidemann, A and Johnson, RS 2008). Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη καθώς εμφανίζει περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α είναι διαρκής αλλά η σταθεροποίησή της εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου. Επίσης ο HIF-1α φαίνεται να εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει μια περιοχή βασικών αμινοξέων (17-30), την περιοχή HLH (αμινοξέα 31-71) και την περιοχή PAS (αμινοξέα 99-343) με τις A (99-209) και B (242-343) υποπεριοχές. Ο HIF-1α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), οι οποίες εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α, μια αμινοτελική, την N-TAD

(αμινοξέα 531-575) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 813-826). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (Oxygen Dependent Degradation) (αμινοξέα 401-603) που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (Dery, MA et al., 2005) (Εικόνα 1). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear localization signals) τα N-NLS (αμινοξέα 17-74) και CNLS (αμινοξέα 718-721) (Kallio, PJ et al., 1998).



Εικόνα 1: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α, HIF-2α και ARNT. Οι πρωτεΐνες περιέχουν μια περιοχή bHLH που ευθύνεται για την πρόσδεσή τους στο DNA και δύο PAS περιοχές (A & B) που βοηθούν στον ετεροδιμερισμό τους (με τον ARNT). Στο καρβοξυτελικό του άκρο οι HIF-1α και HIF-2α περιέχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής N-TAD και C-TAD (ενώ ο ARNT έχει μια περιοχή TAD), και την περιοχή ODD που είναι υπεύθυνη για την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμησή του.

1.1.2 HIF-2α

Ο HIF-2α, ο οποίος έχει 870 αμινοξέα, ανακαλύφθηκε το 1997 από τέσσερα ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια ως endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) (Tian, H et al., 1997) ή HIF-related factor (HRF) (Flamme, I et al., 1997) ή HIF-like factor

(HLF) (Ema, M et al., 1997) ή MOP2 (member of PAS family 2) (Hogenesch, JB et al., 1997)

Ο HIF-2α αρχικά ανιχνεύτηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Στη συνέχεια, με λεπτομερείς μελέτες σε όλους τους ιστούς σε συνθήκες υποξίας βρέθηκε ότι ο HIF-2α εκφράζεται στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, σε όργανα όπου η δράση του φαίνεται να υπερέχει έναντι του HIF-1α (Tian, H et al., 1997, Wiesener, MS et al., 2003). Επίσης, με πειράματα ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύθηκε η έκφραση του HIF-2α σε ηπατοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου, νεφρικά κύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και αστροκύτταρα όταν αυτά υποβάλλονται σε συστηματική υποξία (Wiesener, MS et al., 2003). Ενδιαφέρον είναι ότι τα επίπεδα του mRNA του HIF-2α είναι υψηλά σε ιστούς που είναι κυρίως υπεύθυνοι για τη μεταφορά οξυγόνου, όπως στον πνεύμονα, την καρδιά και το ενδοθήλιο (Tian, H et al., 1997), (Wiesener, MS et al., 2003). Στον πνεύμονα, ως απάντηση στην υποξία, η πρωτεΐνη του HIF-2α σταθεροποιείται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου ο HIF-1α δεν εντοπίζεται. Τα επίπεδα των mRNA του HIF-2α ρυθμίζονται στον πνεύμονα κατά την ανάπτυξη, με επαγωγή τους κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Επίσης ο HIF-2α εκφράζεται στα κύτταρα της νευρικής κορυφής, τα οποία συνθέτουν ορμόνες σημαντικές για τη ρύθμιση του καρδιακού τόνου και στο όργανο του Zuckerkandl, σημαντικό για τη σύνθεση των κατεχολαμινών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Patel, SA and Simon, MC 2008).

Ο HIF-2α παρουσιάζει περίπου 48% ομολογία με τον HIF-1α και ο υψηλότερος βαθμός ομολογίας εντοπίζεται στις περιοχές bHLH με ποσοστό 85%, και στις περιοχές PAS-A και PAS-B με 68% και 73% αντίστοιχα (Tian, H et al., 1997, Hu, CJ et al., 2003). Στην αμινοτελική περιοχή του HIF-2α όπως και του HIF-1α βρίσκονται τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για το διμερισμό τους με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs. Πιο αναλυτικά, η περιοχή του HIF-2α που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 28-64 αποτελεί την περιοχή HLH και τα αμινοξέα 84-347 την περιοχή PAS, στην οποία περιλαμβάνονται οι υποπεριοχές A (84-154) και B (230-300). Ο HIF-2α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό τμήμα του συνόλου του HIF-2α, μια αμινοτελική, την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 830-870). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (αμινοξέα 366-619), η οποία παίζει ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη σταθερότητα της

πρωτεΐνης. Η N-TAD περιοχή, η οποία έχει μικρή ομολογία ανάμεσα στον HIF-1α και στον HIF-2α (40%), είναι εκείνη που απονέμει την εξειδίκευση για τα γονίδια στόχους. Η αντικατάστασή της N-TAD περιοχής του HIF-2α από την αντίστοιχη του HIF-1α έχει δείξει ότι μεταβάλλει την εξειδίκευση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων (Hu et al 2003). Η C-TAD περιοχή και των δύο ισομορφών έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συσυνεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι μεταξύ άλλων ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α περιέχει δυο πιθανά NLS, τα N-NLS (αμινοξέα 14-50) και C-NLS (αμινοξέα 705-742) (Luo, JC and Shibuya, M 2001).

1.1.3. HIF-3α

Ο HIF-3α, ο οποίος ανακαλύφθηκε μεταγενέστερα των HIF-1α και HIF-2α, έχει ομοιότητες με αυτούς ως προς τις περιοχές bHLH (75% και 76% ομολογία αντίστοιχα) και PAS (34% και 36% ομολογία στην PAS-A, 40% και 36% στην PAS-B), δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD, αλλά μόνο την περιοχή N-TAD. Ο HIF-3α ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-3, αλλά η μεταγραφική ενεργότητά του διαφέρει από αυτή των HIF-1 και HIF-2. Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ένα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α, το ανασταλτικό PAS ή IPAS, το οποίο εκφράζεται στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας και το κερατοειδικό επιθήλιο. Το IPAS δεν έχει ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής, αλλά μάλλον αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του HIF-1α και εμποδίζει την πρόσδεσή του στο DNA δρώντας σαν ένας επικρατής αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1. Ωστόσο η έκφραση του IPAS μπορεί να επάγεται από την υποξία στην καρδιά και στον πνεύμονα συμβάλλοντας σε αρνητική ανατροφοδότηση της δράσης του HIF-1 σε αυτούς τους ιστούς (Makino, Y et al., 2007).

1.1.4 HIF-1β ή ARNT

Ο HIF-1β είναι ταυτόσημος με την πρωτεΐνη ARNT η οποία έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με τον παράγοντα AHR προς σχηματισμό του λειτουργικού υποδοχέα της διοξίνης. Ωστόσο ο ARNT ετεροδιμερίζεται και με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH-PAS όπως είναι ο HIF-1α, -2α, η Single-minded protein 1 και 2 (SIM 1 & 2) και ο

παράγοντας Cardiovascular helix-loop-helix factor 1 (CHF1) (Beischlag, TV et al., 2008). Ο ARNT αποτελείται από 798 αμινοξέα και στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει ένα NLS, μια περιοχή bHLH και την PAS περιοχή, οι οποίες αντίστοιχα ευθύνονται για τον πυρηνικό του εντοπισμό, την πρόσδεση στο DNA και τον ετεροδιμερισμό του (Εικόνα 1). Στο καρβοξυτελικό του άκρο υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής η οποία δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στη μεταγραφική ενεργότητα των ετεροδιμερών HIF-1/2α/ARNT ή AhR/ARNT (Dery, MA et al., 2005). Δύο ακόμη ισομορφές του ARNT (ARNT2 και ARNT3) έχουν περιγραφεί, ωστόσο αυτοί κυρίως συμμετέχουν σε μη οξυγόνο-εξαρτώμενα μονοπάτια όπως στην ανάπτυξη του υποθαλάμου και ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού αντίστοιχα (Bunger, MK et al., 2000, Michaud, JL et al., 2000, Keith, B et al., 2012).

1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF- α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

Οι μεταγραφικά ενεργές α υπομονάδες των HIF είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων ρυθμίσεων που συμβαίνουν σε διάφορα στάδια. Πιο συγκεκριμένα, κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η μεταγραφή των γονιδίων των HIF-1 α και HIF-2 α , η σύνθεση και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης τους καθώς και η είσοδός τους στον πυρήνα, ο διμερισμός τους με τον ARNT, η πρόσδεση στο DNA και η αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της μεταγραφής ρυθμίζονται τόσο από οξυγόνο-εξαρτώμενες όσο και από οξυγόνο-ανεξάρτητες διαδικασίες.

1.2.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση

Στην συνέχεια της διατριβής θα αναφέρεται ο όρος HIF-1/2 α , όταν τα δεδομένα αντιστοιχούν και στις δύο ισομορφές HIF-1 α και HIF-2 α .

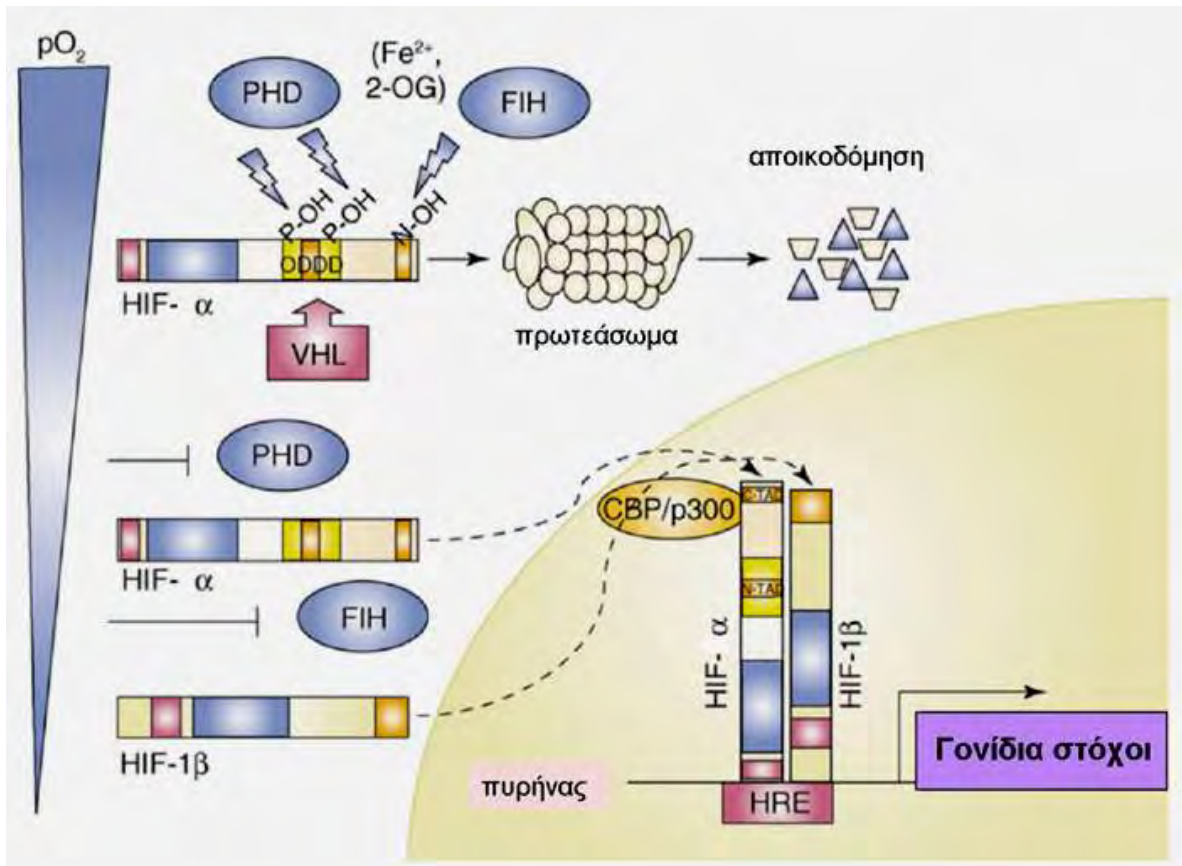
1.2.1.1 Υδροξυλίωση των HIF-1/2 α

Η μεγάλη ομολογία του HIF-1 α με τον HIF-2 α , παρέχει τη μοριακή βάση για κοινή ρύθμιση αφενός της σταθερότητας της πρωτεΐνης τους με οξυγόνο-εξαρτώμενο τρόπο και αφετέρου της μεταγραφικής ενεργότητας της C-TAD περιοχής τους μέσω

υδροξυλιώσης μίας συντηρημένης ασπαραγίνης από τον «παράγοντα αναστολής του HIF» (Factor Inhibiting HIF, FIH-1).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι HIF-1/2α παράγονται συνεχώς αλλά αμέσως αποικοδομούνται στο 26S πρωτεάσωμα. Αρχικά, οι HIF-1/2α υδροξυλιώνονται σε δύο κατάλοιπα προλίνης, P402/P564 του HIF-1α και P405/P531 του HIF-2α, που βρίσκονται στην περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD) από τις υδροξυλάσες προλίνης ή προλυλο-υδροξυλάσες (Proline Hydroxylase Domain, PHD) (Εικόνα 2). Οι PHDs συναντώνται σε τρεις ισομορφές τις PHD1, PHD2 και PHD3 και υδροξυλιώνουν προλίνες που περιέχονται στο συντηρημένο μοτίβο LeuXxxXxxLeuAlaPro στην ODD περιοχή των HIF-1/2α. Τα ένζυμα αυτά είναι μέλη της υπερικογένειας των διοξυγενασών, περιέχουν Fe^{+2} στο καταλυτικό τους κέντρο και απαιτούν οξυγόνο (O_2), α-κετογλουταρικό και ασκορβικό για τη δράση τους. Πιο αναλυτικά, η αντίδραση εξαρτάται απόλυτα από το οξυγόνο, αφού το άτομο του οξυγόνου για το σχηματισμό της υδροξυλομάδας στην προλίνη προέρχεται από το μοριακό οξυγόνο. Το α-κετογλουταρικό είναι απαραίτητο καθώς χρησιμοποιεί το άλλο άτομο οξυγόνου και αποκαρβοξυλιώνεται σχηματίζοντας CO_2 και ηλεκτρικό οξύ. Επίσης, το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του σιδήρου στη μορφή Fe^{2+} για τον επόμενο καταλυτικό κύκλο (Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008). Πρόσφατα, βρέθηκε μία ακόμη PHD του ενδοπλασματικού δικτύου, η οποία ονομάζεται P4H-TM, επάγεται από την υποξία και υδροξυλιώνει τους HIF-1/2α *in vitro* αλλά η σημασία της δεν έχει διασαφηνιστεί (Koivunen, P et al., 2007).

Η προλυλο-υδροξυλίωση του HIF-1/2α επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau, pVHL) μέσω της β περιοχής του, με την περιοχή ODD των HIF-1/2α και τους ουβικιτινώει. Ο pVHL αποτελεί συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και έπειτα από την πρόσδεσή του στους HIF-1/2α προσδένονται οι πρωτεΐνες ελογκίνη B και C (elongins B and C), η κουλίνη 2 (cullin 2) και η Ring-box1 και στη συνέχεια οι ουβικιτινωμένοι HIF-1/2α κατευθύνονται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008). Η απενεργοποίηση της VHL σχετίζεται με το σύνδρομο Von Hippel-Lindau, μιας κληρονομικής μορφής καρκίνου στα νεφρά (Clear Cell Renal Carcinoma) η οποία χαρακτηρίζεται από συνεχή έκφραση των HIF-1/2 εξαιτίας της μη ουβικιτινώσεως και μη αποικοδόμησης τους (Ivan, M et al., 2001).



Εικόνα 2: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της α υπομονάδας των HIF. Το οξυγόνο ρυθμίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF- α . Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες των HIF-1/2 α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη VHL. Οι HIF-1/2 α ουβικτινιώνονται και οδηγούνται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Το οξυγόνο ακόμη ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1/2 α με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης των HIF-1/2 α από το ένζυμο FIH-1 (Factor Inhibiting HIF) εμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών p300 και CBP στους HIF-1/2 α και έτσι αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Brahimi-Horn, MC et al., 2007).

Σε μια σειρά από μελέτες έχει διερευνηθεί η σημασία και εξειδίκευση των τριών PHDs. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις PHDs εκφράζονται ευρέως. Τα επίπεδα mRNA του *PHD3* είναι αυξημένα στην καρδιά, ενώ του *PHD1* στους όρχεις. Επίσης, τα επίπεδα mRNA του *PHD2* και του *PHD3* αυξάνονται κατά την υποξία, και σε μερικούς κυτταρικούς τύπους ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες (Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008). Οι τρεις PHDs διαφέρουν στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους. Η *PHD1* εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, η *PHD2* βρίσκεται κυρίως στο

κυτταρόπλασμα ενώ η PHD3 ανιχνεύεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Metzen, E et al., 2003).

Όλες οι PHDs υδροξυλιώνουν την καρβοξυτελική περιοχή της ODD (C-ODD) πιο αποτελεσματικά από την αμινοτελική περιοχή της ODD (N-ODD), ενώ η PHD3 δεν έχει καθόλου δραστηριότητα στην N-ODD (Hirsila, M et al., 2003). Η PHD1 υδροξυλιώνει την N-ODD του HIF-2α πιο αποτελεσματικά από την PHD2, η οποία προτιμά την N-ODD του HIF-1α. In vitro πειράματα με siRNA για την απενεργοποίηση κάθε μίας από τις τρεις PHD καθώς και πειράματα απαλοιφής των γονιδίων των PHDs απέδειξαν ότι η PHD2 είναι πιθανόν το κύριο ένζυμο για την υδροξυλίωση του HIF-1α ενώ οι PHD1 και PHD3 είναι οι κύριες υπεύθυνες για την υδροξυλίωση του HIF-2α. Όλες οι PHDs έχουν μια προσθετική δράση στην σταθεροποίηση και του HIF-1α και του HIF-2α. Φαίνεται πως διαφορετικές ισομορφές PHD ρυθμίζουν τον HIF-1α ή τον HIF-2α ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, την διάρκεια του υποξικού στρες και την διαθεσιμότητα των PHD (Ginouves, A et al., 2008).

Τέλος, βρέθηκε ότι τα *PHD2* και *PHD3* περιέχουν HRE στον υποκινητή τους και η έκφραση των πρωτεϊνών τους επάγεται από την υποξία γεγονός που υποδεικνύει ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης των HIF-1/2α έπειτα από παρατεταμένη υποξία. Πιθανόν, η επαγωγή των PHDs από την υποξία να έχει σχέση με διαφορετική ρύθμιση των HIF-1/2α σε σύντομη και παρατεταμένη υποξία. Αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης σε υποξικές συνθήκες οι PHD1 και PHD3 υπόκεινται σε αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος μέσω των λιγασών ουβικιτίνης Siah1α και Siah2 (Nakayama, K et al., 2004, Nakayama, K and Ronai, Z 2004).

Η ενεργότητα των PHDs ρυθμίζεται και από τη λειτουργία του κύκλου του Krebs, εφόσον το α-κετογλουταρικό είναι μεταβολικό ενδιάμεσο του κύκλου. Δυσλειτουργία του κύκλου στην υποξία ή μεταλλάξεις στα ένζυμα που συμμετέχουν αυξάνουν τα επίπεδα του φουμαρικού και ηλεκτρικού οξέος με αποτέλεσμα, λόγω δομικής ομοιότητας να αναστέλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ α-κετογλουταρικού και PHDs και έτσι να αναστέλλεται η υδροξυλίωση και αποικοδόμηση των HIF-1/2α (Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008).

Εκτός από τις PHDs, οι HIF-1/2α υπόκεινται σε περαιτέρω οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Ο HIF-α υδροξυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στη C-TAD περιοχή (Asn803 για τον HIF-1α και Asn851 για τον HIF-2α)

από την οξυγόνο-εξαρτώμενη υδροξυλάση που ονομάζεται παράγοντας αναστολής του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH). Ο FIH είναι και αυτός μέλος της υπεροικογένειας των διοξυγενασών και απαιτεί μοριακό οξυγόνο, Fe^{+2} και κετογλουταρικό για τη δράση του (Εικόνα 2). Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης αυτής στο καρβοξυτελικό άκρο εμποδίζει την σύνδεση μόνο του HIF C-TAD, και όχι του N-TAD, με την πλούσια σε ιστιδίνες περιοχή των μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών CBP και P300 (Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008). Είναι γνωστό ότι οι περιοχές N-TAD και C-TAD των HIF-1/2α είναι υπεύθυνες για την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων στόχων. Συνεπώς, ο FIH αναστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα της περιοχής C-TAD, αλλά αφήνοντας ανεπηρέαστη την N-TAD, οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης μόνο μιας ομάδας γονιδίων στόχων (Webb, JD et al., 2009). Κατά αυτόν τον τρόπο η C-TAD περιοχή είναι ανενεργή και αναστέλλεται η μεταγραφή των εξαρτώμενων γονιδίων από την περιοχή C-TAD.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-2α είναι πιο ανθεκτικός στην δράση του FIH-1 από ότι ο HIF-1α. Αυτή η διαφορά αποδόθηκε στα διαφορετικά αμινοξέα που περιβάλλουν την ασπαραγίνη που υδροξυλιώνεται στην αντίστοιχη περιοχή C-TAD. Ο HIF-1α υδροξυλιώνεται πιο αποτελεσματικά από τον FIH-1 λόγω της βαλίνης που βρίσκεται δίπλα στην υδροξυλιωμένη ασπαραγίνη, ενώ ο HIF-2α έχει στην αντίστοιχη θέση μία αλανίνη (Bracken, CP et al., 2006).

Η υδροξυλίωση των HIF-1/2α είναι ένας διπλός ελεγκτικός μηχανισμός. Στη νορμοξία, οι HIF-1/2α αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα και αν μια ποσότητα της πρωτεΐνης ξεφύγει από αυτό το μηχανισμό ρύθμισης, αυτή θα είναι μεταγραφικά ανενεργή λόγω της δράσης του FIH. Μελέτες της ενζυμικής δράσης έδειξαν ότι οι PHDs και ο FIH έχουν πολύ διαφορετικές σταθερές συγγένειας για το O_2 . Πιο συγκεκριμένα, η K_m του FIH για το οξυγόνο είναι 3 φορές χαμηλότερη από αυτήν των PHDs (Koivunen, P et al., 2004). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια μικρή πτώση στη συγκέντρωση οξυγόνου πρώτα θα απενεργοποιήσει τις PHDs και μια μεγαλύτερη μείωση απαιτείται για να επηρεάσει την ενεργότητα του FIH. Συνεπώς, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των HIF-1/2α θα αυξηθούν, αλλά η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας μέσω του C-TAD θα διατηρείται. Ωστόσο, οι HIF-1/2α θα επάγουν την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων μόνο μέσω του N-TAD (Dayan, F et al., 2006).

Αν και οι πρωτεΐνες του HIF-1α και του HIF-2α ρυθμίζονται με τον ίδιο τρόπο από τον οξυγόνο-εξαρτώμενο μηχανισμό του PHD-VHL, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι επάγονται

με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Σε κύτταρα νευροβλαστώματος και γλοιώματος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι, ενώ ο HIF-1α σταθεροποιείται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ (0-2% O₂, ο HIF-2α επάγεται και σε πιο ήπια υποξία (2-5% O₂) καθώς και στη νορμοξία. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων, τα οποία στις συγκεκριμένες μελέτες είτε προέρχονται από ένα εμβρυικό στάδιο διαφοροποίησης είτε είναι στελεχιαία κύτταρα (Nilsson, H et al., 2005, Holmquist-Mengelbier, L et al., 2006, Li, Z et al., 2009). Επίσης, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α παραμένουν αυξημένα σε καλλιέργεια μεγάλης χρονικής διάρκειας (48 ώρες) σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα νευροβλαστώματος και αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται έντονα σε μικρής χρονικής διάρκειας έκθεση (4 ώρες) στην υποξία και μειώνονται μετά από κάποιες ώρες, το οποίο είναι αποτέλεσμα αρνητικής ρύθμισης μέσω ενός φυσικού αντινοσηματικού mRNA HIF-1α (Uchida, T et al., 2004).

1.2.1.2 Ρύθμιση των HIF-1/2α από τα μιτοχόνδρια και τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μικρά μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων και χαρακτηρίζονται από μεγάλη δραστικότητα. Η αναγωγή του μοριακού O₂ δημιουργεί τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα ROS δημιουργούνται φυσιολογικά ως παραπροϊόντα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούν O₂, του κυτοχρώματος P450, των οξειδασών των αμινοξέων, της οξειδάσης της γλυκόζης, των οξειδασών NADH/NADPH, της συνθάσης του NO. Το ανιόν υπεροξειδίου (O₂•), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂), η ρίζα υδροξυλίου (HO•) και το μονοξειδίο του αζώτου (NO•) είναι από τις σημαντικότερες ενώσεις ROS. Τα κύτταρα αμύνονται στην παραγωγή ROS με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση και αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η θειορεδοξίνη, η γλουταθειόνη και οι βιταμίνες E και C. Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου προκαλείται οξειδωτικό στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες ή τους πολυσακχαρίτες, καθώς και απορύθμιση του πολλαπλασιασμού ή απόπτωση. Από την άλλη, τα ROS μπορούν να δράσουν ως σήματα για την ενεργοποίηση

συγκεκριμένων μονοπατιών, ιδιαίτερα σε στρεσογόνες καταστάσεις που προκαλούν την επαγωγή τους, με αποτέλεσμα την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης, το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου ή την επιβίωση (Murphy, MP 2009).

Τα μιτοχόνδρια μέσω της παραγωγής ROS εμπλέκονται σε ποικίλες, εξαρτώμενες από τους HIF και μη, υποξικές διαδικασίες. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζονταν στο ρόλο των ROS στη ρύθμιση μόνο του HIF-1α και υποστήριζαν ότι τα μιτοχόνδρια δρουν σαν αισθητήρες οξυγόνου αυξάνοντας τη δημιουργία ROS στην υποξία και προκαλώντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία οδηγούν σε επαγωγή του HIF-1α (Chandel, NS et al., 1998, Chandel, NS et al., 2000). Σε πιο πρόσφατες μελέτες διερευνήθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α αλλά και του HIF-2α από τα ROS των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι τα ROS σταθεροποιούν τον HIF-1α και τον HIF-2α και η αναστολή της έκφρασης στοιχείων του συμπλέγματος III της αναπνευστικής αλυσίδας στο μιτοχόνδριο, όπως το κυτόχρωμα C και οι πρωτεΐνες σιδήρου-θείου, ανέστειλε τη σταθεροποίηση των HIF-1/2α (Guzy, RD et al., 2005, Mansfield, KD et al., 2005) ενώ αναστολή του συμπλεγματος IV της αναπνευστικής αλυσίδας δεν είχε το ίδιο αποτέλεσμα (Brunelle, JK et al., 2005). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων στο κυτόχρωμα C, διαδικασία που περιλαμβάνει την παραγωγή ROS, και όχι η κυτταρική αναπνοή, είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των HIF-1/2α. Ωστόσο, σε χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων βρέθηκε με αναστολή των συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων ότι για την επαγωγή του HIF-2α κατά την διάρκεια της υποξίας είναι απαραίτητα λειτουργικά μιτοχόνδρια, χωρίς να εμπλέκονται τα αυξημένα επίπεδα των ROS σε αυτή την επαγωγή (Brown, ST and Nurse, CA 2008). Συνεπώς, η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι τα αυξημένα επίπεδα των ROS είναι απαραίτητα για την έκφραση των HIF-1/2α σε κάποια κύτταρα, ενώ σε άλλα κύτταρα ισχύουν άλλοι εναλλακτικοί μηχανισμοί. Περαιτέρω δεδομένα προήλθαν από μελέτες σε ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου *junD*, τα οποία επιδεικνύουν αυξημένη παραγωγή ROS και οδηγούν σε μη φυσιολογική έκφραση των HIF-1/2α κατά τη νορμοξία. Σε αυτή την περίπτωση τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα H_2O_2 ανέστειλαν τη δράση των PHDs λόγω της οξειδωσης του Fe^{2+} , το οποίο είναι απαραίτητο για την αντίδραση της υδροξυλίωσης, οδηγώντας σε αυξημένη σταθεροποίηση των HIF-1/2α (Gerald, D et al., 2004, Gordan, JD and Simon, MC 2007). Επίσης σε κύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται ο VHL η οξειδάση του NADPH παρουσιάζει αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα με αποτέλεσμα τα ROS

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

1.2.1.3 Ρύθμιση των HIF-1/2α από τη διακοπτόμενη υποξία

Η διακοπτόμενη υποξία συμβαίνει όταν η συγκέντρωση του O₂ στους ιστούς εναλλάσσεται μεταξύ φυσιολογικών και υποξικών επιπέδων. Αυτή η κατάσταση της απουσίας O₂ σχετίζεται με την επαναλαμβανόμενη υπνική άπνοια, στην οποία παροδικές παύσεις της αναπνοής οδηγούν σε χρόνια διακοπτόμενη υποξία κατά τη διάρκεια του ύπνου. Οι ασθενείς αυτής της νόσου έχουν πολλές πιθανότητες να αναπτύξουν υπέρταση, αθηροσκλήρωση, έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο (Basner, RC 2007).

Κατά την διακοπτόμενη υποξία, υποστηρίζεται ότι, οι α υπομονάδες των HIF ρυθμίζονται διαφορετικά. Συγκεκριμένα, στη διακοπτόμενη υποξία ο HIF-1α επάγεται μέσω της ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το Ca²⁺ φωσφολιπάσης C-γ και των σηματοδοτικών μονοπατιών της PKC και του mTOR. Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται από την αύξηση των ROS που παράγονται από την NADPH οξειδάση και όχι από τα ROS των μιτοχονδρίων που αναστέλλουν τις PHD στη συνεχή υποξία (Peng, YJ et al., 2006, Yuan, G et al., 2008). Αντίθετα, η έκφραση του HIF-2α καταστέλλεται μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις καλπαΐνες, πρωτεάσες που ενεργοποιούνται από το ιόντα Ca²⁺. Η αναστολή του HIF-2α φαίνεται να συνεισφέρει στην αύξηση των ROS κατά την διακοπτόμενη υποξία και σε καρδιαγγειακές αντιδράσεις in vivo (Nanduri, J et al., 2009, Prabhakar, NR and Semenza, GL 2012). Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι οι HIF-1α και HIF-2α έχουν αντίθετους ρόλους στην υπνική άπνοια.

1.2.2 Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση

1.2.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Σχετικά λίγα είναι γνωστά για την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων *HIF1A* και *EPAS1*. Υπάρχουν μόνο μερικές αναφορές που δείχνουν ότι σε καταστάσεις φλεγμονής το σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB επηρεάζει τα επίπεδα mRNA του HIF-1α (Frede, S et al., 2006, Rius, J et al., 2008, van Uden, P et al., 2008). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB (Inhibitory κB) και

η επακόλουθη ενεργοποίηση των υπομονάδων του NF-κB (υπομονάδες p50 και p65 (RelA) επηρεάζει τα βασικά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του HIF-1α έπειτα από απόκριση στη θρομβίνη, το H₂O₂ και την βραχείας διάρκειας υποξία (Belaiba, RS et al., 2007, Bonello, S et al., 2007, van Uden, P et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι υπομονάδες p50 και p65 του NF-κB αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α στην περιοχή -197/-188 bp. Η μετάλλαξη αυτής της περιοχής ανέστειλε την μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α από τον NF-κB υποδεικνύοντας ότι πράγματι υπάρχει ένας σημαντικός σύνδεσμος ανάμεσα στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της φλεγμονής και του μονοπατιού της υποξίας (Rius, J et al., 2008). Επιπλέον η αλληλουχία πρόσδεσης του NF-κB στον υποκινητή του HIF-1α έχει βρεθεί συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη υποδεικνύοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο μονοπατιών (Bonello, S et al., 2007). Κάποια σύνδεση μεταξύ του μονοπατιού του NF-κB και την έκφραση του EPAS1 δεν έχει μέχρι σήμερα αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Επιπλέον, οι κυτταροκίνες από τα βοηθητικά T κύτταρα (Th1) όπως η ιντερφερόνη γ (IFNγ) ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-κB-HIF-1α με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α. Ενώ, κυτταροκίνες των Th2 όπως η ιντερλευκίνη 4 και 10 (IL-4 και IL-10) επάγουν με διαφορετικό τρόπο την έκφραση του EPAS1 (Takeda, N et al., 2010). Ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται δεν είναι γνωστός.

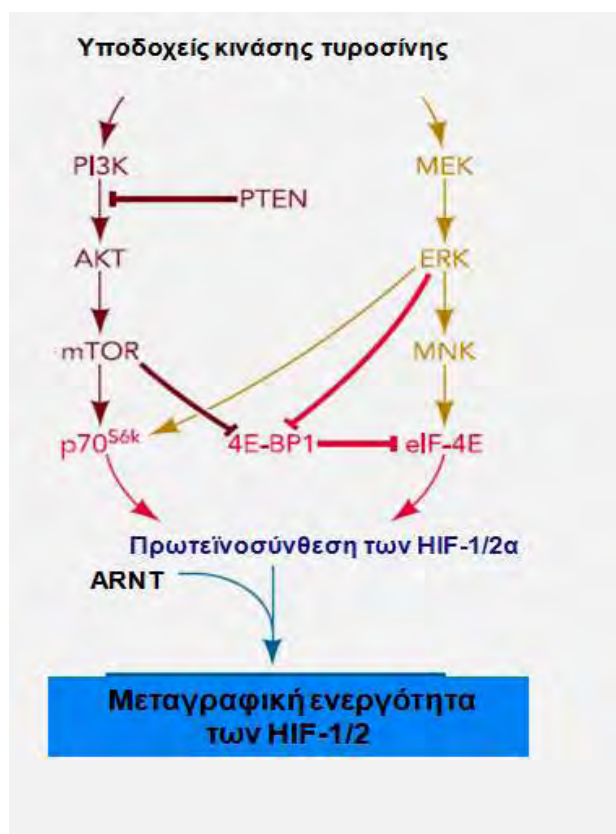
Η έκφραση του HIF1A, σε αντίθεση με εκείνη του EPAS1, επίσης ρυθμίζεται από το SWI/SNF σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης μέσω της πρωτεΐνης BAF57 η οποία είναι γνωστή και ως SMARCE1 (Kenneth, NS et al., 2009).

1.2.2.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η αύξηση των επιπέδων HIF-1/2α ως απόκριση στα ερεθίσματα αυξητικών παραγόντων διαφέρει σε δύο σημαντικά σημεία από την αύξηση των HIF-1/2α κατά την υποξία. Πρώτον, ενώ η υποξία αυξάνει τα επίπεδα των HIF-1/2α σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, η διέγερση από αυξητικούς παράγοντες επάγει την έκφρασή τους με ιστοειδικό τρόπο. Δεύτερον, ενώ η υποξία σχετίζεται με μειωμένη αποικοδόμηση των HIF-1/2α, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτταροκίνες και άλλα μόρια διεγείρουν τη σύνθεση των HIF-1/2α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της

τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) (Hansen, AE et al., 2011).

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι αυξημένα επίπεδα μετάφρασης του mRNA των HIF-1/2α αυξάνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ως αναμενόμενο τη δραστικότητα των HIF-1/2α, κυρίως σε κύτταρα με ενεργοποιημένο το μονοπάτι της PI3K-AKT-mTOR, το οποίο είναι κοινό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την PI3K και τις MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Στο μονοπάτι των MAPK, η ERK1/2, η οποία έχει ενεργοποιηθεί από τη MEK, ενεργοποιεί με τη σειρά της την MNK. Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p70 S6 κινάση (S6K), η οποία κατόπιν φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την προσδεδεμένη στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E) πρωτεΐνη (4E-BP1). Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF-4E εμποδίζεται από τη φωσφορυλίωσή του από την mTOR και την ERK έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' κάλυμμα. Επίσης η MNK φωσφορυλιώνει τον eIF-4E και διεγείρει τη δράση του απευθείας. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η αυξημένη μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και οι HIF-1/2α (Εικόνα 3). Πιθανόν ο παραπάνω μηχανισμός δράσης του μονοπατιού της PI3K να οδηγεί στην επαγωγή του HIF-1α από ορμόνες όπως η αγγειοτενσίνη II, η θρομβίνη, η ινσουλίνη και η ενδοθηλίνη σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στα μακροφάγα (Bilton, RL and Booker, GW 2003). Για τον HIF-2α οι αναφορές είναι περιορισμένες. Έχει περιγραφεί ότι ο IGF-1 επάγει τον HIF-2α μέσω του μονοπατιού της PI3K, με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφραση του VEGF σε κύτταρα οστεοβλάστη (Akeno, N et al., 2002).



Εικόνα 3: Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης των HIF-1/2α : Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί μονοπάτια της PI3K και των MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT και την mTOR. Τα μονοπάτια της mTOR και των MAPK οδηγούν στη μετάφραση του mRNA των HIF-1/2α σε πρωτεΐνη (Semenza, GL 2009).

Μελέτες που αφορούν το mTOR έχουν δείξει ότι υπάρχουν δύο διακριτά σύμπλοκα mTOR, που ονομάζονται mTORC1 και mTORC2. Το σύμπλοκο mTORC1 είναι ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη και αποτελείται από το mTOR και την πρωτεΐνη Raptor (regulatory-associated protein of mTOR). Το mTORC1 ενεργοποιείται από την AKT και στη συνέχεια επάγει την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης της p70 S6 κινάσης και 4E-BP1. Αντίθετα, το mTORC2 δεν αναστέλλεται από την ραπαμυκίνη, αποτελείται από το mTOR και την πρωτεΐνη Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) και, αντίθετα από το mTORC1, ενεργοποιεί την AKT μέσω φωσφορυλίωσης (Guertin, DA and Sabatini, DM 2007). Μέχρι πρόσφατα δεν είχε βρεθεί σύνδεση μεταξύ HIF-2α και mTOR. Ωστόσο μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από το mTORC2 και όχι από το mTORC1, πιθανόν μέσω

οξειδοαναγωγικής ρύθμισης του mTORC2, ενώ η έκφραση του HIF-1α εξαρτάται και από τα δύο σύμπλοκα σε κύτταρα νεφρικού καρκίνου. Επίσης στην ίδια εργασία μελετήθηκε η εξάρτηση της έκφρασης των HIF-1/2α από την AKT, η οποία απαντάται σε τρεις διαφορετικές ισομορφές (AKT1, AKT2, AKT3) και παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από την AKT2 ενώ η έκφραση του HIF-1α από την AKT3 (Toschi, A et al., 2008, Nayak, BK et al., 2012).

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν έναν ακόμη μηχανισμό ρύθμισης του HIF-2α σε μεταφραστικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, ο HIF-2α, περιέχει ένα συντηρημένο και λειτουργικό στοιχείο απόκρισης στο σίδηρο (iron-responsive element, IRE) στη 5' μη μεταφρασμένη περιοχή (5'UTR) του mRNA του, και μέσω αυτού του IRE, η σιδηρορυθμιζόμενη πρωτεΐνη που συνδέεται στο IRE (IRE binding protein1 (IREBP1, γνωστή επίσης και ως ακονιτάση) ρυθμίζει την μετάφραση του mRNA του *EPAS1* ανάλογα με την διαθεσιμότητα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Σε συνθήκες υποξίας, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι ανεπαρκή η IREBP1 συνδέεται στα IRE στο 5'UTR του mRNA του *EPAS1* και αναστέλλει την μετάφραση του HIF-2α (Sanchez, M et al., 2007). Αυτή η ρύθμιση είναι ειδική για τον HIF-2α επειδή η IREBP1 δεν μπορεί να συνδεθεί στο mRNA του *HIF1A* ή να ρυθμίσει την μετάφρασή του (Zimmer, M et al., 2008)

1.2.2.3 Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σταθερότητας

Ενώσεις που «μιμούνται» την υποξία

Εκτός από την υποξία, τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α επάγονται και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων που ονομάζονται «μιμητές της υποξίας». Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως ενώσεις ανάλογες του α-κετογλουταρικού όπως είναι η διμεθυλοξαλλο-γλυκίνη (DMOG) προκαλούν αναστολή των πρόλυλο-υδροξυλασών και οδηγούν στη σταθεροποίηση του HIF-1/2α εξαιτίας της μη υδροξυλίωσης και άρα της μη πρωτεόλυσής του από το πρωτεάσωμα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και διάφοροι χηλικοί παράγοντες όπως η δεσφεριοξαμίνη (DFO) οι οποίοι δεσμεύουν το Fe^{+2} που απαιτούν οι υδροξυλάσες (PHDs και FIH) των HIF-1/2α, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές (Zagorska, A and Dulak, J 2004).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως δισθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο προκαλούν επαγωγή του HIF-1α (Wang, GL et al., 1995) και του HIF-2α (Wiesener, MS et al., 1998). Η δράση του κοβαλτίου, που έχει περισσότερο μελετηθεί, επικεντρώνεται στη

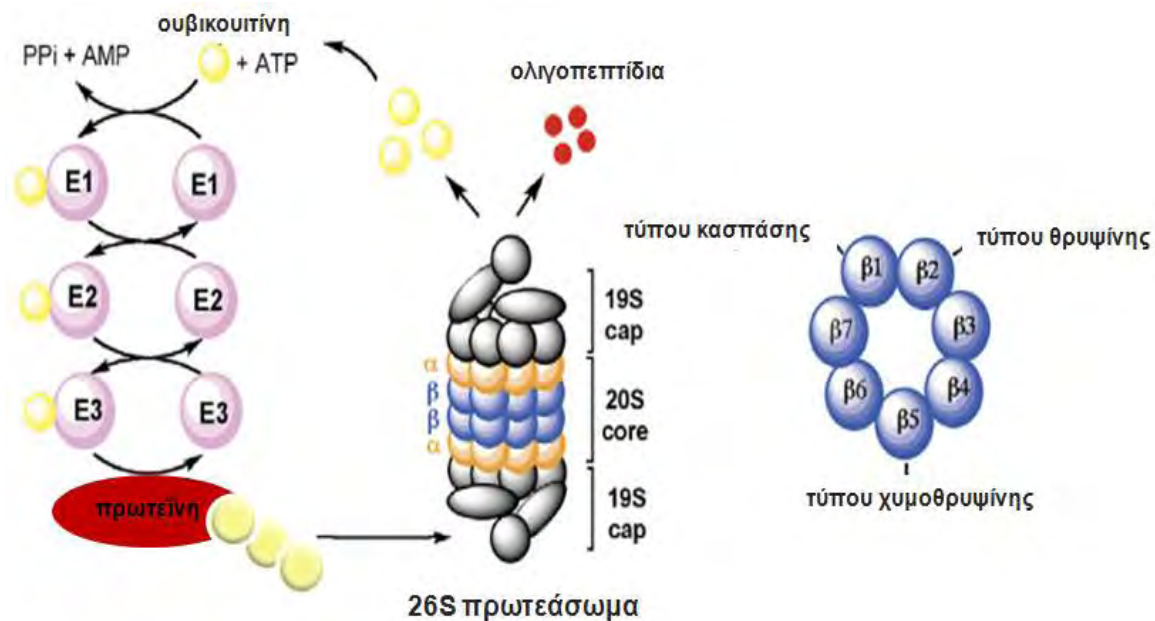
σταθεροποίηση του HIF-1α, και είναι γενικά αποδεκτό ότι το ίδιο ισχύει και για τον HIF-2α λόγω δομικής ομοιότητας και κοινής οξυγόνο-εξαρτώμενης ρύθμισης των HIF-α υπομονάδων. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης του κοβαλτίου δεν είναι απόλυτα κατανοητός διότι υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ποικίλους μηχανισμούς. In vitro μελέτες έδειξαν ότι το κοβάλτιο αναστέλλει τη δραστηριότητα ανασυνδυασμένων PHDs. Από τα αποτελέσματα αυτά διατυπώθηκε η υπόθεση ότι το κοβάλτιο αντικαθιστά το σίδηρο στο κέντρο πρόσδεσης του σιδήρου των PHDs (Maxwell, P and Salnikow, K 2004). Ένας άλλος μηχανισμός, που έχει μελετηθεί από το εργαστήριό μας, περιλαμβάνει την επαγωγή του HIF-1α μέσω του μονοπατιού της PI3K και των ROS (Chachami, G et al., 2004, Triantafyllou, A et al., 2006), ενώ έχει επίσης αναφερθεί ότι το κοβάλτιο οξειδώνει το ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα να απενεργοποιούνται οι PHDs επειδή δεν ανάγεται ο Fe^{3+} σε Fe^{2+} που απαιτούν οι υδροξυλάσες του HIF-1α για να δράσουν, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές (Salnikow, K et al., 2004, Fong, GH and Takeda, K 2008). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το κοβάλτιο εμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω πρόσδεσής του στην κουλίνη 2. Η κουλίνη 2 είναι συστατικό του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, που οδηγεί τον HIF-1α προς αποικοδόμηση. Το κοβάλτιο έχει την ικανότητα να ενώνεται μόνο με αυτό το συστατικό του συμπλόκου, αναστέλλοντας τη δράση του χωρίς να επηρεάζει το σχηματισμό του. Σε επόμενη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο εμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α με ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τον VHL (Kanaya, K et al., 2002, Kanaya, K and Kamitani, T 2003). Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί για τη σταθεροποίηση του HIF από κοβάλτιο είναι ότι το κοβάλτιο μπορεί να ενωθεί απευθείας με τον HIF-2α και να εμποδίσει με τον τρόπο αυτό την αποικοδόμησή του. Στη συγκεκριμένη εργασία, με in vitro μελέτες αποδείχθηκε ότι το κοβάλτιο προσδένεται απευθείας στην ODD περιοχή της HIF-2α πρωτεΐνης εμποδίζοντας την υδροξυλίωση και την αλληλεπίδρασή του με τον VHL (Yuan, Y et al., 2003).

Αναστολείς πρωτεασώματος

Σε συνθήκες νορμοξίας, οι HIF-1/2α υδροξυλιώνονται από τις PHDs, γεγονός που επιτρέπει την αναγνώρισή του από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL, η οποία είναι συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης, με αποτέλεσμα την πολυουβικιτινίωση και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα (Εικόνα 4). Το σύστημα

ουβικιτίνης πρωτεασώματος ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες του κυττάρου όπως η μεταγραφή, ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η αποκατάσταση βλαβών του DNA. Μια σειρά ενζύμων συμμετέχουν στην διαδικασία της σύνδεσης εκατοντάδων πρωτεϊνών με την ουβικιτίνη ώστε να αναγνωριστούν στη συνέχεια από το πρωτεάσωμα και να αποδομηθούν. Η συνολική πολυπρωτεϊνική δομή του πρωτεασώματος ονομάζεται 26S και έχει μοριακό βάρος 2,5 MDa και κυλινδρικό σχήμα. Αποτελείται από δύο λειτουργικές υπομονάδες, τα δύο άκρα του 26S κυλίνδρου καλύπτονται από 19S ρυθμιστικές υπομονάδες που λειτουργούν ως αναγνωριστική υπομονάδα της συνδεδεμένης με την ουβικουιτίνη πρωτεΐνης, ενώ στο κέντρο βρίσκεται ο καταλυτικός 20S πυρήνας του συμπλόκου αποτελούμενο από δύο επταμερείς α υπομονάδες και δύο επταμερείς β υπομονάδες και οι δύο σε δακτυλιοειδή μηχανισμό. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από κατάλοιπα θρεονίνης, των οποίων οι υδροξυλομάδες λειτουργούν ως πυρηγόφιλα κέντρα. Το 20S πρωτεάσωμα έχει τρεις καταλυτικές δραστηριότητες, τύπου χυμοθρυψίνης, τύπου θρυψίνης και τύπου κασπάσης ($\beta 5$, $\beta 2$ και $\beta 1$ αντίστοιχα) (Εικόνα 4). Η σημασία της κάθε ενζυμικής δραστηριότητας ποικίλει ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης-υποστρώματος (Adams, J 2003, Vlachostergios, PJ et al., 2009, 2009)

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη πολυενζυμική διεργασία. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση, αρχικά σημαίνονται με μια αλυσίδα πολυ-ουβικουιτίνης, δηλαδή αρκετά μόρια ουβικουιτίνης συνδέονται σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών. Μέσω αυτής της αλυσίδας, η 19S ρυθμιστική υπομονάδα μπορεί να τις αναγνωρίσει ως υποστρώματα για πρωτεόλυση. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και εισέρχονται στον 20S πρωτεολυτικό πυρήνα. Εκεί λαμβάνει χώρα η τελική διάσπασή τους σε μικρά πεπτίδια, μεγέθους 3 ως 23 αμινοξέα (Adams, J 2003, Vlachostergios, PJ et al., 2009, 2009, Vlachostergios, PJ et al., 2012) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση, αρχικά σημαίνονται με μια αλυσίδα πολυ-ουβικιτίνης, και μέσω αυτής της αλυσίδας, η 19S ρυθμιστική υπομονάδα μπορεί να τις αναγνωρίσει ως υποστρώματα για πρωτεόλυση. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και εισέρχονται στον 20S πρωτεολυτικό πυρήνα. Εκεί λαμβάνει χώρα η τελική διάσπασή τους σε μικρά πεπτίδια, μεγέθους 3 ως 23 αμινοξέα. Το 20S πρωτεάσωμα έχει τρεις καταλυτικές δραστηριότητες, τύπου χυμοθρυψίνης, τύπου θρυψίνης και τύπου κασπάσης (β5, β2 και β1 αντίστοιχα) (Moore, BS et al., 2008).

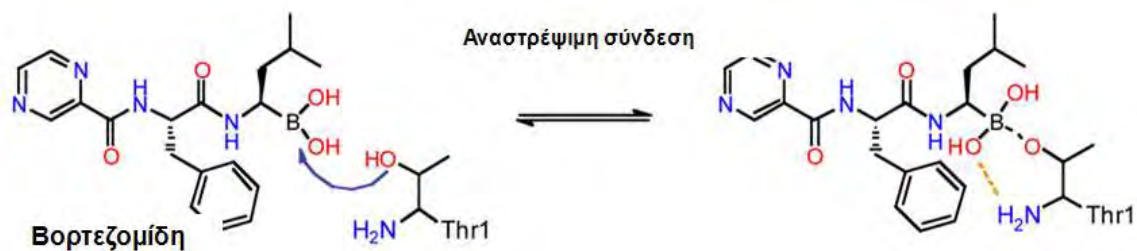
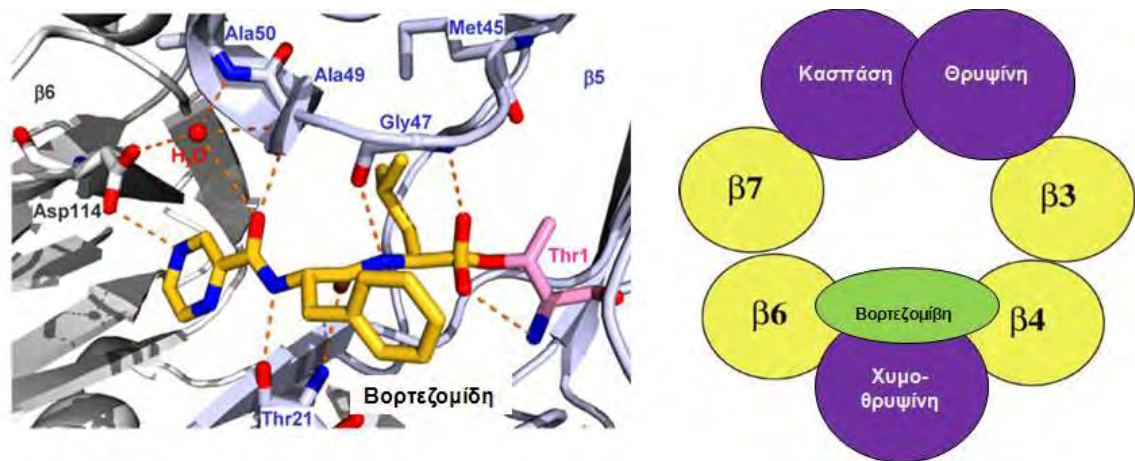
Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει εδραιωθεί ως ισχυρή και υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, και αναστολείς του πρωτεασώματος έχουν χρησιμοποιηθεί έναντι διάφορων καρκινικών τύπων, τόσο σε ζωικά όσο και κλινικά μοντέλα, αλλά και στην αντιμετώπιση κακοήθων ασθενειών.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

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος είναι ουσίες που ποικίλλουν ως προς τις ιδιότητες και τον τρόπο με τον οποίο αναστέλλουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Υπάρχουν αναστολείς πρωτεασώματος που είναι α) τριπεπτίδια με αλδεΐδη (π.χ. το MG132, ο αναστολέας καλπαΐνης I και το φυσικό τριπεπτίδιο λευπεπτίνη) και πεπτίδια με

βορονικό οξύ (π.χ. η βορτεζομίδη) τα οποία προκαλούν αναστρέψιμη αναστολή, β) μη αλδεϋδικά πεπτίδια που προκαλούν μη αναστρέψιμη αναστολή (π.χ. οι εποξυκετόνες) και γ) μη πεπτιδικά φυσικά προϊόντα όπως είναι β-λακτόνες (π.χ. η λακτακυστεΐνη). Οι αναστολείς αυτοί απενεργοποιούν το πρωτεάσωμα διότι μεταβάλλουν κυρίως την δραστικότητα του πρωτεασώματος τύπου χυμοθρυψίνης (Moore, BS et al., 2008).

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

Η βορτεζομίδη είναι ένα διπεπτίδιο με βορονικό οξύ το οποίο έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα κύτταρα και να αναστέλλει εξειδικευμένα και αναστρέψιμα το 26S πρωτεάσωμα (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος τροποποιώντας απευθείας τα καταλυτικά κατάλοιπα θρεονίνης των β υπομονάδων. Σε σύγκριση με άλλους, δομικά ανάλογους αναστολείς, προσδένεται πολύ πιο αποτελεσματικά και αναστέλλει το πρωτεάσωμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η βορτεζομίδη έχει εγκριθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η πάθηση εξελίσσεται παρά την προηγούμενη χορήγηση άλλης χημειοθεραπείας και σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για μεταμόσχευση μυελού των οστών (Papandreou, CN and Logothetis, CJ 2004, Chen, D et al., 2011).



Εικόνα 5: Σχηματικά η πρόσδεση της βορτεζομίδης σε κατάλοιπα θρεονίνης. Η βορτεζομίδη είναι ένα διπεπτίδιο βορονικού οξέος το οποίο έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα κύτταρα και να αναστέλλει εξειδικευμένα και αναστρέψιμα το 26S πρωτεασώμα. Η βορτεζομίδη προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος τροποποιώντας απευθείας τα καταλυτικά κατάλοιπα θρεονίνης των β υπομονάδων. Η βορτεζομίδη μεταβάλλει τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος τύπου χυμοθρυψίνης (Adams, J 2003, Moore, BS et al., 2008).

Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την αναστολή της δράσης του HIF-1 από τη βορτεζομίδη δεν είναι πλήρως κατανοητοί και τα αποτελέσματα των μελετών αντιφατικά. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, οστεοσαρκώματος και γλοιώματος βρέθηκε ότι βορτεζομίδη αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω αναστολής της C-TAD περιοχής χωρίς να επηρεάζεται η σύνδεση HIF-1 με τον συμπάρογο της μεταγραφής p300 (Kaluz, S et al., 2006, Birle, DC and Hedley, DW 2007). Ενώ, σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, απέδειξαν ότι βορτεζομίδη ενισχύει την σύνδεση του HIF με τον HIF-1α εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-1 με τον p300 προκαλώντας την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (Shin, DH et al., 2008). Μία άλλη μελέτη αναφέρει ότι η βορτεζομίδη μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α μέσω επαγωγής της φωσφορυλίωσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (translation initiation factor 2α, eIF2α) με αποτέλεσμα να καταστέλλεται γενικά ο μηχανισμός

μετάφρασης του κυττάρου (Zhu, K et al., 2009). Ωστόσο, η δράση της βορτεζομίδης στην έκφραση και την λειτουργία του HIF-2α δεν έχει μελετηθεί.

Άλλες πρωτεΐνες

Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η σταθερότητα των πρωτεϊνών του HIF-1α και του HIF-2α ρυθμίζονται με διαφορετικό όμως τρόπο από μία E3 λιγάση της ουβικουιτίνης που ονομάζεται παράγοντας που σχετίζεται με την υποξία (Hypoxia associated factor, HAF). Έχει βρεθεί ότι ο HAF υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους και τα επίπεδά του είναι μειωμένα σε μικρής διάρκειας υποξία ενώ είναι αυξημένα σε μεγάλης διάρκειας υποξία. Ο HAF ως λιγάση συνδέεται στην ODD περιοχή του HIF-1α και τον ουβικουιτινυλιώνει με μηχανισμό ανεξάρτητο του οξυγόνου και του pVHL αλλά με αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος (Koh, MY et al., 2008). Ο HAF επίσης συνδέεται με τον HIF-2α αλλά στην περιοχή C-TAD με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι με την εναλλαγή της έκφρασης του HAF στα καρκινικά κύτταρα, μεταβάλλεται η μεταγραφή των γονιδίων από HIF-1 εξαρτώμενη, σε HIF-2 εξαρτώμενη (Koh, MY et al., 2011).

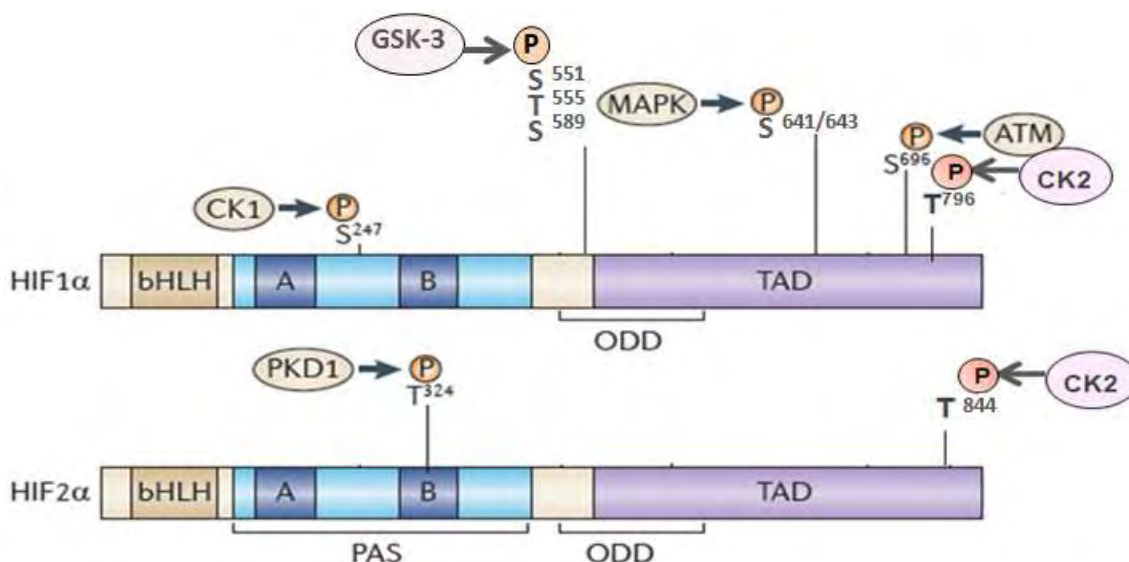
Επίσης έχουν βρεθεί και άλλες πρωτεΐνες όπως οι οποίες ρυθμίζουν την σταθερότητα του HIF-1α και όχι του HIF-2α όπως η HSP70/CHIP (Luo, W et al., 2010), η πρωτεΐνη MgcRacGap (Lyberopoulou, A et al., 2007), Lymperopoulou et al, 2013), COMDD1 (van de Sluis, B et al., 2009, van de Sluis, B et al., 2010), Hsp90 (Liu, YV and Semenza, GL 2007) και RACK1 (Liu, YV et al., 2007).

1.2.2.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων είναι ένας κοινός μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητάς τους. Οι πρώτες ενδείξεις πως ο HIF-1 είναι στόχος φωσφορυλίωσης δόθηκαν από τους Wang και Semenza το 1992 (Semenza, GL and Wang, GL 1992). Από τότε μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί συγκεκριμένες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την p42/44 MAPK στις σερίνες 641 και 643 (Mylonis, I et al., 2006) και ο βιολογικός ρόλος αυτής της φωσφορυλίωσης αυτής είναι να «καλύπτει» ένα σήμα πυρηνικής εξόδου

(Nuclear Export Signal, NES), αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (Mylonis, I et al., 2008). Έτσι ο φωσφορυλιωμένος από την p42/44 MAPK HIF-1α παραμένει στον πυρήνα και μπορεί πλέον να προσδεθεί με τον ARNT για να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στην PAS-B περιοχή της αμινοτελικής του επικράτειας και στη σερίνη 247 από την κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ). Η φωσφορυλίωση αυτή είχε αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης, τη σταθερότητα ή τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της σερίνης 247 του HIF-1α από την CK1δ επηρέασε αρνητικά τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT οδηγώντας σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1 (Kalousi, A et al., 2010) (Εικόνα 6) .



Εικόνα 6: Η σύνοψη των γνωστών φωσφορυλιώσεων των HIF-1α και HIF-2α. Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στην σερίνη 247 από την CK1, στην περιοχή ODD από την GSk-3, στις σερίνες 641 και 643 από την p42/44 MAPK, στην σερίνη 696 από την ATM και στην θρεονίνη 796 από την CK2. Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στην θρεονίνη 324 από την PDK1 και στην θρεονίνη 844 από την CK2 (Keith, B et al., 2012).

Επίσης και η κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) φαίνεται να επηρεάζει τον HIF-1α αλλά θετικά. Έχει αναφερθεί ότι η CK2 είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στη

θρεονίνη 796, και δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής p300 (Cho, H et al., 2007) αλλά πιθανόν να επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον FIH (Lancaster, DE et al., 2004) με αποτέλεσμα την διατήρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου, GSK-3 επηρεάζει αρνητικά τον HIF-1α εντείνοντας την αποικοδόμησή του μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου από την pVHL (Flugel, D et al., 2007). Επιπλέον, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 696 από την προκαλούμενη μεταλλάξεις κινάση υπεύθυνη για το σύνδρομο αταξίας τηλεαγγειεκτασίας (ataxia telangiectasia mutated, ATM kinase) με αποτέλεσμα την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTORC1 σε υποξικές συνθήκες (Εικόνα 6) (Cam, H et al., 2010).

Μεταγενέστερα από τον HIF-1α βρέθηκε ότι και ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται (Conrad, PW et al., 1999). Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την CK2 στη θρεονίνη 844 και αυτή η φωσφορυλίωση είναι σημαντική για τη διατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-2α (Gradin, K et al., 2002). Επίσης έχει βρεθεί μόνο μία ακόμη κινάση που φωσφορυλιώνει τον HIF-2α, η κινάση της πρωτεΐνης D1 (protein kinase D1, PKD1) η οποία τον φωσφορυλιώνει στην θρεονίνη 324 (Εικόνα 6). Αυτή η φωσφορυλίωση εμποδίζει την σύνδεση του HIF-2 με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1 και φαίνεται να εξαρτάται από ένα γειτονικό κατάλοιπο προλίνης το οποίο είναι μοναδικό στον HIF-2α (Εικόνα 7). Ο HIF-1α δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την PDK1 στην αντίστοιχη θρεονίνη 322 με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA λόγω μη σύνδεσης με τον MYC αλλά με τον SP1 (To, KK et al., 2006).

in vivo το σύστημα Sirt1/HIF-2α ρυθμίζει την νεφρική και ηπατική έκφραση της ερυθροποιητίνης (Dioum, EM et al., 2009). Μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα υποστηρίζει ότι ο μεταγραφικός συμπαράγοντας CBP ακετυλιώνει ειδικά τον HIF-2α στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και είναι απαραίτητος για την λειτουργία του συμπλόκου Sirt1/HIF-2 (Chen, R et al., 2012).

Η Sirt1 αποακετυλιώνει και τον HIF-1α, με αποτέλεσμα όμως να καταστέλλεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Lim, JH et al., 2010). Επίσης, η λυσίνη 532 (K532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD του HIF-1α βρέθηκε να ακετυλιώνεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης, της arrest-defective-1 (ARD1). Η ακετυλίωση της λυσίνης K532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του (Jeong, JW et al., 2002).

Σουμοϋλίωση

Άλλη μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται ο HIF-1/2α είναι η σουμοϋλίωση. Η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικουιτίνη στη δομή και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με ένα παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό. Η σουμοϋλίωση είναι μια διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες δεν οδηγούνται απαραίτητα για αποικοδόμηση όπως στην ουβικουιτινυλίωση, αλλά έχει συνδεθεί με διάφορα μονοπάτια όπως η ενδοκυτταρική μεταφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η DNA αντιγραφή και επιδιόρθωση, ο RNA μεταβολισμός και η κυτταρική σηματοδότηση (Muller, S et al., 2001).

Ο HIF-1α περιέχει τρεις αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, στις λυσίνες στις θέσεις 391, 477 και 532. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων (Brahimi-Horn, C et al., 2005). Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν έχει διευκρινιστεί. Μια σειρά από μελέτες έδειξε ότι η σουμοϋλίωση αυξάνει τη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, ενώ υπάρχουν δεδομένα που αντικρούουν αυτό τον ισχυρισμό υποστηρίζοντας ότι η σουμοϋλίωση μειώνει την ενεργότητα του HIF-1α και επάγει την ουβικιτινίωσή του μέσω του pVHL (Lisy, K and Peet, DJ 2008).

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο HIF-2α είναι πρωτεΐνη στόχος για σουμοϋλίωση και ότι περιέχει δύο αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης,

LK₃₉₄EE και LK₄₉₇IE. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στην λυσίνη 394 του HIF-2α με αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Ο σουμυλιωμένος HIF-2α ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες RNF4 λιγάση, SENP1 πρωτεάση και τον VHL και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (van Hagen, M et al., 2010).

Άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις

Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι οι HIF-1α και HIF-2α συνδέονται με την NEDD-8, η οποία είναι μία πρωτεΐνη που είναι δομικά όμοια με την ουβικουΐτίνη και συμμετέχει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Η NEDD8 συγκεκριμένα έδειξε ότι ο HIF-1α μέσω της τροποποίησης αυτής σταθεροποιείται (Ryu, JH et al., 2011).

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι ο HIF-1α υπόκειται και άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως είναι η νιτροσυλίωση στη κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του (Yasinska, IM and Sumbayev, VV 2003) και στη κυστεΐνη 533 της περιοχής ODD (Li, F et al., 2007). Όσον αφορά τη νιτροσυλίωση της κυστεΐνης 800 δεν έχει σαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος της καθώς τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα (Lisy, K and Peet, DJ 2008). Ωστόσο η νιτροσυλίωση στη κυστεΐνη 533 έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω αναστολής της δέσμευσης του pVHL στην περιοχή ODD του HIF-1α ODD (Li, F et al., 2007). Για τον HIF-2α δεν υπάρχουν ακόμα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι νιτροσυλιώνεται.

1.2.2.5 Μεταφορά των HIF-1/2α στον πυρήνα, ετεροδιμερισμός με τον ARNT και σύνδεση με το DNA

Κατά την υποξία ο HIF-1/2α σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, μια διαδικασία που γίνεται μέσω ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη και ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Στο μόριο του HIF-1α, όπως και του HIF-2α, έχουν αναγνωριστεί βάσει ομολογίας αλληλουχιών δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-74 για τον HIF-1α και 14-50 για τον HIF-2α) το οποίο είναι δομικά όμοιο με αυτό της νουκλεοπλασμίνης και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756 για

τον HIF-1α και 705-742 για τον HIF-2α) το οποίο θεωρούνταν ότι είναι ανάλογο με αυτό του SV40 (Kallio, PJ et al., 1998). Ωστόσο, άλλοι απέδειξαν ότι το καρβοξυλικό NLS είναι διμερές (bipartite-type NLS) που αποτελείται από δύο περιοχές βασικών αμινοξέων και τα ενδιάμεσα αμινοξέα από τις δυο αυτές βασικές περιοχές είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του NLS (Luo, JC and Shibuya, M 2001). Έχει δειχθεί πειραματικά για τον HIF-1α ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS είναι λειτουργικό και αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των α ιμπορτινών (Depping, R et al., 2008). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι μεταλλάξεις σε σημαντικά αμινοξέα του καρβοξυτελικού NLS δεν απέκλεισαν την είσοδο του HIF-1α από τον πυρήνα, υποδεικνύοντας την πιθανότητα να υπάρχει και άλλος τρόπος εισόδου του στον πυρήνα. Επιπλέον έγινε γνωστό ότι οι ιμπορτίνες 4 και 7 οδηγούν τον HIF-1α στον πυρήνα, με την ιμπορτίνη 7 να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή του HIF-1α bHLH-PASA (Chachami, G et al., 2009).

Εκτός από το σήμα εισόδου στον πυρήνα, ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι διαθέτει και ένα σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear export signal, NES) ανάμεσα στα αμινοξέα 632-639 (Mylonis, I et al., 2006). Όπως έχει προαναφερθεί η εξαγωγή του HIF-1α αναστέλλεται λόγω της φωσφορυλίωσης του από την p42/44 MAPK στις γειτονικές του NES σερίνες 641 και 643, γεγονός που εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τη πρωτεΐνη CRM1 (Mylonis, I et al., 2008). Ωστόσο, για τον HIF-2α δεν έχει βρεθεί σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα ούτε έχει μελετηθεί ο μηχανισμός ρύθμισης της εξόδου του.

Μετά την είσοδο του στον πυρήνα, ο HIF-1/2α πρέπει να ετεροδιμεριστεί με τον ARNT, μέσω των PAS περιοχών τους, προκειμένου να σχηματίσει το ενεργό σύμπλοκο του HIF (HIF-1 και HIF-2) ώστε να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Σε αντίθεση με τον HIF-1/2α, ο ARNT δε ρυθμίζεται από την υποξία και δεν είναι απαραίτητος για τη μετακίνηση του HIF-1/2α στον πυρήνα.

Το ετεροδιμερές HIF-α/HIF-1β, που σχηματίζεται στον πυρήνα, για να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων, προσδένεται σε αυτά σε μια αλληλουχία πρόσδεσης (HIF binding site, HBS) που βρίσκεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements, HRE). Η αλληλουχία αυτή είναι η (A/G)CGTG και πρόσφατες αναλύσεις αποκάλυψαν ότι δεν υπάρχουν επιπρόσθετες αλληλουχίες που απαιτούνται για την σύνδεση των HIFs (Xia, X and Kung, AL 2009, Schodel, J et al., 2011). Τα HRE βρίσκονται είτε στον υποκινητή είτε στον ενισχυτή των γονιδίων στόχων των HIFs. Η αλληλουχία πρόσδεσης του HIF περιέχει το δινοκλεοτίδιο CpG, το οποίο στις περισσότερες αλληλουχίες πρόσδεσης είναι κυρίως σε περιοχές που δε μεθυλιώνονται

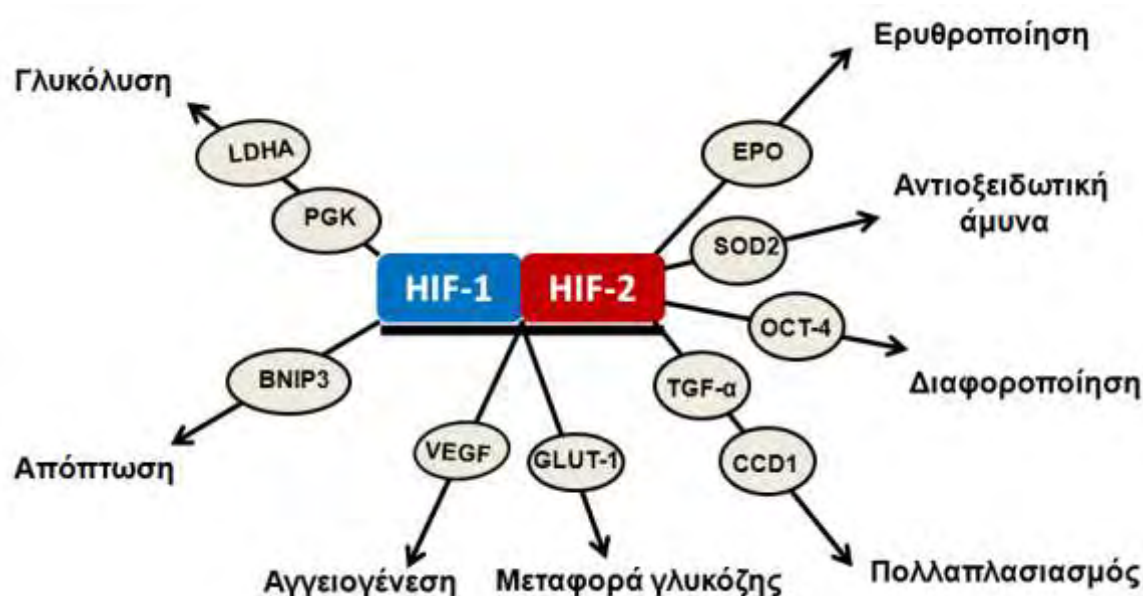
(Kaluz, S et al., 2008). Άμεση σύγκριση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α ή του HIF-2α με την αλληλουχία σύνδεσης σε καρκινικά κύτταρα του μαστού έδειξε ότι υπάρχουν μερικές περιοχές στο γονιδίωμα που συνδέονται αποκλειστικά με τον HIF-1α, ενώ υπάρχουν πολλές άλλες που συνδέονται με τον HIF-1α ή τον HIF-2α με ίδια συγγένεια αν και ο HIF-2α συνεισφέρει στην υποξική έκφραση λίγων γονιδίων σε αυτά τα κύτταρα (Mole, DR et al., 2009). Επίσης μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι HIFs συνδέονται με υψηλή συγγένεια σε περίπου 500 θέσεις σε ολόκληρο το γονιδίωμα και πολλές από τις θέσεις αυτές εντοπίζονται σε μεγάλη απόσταση (>100 kb) από τα γονίδια που ρυθμίζουν (Schodel, J et al., 2011).

1.3 ΚΟΙΝΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ HIFs

Ο HIF-1 και ο HIF-2, εφόσον προσδεθούν στα HRE των γονιδίων στόχων τους, κρίνεται απαραίτητο να αλληλεπιδράσουν με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300 μέσω της C-TAD περιοχής των HIF-1/2α, για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η αλληλεπίδραση του C-TAD HIF-1/2α με τους CBP/p300 είναι οξυγονοεξαρτώμενη και εμποδίζεται σε συνθήκες νορμοξίας από την υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης στην C-TAD από την FIH (Schofield, CJ and Ratcliffe, PJ 2005, Kaelin, WG, Jr. and Ratcliffe, PJ 2008). Αυτή η αλληλεπίδραση «στρατολογεί» και άλλους βοηθητικούς συνενεργοποιητές, όπως ο SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), ο TIF-2 (Transcription Intermediary Factor-2) και ο Ref-1 (Redox factor-1). Οι συνενεργοποιητές παίζουν δύο κύριους ρόλους, σταθεροποιούν το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής το οποίο περιέχει την RNA πολυμεράση II και επίσης έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών η οποία απαιτείται ώστε η πολυμεράση να έχει πρόσβαση στο DNA της χρωματίνης και να το μεταγράψει σε RNA (Ruas, JL et al., 2005).

Παρόλο που οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στη δομή, στο οξυγονοεξαρτώμενο μηχανισμό ενεργοποίησης και συνδέονται στην ίδια αλληλουχία στο DNA, μελέτες όσον αφορά την έκφραση και τη λειτουργικότητα τους αποκάλυψαν ότι οι HIF-α υπομονάδες ρυθμίζουν και κοινά και ειδικά γονίδια στόχους. Για παράδειγμα, ο HIF-1 είναι ο μόνος που ενεργοποιεί γονίδια που κωδικοποιούν τα γλυκολυτικά ένζυμα, όπως κινάση του φωσφογλυκερινικού οξέος (*PGK*) και γαλακτική αφυδρογονάση A (*LDHA*) κ.α., αυτά που προωθούν την απόπτωση όπως το

προαποπτωτικό γονίδιο *BNIP-3* και αυτά που εμπλέκονται στη ρύθμιση του pH όπως ο μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας 4 (*MCT4*) (Εικόνα 8). Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α ρυθμίζει αποκλειστικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, όπως η αγγειοποιητίνη 1, ο υποδοχέας της Tie-2/TEK και η ερυθροποιητίνη (*EPO*), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως η κυκλίνη D1 και ο μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας-α (*TGF-α*), στην διαφοροποίηση, όπως ο εμβρυϊκός μεταγραφικός παράγοντας *Oct-4* (*Pou5f1*, *Oct-3/4*) ο οποίος διατηρεί την πολυδυναμικότητα των στελεχιαίων κυττάρων, στην μετάσταση όπως η οξειδάση λυσίνης (*LOX*) και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες βασικής ουσίας (*MMP3*, *MMP13*) (Εικόνα 8). Μια τρίτη ομάδα γονιδίων, που συμπεριλαμβάνει τον αγγειακό αυξητικό παράγοντα A (*VEGFA*), τον μεταφορέα της γλυκόζης 1 (*GLUT-1*) και την ιντερλευκίνη 6 (*IL-6*) ρυθμίζονται και από τους δυο (Keith, B et al., 2012). Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η N-TAD περιοχή της HIF-α υπομονάδας απονέμει την εξειδίκευση για τα ειδικά γονίδια στόχους του HIF-1α και του HIF-2α ενώ η C-TAD περιοχή επάγει τα κοινά γονίδια στόχους (Εικόνα 8) (Hu, CJ et al., 2007).



Εικόνα 8: Μερικά κοινά και ειδικά γονίδια-στόχοι των HIF-1α και HIF-2α.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες απαιτείται για τη βέλτιστη και κυτταροειδική ρύθμιση των HIF γονιδίων στόχων. Έχουν βρεθεί ειδικοί συνεργοποιητές της μεταγραφής που αλληλεπιδρούν ειδικά

με τον HIF-2α. Πολλά μέλη της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων συνεργάζονται με τον HIF-2α. Μία μελέτη που έγινε σε καρκινικά κύτταρα του μαστού έδειξε ότι κάποια γονίδια που ρυθμίζονται αποκλειστικά από τον HIF-2α, παρουσιάζουν ειδικές θέσεις δέσμωσης για συγκεκριμένους ETS μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίες εντοπίζονται παρακείμενα των HREs (Aprelikova, O et al., 2006). Για παράδειγμα, ο Ets-1 συνεργάζεται με τον HIF-2α, και όχι με τον HIF-1α, για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα 2 του VEGF (*Flk-1*). Η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του Ets-1 και του HIF-2α γίνεται μέσω της περιοχής του εξονίου 7 του Ets-1 και του καρβοξυτελικού άκρου του HIF-2α (Elvert, G et al., 2003). Επίσης, ο HIF-2 ειδικά επάγει τον υποκινητή της καδερίνης (*VE-cadherin*) σε συνεργασία με τον Ets-1 μέσω δύο θέσεων δέσμωσης των ETS και ανεξάρτητα της υποξίας (Le Bras, A et al., 2007). Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των ETS, ο Elk-1, συνεργάζεται με τον HIF-2α για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2 όπως του *CITED 2*, της *EPO*, της *IGFBP3* και του *PAI-1* (Aprelikova, O et al., 2006, Hu, CJ et al., 2007).

Ένας άλλος μεταγραφικός συνενεργοποιητής που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-2α είναι ο NF-κB essential modulator (NEMO). Έπειτα από πειράματα με το σύστημα των δύο υβριδίων, ανοσοκατακρίμνησης και in vitro αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών βρέθηκε ότι ο NEMO συνδέεται ειδικά στον HIF-2α, και όχι στον HIF-1α, επάγοντας σε νορμοξία την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 βοηθώντας στην καλύτερη στρατολόγηση του CBP/p300 (Bracken, CP et al., 2005).

Επιπλέον μία πολύ πρόσφατη μελέτη, έδειξε για πρώτη φορά ότι ο USF2 (upstream stimulatory factor-2), ο οποίος ανήκει στους μεταγραφικούς παράγοντες με δομή helix-loop-helix-leucine-zip, είναι απαραίτητος για την μεταγραφή των HIF-2 γονιδίων στόχων, όπως της *EPO*, του *PAI-1* και του *CITED-2* στην υποξία σε Hep3B, RCC4 και mES. Συγκεκριμένα, η αναστολή της δράσης του USF2 μείωσε σημαντικά την επαγωγή των HIF-2 γονιδίων στόχων σε συνθήκες υποξίας, ενώ η επαγωγή της δράσης του USF2, σε κύτταρα που δεν ήταν ενεργός, ενεργοποίησε την μεταγραφή των HIF-2 γονιδίων στόχων σε συνθήκες υποξίας. Μηχανιστικά, ο USF2 ενεργοποιεί τα HIF-2 γονίδια στόχους, και όχι τα HIF-1 γονίδια στόχους, μέσω δέσμωσης στους υποκινητές των γονιδίων, αλληλεπίδρασης με το HIF-2α και «στρατολογώντας» τους συνενεργοποιητές CBP/P300 με σκοπό τον σχηματισμό ενός ενισχυμένου μεταγραφικού συμπλόκου (Pawlus, MR et al., 2012).

1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Η ανάπτυξη των συστημάτων μεταφοράς οξυγόνου κατά την εμβρυογένεση είναι άμεσα εξαρτώμενη από τις διαφορές των επιπέδων οξυγόνου στους υπό διαφοροποίηση ιστούς και είναι μια διαδικασία συντηρημένη στα μετόζωα. Έχει παρατηρηθεί ότι το υποξικό περιβάλλον (1%-5% O₂) κατά την εμβρυογένεση υποβοηθά τη μορφογένεση του καρδιαγγειακού, του αναπνευστικού, του νευρικού συστήματος και την ανάπτυξη του πλακούντα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις προήλθαν από πειράματα που έγιναν σε έμβρυα ποντικών στα οποία έγινε απαλοιφή γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι της υποξίας και ειδικότερα των γονιδίων του HIF-1α, HIF-2α και ARNT.

Η πρωτεΐνη του HIF-1α είναι ανιχνεύσιμη μεταξύ των εμβρυονικών ημερών 8.5 και 9.5 σε φυσιολογικά έμβρυα ποντικού. Η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α (*HIF-1α^{-/-}*) οδήγησε σε θάνατο των εμβρύων την 11^η μέρα λόγω έλλειψης σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων, μειωμένου αριθμού σωματιών, ελαττωματικού σχηματισμού νευρικού ιστού, ανωμαλιών στο σχηματισμό αγγείων της καρδιάς και αυξημένης ιστικής υποξίας (Iyer, NV et al., 1998, Ryan, HE et al., 1998). Η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον ARNT είχε παρόμοιο φαινότυπο με αυτό των HIF-1α^{-/-} εμβρύων, προκαλώντας το θάνατο των εμβρύων τη 10,5 μέρα που οφειλόταν σε ελαττωματικό σχηματισμό αγγείων του λεκιθικού ασκού, των βραγχιακών τόξων, των σωματιών και του πλακούντα (Doedens, A and Johnson, RS 2007, Simon, MC and Keith, B 2008).

Η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α (*HIF-2α^{-/-}*) σε ποντίκια επιχειρήθηκε από αρκετές ερευνητικές ομάδες και παρουσίασε διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα με τη σειρά πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκε λόγω του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου. Η πρώτη ερευνητική ομάδα που δημιούργησε *HIF-2α^{-/-}* ποντίκια ανέφερε ότι η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α οδήγησε σε θάνατο στο μέσο της κύησης λόγω βραδυκαρδίας προκαλούμενη από ανεπαρκή παραγωγή κατεχολαμινών, και πρότειναν ότι ο HIF-2α ρυθμίζει την εμβρυική σύνθεση των κατεχολαμινών σε συνθήκες υποξίας (Tian, H et al., 1998). Επίσης, τα ομόζυγα νεογνά πέθαναν σύντομα μετά από τη γέννηση τους λόγω της ατελούς εμβρυϊκής ωρίμανσης των πνευμόνων (Tian, H et al., 1998). Μια άλλη ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι η απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α οδήγησε σε θάνατο κατά τις εμβρυονικές ημέρες 9,5-13,5 λόγω ανεπαρκούς συγχώνευσης αγγείων και αναδιαμόρφωσής τους (Peng, J et al., 2000). Μία τρίτη ομάδα ανέφερε ότι τα μισά *HIF-2α^{-/-}* ποντίκια πέθαναν μετά την εμβρυονική ημέρα 13,5, ενώ αυτά που επέζησαν πέθαναν

2-3 ημέρες μετά τη γέννηση λόγω συνδρόμου αναπνευστικής δυσφορίας (Compernelle, V et al., 2002). Συμπερασματικά, η φυσιολογική υποξία που παρουσιάζεται in utero είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του καρδιαγγειακού-αναπνευστικού συστήματος (Doedens, A and Johnson, RS 2007, Simon, MC and Keith, B 2008). Διασταυρώνοντας ποντίκια με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, μια άλλη ερευνητική ομάδα κατάφερε να αποκτήσει έναν μικρό αριθμό βιώσιμων ενήλικων *HIF-2α*^{-/-} ποντικιών. Αυτά τα ποντίκια παρουσίασαν δυσλειτουργίες σε πολλά ζωτικά όργανα όπως πανκυτταροπενία (απουσία κυττάρων ερυθράς και λευκής σειράς), ηπατική στεάτωση, καρδιακή υπερτροφία, σκελετική μυοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια η οποία σχετιζόταν με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Τα *HIF-2α*^{-/-} ποντίκια είχαν αυξημένα επίπεδα ROS στο ήπαρ λόγω της μειωμένης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα (AOEs) όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, προσδίδοντας στον HIF-2α ένα νέο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Scortegagna, M et al., 2003).

Επίσης, η ιστοειδική απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α υπέδειξε το διαφορετικό ρόλο του σε σχέση με το HIF-1α. Σε ηπατικά κύτταρα ποντικού έπειτα από απαλοιφή του HIF-2α, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ηπατικής ερυθροποιητίνης και επιπλέον δείχθηκε ότι για την έκφραση της είναι απαραίτητος ο HIF-2α και όχι ο HIF-1α (Rankin, EB et al., 2007). Επιπλέον, η απαλοιφή του HIF-2α και όχι του HIF-1α στο εντερικό επιθήλιο οδήγησε σε μειωμένη απορρόφηση του σιδήρου υπογραμμίζοντας το ρόλο που παίζει ο HIF-2α στην ομοιοστασία του σιδήρου λόγω της επαγωγής της έκφρασης του μεταφορέα σιδήρου DMT1 (Mastrogiannaki, M et al., 2009).

1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

1.5.1 Γενικά

Μία από τις καλύτερα μελετημένες συστηματικές προσαρμογές στην υποξία είναι η ενεργοποίηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων. Έναν αιώνα πριν, ερευνητές είχαν παρατηρήσει την σχέση ανάμεσα στη μειωμένη πίεση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και τον αυξημένο αριθμό ερυθροκυττάρων στο αίμα ανθρώπων και ζώων. Λίγα χρόνια μετά βρέθηκε ότι η ορμόνη που ρυθμίζει την παραγωγή των ερυθροκυττάρων είναι η ερυθροποιητίνη (EPO) (Haase, VH 2010, Jelkmann, W 2011).

Η EPO είναι ο κύριος αυξητικός αιμοποιητικός παράγοντας, που διεγείρει την ερυθροποίηση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής, νεογνικής κι ενήλικης ζωής. Αναστέλλει την απόπτωση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους σε νορμοβλάστες και λειτουργεί αφού συνδεθεί με τον ειδικό της υποδοχέα (EPO-R) στη επιφάνεια του κυττάρου. Η σηματοδότηση από τον EPO-R περιλαμβάνει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το μονοπάτι του STAT-5, της PI-3K/AKT, της MAPK/ERK και της PKC (Haase, VH 2010, Jelkmann, W 2011).

Η EPO έχει μοριακό βάρος 30,4 kD περιέχει 165 αμινοξέα και είναι εξαιρετικά γλυκοσυλιωμένη σε ποσοστό 40% υδατάνθρακες. Το μόριό της αποτελείται από τέσσερις γλυκοσυλιωμένες αλυσίδες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη βιολογική της δράση και προστατεύουν τη δομή της από την καταστροφική επίδραση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Επιπλέον, οι N- και O-συνδεδεμένες αλυσίδες είναι απαραίτητες για την παραγωγή και έκκριση της ερυθροποιητίνης. Η βιολογική της δράση καθορίζεται, επίσης, από δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, μείωση των σουλφυδρικών ομάδων οδηγεί σε απώλεια της βιολογικής δραστηριότητας της EPO, ενώ η αποκατάσταση της λειτουργικότητάς τους επαναφέρει τη βιολογική δραστηριότητα της EPO κατά 85% (Jelkmann, W 2004).

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, η κύρια θέση παραγωγής της EPO είναι το ήπαρ, ενώ στους ενήλικες ο νεφρός, με το ήπαρ να αποτελεί τη δευτερεύουσα πηγή. Η αλλαγή της θέσης παραγωγής από το ήπαρ στους νεφρούς καθορίζεται από τη διάρκεια της κύησης. Έως την 30η εβδομάδα της κύησης λιγότερο από το 9% της συνολικής έκφρασης του mRNA του γονιδίου της EPO προέρχεται από τους νεφρούς, ενώ το ποσοστό αυτό φθάνει στο 27% στις 32 εβδομάδες κύησης, ως συνέπεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης του νεφρού. Ο μηχανισμός, όμως, που ρυθμίζει τη μετάθεση της παραγωγής της EPO από το εμβρυϊκό ήπαρ στο νεφρό δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Haase, VH 2010, Jelkmann, W 2011).

Η υποξία αποτελεί το κυρίαρχο φυσιολογικό ερέθισμα για την παραγωγή της ερυθροποιητίνης και ανάλογα με τις συνθήκες της υποξία τα επίπεδα της EPO μπορούν να αυξηθούν πολλές εκατοντάδες φορές. Η παραγωγή της ερυθροποιητίνης ως απάντηση στην υποξία εξαρτάται από τη θέση παραγωγής και το στάδιο της ανάπτυξης. Ειδικότερα, υπάρχει διαφορά στο ερέθισμα της υποξίας για την παραγωγή ερυθροποιητίνης μεταξύ νεφρού και ήπατος. Η ποσότητα της EPO που παράγεται από τα ηπατικά κύτταρα, είναι

μόνο το 10% αυτής που παράγεται από τα νεφρικά κύτταρα σε υποξία, ενώ απαιτείται μεγαλύτερη διάρκεια υποξίας στο ήπαρ από ότι στο νεφρό. Η ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής της EPO μπορεί να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός της υποξίας, όπως ο ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) και ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) (Haase, VH 2010, Jelkmann, W 2011).

1.5.2 Ο ρόλος του HIF-2α στην παραγωγή της ερυθροποιητίνης.

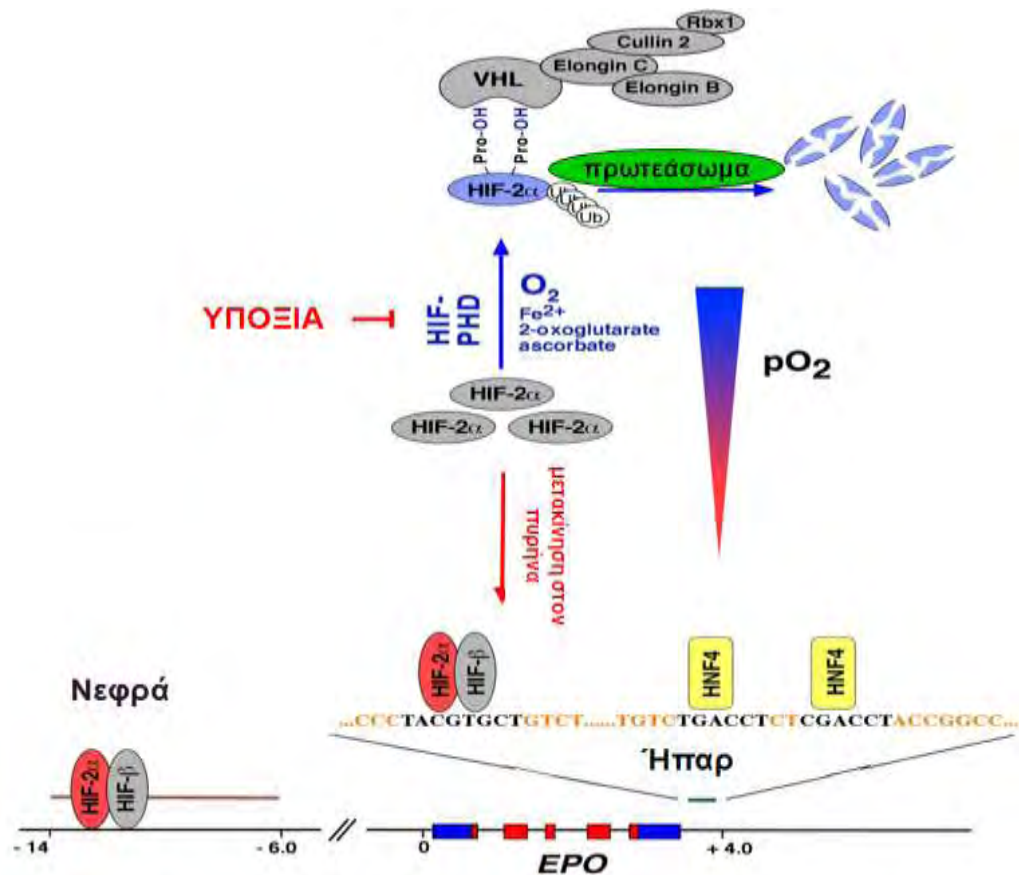
Παρόλο που ο HIF-1 ανακαλύφθηκε έπειτα από αναλύσεις του μοριακού μηχανισμού επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας και απομονώθηκε από στήλη αγκιστείας που περιείχε ακινητοποιημένη την DNA αλληλουχία του 3'ενισχυτή της EPO, στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι ο HIF-2 είναι ο ρυθμιστής της επαγωγής της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας στα νεφρά και στο ήπαρ με *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Αυτή η άποψη επιβεβαιώθηκε με ιστολογικές μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι τα σημεία έκφρασης του HIF-2α στα νεφρικά κύτταρα συμπίπτουν με τα σημεία παραγωγής της ερυθροποιητίνης (Haase, VH 2010).

Οι πρώτες παρατηρήσεις προήλθαν από απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α σε έμβρυα ποντικών τα οποία όμως κατάφεραν να επιζήσουν μετά τη γέννα λόγω διασταύρωσης ποντικών με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Τα βιώσιμα ενήλικα *HIF-2α*^{-/-} ποντίκια παρουσίαζαν, εκτός των άλλων, αναιμία και εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα νεφρικής ερυθροποιητίνης, ενώ η χορήγηση ανασυνδυασμένης EPO αποκατέστησε την αιμοποίηση, αποδεικνύοντας ότι η αναιμία ήταν αποτέλεσμα της μειωμένης παραγωγής της EPO στα νεφρά και όχι άλλης δυσλειτουργίας στην διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (Scortegagna, M et al., 2003, Scortegagna, M et al., 2005) Μια άλλη ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε ένα ρυθμιζόμενο σύστημα αποσιώπησης των HIFs μετά τη γέννηση των ποντικών, και μελέτησε την επίδραση της ολικής απαλοιφής του HIF-2α ανεξάρτητα από τις απαιτήσεις κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ολική αποσιώπηση του HIF-2α οδηγεί σε αναιμία που συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα της EPO, γεγονός που το οποίο αποδεικνύει ότι ο HIF-2α είναι ο κύριος ρυθμιστής της παραγωγής EPO στα ενήλικα ποντίκια σε φυσιολογικές και υπό στρες καταστάσεις (Gruber, M et al., 2007). Επίσης, σε ηπατικά κύτταρα ποντικού έπειτα από απαλοιφή του HIF-2α, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα ηπατικής

ερυθροποιητίνης και επιπλέον δείχθηκε ότι για την έκφραση της είναι απαραίτητος ο HIF-2α και όχι ο HIF-1α (Rankin, EB et al., 2007).

Επιπλέον, με *in vitro* μελέτες, έπειτα από πειράματα αποσιώπησης του HIF-1α ή του HIF-2α σε διάφορες κυτταρικές σειρές βρέθηκε ότι η επαγωγή της EPO σε συνθήκες υποξίας εξαρτάται από τον HIF-2α και όχι από τον HIF-1 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B, κύτταρα νευροβλαστώματος Kelly και σε αστροκύτταρα (Warnecke, C et al., 2004, Chavez, JC et al., 2006, Rankin, EB et al., 2007). Επίσης μια πολύ πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η επαγωγή της νεφρικής EPO στην υποξία εξαρτάται αποκλειστικά από τον HIF-2 και όταν η απαλοιφή του HIF-2 γίνεται στα νεφρά, ο ηπατικός HIF-2 αναλαμβάνει τον ρόλο του κύριου ρυθμιστή της EPO στον ορού. Ακόμη απέδειξαν ότι ο HIF-2 των ηπατοκυττάρων ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων που συμβάλλουν στο μεταβολισμό του σιδήρου, αποδίδοντας έναν νέο ρόλο στον HIF-2 στο συντονισμό της σύνθεσης της EPO περιλαμβάνοντας την ομοιόσταση του σιδήρου (Kapitsinou, PP et al., 2010).

Ο μοριακός μηχανισμός της εξαρτώμενης από τον HIF-2 επαγωγής της EPO δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος βρέθηκε ότι ο HIF-2, και όχι ο HIF-1, συνδέεται με τα ενδογενή HRE της EPO, ενώ ο HIF-1 δεσμεύεται στα HRE μόνο της ανασυνδιασμένης EPO *in vitro*. Επίσης, βρέθηκε ότι για την επαγωγή της μεταγραφής του ενισχυτή της EPO από τον HIF-2 απαιτείται η παρουσία μίας πρόσθετης αλληλουχίας του ενισχυτή που βρίσκεται δίπλα στα HRE η οποία περιέχει θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 9). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο HIF-2 συνεργάζεται και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την επαγωγή της μεταγραφής της EPO. Μία από αυτές τις θέσεις στον ενισχυτή της EPO περιλαμβάνει τα στοιχεία DR2 τα οποία είναι θέσεις δέσμευσης για τα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών ορμονών. Ο HNF-4 (Hepocyte Nuclear Factor-4) αποτελεί ένα πιθανό υποψήφιο παράγοντα που μπορεί ειδικά να συνεργάζεται με τον HIF-2 διότι συνδέεται στα DR-2. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο HNF-4, όπως και ο HIF-2α, εκφράζεται σε θέσεις όπου εντοπίζεται η σύνθεση της EPO στο ήπαρ και στα νεφρά ενώ φαίνεται να είναι απαραίτητος για την επαγωγή του γονιδίου της EPO στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Haase, VH 2010, Jelkmann, W 2011).



Εικόνα 9: Η ρύθμιση της EPO από τον HIF-2 σε συνθήκες υποξίας. Στο ήπαρ, η υποξική επαγωγή της EPO γίνεται μέσω των στοιχείων απόκρισης που βρίσκονται στο 3' άκρο του γονιδίου της EPO, ενώ στα νεφρά βρίσκεται στη περιοχή 6-14 kb πριν το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής (Haase, VH 2010).

Επίσης, η συστηματική παραγωγή της EPO ρυθμίζεται από διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-2α. Μία από αυτές είναι η αποκετυλίωση του HIF-2α από την σιρτουΐνη-1, η οποία αυξάνει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 σύνθεση της EPO in vivo και in vitro (Dioum, EM et al., 2009).

Επίσης, πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι μια σειρά από μεταλλάξεις στο γονίδιο του HIF-2α, το *EPAS1*, προκαλούν αύξηση της παραγωγής της EPO που προκαλεί αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα, μια ασθένεια η οποία ονομάζεται ερυθροκυττάρωση. Η ερυθροκυττάρωση είναι κληρονομική ασθένεια και διακρίνεται σε πρωτοπαθής ή συγγενής και δευτεροπαθής ή επίκτητη. Οι μεταλλάξεις στο *EPAS1* προκαλούν συγγενή ερυθροκυττάρωση τύπου 4 με αυτοσωματική κυρίαρχη κληρονομικότητα. Έχουν βρεθεί πάνω από μία μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν αλλαγές

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

1.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

1.6.1 HIF-2 και καρκίνος

Στην πλειοψηφία των ανθρώπινων όγκων, όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του προστάτη και των νεφρών έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των HIF-1α και HIF-2α λόγω είτε της ανάπτυξης τοπικής υποξίας είτε γονιδικών τροποποιήσεων. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νεοσύστατου όγκου και της συνεχούς αύξησης του μεγέθους του μειώνεται σταδιακά το οξυγόνο στο εσωτερικό του μικροπεριβάλλον. Η υποξία, κυρίως μέσω των HIFs, προωθεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων με το να προάγει τον αναερόβιο μεταβολισμό, να επάγει την δημιουργία νέων αγγείων, να αντιστέκεται στην απόπτωση, διαδικασίες που οδηγούν σε κακοήθη φαινότυπο και επιθετική καρκινική συμπεριφορά. Τα παραπάνω σχετίζονται με αυξημένη μετάσταση και κακή διάγνωση σε ασθενείς σε διάφορους τύπους καρκίνου.

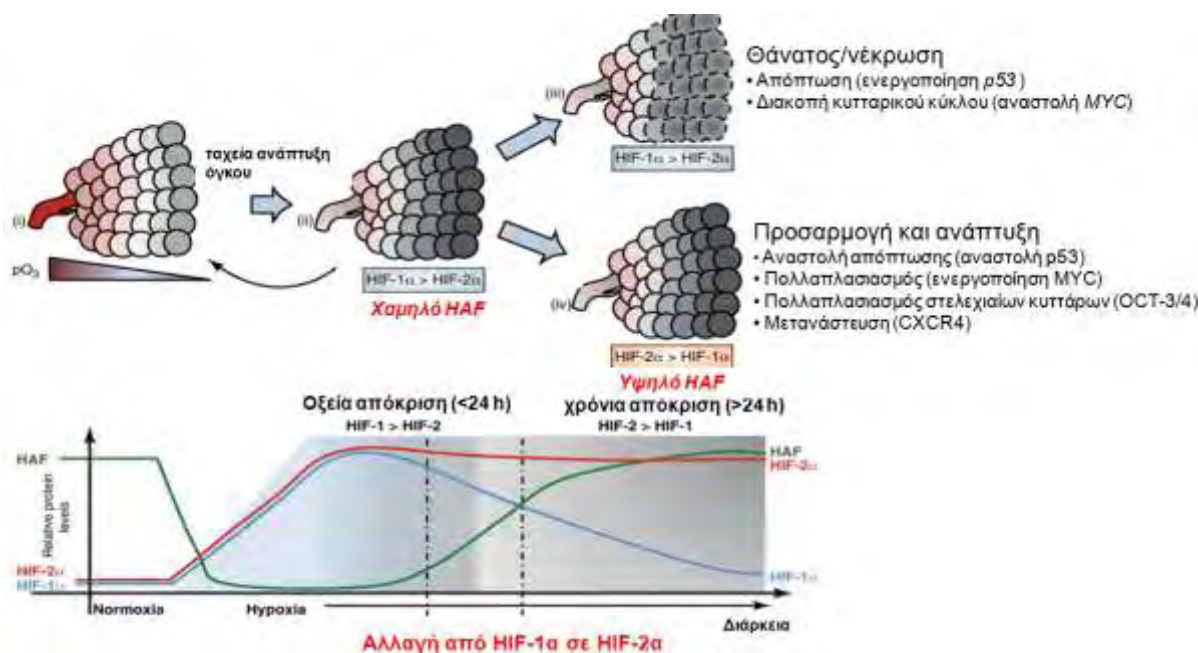
Σύμφωνα με τη δράση του HIF-1 και του HIF-2 στις μεταβολές της συγκέντρωσης του οξυγόνου, ο HIF-1 παρουσιάζει μία γρήγορη επαγωγή σε έντονη ή παροδική υποξία,

ενώ η χρόνια υποξία ευνοεί την ενεργοποίηση του HIF-2. Ωστόσο, για το αν είναι ο HIF-1 ή ο HIF-2, ή και οι δύο HIFs που προωθούν την ανάπτυξη του όγκου, αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των απαιτούμενων συμπαραγόντων, και την λειτουργικότητα των HIF-α υπομονάδων σε συγκεκριμένα μονοπάτια όπως της απόπτωσης, η οποία ενισχύεται κυρίως από τον HIF-1, και της προόδου του κυτταρικού κύκλου από τον HIF-2 (Koh, MY and Powis, G 2012).

Η έκφραση του HIF-1α συσχετίζεται με κακή διάγνωση στα αρχικά στάδια καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του μαστού, στο ολιγοδενδρογλοίωμα, στο καρκίνο των ωοθηκών και το στοματοφαρυγγικό καρκίνο. Ωστόσο, σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του HIF-2α και της αυξημένης θνησιμότητας των ασθενών έχει παρατηρηθεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως, το νεφρικό καρκίνωμα διαυγών κυττάρων με ελαττωματικό *VHL* (*VHL*-deficient ccRCC), το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), το νευροβλάστωμα, το καρκίνο κεφαλής-τραχήλου. Η έκφραση του HIF-2α σε αυτούς τους τύπους καρκίνου αποτελεί έναν αρνητικό προγνωστικό δείκτη. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η υπερέκφραση του HIF-1α συσχετίζεται με μειωμένη θνησιμότητα σε NSCLC και καρκίνο κεφαλής-τραχήλου προτείνοντας ότι οι δύο HIF-α υπομονάδες έχουν διαφορετικές επιδράσεις στη πορεία της ασθένειας ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου (Bertout, JA et al., 2009). Αυτή η διαφορά των HIF-α πρωτεϊνών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό εκτός από την ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων στόχων και στην διαφορετική επίδρασή τους σε σημαντικές ογκοπρωτεΐνες και ογκοκατασταλτικούς παράγοντες (Keith, B et al., 2012).

Οι διακριτοί ρόλοι του HIF-1α και του HIF-2α κατά την καρκινογένεση έχουν μελετηθεί περισσότερο σε *VHL*-deficient ccRCC. Στο 70% των ccRCC, το γονίδιο του *VHL* είναι απενεργοποιημένο, λόγω σημειακής μετάλλαξης ή διαγραφής ή μεθυλίωσης, με αποτέλεσμα οι HIF-1α και HIF-2 να εκφράζονται ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου. Πειράματα υπερέκφρασης και απαλοιφής του HIF-1α και του HIF-2α σε κυτταρικές σειρές με *VHL*-deficient ccRCC, υπέδειξαν ότι ο HIF-2α, και όχι ο HIF-1α, είναι ο κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης του όγκου. Επιπλέον, κατά την πορεία της νόσου η έκφραση του HIF-1α μειώνεται σταδιακά σε προχωρημένα στάδια ενώ η έκφραση του HIF-2α αυξάνεται (Εικόνα 10) (Qing, G and Simon, MC 2009). Μία πιθανή εξήγηση είναι η διαφορετική δράση του HIF-1α και του HIF-2α στην πρωτεΐνη MYC. Το πρωτοογκογονίδιο *MYC* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που έχουν να κάνουν με την βιογένεση του ριβοσώματος, τον ενεργειακό

μεταβολισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο HIF-1α έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη MYC αναστέλλοντας τη μεταγραφική της ενεργότητα με αποτέλεσμα να μειώνεται ο εξαρτώμενος από την MYC αναερόβιος μεταβολισμός, η πρωτεϊνική σύνθεση και η κυτταρική διαίρεση (Keith, B et al., 2012). Αντιθέτως, ο HIF-2α προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενισχύοντας την δραστικότητα της MYC (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, ο HIF-2α προωθεί τον κυτταρικό κύκλο αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες p21 και p27, και αυξάνοντας την ίδια στιγμή την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την κυκλίνη D2 και τον E2F1 (Gordan, JD et al., 2007, Qing, G and Simon, MC 2009). Μία πιθανή εξήγηση του μηχανισμού που εμπλέκεται σε αυτό είναι ότι ο HIF-1α μέσω της PAS περιοχής του συνδέεται στον SP1 και όχι στην MYC, ενώ ο HIF-2α λόγω της φωσφορυλίωσης από την PDK1, δεν μπορεί να συνδεθεί στην SP1 αλλά σχηματίζει σύμπλοκο με την MYC.



Εικόνα 10: Η μεταβολή της μεταγραφής από εξαρτώμενη από τον HIF-1 σε μεταγραφή εξαρτώμενη από τον HIF-2 σε χρόνια υποξία σε καρκινικούς όγκου. Στα αρχικά στάδια του καρκίνου, ο HAF είναι σε χαμηλά επίπεδα, και ο HIF-1α υπερτερεί του HIF-2α με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του p53 και την απόπτωση καθώς και την αναστολή του MYC και την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου ο HAF είναι σε υψηλά επίπεδα, και ο HIF-2α υπερτερεί του HIF-1α με αποτέλεσμα την αναστολή του p53, την ενεργοποίηση του MYC και του πολλαπλασιασμού καθώς και την ενεργοποίηση του OCT-3/4 και του CXCR4 (Koh, MY and Powis, G 2012).

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι HIFs ασκούν διαφορετικές επιδράσεις στην πορεία του όγκου, αφορά την υποξική ρύθμιση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης

p53. Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται εκτός των άλλων στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων. Ο HIF-1α συνδέεται με την p53, με αποτέλεσμα η p53 να σταθεροποιείται και να επάγεται η απόπτωση και ο κυτταρικός θάνατος. Αντιθέτως, έχειδειχθεί ότι ο HIF-2α έμμεσα καταστέλλει την δραστικότητα της p53 και με αυτό ενισχύει την αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην χημειοθεραπεία και την ραδιοθεραπεία (Bertout, JA et al., 2009, Roberts, DL et al., 2009). Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι συγκεκριμένοι καρκίνοι, περιλαμβάνοντας όχι μόνο τον νεφρικό κυτταρικό καρκίνο, μπορεί να διαφέρουν στην συμπεριφορά του όγκου και στην αντίσταση στα φάρμακα ανάλογα με την έκφραση του HIF1α ή/και του HIF-2α.

Ο HIF-2 φαίνεται να ευνοεί έναν επιθετικό καρκινικό φαινότυπο μέσω πολλαπλών μηχανισμών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την μετάσταση και την διαφοροποίηση. Ο HIF-2 έχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου, μέσω, εκτός της ρύθμισης της δράσης της πρωτεΐνης MYC, της ενεργοποίησης της έκφρασης του TGF-α και της κυκλίνης D1 σε καρκινικά νεφρικά κύτταρα (Qing, G and Simon, MC 2009). Όσον αφορά την δημιουργία νέων αγγείων, ο HIF-2 επάγει άμεσα την έκφραση προ-αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF, της EPO, της αγγειοποιητίνης και του υποδοχέα TIE-2 (Gruber, M et al., 2007). Επίσης, ένα πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών υποδεικνύει πως ο HIF-2 συμβάλλει θετικά στη μετάσταση του όγκου ρυθμίζοντας την έκφραση σημαντικών παραγόντων που ελέγχουν την μεταστατική ικανότητα του κυττάρου, όπως η E-καδερίνη, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό των κυτταρικών συνδέσεων, η χυμοκίνη CXCR4, η οξειδάση λυσίνης (LOX) η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση του συνδετικού ιστού και ο παράγοντας TWIST (Qing, G and Simon, MC 2009). Επιπλέον, πολυδύναμα καρκινικά στελεχιαία κύτταρα έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και φαίνεται πως η υποξία και ο HIF-2 ενισχύουν την αποδιαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Ο HIF-2 επάγει άμεσα και ειδικά την έκφραση του OCT-4, ενός μεταγραφικού παράγοντα που διατηρεί την αδιαφοροποίητη ταυτότητα των βλαστικών κυττάρων (Covello, KL et al., 2006).

Επίσης, ο HIF-2α παίζει σημαντικό ρόλο στη γένεση και τη πρόοδο του νευροβλαστώματος, το οποίο αποτελεί τον πιο συχνό όγκο της παιδικής ηλικίας και αναπτύσσεται από τα αρχέγονα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Ο HIF-2α σταθεροποιείται και εκφράζεται στο νευροβλάστωμα σε περιοχές με πλούσια αγγείωση και με υψηλότερα ποσοστά οξυγόνου (5%) σε σχέση με τον HIF-1α. Επιπλέον, ο HIF-1α

σταθεροποιείται γρήγορα αλλά μετά αποικοδομείται, ενώ ο HIF-2α παραμένει εκφρασμένος σε υποξία μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας, γεγονός που συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και κακή πρόγνωση του καρκίνου (Holmquist-Mengelbier, L et al., 2006).

Η απορύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών στον καρκίνο επίσης συμβάλλει στην υπερέκφραση των HIF και την ενεργοποίησή τους. Σε καρκινικά κύτταρα στα οποία είναι συνεχώς ενεργά τα μονοπάτια των Ras-MAPK-ERK, του Src ή αυτό των PI3K-AKT-mTOR έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών HIF-1/2α. Επιπλέον, η απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως της PTEN, η οποία οδηγεί σε συνεχή ενεργότητα της AKT, σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα των HIF-1/2. Στον καρκίνο του προστάτη, στον οποίο είναι απενεργοποιημένος ο PTEN, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση κυρίως του HIF-1α σε σύγκριση με φυσιολογικό επιθήλιο του προστάτη. Ο καρκίνος του προστάτη είναι μία πολύπλοκη πολυπαραγοντική νόσος στην οποία τα αρχικά στάδια είναι ορμονο-εξαρτώμενα και για αυτό αντιδρούν στη θεραπεία με στέρηση ανδρογόνων. Ωστόσο, με την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη η θεραπεία με στέρηση ανδρογόνων δεν είναι αποτελεσματική λόγω της ορμονο-ανεξάρτητης κατάστασης στα προχωρημένα στάδια (Papandreou, CN and Logothetis, CJ 2004). Επιπλέον, ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος αποτελεί παράδειγμα καρκίνου που παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα των μονοπατιών Ras-MAPK-ERK και του PI3K-AKT-mTOR, και χαρακτηρίζεται ως ένας από τους πλέον αγγειοβριθείς συμπαγείς όγκους. Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του HIF-1α και του HIF-2α είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Mylonis, I and Simos, G 2012). Επίσης, το γεγονός ότι η έκφραση των αγγειογενετικών γονιδίων στα ηπατοκύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από τον HIF-2 αποτελεί σημαντική υπόδειξη ότι ο HIF-2 κυριαρχεί στη ρύθμιση της αγγειογένεσης στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Πράγματι, η απενεργοποίηση του HIF-2α καταστέλλει την ανάπτυξη του σχετιζόμενου με τον VHL ηπατικού αιμαγγειώματος (Rankin, EB et al., 2008) και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου ντοξορουμπισίνη (doxorubicin) στη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (He, C et al., 2012).

1.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Αφού οι HIFs έχουν κεντρικό ρόλο στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό μικροπεριβάλλον του όγκου, η δυνατότητα επιλεκτικής αναστολής της δράσης των HIFs φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό κλινικό πλεονέκτημα. Ιστορικά, οι πρωτεΐνες που δεσμεύονταν στο DNA παρουσίαζαν δυσκολία στη στόχευση για θεραπεία, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί πολλές ουσίες που αναστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα των HIFs είτε άμεσα ή έμμεσα. Για παράδειγμα ουσίες που στοχεύουν την τοποϊσομεράση I όπως η τοποτεκάνη (topotecan), και παράγοντες παρεμβολής στο DNA όπως η εχινόμυκίνη (echinomycin) η οποία παρεμβαίνει στις αλληλουχίες HRE, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τον ετεροδιμερισμό των HIF υπονομάδων και τη μεταγραφική ενεργότητα (Keith, B et al., 2012). Ένα άλλο σημείο παρέμβασης στο μονοπάτι του HIF είναι στο επίπεδο της μετάφρασης του mRNA του. Έχει δείχθει ότι σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν τα μονοπάτια PI3K-Akt-mTOR και η αναστολή τους μπορεί να προκαλέσει την αναστολή της μετάφρασης του HIF. Για παράδειγμα ο αναστολέας της mTOR, ραπαμυκίνη αλλά και αναστολείς που δρουν σε παράγοντες που ενεργοποιούν το mTOR μονοπάτι (υποδοχείς EGFR, HER2-Neu ή BCR-AbI) μπορούν να αναστείλουν την έκφραση του HIF-1α. Οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι η δραστηριότητα των HIFs αναστέλλεται από διάφορα φάρμακα που ήδη έχουν εγκριθεί για την θεραπεία του καρκίνου, ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν αυτά τα φάρμακα μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη και την πρόοδο των αρχικών όγκων μέσω ειδικής αναστολής της δράσης των HIFs (Keith, B et al., 2012).

Λόγω των διαφορετικών επιδράσεων του HIF-1 και του HIF-2 στην ανάπτυξη του όγκου, θα ήταν σημαντικό να προσδιοριστούν αναστολείς που επιλεκτικά επηρεάζουν μόνο τον HIF-1 ή τον HIF-2. Για παράδειγμα, αναστέλλοντας τον HIF-1 θα είχε ιδιαίτερο πλεονέκτημα σε γλυκολυτικούς υποξικούς όγκους, ενώ η αναστολή του HIF-2 θα ήταν χρήσιμη για την θεραπεία του νεφρικού καρκίνου. Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι μία σειρά ουσιών μικρού μοριακού βάρους εμπλέκονται στην μετάφραση του mRNA του *EPAS1* ενισχύοντας την σύνδεση του IREBP1 με τα στοιχεία IRE που βρίσκονται στο 5'UTR του *EPAS1*, αλλά όχι στο *HIF1A* (Zimmer, M et al., 2008).

Η αναστολή των HIFs μπορεί να είναι ωφέλιμη ως ένα σημείο, επειδή έχει βρεθεί ότι και η υπερέκφραση του HIF-2α όπως και η απαλοιφή του *EPAS1* αυξάνουν τους όγκους του πνεύμονα σε ποντίκια αν και με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η υπερέκφραση του HIF-2α αυξάνει την έκφραση του VEGFA και του SNAIL προάγοντας την

αγγειογένεση και την εισβολή του όγκου, ενώ από την άλλη μεριά η πλήρης απώλεια του HIF-2α μειώνει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου SCGB3A1 το οποίο είναι γονίδιο στόχος του HIF-2 (Keith, B et al., 2012).

1.7 ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ

1.7.1 Η οικογένεια κινασών καζεΐνης 1 (CK1)

Η κινάση καζεΐνης 1 (Casein Kinase 1, CK1) ανήκει στην υπεροικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και εκφράζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η οικογένεια των κινασών CK1 είναι εξελικτικά συντηρημένη ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί αρκετά γονίδια κινάσης καζεΐνης από το ζυμομύκητα μέχρι και τους ανώτερους ευκαρυώτες. Μέχρι στιγμής, έχουν χαρακτηριστεί τουλάχιστον 7 ισομορφές CK1 (α,β,γ1,γ2,γ3,δ και ε). Το μοριακό βάρος των ισομορφών της CK1 ποικίλλει από 37 kD (CK1α) ως 50 kD (CK1γ3). Οι κινάσες καζεΐνης 1 δρουν σαν μονομερή. Ο χαρακτηρισμός της εξειδίκευσης στην αναγνώριση του υποστρώματος από τις ισομορφές της CK1 αρχικά οδήγησε στην ταυτοποίηση της ομόφωνης αλληλουχίας S/T(P)-X1-2-S/T, υποδεικνύοντας ότι η τροποποίηση των καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης από τη CK1 απαιτεί προηγούμενη φωσφορυλίωση άλλου καταλοίπου που βρίσκεται αμινοτελικά του κατάλοιπου στόχου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μια ομάδα όξινων αμινοξέων που προηγούνται της σερίνης/θρεονίνης ή ένα όξινο αμινοξύ στη θέση N-3 μπορεί να υποκαταστήσει ικανοποιητικά το απαιτούμενο 'φωσφο-αμινοξύ'. Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση ενός υποστρώματος από την CK1 δεν φαίνεται να εξαρτάται αυστηρά από την ομόφωνη αλληλουχία επειδή πολλές φορές παίζει πολύ πιο σημαντικό ρόλο η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης υποστρώματος (Knippschild, U et al., 2005).

Μέχρι στιγμής ο αριθμός των γνωστών υποστρωμάτων της CK1 συνεχώς αυξάνεται. Στα υποστρώματα της CK1 διακρίνεται μεγάλη ποικιλία από ενδοκυττάρια πρωτεΐνες όπως ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες, ογκογονίδια ικής προέλευσης, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού μέχρι μεμβρανοσύνδετες πρωτεΐνες και υποδοχείς, κάτι που υποδεικνύει την εμπλοκή της κινάσης στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών.

Αν και όλες οι ισομορφές της CK1 είναι συνεχώς ενεργά ένζυμα, έχουν αναφερθεί μερικοί παράγοντες που μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση και δραστηριότητα της CK1.

Η επώαση των κυττάρων με ινσουλίνη, ή ο ικός μετασχηματισμός, η επώαση με αναστολείς τοποϊσομερασών ή η γ-ακτινοβολία οδηγεί σε αυξημένη δράση της CK1 και αύξηση των πρωτεϊνικών της επιπέδων. Η αύξηση της συγκέντρωσης της 4,5 διφωσφορικής ινσιτόλης (PIP2) στη μεμβράνη μειώνει τη δραστηριότητα της CK1α σε ερυθροκύτταρα και νευρικά κύτταρα. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η διαμερισματοποίηση είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης κινάσης-υποστρώματος. Ένας άλλος μηχανισμός που επηρεάζει τη δράση της CK1 είναι η ανασταλτική αυτοφωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα ειδικά στο καρβόξυτελικό τμήμα της CK1 και σε μερικές περιπτώσεις και στην καταλυτική περιοχή (Knippschild, U et al., 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, η CK1 φωσφορυλιώνει ένα πλήθος πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαφορετικές λειτουργίες. Συνοπτικά, η CK1 έχει αναφερθεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης κυτταρικών λειτουργιών και μονοπατιών όπως είναι οι κερκάρδιοι ρυθμοί, το αναπτυξιακό μονοπάτι Wnt, η απόπτωση και ο καρκίνος.

1.7.2 Η οικογένεια των κινάσων που ελέγχονται από εξωκυτάρια μηνύματα (ERK)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ελέγχονται από εξωκυτάρια μηνύματα (ERK) είναι υψηλά διατηρημένες κινάσες σερίνης/θρεονίνης και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAP κινάσες) και είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Η οικογένεια ERK των MAP κινάσων αποτελείται από τις κινάσες ERK1 και ERK2, οι οποίες είναι όμοιες δομικά και λειτουργικά και τη MAP κινάση ERK3, η οποία παρουσιάζει σημαντική ομολογία με την ERK2 MAP κινάση, αλλά παράλληλα εμφανίζει διακριτές λειτουργικές διαφορές που τη διαφοροποιούν από τις άλλες δύο κλασσικές κινάσες. Τα μέλη της οικογένειας ERK που εκφράζονται ευρέως είναι οι κινάσες ERK1 και ERK2, που συχνά αναφέρονται ως p42/p44 MAP κινάσες. Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης /θρεονίνης σε αλληλουχία Ser/Thr-Pro (Roskoski, R, Jr. 2012).

Η ενεργοποίηση των MAP κινάσων εξαρτάται από έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης στον οποίο συμμετέχουν κινάσες των MAP κινάσων. Ειδικότερα, η φωσφορυλίωση των διαφόρων MAP κινάσων πραγματοποιείται από μια κατηγορία κινάσων που καλούνται MAPK κινάσες (MAPKKs ή MEKs) και εμφανίζουν ειδικότητα για τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν. Οι ERK κινάσες φωσφορυλιώνονται από τις MEK1

και MEK2 κινάσες στην αλληλουχία Thr-Glu-Tyr. Εκτός από την ενεργοποίηση τους από τις MEK, η ενεργότητά των ERK1/2 ρυθμίζεται από τις πρωτεϊνικές φωσφάτασες μέσω αποφωσφορυλίωσης του μοτίβου ενεργοποίησης.

Το μονοπάτι ERK, ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες και συμμετέχει κυρίως στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Οι ERK1/2 κινάσες, αυξάνουν τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων και επιδρώντας στα ριβοσώματα, τη χρωματίνη και τους μεταγραφικούς παράγοντες συντελούν στην αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα μέσω της επαγωγής του αναστολέα των εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών p21WAF/CIP1 μπορούν να επιφέρουν αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Roskoski, R, Jr. 2012).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Κεντρικό ρόλο στη μεταγραφική απόκριση στην υποξία διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία, ο HIF-1α και ο HIF-2α. Παρόλο που οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν πολλές δομικές ομοιότητες, η πρόσφατη βιβλιογραφία δείχνει ότι έχουν μοναδικούς μεταγραφικούς στόχους και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Εκτός από την υποξία, οι HIF-1α και HIF-2α επάγονται σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου από ορισμένες χημικές ενώσεις (όπως η δεσφερριτοξαμίνη, το κοβάλτιο, οι αναστολείς των προλυλο-υδροξυλασών ή του πρωτεασώματος), μια διαδικασία γνωστή ως «χημική υποξία». Παρ' όλες τις γενικά αποδεκτές ομοιότητες στη δομή και την ρύθμιση των HIF-1α και HIF-2α, η ρύθμιση του HIF-2α διαφαίνεται να είναι διαφορετική σε συνθήκες νορμοξίας. Επιπλέον, η ρύθμιση του HIF-2α από τους παραπάνω παράγοντες καθώς και οι μηχανισμοί δράσης τους δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί και για αυτό αποτέλεσαν το βασικό αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

Πρώτος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη του ρόλου του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, και συγκεκριμένα: α) η διαλεύκανση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α στην υποξία και στη νορμοξία παρουσία διαφόρων ενώσεων που μιμούνται την υποξία όπως το κοβάλτιο και των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν και β) η ανάπτυξη συστήματος για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 διακριτά από εκείνη του HIF-1, χρησιμοποιώντας ειδικούς μεταγραφικούς στόχους για τον καθέναν και μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α στις διάφορες συνθήκες υποξικού στρες και σύγκριση με εκείνη του HIF-1.

Δεύτερος στόχος ήταν η μελέτη της μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, και συγκεκριμένα: α) η μελέτη της επίδρασης της κίνησης της καζεΐνης 1 στην επαγωγή του HIF-2α και β) η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των ERK1/2 στην επαγωγή του HIF-2α.

Τρίτος στόχος ήταν η μελέτη του μηχανισμού δράσης του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στους HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη και σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές:

- Huh7, κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- HepG2, κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- HEp2, επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του λάρυγγα
- Saos2, κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος
- LnCaP, κύτταρα ανθρώπινου ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη
- PC3, κύτταρα ανθρώπινου ορμονο-ανεξάρτητου καρκίνου του προστάτη

2.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

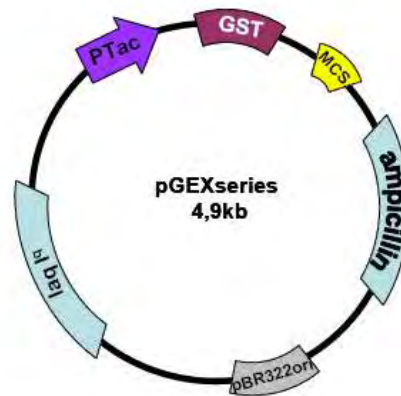
- TOP10 (Invitrogen): Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.
- BL21 RIL (Stratagene): Τα συγκεκριμένα *E.coli* κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Από τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν οι Lon και OmpT πρωτεάσες. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αυτά των αργινίνης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του RIL πλασμιδίου.
- XL1-Blue (Stratagene): Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη τεχνική της μεταλλαξιγένεσης.

2.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

- pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia)

Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του πλήρους

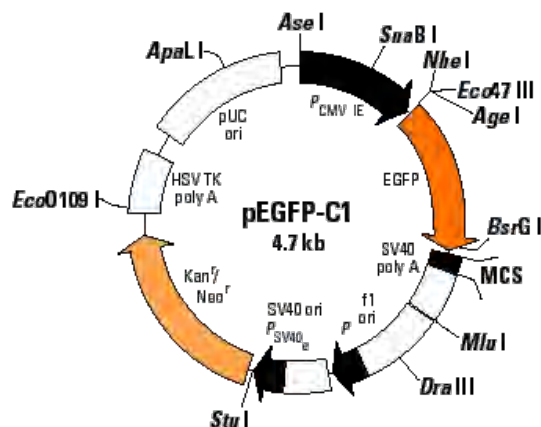
μήκους HIF-2α αλλά και του τμήματος 542-870 στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, η οποία βρίσκεται μέσα στην MCS περιοχή και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη GST. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 έχει μέγεθος 4,9 kb, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικιλίνη, γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI και τον υποκινητή PTac (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1

- pEGFP-C1 (Clontech)

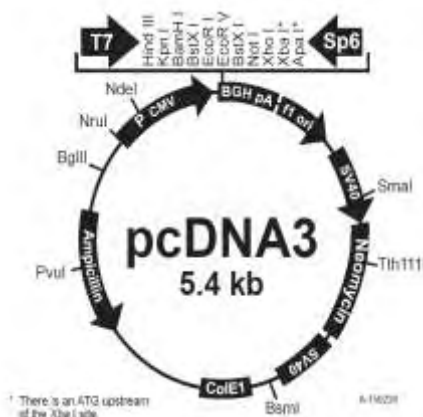
Ο συγκεκριμένος φορέας δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στην 5' περιοχή του MCS και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pEGFP-C1

- pCDNA3 (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA3 χρησιμοποιείται για την έκφραση της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης χωρίς επίτοπο σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pCDNA3

- pGL2-SOD2-Luc

Ο pGL2-SOD2-Luc χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου SOD2 (-1,452 bp - +40 bp) στον SV-40 υποκινητή, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυρολαμπίδας (Mazure et al., 1996). Ο pGL2-SOD2 είναι ευγενική χορηγία του Δρ. Garcia A. (Department of Medicine, University of Texas (Scortegagna, M et al., 2003) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Ο υποκινητής της SOD2.

- *pGL3-PGK-Luc*

Ο *pGL3-PGK-Luc* χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου PGK (-678 bp - +1 bp) στον SV-40 υποκινητή, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (Mazure et al., 1996). Ο *pGL3-PGK* είναι ευγενική χορηγία του Δρ. M. Celeste Simon (Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania) (Hu, CJ et al., 2003) (Εικόνα 15).

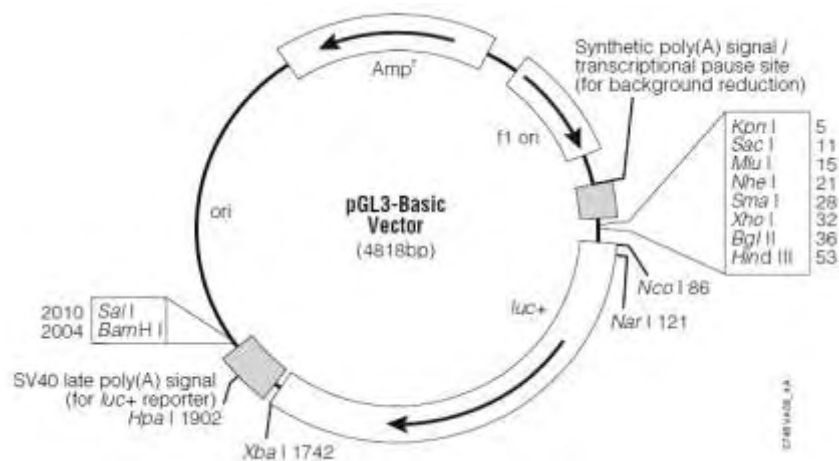


Εικόνα 15: Ο υποκινητής της *PGK*.

- *pGL3-VEGF-5HRE & pCI-renilla*

Ο *pGL3-VEGF-5HRE* χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου VEGF στον SV-40 υποκινητή, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (Εικόνα 16).

Όσον αφορά τον πλασμιδιακό φορέα *pCI-renilla* (Promega), όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της *Renilla* και χρησιμοποιείται σαν κοντρόλ για τον έλεγχο της διαμόλυνσης και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 16: Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-Basic

2.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA)

Οι εκκινητές και τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech.

Οι αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

HIF-2 α F-1: 5'- TTTT**GGATCC**ATGCAGCTGACAAGGAGAAG - 3'

HIF-2 α F-541: 5'- TTTT**GGATCC**ATGCAGCTAAGCCCCATC - 3'

Οι αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

HIF-2 α R-870 : 5'- TTTT**GGATCC**GTCAGGTGGCCTG - 3'

HIF-2 α R-820 : 5'- TTTT**GGATCC**TCATGACACCTTGTGGGC - 3'

HIF-2 α R-679 : 5'- TTTT**GGATCC**TCAGAAGGTGGAGAC - 3'

HIF-2 α R-542 : 5'- TTTT**GGATCC**TCAGAAGTCTTCCCCGTC - 3'

HIF-2 α R-497 : 5'- TTTT**GGATCC**TCACCTCAGGTCGTTATC - 3'

(Με μπλε γράμματα έχει επισημανθεί η αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *BamHI* (GGATCC) και με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (ATG και TCA αντίστοιχα)).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την RT-PCR είναι οι ακόλουθες

EPO F: 5'- AGGCCGAGAATATCAGACG- 3'

EPO R: 5'- CCATCCTCTTCCAGGCATAGAAA – 3'

PGK F: 5'- CTGTGGCTTCTGGCATAACCT – 3'

PGK R: 5'- CGAGTGACAGCCTCAGTATA – 3'

Ακτίνη F: 5'- CCAACCGCGAGAAGATGA – 3'

Ακτίνη R: 5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG – 3'

- Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση που οδηγεί σε μετατροπή της σερίνης 249 σε αλανίνη είναι οι ακόλουθες:

S249A F: 5' - C CTG AGC CGC CAC **G**CC ATG GAC ATG AAG TTC - 3'

S249A R: 3' - G GAC TCG GCG GTG **C**GG TAC CTG TAC TTC AAG - 5'

- Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση που οδηγεί σε μετατροπή της σερίνης 249 σε ασπαρτικό είναι οι ακόλουθες:

S249D F: 5' - C TTC CTG AGC CGC CAC **G**AC ATG GAC ATG AAG TTC - 3'

S249D R: 3' - G AAG GAC TCG GCG GTG **C**TG TAC CTG TAC TTC AAG - 5'

(Με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι βάσεις στις οποίες γίνεται η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση ώστε κατά την μετάφραση τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στις σερίνη 249 θα μεταφραστούν σε αλανίνη ή ασπαρτικό).

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α χρησιμοποιήθηκε το siRNA Hs-HIF1A HP validated siRNA (Qiagen).

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α χρησιμοποιήθηκε το EPAS1 HP validated siRNA (Qiagen).

Για την αποσιώπηση της έκφρασης της κινάσης της καζεΐνης 1 χρησιμοποιήθηκε το siRNA Hs-CSNK1D5 HP validated siRNA (Qiagen) και ως αρνητικό δείγμα ελέγχου το AllStars siRNA (Qiagen).

2.1.5 Αλληλούχηση (sequencing)

Η αλληλούχηση των πλασμιδιακών φορέων pGEX-4T1-HIF-2α-S249A και pGEX-4T1-HIF-1α-S249D στους οποίους εισήχθησαν οι μεταλλάξεις στο cDNA του HIF-2α έγιναν από την εταιρεία CEMIA DNA Sequencing.

2.1.6 Χημικά ενώσεις-αντιδραστήρια

- Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικής καθαρότητας έγινε από τις εταιρίες Sigma (St. Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).
- Τα ακτινογραφικά φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημειοφωταύγεια και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των ακτινογραφικών φιλμ ήταν αντίστοιχα: X-Ray developer και X-Ray fixer της εταιρίας Kodak.

2.1.7 Υλικά μοριακής βιολογίας

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

2.1.8 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρίας Abcam σε αραίωση 1:500.
- Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα (*Lyberopoulou et al., 2007*) από ορό κουνελιού σε αραίωση 1:3000.

- Μονοκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα από ορό ποντικίου της εταιρίας BD Biosciences σε αραίωση 1:1000.
- Μονοκλωνικό αντί-ARNT αντίσωμα από ορό ποντικού της εταιρείας BD Biosciences σε αραίωση 1:500.
- Πολυκλωνικό αντί-CK1δ αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρείας Santa Cruz σε αραίωση 1:200.
- Μονοκλωνικό αντί-actin (Cell Signalling) αντίσωμα σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικό αντί-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) και p44/42 MAPK (ERK1/2) αντισώματα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικά αντί-phospho-Akt (Ser473) και ολική Akt αντισώματα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικά αντί-phospho-p70 S6 kinase (Thr389) και αντί-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) αντισώματα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικό αντί- eIF2a αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling Technology σε αραίωση 1:1000.
- Πολυκλωνικό αντί-Histone 2B αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρίας Abcam σε αραίωση 1: 500.
- Πολυκλωνικό αντί-GST αντίσωμα από ορό κατσίκας της εταιρίας Amersham Biosciences σε αραίωση 1:3000.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz) ή με Cy3(για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι, ποντικό ή κατσίκα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές Huh7, HepG2, Hep2, Saos2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Gibco το οποίο περιείχε

10% ορό εμβρύου βωός (FBS) και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Οι κυτταρικές σειρές LNCaP και PC3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Euroclone, UK) με 10% FBS και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

2.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κύτταρα τα οποία ήταν προσκολλημένα σε τρυβλίο ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0.2% τρυψίνης σε PBS και το τρυβλίο επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 2 ml θρεπτικού υλικού ψύξης που περιείχε 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους (-1 °C/min) στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιέργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανση τους στους 37°C και στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα στάγδην (για την αποφυγή πρόκλησης ωσμωτικού σοκ) 10 ml θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 200xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37°C σε 5% CO₂.

2.2.3 Μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α

Η επαγωγή των HIF-1α και HIF-2α στις διάφορες κυτταρικές σειρές έγινε με επώαση των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες (1% O₂), εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό, οι οποίες αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας (IN VIVO₂ 200, RUSKINN Life Sciences), με τον αναστολέα των προλυλο- υδροξυλασών διμεθυλοξαλυλο-γλυκίνη (DMOG) σε συγκέντρωση 1 mM, με την δεσφερριοξαμίνη (DFO) σε συγκέντρωση 150 μM και με το χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl₂) σε συγκέντρωση 150 μM.

Η μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α στις διάφορες κυτταρικές σειρές έγινε με προσθήκη διαφόρων χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις και για χρόνους που αναφέρονται στα αποτελέσματα.

2.2.4 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε 150μl διαλύματος λύσης (25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, και 1mM Na₃VO₄). Οι αναστολείς PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και Na₃VO₄ (αναστολέας φωσφατασών) προστίθενται πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για 30 λεπτά στους 4°C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και ακολούθησε θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά.

2.2.5 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα

Σε τρυβλίο με κύτταρα, αφού έχει γίνει αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, προστίθεται 1,5 ml διαλύματος PBS 1x και γίνεται απόξυση των κυττάρων. Τα αποκολλημένα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι των 1.5 ml και φυγοκεντρούνται για 12 sec στα 12000xg. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 400 μl υποτονικού διαλύματος A. Ακολουθεί ανάδευση για 10 sec σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 15 min. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 min στα 12000xg. Αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο και αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl υπέρτονου διαλύματος B. Ακολουθεί ανάδευση για 10 sec σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 20 min. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 min στα 12000xg και το υπερκείμενο που αποτελεί το πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και φυλάσσεται στους -20°C.

Διάλυμα Α: 10 mM Hepes pH 7,5, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DDT, 0,2 mM PMSF

Διάλυμα Β: 20 mM Hepes pH 7,5, 25% γλυκερόλη, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DDT, 0,2 mM PMSF

2.2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

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

2.2.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8-10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel): 8-10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτική επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O. Πάνω από την πηκτική επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτική έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0,1% SDS). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 min, με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

2.2.8 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτική αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτική στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτική πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτική και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική θήκη τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά, με τη νιτροκυτταρίνη να είναι προς τον θετικό πόλο. Η μεταφορά έγινε στα 400 mA για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με

PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 3% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Ακολούθως έγινε επώαση με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραίωση, με 3% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (3x 5 min).

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινοφθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα μεταφοράς: 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, pH 9,2

Ponceau S 0,2%: 2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραίωση 1:10

PBS Phosphate Buffer Saline: 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4

PBS-Tween 20: 0,1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

2.2.9 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού

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

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση των HIF-1α και HIF-2α. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την μέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με PBS/3% φορμαλδεύδη για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα πλύση με PBS και κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 40°C. Το πρώτο αντίσωμα προστέθηκε για μια ώρα σε PBS-0.1% Tween/1% BSA, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικά πλυσίματα με PBS 0,1% Tween/1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το 2ο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC ή Cy3 σε αραιώση 1:1000) για 30 λεπτά στους 4°C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 2 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη) η οποία

έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο DNA. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.2.10 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια pEGFP και pCDNA3

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων.

Μέθοδος με τη χρήση μη λιπιδικού πολυμερούς (Transpass D2)

Στη μέθοδο αυτή το DNA εισέρχεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω ενός ιζήματος που σχηματίζεται με το διάλυμα ενός μη λιπιδικού κατιονικού πολυμερούς που προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

Πρώτα γίνεται προετοιμασία του ιζήματος. Συγκεκριμένα σε ένα σωληνάκι προστίθενται περίπου 1,5 µg DNA σε 0,6 ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά και ορό. Προστίθενται στη συνέχεια περίπου 1-2 µl του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης Transpass D2, το μίγμα ανακινείται και επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστούν σύμπλοκα με το DNA. Κατόπιν το μίγμα προστίθεται προσεκτικά πάνω από τα κύτταρα (που καλύπτουν περίπου το 50% της επιφάνειας του τρυβλίου) και επωάζεται στους 37°C, 5% CO₂ για 3 ώρες. Έπειτα αντικαθίσταται το θρεπτικό υλικό αυτή τη φορά με πλήρες και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Την επόμενη μέρα γίνεται κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

2.2.11 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA

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

μονόκλωνων μορίων RNA και οδηγούν είτε στη διάσπαση ή τη μεταφραστική καταστολή των τελευταίων.

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

Για την αποσιώπηση της έκφρασης των HIF-1α, HIF-2α και CK1δ έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με το αντίστοιχο ολιγοριβονουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δημιουργίας λιποσωμάτων με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ως αρνητικό δείγμα siRNA χρησιμοποιήθηκε το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών. Αρχικά έγινε προετοιμασία των λιποσωμάτων. Σε ένα σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκαν τα siRNA. Σε ένα δεύτερο σωληνάκι με 50 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικά προστέθηκε 1.5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000, ανακινήθηκε καλά και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το περιεχόμενο από τα δυο σωληνάκια ενώθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά για να δημιουργηθούν λιποσώματα που να περιέχουν το εκάστοτε siRNA. Στη συνέχεια τα λιποσώματα μαζί με 400 μl DMEM, χωρίς ορό και αντιβιοτικά, τοποθετήθηκαν πάνω από την επιφάνεια κυττάρων (40-50% επικάλυψη επιφάνειας τρυβλίου) και έγινε επώαση για 4 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Μετά το πέρας των 4 ωρών έγινε αλλαγή σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και αντιβιοτικά και τα κύτταρα επώαστηκαν εκ νέου στους 37°C, 5% CO₂ για 16 ώρες οπότε και ακολούθησε επαγωγή των HIF-1α και HIF-2α και λύση των κυττάρων για μέτρηση λουσιφεράσης ή για ανοσοαποτύπωση ή για RT-PCR .

2.2.12 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg²⁺. Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της

ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1α και HIF-2α στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το pGL3-VEGF-5HRE ή το pGL2-SOD2-Luc ή το pGL3-PGL-Luc και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το μη λιπιδικό πολυμερές Transpass D2. Τα κύτταρα λύθηκαν με 100-150 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay system kit της Promega) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολούθησε στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 20 μl από το διάλυμα stop & glo (του luciferase assay reagent, Promega) προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παρήχθη μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα stop & glo σταματάει την δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμίδας και ταυτόχρονα επάγει τη δράση της Renilla λουσιφεράσης.

2.2.13 Προσδιορισμός της πρωτεασωματικής δραστηριότητας

Η πρωτεασωματική δραστηριότητα μετρήθηκε με φθοριομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια της εταιρίας Chemicon International. Τα δείγματα προς ανάλυση προήλθαν από 10^6 κύτταρα, τα οποία ομογενοποιήθηκαν με 1 ml παγωμένο νερό και φυγοκεντρήθηκαν στα 12000xg. Το υπερκείμενο υπεβλήθη σε τρεις κύκλους ταχείας ψύξης και επαναθέρμανσης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 12000xg για 45 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι τη χρήση του στη δοκιμασία. Η δοκιμασία της πρωτεασωματικής δραστηριότητας εκτελέστηκε σε τρυβλίο 96 θέσεων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Σε κάθε θέση δείγματος προς ανάλυση τέθηκαν 10 μl συμπυκνωμένου υποστρώματος ρυθμιστικού διαλύματος του kit, 10 μl του πρωτεασωματικού υποστρώματος LLVY-AMC (λευκίνη-λευκίνη-βαλίνη-τυροσίνη-7-αμινο-4-μεθυλ-κουμαρίνη), 20 μl του προς ανάλυση δείγματος και 60 μl αποσταγμένου ύδατος.

Ο συνολικός όγκος ήταν 100 μl. Στις θέσεις μάρτυρες με υπόστρωμα αντί για δείγμα τέθηκαν 20 μl επιπλέον αποσταγμένου ύδατος, ενώ στις θέσεις μάρτυρες χωρίς υπόστρωμα τέθηκαν 90 μl αποσταγμένου ύδατος αντί για δείγμα και υπόστρωμα ώστε να συμπληρώνεται ο συνολικός όγκος των 100 μl. Τα τριβλία επώαστηκαν για μία ώρα στους 37 °C. Οι μετρήσεις έγιναν σε συσκευή 1420 Victor (Walla, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 380 nm. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση των τιμών μαρτύρων με και χωρίς υπόστρωμα και η πρωτεασωμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια προκατασκευασμένου διαγράμματος φθορισμού-πρωτεασωμικής δραστηριότητας.

2.2.14 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων VEGF σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών

Ο προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων VEGF μετρήθηκε στο υπερκείμενο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία του Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Inc.). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg VEGF / μg ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων.

2.2.15 Προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων ερυθροποιητίνης σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών

Ο προσδιορισμός των εκκρινόμενων επιπέδων της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία του RIA ¹²⁵I EPO-Trac της DiaSorin, η οποία είναι ραδιοανοσοπροσδιορισμός ανταγωνιστικής δέσμησης και ασταθούς ισορροπίας. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη τόσο για τον ιχνηθέτη όσο και για τους βαθμονομητές. Τα δείγματα επώάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα αίγας EPO-Trac (αντί-EPO αίγας) και αφήνονται να αντιδράσουν για 2 ώρες πριν την προσθήκη του ιχνηθέτη EPO-Trac ο οποίος είναι σημασμένος με ιώδιο¹²⁵. Μετά από ολονύκτια επώαση, το δευτερογενές αντίσωμα συμπλόκου κατακρήμνισης αντί-αίγας από όνο (DAG-PPT) προστίθεται στους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες του προσδιορισμού. Το DAG-PPT είναι ένας αντιορός αίγας από όνο, ο οποίος υπέστη κατακρήμνιση εκ των προτέρων με φυσιολογικό ορό αίγας, και επιφανειοδραστικό μέσο. Το DAG-PPT επώάζεται με τους βαθμονομητές ή τα δείγματα, το πρωτογενές αντίσωμα και τον

ιχνηθέτη για τριάντα λεπτά πριν τη φυγοκέντρηση των δοκιμαστικών σωλήνων για το διαχωρισμό του δεσμευμένου και του μη δεσμευμένου ιχνηθέτη. Ο μη δεσμευμένος ιχνηθέτης απομακρύνεται με μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Γίνεται μέτρηση του δεσμευμένου ιχνηθέτη που παραμένει στα σφαιρίδια σύμπλοκου DAG-PPT με μετρητή γάμα για 1 λεπτό. Οι αριθμοί ¹²⁵I είναι αντιστρόφως ανάλογοι της ποσότητας EPO που υπάρχει σε κάθε δείγμα. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας με υπεύθυνο τον επίκουρο καθηγητή Παναγιώτη Γεωργούλια.

2.2.16 Απομόνωση ολικού κυτταροπλασματικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα έγινε με την μέθοδο της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Σε τρυβλίο με κύτταρα, αφού έχει γίνει αφαίρεση του θρεπτικού υλικού, προστίθεται 1,5 ml διαλύματος PBS 1x και γίνεται απόξυση των κυττάρων. Τα αποκολλημένα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι των 1.5 ml και φυγοκεντρούνται για 12 sec στα 12000xg. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 700 μl ισοθειοκυανικής γουανιδίνης (trizol) και ακολουθεί έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα. Στο δείγμα γίνεται προσθήκη 160 μl χλωροφορμίου και ακολουθεί πάλι έντονη ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα και φυγοκέντρηση 5 λεπτά στα 12000xg. Μεταφέρεται η υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA σε νέο σωληνάκι και προστίθεται 400 μl ισοπροπανόλη και μετά από ανάδευση τοποθετείται για 30 λεπτά στους -20 °C για την κατακρήμνιση του RNA. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 12000xg και στο ίζημα προστίθεται 70% αιθανόλη, ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση και το ίζημα, από το οποίο έχει απομακρυνθεί η αιθανόλη, επαναιωρείται σε 30 μl αποστειρωμένου ύδατος καθαρού από ένζυμα αποικοδόμησης του RNA. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C.

2.2.17 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA, Φασματοφωτομέτρηση RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν σε υπεριώδες φασματοφωτόμετρο, με μέτρηση της οπτικής

απορρόφησης σε μήκη κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Συγκεκριμένα η ποσότητα του RNA προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260 nm στηριζόμενοι στο ότι διάλυμα RNA 40μg/ml έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Σε μήκος κύματος 280nm ελέγχεται η πρόσμιξη πρωτεϊνών. Ο λόγος των τιμών απορρόφησης που παρουσιάζει ένα διάλυμα RNA, A260/A280, αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του και των προσμείξεων από DNA ή και πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμίξεις, τότε ο λόγος OD260:OD280 = 2. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 έως 2. Η αραιώση των δειγμάτων που φωτομετρήθηκαν ήταν 1/10 (5μl RNA και 45μl αποσταγμένου νερού ελεύθερου από RNάσες), ενώ ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας.

2.2.18 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR)

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

♦ *Σύνθεση cDNA*

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

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

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

◆ *Real-Time PCR*

Για την ανίχνευση του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των φθορίζουσων χρωστικών με τη χρωστική SYBR Green. Η SYBR Green δεσμεύεται μη ειδικά πάνω στο δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να εκπέμπει ακτινοβολία, ενώ αντίθετα η μη δεσμευμένη χρωστική δεν εκπέμπει. Κατά τη διάρκεια λοιπόν της επέκτασης του DNA, όσο και περισσότερη χρωστική προσδένεται με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.

Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιούνται στο μηχάνημα Mini Opticon System της εταιρίας BioRad.

Αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινήτων. Αυτό περιλαμβάνει το ζεύγος των δύο εκκινήτων, το SYBR Green Master Mix και H₂O. Η τελική συγκέντρωση των εκκινήτων είναι 0,5 pmol/µl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά πλαστικά 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 15 µl από το master mix και 5 µl δείγματος cDNA από τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Κάθε αντίδραση πραγματοποιείται δύο φορές, σε δύο θέσεις του plate. Επίσης χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου, δείγματα από RNA των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών, τα οποία δεν έχουν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (RTC), καθώς και δείγματα στα οποία αντί cDNA προστίθεται H₂O (NTC).

Στη συνέχεια ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιούνται 40 κύκλοι ενίσχυσης. Το πρόγραμμα που ακολουθείται αναλυτικά περιγράφεται παρακάτω:

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν

- 2 min → 50°C
- 10 min → 94°C
- 15 sec → 95°C
- 1 min → 60°C

Αριθμός κύκλων: 40

- 2 sec → 60°C

Με την τεχνική της Real Time RT-PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του κυττάρου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Με τη σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Στην εργασία αυτή, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης.

Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχο ως προς το γονίδιο αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχει εφαρμοσθεί το μαθηματικό μοντέλο του $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta C_t}$, που έχει και την πιο ευρεία χρήση, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με παρεμφερή τιμή απόδοσης (efficiency, E), καθώς δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από

την εξίσωση: $R = 2^{-(\Delta C_t \text{ δείγμα} - \Delta C_t \text{ μάρτυρας})}$ (Livak 2001).

Το επίπεδο φθορισμού στο οποίο λαμβάνονται οι τιμές που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς καθορίζεται αυτόματα ή από τον ερευνητή, στο επίπεδο όπου ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος είναι ο υψηλότερος κατά την εκθετική φάση.

2.2.19 Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-2α με PCR

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν για τα τμήματα του HIF-2α 1-870, 1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 366-497, 366-542, 366-679, 366-820, 366-870. 542-820 και 542-870 (η αρίθμηση είναι σύμφωνη με την αμινοξική αλληλουχία του HIF-2α).

Πρώτα ενισχύθηκαν τα τμήματα του HIF-2α με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράσης για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της PCR και έπειτα χρησιμοποιήθηκε Vent πολυμεράση λόγω της μεγαλύτερης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στις ίδιες συνθήκες. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

- 150 ng εκμαγείο DNA (pGEX-4T1-HIF-2α)
- 1x Thermopol Buffer
- 2 mM από κάθε dNTP
- 1 unit Vent πολυμεράση
- 50 pmoles/μl πρόσθιου εκκινητή
- 50 pmoles/μl οπίσθιου εκκινητή
- DMSO
- MgSO₄
- H₂O έως όγκο 50 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν

- 30 sec → 94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec → 50°C στάδιο υβριδοποίησης

- 2 min 30 sec → 72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min → 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min → 72°C

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (Tm) Oligo Calculator.

Στο τέλος 5 μl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του PCR clean kit της εταιρείας Qiagen και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.20 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αγαρόζης με προσθήκη αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από: το μέγεθος των τμημάτων του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0,04 M Tris-οξικό, 0,001 M EDTA pH 8,0), παρουσία και βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα (590 nm) χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή. Το διάλυμα φόρτωσης των

δειγμάτων αποτελείται από 5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% κυανού του ξυλενίου.

2.2.21 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση (Site-directed mutagenesis)

Η τεχνική της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιεί τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μαζί με ειδικούς εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια για να εισάγει σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA με σκοπό την αλλαγή ή απαλοιφή ενός ή περισσότερων κωδικονίων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το QuickChange site-directed mutagenesis kit της εταιρείας Stratagene το οποίο χρησιμοποιεί την DNA πολυμεράση *PfuUltra* για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA από ολόκληρους πλασμιδιακούς φορείς με μεγάλη ακρίβεια χρησιμοποιώντας παράλληλα χωρίς πρόβλημα τα μεταλλαγμένα ολιγονουκλεοτίδια για την στοχευμένη αλληλουχία του DNA.

Απαραίτητα υλικά για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι ένας υπερελικωμένος πλασμιδιακός φορέας με το προς μελέτη ένθεμα και δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Τα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι συμπληρωματικά για τις δύο αλυσίδες του πλασμιδιακού φορέα επιμηκύνονται κατά την αντίδραση της PCR από την πολυμεράση *PfuUltra* δημιουργώντας ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο. Μετά την PCR, ακολουθεί πέψη με το ένζυμο *DpnI* το οποίο αναγνωρίζει μεθυλιωμένες περιοχές στο DNA, με αποτέλεσμα να προκαλεί την πέψη του μητρικού πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε σαν καλούπι αλλά να αφήνει ανέπαφα τα μεταλλαγμένα πλασμίδια που δημιουργήθηκαν κατά την PCR και δεν είναι μεθυλιωμένα. Ακολουθεί μετασχηματισμός σε επιδεκτικά σε μετασχηματισμό βακτήρια XL1-Blue και επιλογή των κλώνων που περιέχουν τη μετάλλαξη με αλληλούχηση.

Πιο συγκεκριμένα η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής :

Σχεδιάστηκαν ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για τις σερίνη 249 HIF-2α με τις αντίστοιχες επιθυμητές μεταλλάξεις (βλ. Υλικά-Εκκινητές) και κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech.

Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Όπου N είναι το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου σε βάσεις (ενδείκνυται να είναι ανάμεσα στις 25 με 45 βάσεις με την περιοχή προς μετάλλαξη να βρίσκεται στο κέντρο του ολιγονουκλεοτιδίου), %GC είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων G και C στο σύνολο των νουκλεοτιδίων (ενδείκνυται το ποσοστό να είναι τουλάχιστον 40%) και % mismatch είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων που είναι διαφορετικά σε σχέση με την αλληλουχία αργίου τύπου.

Ακολούθησε PCR με το εξής μίγμα:

- 15 ng pGEX-4T1-HIF-2α wt (εκμαγείο)
- 1x Buffer
- 125 ng πρόσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 125 ng οπίσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 1 μl από μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs
- 2,5 units *PfuUltra* HF DNA pol
- H₂O ως 50 μl

Οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες:

1. 30 sec 95°C
2. 1 min 95°C
3. 1 min 55°C
4. 8 min 68°C

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

Μετά το τέλος κρατήθηκαν από 2 μl από την κάθε αντίδραση σαν δείγμα ελέγχου για τον μετέπειτα μετασχηματισμό.

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

2.2.22 Κλωνοποίηση του HIF-2α και τμημάτων του σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο HIF-2α πλήρους μήκους ή τμήματά του που ενισχύθηκαν με PCR καθώς και οι πλασμιδιακοί φορείς όπου εισήχθησαν υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI. Το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 10 µg DNA του HIF-2α
- 1x Buffer *Bam*HI
- 5 u *Bam*HI
- H₂O

Για το πλασμίδιο pGEX-4T1 το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 10 µg pGEX-4T1
- 1x Buffer *Bam*HI
- 10 u *Bam*HI
- H₂O

Στο τέλος της πέψης έγινε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του pGEX-4T1 για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι προστέθηκαν 2 µl ενζύμου CIP για 30 min στους 37°C και προσθήκη άλλου 1 µl CIP για άλλα 30 min στους 37°C.

Όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστική πηκτή (1% αγαρόζης σε 1x TAE, 1:20.000 βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml). Ηλεκτροφορήθηκε όλη την ποσότητα των δειγμάτων στα 90 V και με το τέλος της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκαν οι ζώνες από την πηκτή με τη βοήθεια λυχνίας UV (364nm). Ακολούθησε ανάκτηση από την πηκτή με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την ποσοτικοποίηση των τμημάτων του DNA που θα χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση λιγάσης ηλεκτροφορήθηκαν γνωστοί όγκοι και από τα υποψήφια ενθέματα (inserts) καθώς και του πλασμιδίου φορέα. Ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης η οποία περιείχε:

- πλασμίδια και ενθέματα σε αναλογία 1:3
- λιγάση

- 1x Buffer λιγάσης
- H₂O

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγμα ελέγχου αντιδράσεις που περιείχαν τον κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο πλασμιδιακό φορέα με λιγάση χωρίς ένθεμα και μια αντίδραση μόνο με τον κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο πλασμιδιακό φορέα χωρίς λιγάση, έτσι ώστε να ελεγχθεί αν ο φορέας έχει αποφωσφορυλιωθεί πλήρως. Οι αντιδράσεις λιγάσης επώαστηκαν ή για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύχτια επώαση στους 16°C.

2.2.23 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός *E.coli* Top10 και *E.coli* BL21RIL

Σε στελέχη *E.coli* Top10 και BL21RIL έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων ή των αντιδράσεων λιγάσης. Πρώτα παρασκευάστηκαν κύτταρα *E.coli* Top10 και *E.coli* BL21RIL δεκτικά για μετασχηματισμό (competent). Εμβολιάστηκαν καλλιέργειες 3ml θρεπτικού TYM με αποικίες από πιάτο με stock καλλιέργειες Top10 και BL21RIL αντίστοιχα και έγινε ολονύχτια επώαση στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραιώση των καλλιεργειών 1:200 και επώασή τους στους 37°C μέχρι OD_{600nm}=0.350-0.400. Τότε οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 3220xg για 5 min στους 4°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I και επώαστηκε για 10 min στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 3220xg για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II. Έγινε επώαση στον πάγο για 60 min και τέλος μοιράστηκαν σε σωληνάκια από 100 μl διαλύματος από την προηγούμενη επαναιώρηση.

Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 0,5~1 μg/μl πλασμιδίου ή 10 μl από αντίδραση λιγάσης σε διαφορετικά σωληνάκια με κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min. Έπειτα έγινε θερμικό σοκ στους 42°C για 3 min και αμέσως μετά τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον πάγο για άλλα 5 min. Μετά προστέθηκαν 900 μl θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικά και επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος επιστρώθηκαν 100 μl κυττάρων σε πιάτα LB_{amp} για τα Top10 και LB_{amp/chl} για τα BL21RIL.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

TYM :2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄

TFB-I: 30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 7,0

TFB-II :10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7,0

LB :1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl

τροβλία LB_{amp} :1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml αμπικιλίνη

τροβλία LB_{amp/chl} :1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, 2% άγαρ, 0,1 mg/ml αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη 34 μg/μl

2.2.24 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες 3 ml θρεπτικού υλικού LB_{amp} εμβολιάστηκαν αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10 και επώστηκαν O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Την άλλη μέρα συλλέχθηκε η καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε στα 20800xg για 12 sec. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 300 μl διαλύματος TENS και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν έγινε προσθήκη 150 μl CH₃COONa 3 M pH 5.2 και ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min στα 20.800xg και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι. Έπειτα προστέθηκε 1 ml αιθανόλης 100%, ανάδευση και τοποθέτηση στους -20°C για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.800xg για 10 min και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου. Έγινε ξέπλυμα με 1 ml 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στα 20.800xg για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 20 μl αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH₂O).

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

TENS : 0,1N NaCl, 0,5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7,5

2.2.25 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)

Από O/N καλλιέργειες μετασχηματισμένων *E.coli* Top10 σε 100 ml θρεπτικού LB_{amp} στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στα 3220xg για 15 min στους 4°C. Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

χρησιμοποιήθηκε το midi kit της Qiagen και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.26 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα κλωνοποιημένα πλασμίδια υπέστησαν πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI*, *XhoI*, *PstI*, *SmaI* και *EcoRI* για να διαπιστωθεί α) η ύπαρξη του ενθέματος και β) ο προσανατολισμός με τον οποίο εισήχθη. Το μείγμα κάθε πέψης περιείχε: 1 μg DNA από κάθε πλασμίδιο, 1x διάλυμα κατάλληλο για το ένζυμο που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση, 5 units από το ένζυμο περιορισμού και H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Οι συνθήκες των πέψεων ήταν 37°C για 1 με 2 ώρες. Ο έλεγχος των πέψεων έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

2.2.27 Επαγωγή της έκφρασης των GST-πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής: Μια αποικία από τρυβλίο που περιείχε κύτταρα με τα μετασχηματισμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντιβιοτικά αμικιλίνη και χλωραμφενικόλη και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37° C. Με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάστηκαν 1-2 L LB (με αντιβιοτικά) και επώαστηκαν υπό ανακίνηση στους 37° C έως ότου η απορρόφηση της

καλλιέργειας έφτασε στα 0.6-0.7 (μέτρηση στα 600 nM). Στην καλλιέργεια προστέθηκε 1 mM IPTG και η επώαση συνεχίστηκε στους 18° C. Μετά την πάροδο 4 ωρών έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 2400xg. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με H₂O και αποθήκευση των κυττάρων στους -20° C.

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

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (10 ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 500 ml αρχικής καλλιέργειας). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων) και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 14500xg για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιείχε 20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5% γλυκερόλη, 0,1 % Tween 20, και 5 mM DTT.

2.2.29 Καθαρισμός των GST-πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας σε στήλη GSH-Sepharose

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST) . Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στα σφαιρίδια είναι το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη.

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά) που φέρουν το γονίδιο της μεταφοράς της γλουταθειόνης (συνήθως από το *Schistosoma japonicum*) πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χμαιοτικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν από τις υπόλοιπες με τον παραπάνω τρόπο. Η

έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια καθαρής γλουταθειόνης η οποία ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των σφαιριδίων της στήλης για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον συγκεκριμένο τρόπο απομόνωσης ήταν η εξής:

Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εξέφραζαν τις χμιαρικές GST-πρωτεΐνες επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (~300 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 1 lt καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλες στήλες των 10 ml όπου κατακρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος λύσης. Η έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με επώαση των σφαιριδίων με 3x 0,2 ml διαλύματος 10 mM γλουταθειόνης, 25 mM Tris pH 9 για 5 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του κλάσματος.

2.2.30 Διαπίδυση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει αλλαγή των μικρομοριακών συστατικών του διαλύματος μιας πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO 6000-8000 της Spectrum). Η μεμβράνη με το δείγμα εισήχθη στη συνέχεια στο διάλυμα διαπίδυσης (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδυσης) και ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4°C. Μετά το πέρας των 16 ωρών το δείγμα συλλέχθηκε από το εσωτερικό της μεμβράνης και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 10000xg και στους 4°C για την απομάκρυνση ιζήματος που πιθανόν δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

2.2.31 Καθαρισμός αντισώματος με τη χρήση πρωτεΐνης ακινητοποιημένης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αρχικά σε πήκτωμα πολυκαρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% αναλύονται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 500 μg GST-HIF-2 α 542-870 πρωτεΐνης. Ακολουθεί μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau. Με τη χρήση νυστεριού λαμβάνεται από τη μεμβράνη το τμήμα που περιέχει την πρωτεΐνη GST-HIF-2 α 542-870. Το τμήμα αυτό της μεμβράνης επώάζεται με διάλυμα 3% αλβουμίνη σε PBS(1x), για 3 ώρες, με στόχο την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Η περίσσεια του διαλύματος μπλοκαρίσματος των μη ειδικών θέσεων απομακρύνεται πλένοντας τη μεμβράνη 3 φορές με διάλυμα PBS(1x). Κάθε πλύση διαρκεί 5 λεπτά. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 250 μl αντιορού σε 10 ml PBS(1x) με 3% αλβουμίνη. Η επώαση πραγματοποιείται σε κλεισμένες σακούλες για 16-18 ώρες, σε 4 °C. Την επόμενη ημέρα, αφού αφαιρεθεί ο αντιορός, η μεμβράνη πλένεται 1 φορά με διάλυμα 3% αλβουμίνη σε PBS(1x) για 1 ώρα και 3 φορές με διάλυμα PBS (1x). Κάθε πλύση διαρκεί 10 λεπτά. Η έκλυση των αντισωμάτων που δεσμεύτηκαν στην πρωτεΐνη, που είναι ακινητοποιημένη στη μεμβράνη, πραγματοποιείται με 300 μl διάλυμα γλυκίνης 0,2 M, 0,5 M NaCl pH 2,3. Συνολικά προκύπτουν τρία εκλούσματα, των 300 μl το καθένα. Κάθε επώαση με το διάλυμα έκλυσης διαρκεί 1 λεπτό. Τα εκλούσματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε σωληνάκι στο οποίο έχει τοποθετηθεί κατάλληλη ποσότητα Na_2HPO_4 0,5M pH 9,0 ώστε να ουδετεροποιηθεί το όξινο pH. Η τελική ποσότητα που συλλέγεται υποβάλλεται σε διαπίδυση και τελικά συμπυκνώνεται και διατηρείται με προσθήκη NaN_3 στους 4 °C.

2.2.32 Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2 α με προγράμματα βιοπληροφορικής

Η δημιουργία βάσεων δεδομένων για τις αλληλουχίες πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την ανάπτυξη προγραμμάτων βιοπληροφορικής, έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες και τις λειτουργίες διαφόρων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα αν η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης είναι γνωστή, μπορεί να προβλεφθεί η δευτεροταγής ή η τριτοταγής δομή της μέσω εύρεσης ομόλογων αλληλουχιών (consensus). Επιπλέον, η σάρωση μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας για την εύρεση ομόλογων αλληλουχιών, μπορεί να δώσει

πληροφορίες για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντός μας με άλλες πρωτεΐνες.

Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκαν αλληλουχίες στον πλήρη HIF-2α που να ταιριάζουν με την αλληλουχία που φωσφορυλιώνουν γνωστές κινάσες, ή η εύρεση σερινών, θρεονινών ή τυροσινών που είναι πιθανό να φωσφορυλιώνονται σε αυτήν την αλληλουχία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ELM. Το πρόγραμμα ELM (Eukaryotic Linear Motif) αναγνωρίζει μοτίβα ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με βάση την πρωτοταγή τους δομή. Επιπλέον, το πρόγραμμα ELM μπορεί να προβλέπει αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης με άλλες ή και φωσφορυλιώσεις από κινάσες μέσω ανάλυσης ομόλογων αλληλουχιών (consensus).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής NET NES Server1 (la Cour, T et al., 2004) και το NESsential (Fu, SC et al., 2011), τα οποία προβλέπουν πλούσια σε λευκίνη πυρηνικά σήματα εξόδου, NES.

2.2.33 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Graph Pad InStat με ANOVA test. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SD). Το στατιστικά σημαντικό όριο είναι *** $p < 0.005$ και ** $p < 0.001$. Η ανάλυση της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με One-Way-analysis of Variance και η σύγκριση επιλεγμένων ζευγών με Bonferroni test.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

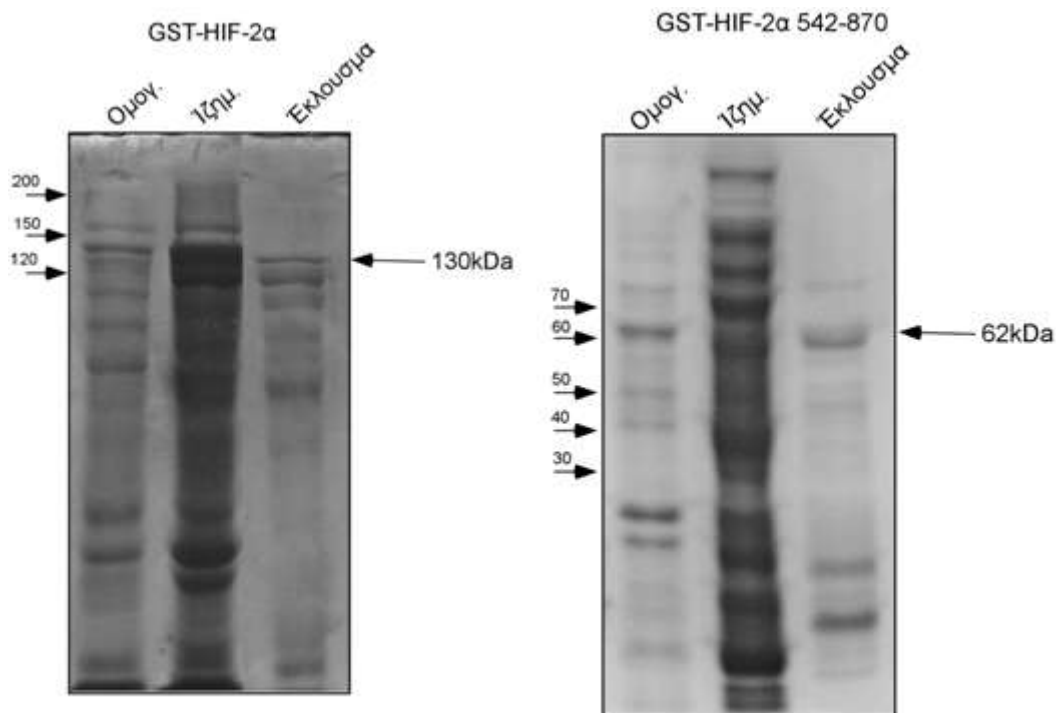
3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ HIF-2α

Για την μελέτη του HIF-2α στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες τεχνικές όπως η ανοσοαποτύπωση και ο ανοσοφθορισμός, που απαιτούν τη χρήση αντισώματος έναντι του ανθρώπινου HIF-2α. Το αντίσωμα αυτό είναι απαραίτητο: α) να είναι ειδικό για τον HIF-2α και μην αναγνωρίζει τον HIF-1α, παρά την 48% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχίας τους, β) να μην αναγνωρίζει μη ειδικές πρωτεΐνες, και γ) να είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα σε κατάλληλο μέσο συντήρησης. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα δύο αντισώματα από δύο διαφορετικές εταιρίες βιοτεχνολογίας, τα οποία αναγνωρίζουν και τα δύο την ίδια περιοχή της πρωτεΐνης του HIF-2α. Λόγω όμως της ανάγκης μεγάλης ποσότητας αντισώματος έναντι του HIF-2α για την παρούσα διατριβή καθώς και άλλων ερευνητικών μελετών του HIF-2α στο εργαστήριο, ακολούθησε η διαδικασία παραγωγή αντισώματος έναντι του ανθρώπινου HIF-2α.

3.1.1. Κατασκευή ανασυνδυασμένου HIF-2α.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή του αντισώματος ήταν η διαθεσιμότητα πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και του τμήματος 542-870 της καρβοξυτελικής επικράτειας του HIF-2α, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο εξαιτίας της μικρής ομολογίας με το αντίστοιχο τμήμα του HIF-1α.

Αρχικά, τα cDNA του πλήρους μεγέθους HIF-2α και το τμήμα 542-870 ενισχύθηκαν με PCR, και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια, pGEX-4T1 σε μια περιοχή που βρίσκεται μετά το τέλος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την GST. Το κλωνοποιημένα πλασμίδια εισήχθησαν σε βακτήρια E.coli BL21RIL, όπου έγινε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με IPTG, λύση των κυττάρων και απομόνωσή τους σαν πρωτεΐνες σύντηξης με GST με χρωματογραφία συγγένειας (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απομόνωση πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και του τμήματος HIF-2α 542-870 σε σύντηξη με GST. Το ομογενοποίημα, το ίζημα και το έκλουσμα της GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Το βέλος δείχνει τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

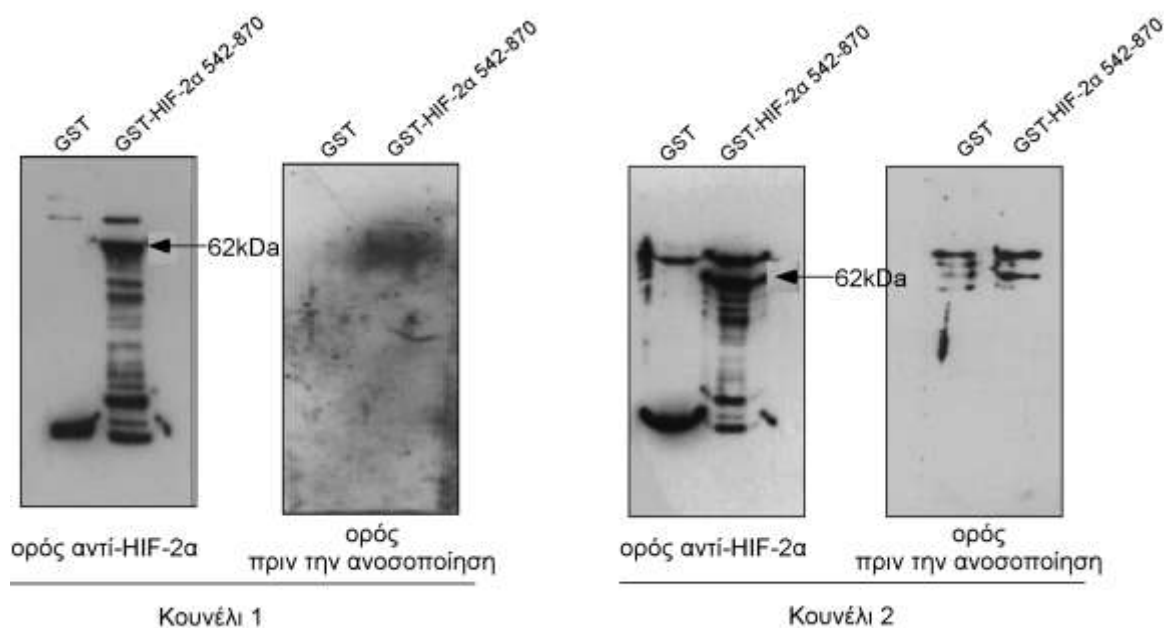
3.1.2. Παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του ανθρώπινου HIF-2α από ορό κουνελιού.

Η πειραματική διαδικασία παραγωγής του αντισώματος περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά και Μέθοδοι.

Η GST-HIF-2α 542-870 πρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο, παραχωρήθηκε στο τμήμα Κτηνιατρικής του Παν.Θεσσαλίας (Αναπληρωτή Καθ. Φαρμακολογίας κ. Παπά Ιωάννη) για την ανοσοποίηση των κουνελιών. Μετά από δύο μήνες ανοσοποίησης έγινε η συλλογή του ορού με σκοπό την απομόνωση του αντισώματος έναντι στον HIF-2α.

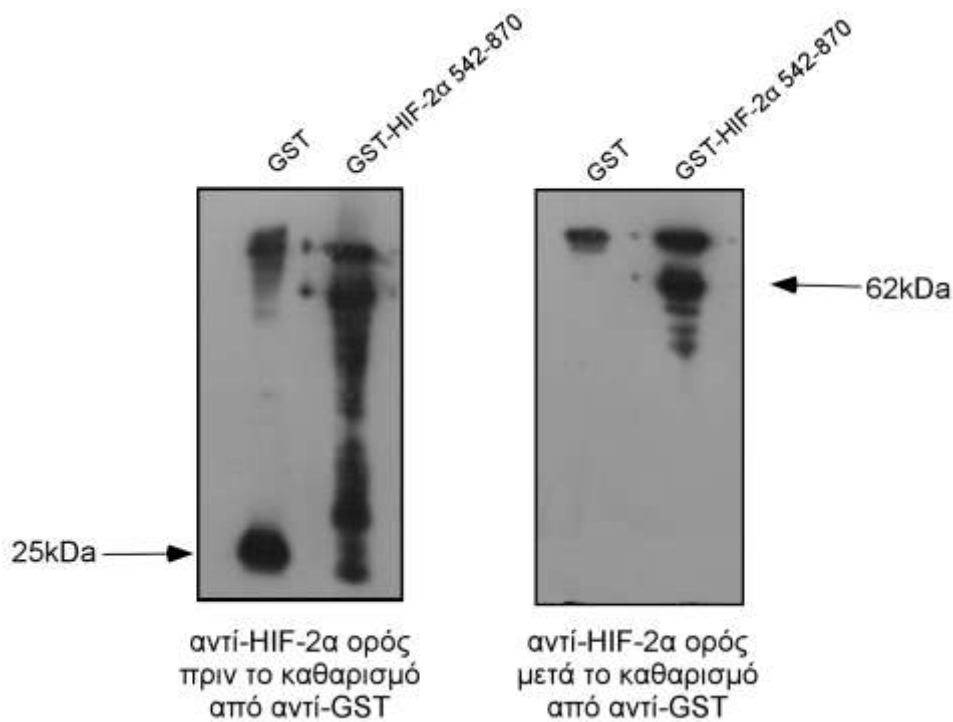
Αρχικά έγινε ο έλεγχος του αντί-ορού για την επιτυχή ανοσοποίηση των κουνελιών. Η πρωτεΐνη GST και το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-2α 542-870 αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση. Ως 1^ο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε από κάθε κουνέλι είτε ο ορός μετά την ανοσοποίηση (ορός αντί-HIF-2α) είτε ο ορός πριν την ανοσοποίηση. Παρατηρήθηκε ότι ο ορός αντί-HIF-2α και των δύο κουνελιών ανιχνεύει

το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-2α 542-870 με μεγαλύτερη επιτυχία από το κουνέλι 1 από το οποίο συνεχίστηκε ο περαιτέρω καθαρισμός (Εικόνα 18).



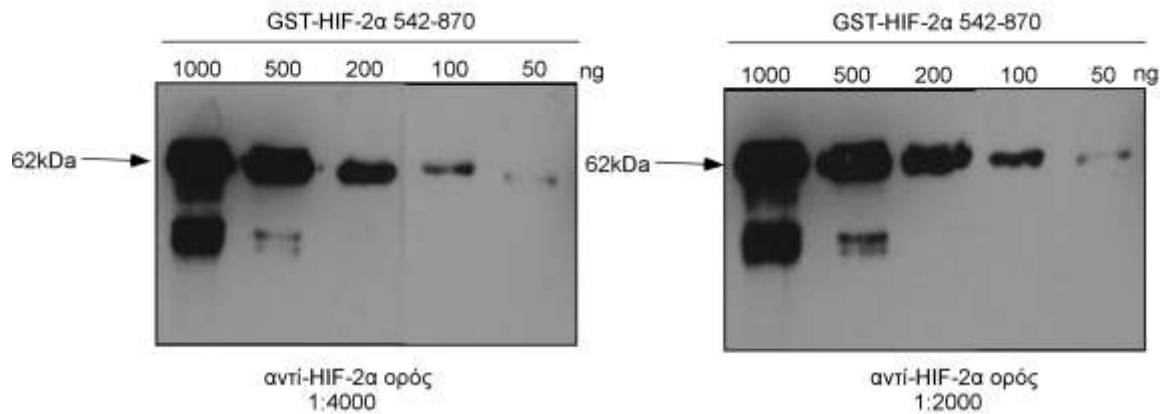
Εικόνα 18: Έλεγχος του ορού των κουνελιών για επιτυχή ανοσοποίηση για το πρωτεϊνικό τμήμα **HIF-2α 542-870**. Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE της πρωτεΐνης GST και του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-2α 542-870 και ανοσοανίχνευση με τον ορό αντί-HIF-2α και τον ορό των κουνελιών πριν την ανοσοποίηση.

Δεδομένου ότι κατά την παρασκευή του αντί-HIF-2α χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη σύντηξης με την GST, ο ορός εκτός του αντισώματος απέναντι στον HIF-2α περιείχε και αντισώματα απέναντι στην GST. Έτσι πριν τη χρήση του ορού, αυτός διαβιβάστηκε 3 φορές από στήλη Σεφαρόζης-γλουταθειόνης στην οποία είχε καθηλωθεί καθαρή GST, ώστε μετά τη δέσμευση των αντισωμάτων της GST σ' αυτή, να παραληφθεί ο αντί-ορός κατά το δυνατόν απαλλαγμένος από αντισώματα απέναντι στην GST. Για τον έλεγχο του αντί-ορού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδου τόσο της GST όσο και της GST-HIF-2α 542-870 και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με τον ορό πριν και μετά τον καθαρισμό από αντισώματα αντί-GST. Όπως φαίνεται στην εικόνα ο αντί-HIF-2α ορός μετά την απαλλαγή των αντισωμάτων αντί-GST δεν ανιχνεύει την πρωτεΐνη GST αλλά μόνο το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-2α 542-870 (Εικόνα 19).



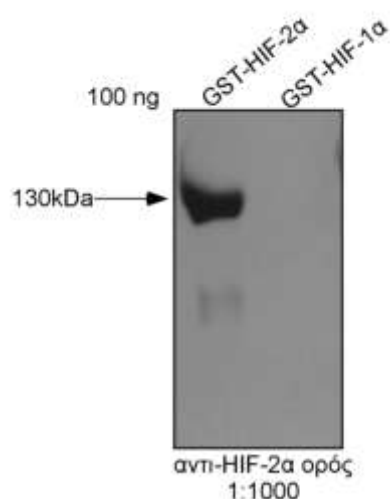
Εικόνα 19: Έλεγχος του αντι-HIF-2α ορού για απαλλαγή από αντισώματα αντι-GST. Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE της πρωτεΐνης GST και του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-2α 542-870 και ανοσοανίχνευση με τον αντι-HIF-2α ορό πριν και μετά την απαλλαγή από αντισώματα αντι-GST.

Στην συνέχεια απομονώθηκε καθαρό αντίσωμα έναντι στον HIF-2α από τον ορό με την μέθοδο της αγκιστείας που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Το καθαρό πλέον αντίσωμα ελέγχθηκε για την ευαισθησία του και την εξειδίκευση του. Αρχικά αναλύθηκαν με SDS-PAGE διάφορες ποσότητες (50-1000 ng) του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-2α 542-870 και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με χρήση του καθαρού αντί-HIF-2α με δύο διαφορετικές αραιώσεις (1:4000 και 1:2000). Παρατηρήθηκε ότι τα 50 ng της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης είναι οριακά ανιχνεύσιμα από το αντί-HIF-2α και στις δύο αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκε, ενώ τα 100 ng είναι ανιχνεύσιμα από το αντί-HIF-2α (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανίχνευση του ανασυνδιασμένου HIF-2α με το αντί-HIF-2α ορό. Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE διάφορες συγκεντρώσεις (50-1000 ng) του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-2α 542-870 και ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα αντί-HIF-2α ορό σε αραιώση 1:4000 και 1:2000.

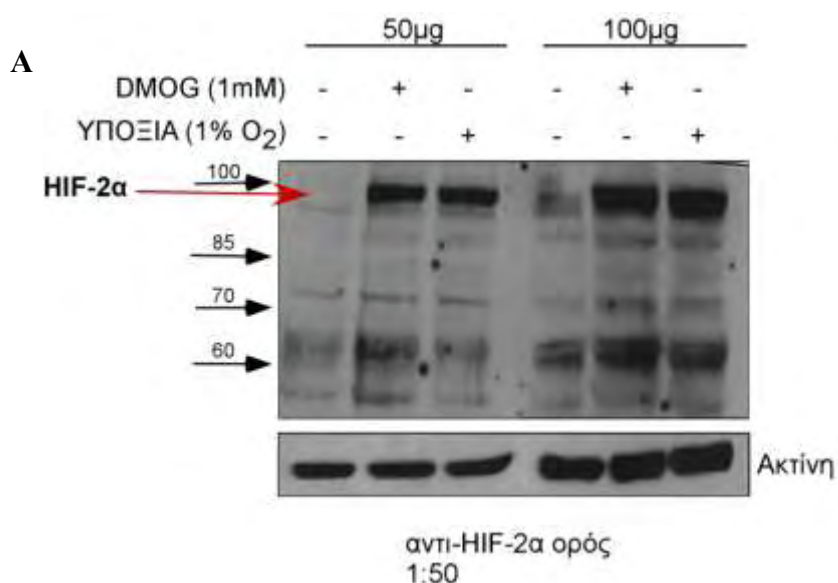
Κατόπιν, για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του αντισώματος, αναλύθηκαν με SDS-PAGE 100 ng του πλήρους μεγέθους GST-HIF-2α και του GST-HIF-1α (κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Δρ.Γεωργίας Χαχάμη) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με χρήση του αντί-HIF-2α με αραιώση 1:1000. Παρατηρήθηκε ότι το αντί-HIF-2α αναγνωρίζει μόνο τον ανασυνδυασμένο HIF-2α και όχι τον ανασυνδυασμένο HIF-1α (Εικόνα 21).

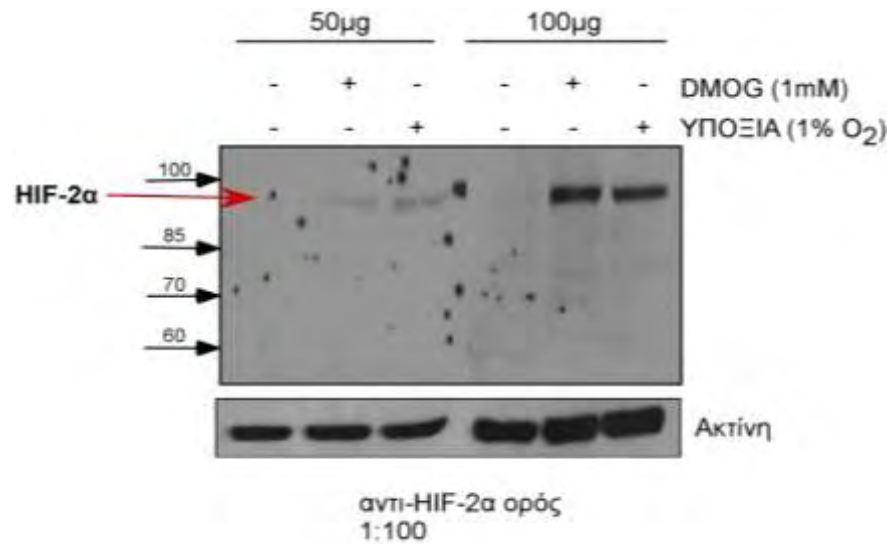


Εικόνα 21: Έλεγχος της εξειδίκευσης του αντί-HIF-2α ορού. Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE 100 ng των πρωτεϊνών σύντηξης GST-HIF-2α και GST-HIF-1α και ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα αντί-HIF-2α σε αραιώση 1:1000.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το αντί-HIF-2α αναγνωρίζει και ανιχνεύει τον ενδογενή HIF-2α, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) ή παρουσία

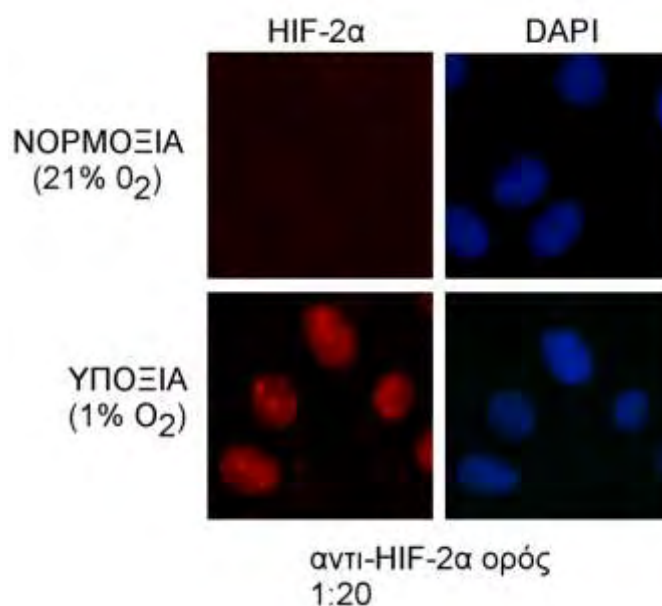
DMOG για 4 ώρες και ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων (50 και 100 μg ολικής πρωτεΐνης) με ανοσοαποτύπωση. Όταν το αντίσωμα αντι-HIF-2α χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:50 αναγνωρίζει και ανιχνεύει πολύ καθαρά τον ενδογενή HIF-2α που επάγεται στην υποξία ή παρουσία DMOG γύρω στα 95-100 kDa και σε 100 μg αλλά και 50 μg (Εικόνα 22A) . Όμως φαίνεται ότι στην αραιώση αυτή εμφανίζονται και μη ειδικές ζώνες κυρίως στα 65 kDa που πιθανόν να αντιστοιχούν στην αλβουμίνη. Για αυτό το λόγο το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε και σε μεγαλύτερη αραιώση 1:100, και παρατηρήθηκε ότι ο επαγμένος HIF-2α από την υποξία ή το DMOG ανιχνεύεται καθαρά μόνο σε 100 μg ολικής πρωτεΐνης χωρίς την εμφάνιση μη ειδικών ζωνών (Εικόνα 22B).



B

Εικόνα 22: Ανίχνευση του ενδογενή HIF-2α με το αντι-HIF-2α ορό σε κύτταρα Huh7 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α με ορό αντι-HIF-2α A. 1: 50 B. 1:100, και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 (50 μg και 100 μg) που επώαστηκαν σε υποξία ή παρουσία DMOG για 4 ώρες.

Επίσης έγινε έλεγχος του αντισώματος και σε πείραμα ανοσοφθορισμού. Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας για 4 ώρες, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και ακολούθησε ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση του HIF-2α με χρήση του αντι-HIF-2α ορό ως 1ο αντίσωμα με αραιώση 1:20. Ο επαγμένος HIF-2α από την υποξία ανιχνεύεται από το αντίσωμα και εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ανίχνευση του ενδογενή HIF-2α με το αντι-HIF-2α ορό σε κύτταρα Huh7 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Ανοσοφθορισμός με αντισώμα έναντι στον HIF-2α με αντι-HIF-2α ορό 1:20 κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε νορμοξία ή υποξία. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα.

Συμπερασματικά, παράχθηκε ειδικό αντί-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού το οποίο αναγνωρίζει με ανοσοαποτύπωση τον ανασυνδιασμένο HIF-2α, και όχι τον HIF-1α, και τον ενδογενή HIF-2α που επάγεται σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία DMOG σε κύτταρα Huh7. Επίσης, το ειδικό αντί-HIF-2α αντίσωμα ανιχνεύει τον υποκυτταρικό ενδογενή HIF-2α σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7 με την μέθοδο της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού.

Το συγκεκριμένο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή σε επαναλήψεις πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που δείχνονται στις εικόνες 59 και 81.

3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-2α

Για τη μελέτη της επαγωγής της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου χρησιμοποιήθηκαν καθιερωμένες σειρές κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 και κάποια πειράματα επαναλήφθηκαν σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2, σε κύτταρα του καρκίνου του λάρυγγα Hep2 και σε κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου, δηλαδή σε υποξία (1% O₂), ή παρουσία χημικών ενώσεων που μιμούνται την υποξία όπως το χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl₂), και άλλων επαγωγέων, όπως η δεσφερριζαμίνη (DFO) και η διμεθυλοξαλυλογλυκίνη (DMOG), και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τον HIF-1α στις ίδιες συνθήκες.

3.2.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7

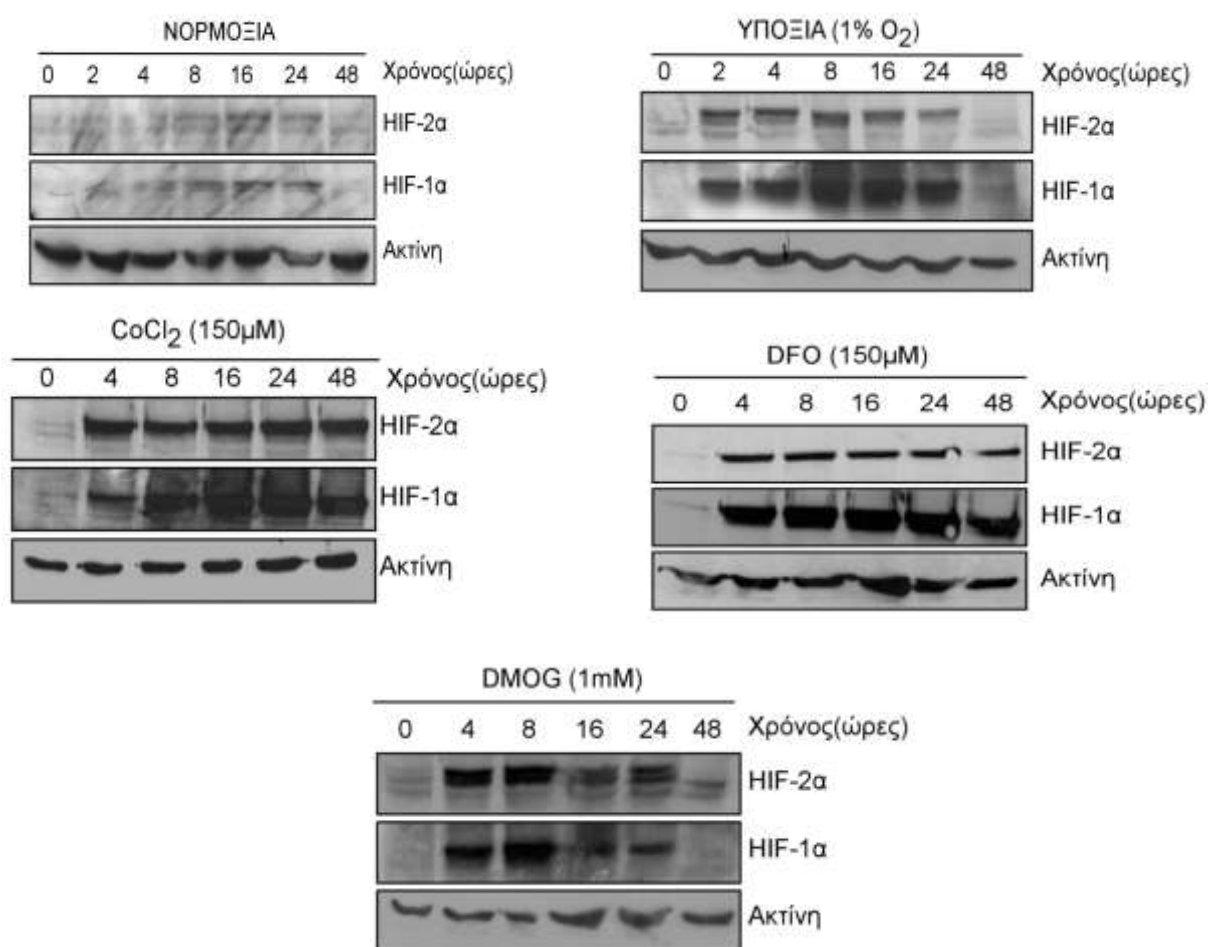
3.2.1.1. Χρονοεξαρτώμενη επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Αρχικά, μελετήθηκε η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και συγκρίθηκε με την επαγωγή της έκφρασής του παρουσία χημικών παραγόντων που «μιμούνται» την υποξία. Τα κύτταρα Huh7 εκφράζουν και τις δύο ισομορφές του HIF. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η κινητική της επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α η οποία συγκρίθηκε με εκείνη του HIF-2α.

Σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), ο HIF-2α ήταν οριακά ανιχνεύσιμος από τις 8 μέχρι τις 24 ώρες. Σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), ο HIF-2α ήταν ανιχνεύσιμος από την 2η ώρα, και τα επίπεδά του παρέμειναν αυξημένα μέχρι και τις 16 ώρες, ενώ στη συνέχεια βαθμιαία μειώνονταν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 48 ώρες. Παρουσία CoCl₂ (150 μM), ο HIF-2α ήταν ανιχνεύσιμος στις 4 ώρες και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48 ώρες. Παρουσία DFO (150 μM), η κινητική της έκφρασης του HIF-2α παρουσίαζε ένα παρόμοιο πρότυπο με αυτό του χλωριούχου κοβαλτίου. Τέλος, παρουσία DMOG (1 mM), ο HIF-2α είχε μέγιστη έκφραση στις 4-8 ώρες και μειώνονταν σε χαμηλά επίπεδα στις 16-24 ώρες και στις 48 ώρες σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Η έκφραση της ακτίνης παρέμενε αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των κυττάρων για 48 ώρες παρουσία των διάφορων επαγωγέων του υποξικού στρες (Εικόνα 24).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ενώ η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή παρουσία DMOG μειώνουν την έκφραση του HIF-2α, δε συμβαίνει κάτι αντίστοιχο στην περίπτωση της παρατεταμένης έκθεσης στο χλωριούχο κοβάλτιο ή στη δεσφερριζαμίνη.

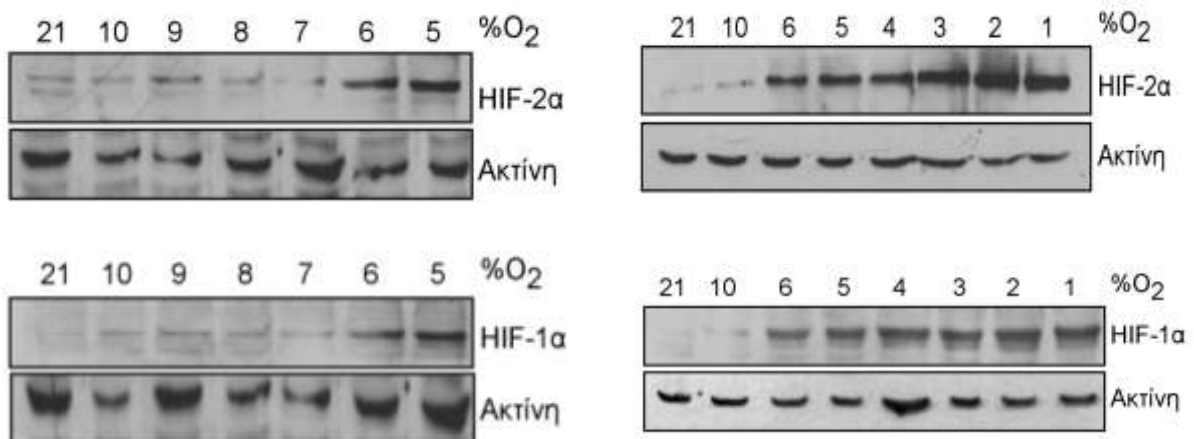
Σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), η έκφραση του HIF-1α ήταν μέγιστη στις 8-16 ώρες, ενώ μειώνονταν στις 48 ώρες. Η κινητική της έκφρασης του HIF-1α παρουσία CoCl₂ ή DFO ή DMOG ήταν παρόμοια με την κινητική της έκφρασης του HIF-2α (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Κινητική ανάλυση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α και του HIF-1α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, τον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για διαφορετικούς χρόνους σε νορμοξία (21% O₂), υποξία (1% O₂), ή παρουσία CoCl₂, DFO ή DMOG. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.1.2. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη του HIF-2α, σε αντίθεση με εκείνη του HIF-1α, επάγεται και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου από την υποξία (1% O₂) σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Για να διερευνηθεί εάν αυτό ισχύει και στα κύτταρα Huh7, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις οξυγόνου από 1 έως 10% για 2 ώρες και μελετήθηκε η έκφραση του HIF-2α και του HIF-1α. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες οξυγόνου από 21% μέχρι και 7%, οι πρωτεΐνες HIF-2α και HIF-1α ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμες. Η επαγωγή της έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών ξεκίνησε σε 6% O₂ και η μέγιστη αύξηση της έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών παρατηρήθηκε από 3% έως 1% O₂ (Εικόνα 25). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι, οι δύο πρωτεΐνες επάγονται στις ίδιες συγκεντρώσεις οξυγόνου στα κύτταρα Huh7.



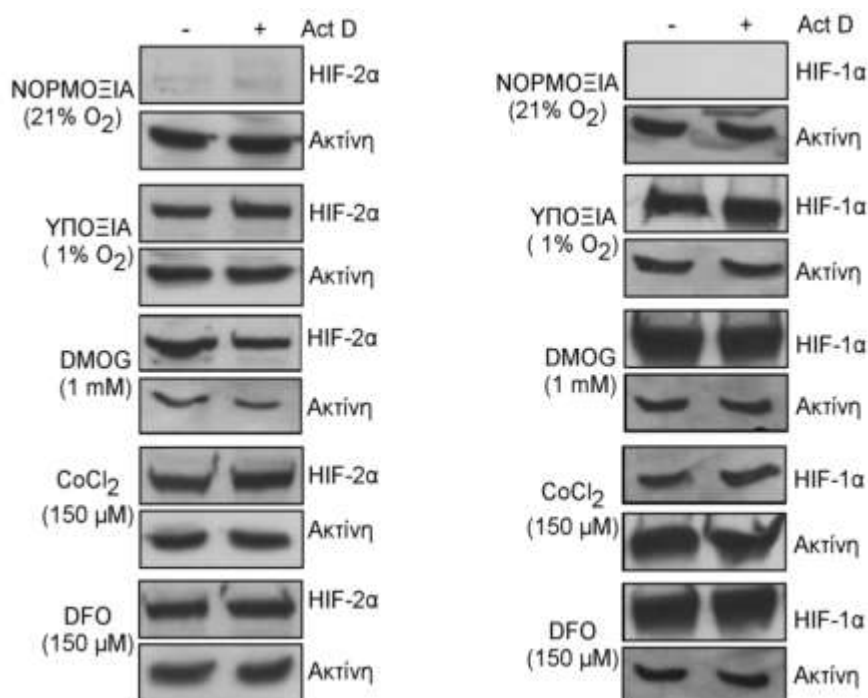
Εικόνα 25: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, τον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.1.3. Ο ρόλος της μεταγραφής στην επαγωγή του HIF-2α.

Η επαγωγή της πρωτεΐνης HIF-2α πιθανόν να οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της, ή σε αύξηση του ρυθμού της μετάφρασης του mRNA ή ακόμη και σε ένα μεταμεταφραστικό γεγονός όπως η αναστολή της αποικοδόμησης της

συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η επαγωγή του HIF-2α από την υποξία προκαλείται από τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης μέσω αναστολής της πρωτεόλυσης της. Παρόλα αυτά, άλλοι επαγωγείς του HIF-2α εκτός της υποξίας δε δρουν μέσω του παραπάνω μηχανισμού, αλλά επιδρούν στη μεταγραφή ή μετάφραση του HIF-2α (Keith, B et al., 2012).

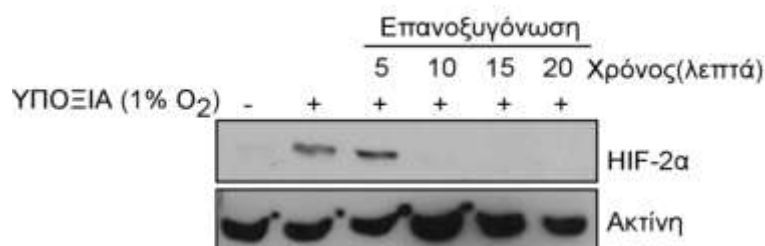
Για να διερευνηθεί αν οι διάφοροι επαγωγείς επηρεάζουν τη μεταγραφή του HIF-2α, χρησιμοποιήθηκε ένας γνωστός αναστολέας του μηχανισμού της μεταγραφής, η ακτινομυκίνη D. Κύτταρα Huh7 προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με 0,5 μg/ml ακτινομυκίνη D (ActD), ακολούθησε επίδραση με τους διάφορους επαγωγείς για 4 ώρες και ανάλυση των εκχυλισμάτων των κυττάρων με ανοσοαποτύπωση. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl₂, ή DFO ή DMOG, η παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής δεν επηρέασε τα επίπεδα του HIF-2α, αλλά ούτε και του HIF-1α (Εικόνα 26). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως δεν απαιτείται η παραγωγή mRNA για την αύξηση των επιπέδων του HIF-2α και του HIF-1α από τους συγκεκριμένους επαγωγείς.



Εικόνα 26: Επίδραση της αναστολής της μεταγραφής στην έκφραση των HIF-2α και HIF-1α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, τον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με 0,5 μg/ml Ακτινομυκίνη D (ActD) και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 4 ώρες στην υποξία ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.1.4. Ρόλος της πρωτεϊνοσύνθεσης στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

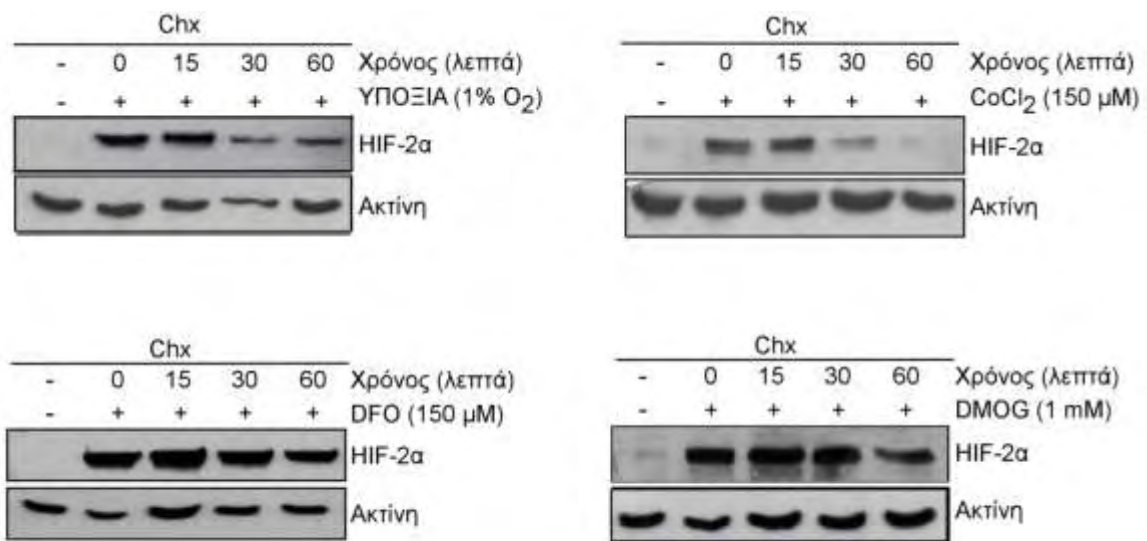
Η παρουσία του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας οφείλεται σε σταθεροποίησή του, επειδή αποφεύγεται η αποικοδόμησή του, η οποία συμβαίνει σε συνθήκες νορμοξίας. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι όταν κύτταρα Huh7 επωάζονται σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και κατόπιν επαναφέρονται σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), ο HIF-2α που έχει παραχθεί, αποικοδομείται με ένα χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Έλεγχος του χρόνου ημιζωής του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 4 ώρες και υποβλήθηκαν σε επανοξυγόνωση (21% O₂) για 5, 10, 15 και 20 λεπτά. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

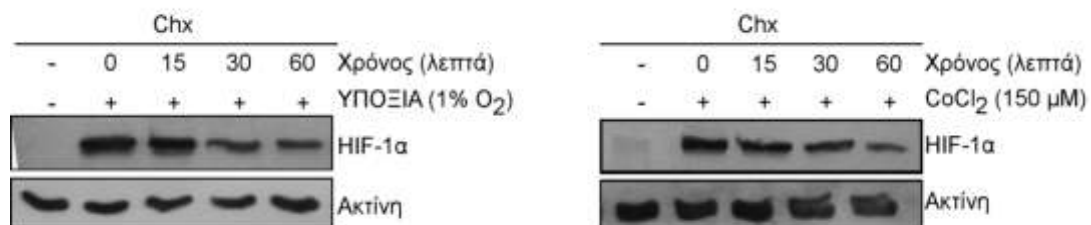
Αφού αποκλείστηκε το γεγονός ότι η επαγωγή του HIF-2α από τους επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή, οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του, στη συνέχεια εξετάστηκε αν η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-2α είναι απαραίτητη για την παρατηρούμενη επαγωγή, χρησιμοποιώντας ένα αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, το κυκλοεξιμίδιο. Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν με τους διάφορους επαγωγείς για 4 ώρες, στη συνέχεια προστέθηκε 10 μg/ml κυκλοεξιμίδιο (Chx) και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε για άλλα 15 έως 60 λεπτά.

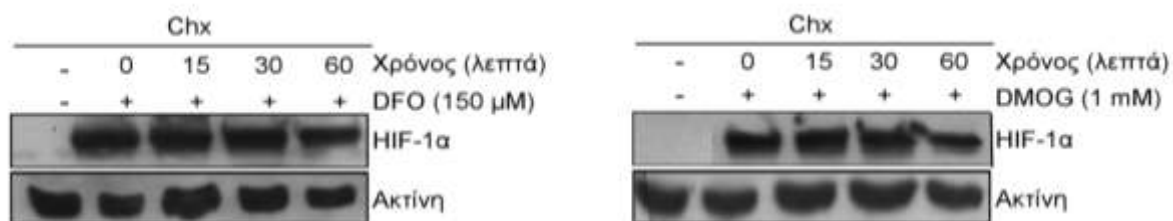
Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε υποξία είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της έκφρασης του HIF-2α σε 30 και 60 λεπτά (Εικόνα 28). Η προσθήκη κυκλοεξιμιδίου σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία CoCl₂ οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του HIF-2α και εξαφάνισής του σε χρόνο μικρότερο των 60 λεπτών (Εικόνα 28). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία DFO ή DMOG, τα επίπεδα του HIF-2α παρέμειναν υψηλά ακόμη και 60 λεπτά μετά την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου (Εικόνα 28). Επομένως, σε συνθήκες υποξίας και παρουσία CoCl₂ απαιτείται η πρωτεϊνοσύνθεση για τη διατήρηση των επιπέδων του HIF-2α.



Εικόνα 28: Επίδραση της αναστολής της μετάφρασης στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξία ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Το κυκλοεξιμίδιο (Chx, 10μg/ml) προστέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλα 15, 30 ή 60 λεπτά παρουσία των επαγωγέων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η πρωτεϊνική σύνθεση είναι απαραίτητη για την επαγωγή του HIF-1α από τους ίδιους επαγωγείς, προκειμένου να συγκριθεί με εκείνη του HIF-2α. Στην περίπτωση που η επαγωγή του HIF-1α προκλήθηκε από την υποξία ή το CoCl_2 , η προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου προκάλεσε σταδιακή μείωση του HIF-1α χωρίς όμως να εξαφανιστεί. Αντίθετα η επαγωγή του HIF-1α που προκλήθηκε από το DFO ή το DMOG επηρεάστηκε ακόμη λιγότερο από το κυκλοεξιμίδιο (Εικόνα 29).





Εικόνα 29: Επίδραση της αναστολής της μετάφρασης στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξία ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Το κυκλοεξιμίδιο (Chx, 10μg/ml) προστέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλα 15, 30 ή 60 λεπτά παρουσία των επαγωγέων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπερασματικά, στην περίπτωση της υποξίας και του CoCl_2 , σε αντίθεση με τη DFO και το DMOG, απαιτείται συνεχής πρωτεϊνοσύνθεση για τη διατήρηση των επιπέδων του HIF-2α, το οποίο δεν συμβαίνει στον ίδιο βαθμό για την επαγωγή του HIF-1α.

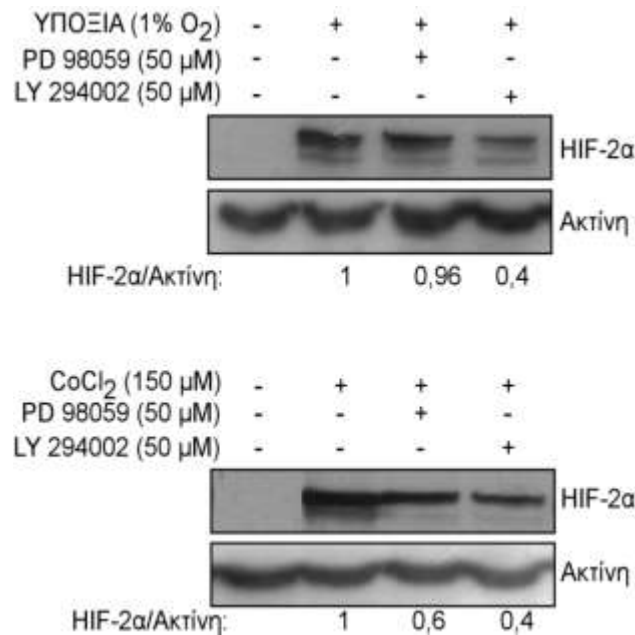
3.2.1.5. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2 στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η μετάφραση του mRNA των υπομονάδων HIF-α βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της φωσφατίδουλο-ινοσιτόλης-3 (PI3K) (Pouyssegur, J and Mechta-Grigoriou, F 2006). Επίσης είναι αποδεκτό ότι η έκφραση καθώς και η ενεργότητα του HIF-1α επηρεάζεται από τα μονοπάτια της PI3K/Akt και της ERK1/2 ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τον επαγωγέα ((Semenza, G 2002, Chachami, G et al., 2004, Triantafyllou, A et al., 2006). Ωστόσο, ο ρόλος των μονοπατιών αυτών στην έκφραση του HIF-2α δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί και οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι αντιφατικές (Toschi, A et al., 2008, Petrella, BL and Brinckerhoff, CE 2009). Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος των μονοπατιών αυτών σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl_2 , χρησιμοποιήθηκε το PD98059, ένας ειδικός αναστολέας της MEK1 (IC_{50} : 4μM) και της MEK2 (IC_{50} : 50μM) κινασών που ενεργοποιούν τις ERK1/2 (p44/42 MAP κινάση), και το LY294002, ένας ειδικός αναστολέας της PI3K (IC_{50} =0.43 μg/ml; 1.40 μM) η οποία ενεργοποιεί την Akt.

Παρουσία του αναστολέα PD98059, η επαγωγή του HIF-2α από την υποξία δεν επηρεάστηκε, ενώ μειώθηκε σημαντικά η επαγωγή του από το CoCl_2 . Αντίθετα, παρουσία

του αναστολέα LY294002, η επαγωγή του και από την υποξία και από το CoCl₂ μειώθηκε σημαντικά (Εικόνα 30).

Επομένως, στην επαγωγή του HIF-2α από την υποξία εμπλέκεται μόνο το μονοπάτι της PI3K/Akt, ενώ στην επαγωγή του HIF-2α από το χλωριούχο κοβάλτιο συμμετέχουν τόσο το μονοπάτι των ERK1/2 κινασών όσο και αυτό της PI3K/Akt.

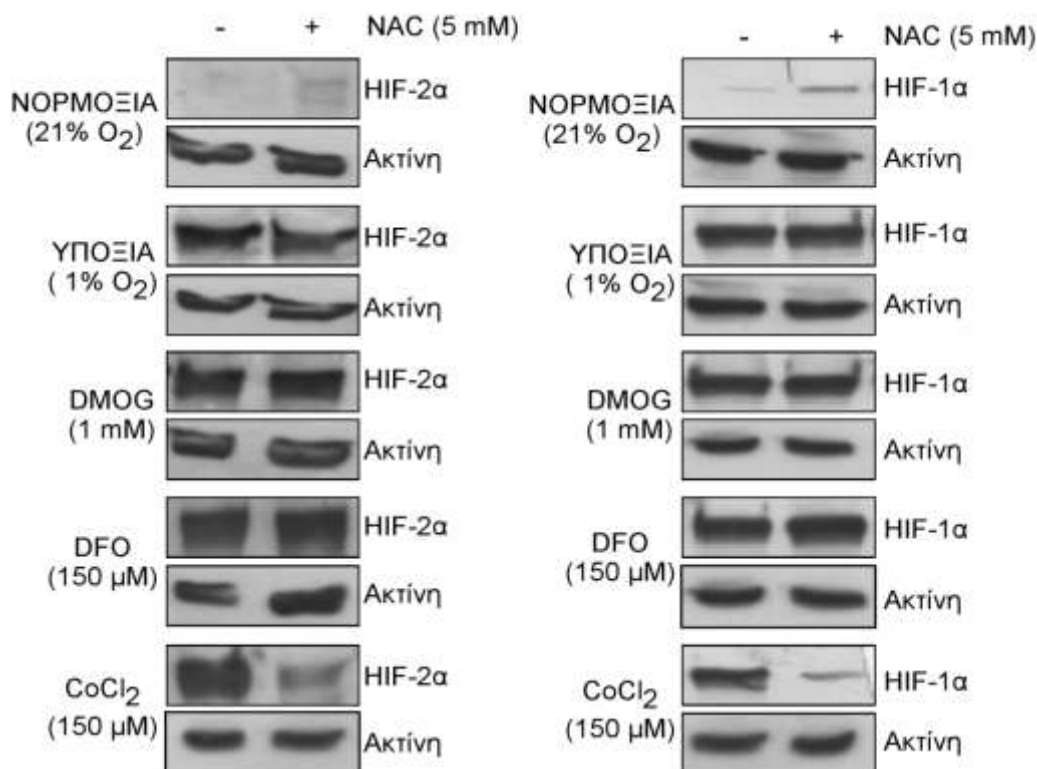


Εικόνα 30: Επίδραση των μονοπατιών ERK1/2 και PI3K/Akt στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξία ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Οι αναστολείς PD98059 (50 μM) και LY294002 (50 μM) προστέθηκαν 15 λεπτά πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν το λόγο του ποσού του HIF-2α προς το ποσό της ακτίνης, εκφρασμένο σε σχέση με τη συνθήκη της υποξίας ή του CoCl₂ αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.1.6. Ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Έχει προταθεί πως τα ROS είναι δυνατόν να οδηγούν στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα με ανενεργό VHL μέσω του μονοπατιού της PI3K (Maranchie, JK and Zhan, Y 2005, Block, K et al., 2007). Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των ROS στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7 χρησιμοποιήθηκε το αντιοξειδωτικό N-ακετυλο-κυστεΐνη (NAC), που είναι πρόδρομη ένωση της γλουταθειόνης. Η παρουσία 5 mM NAC σε

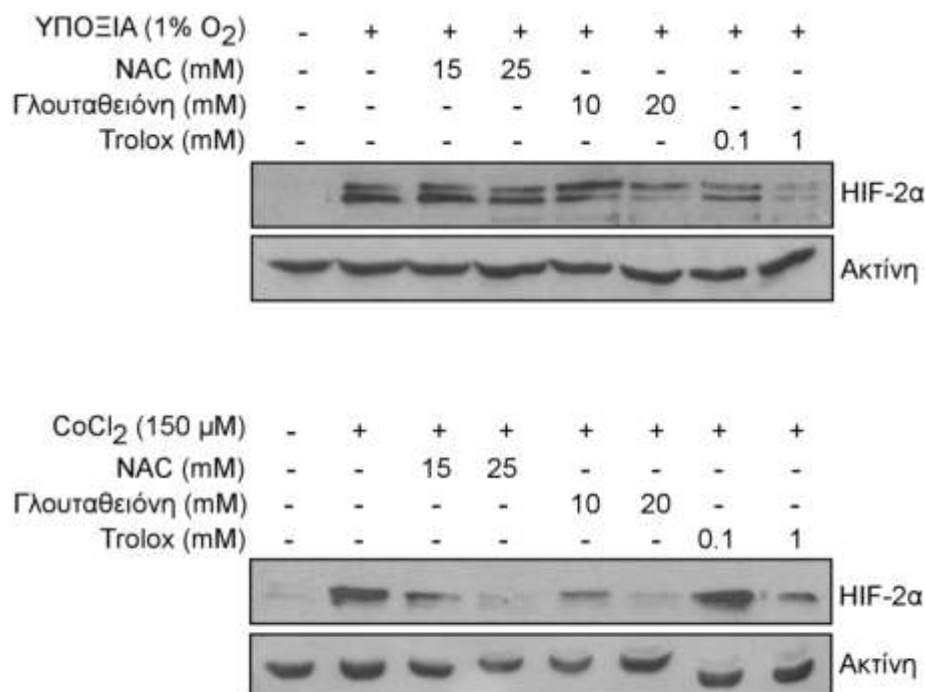
συνθήκες υποξίας ή παρουσία δεσφερριδοξαμίνης ή DMOG δεν επηρέασε την έκφραση του HIF-2α, ενώ η ίδια συγκέντρωση NAC παρουσία CoCl₂ οδήγησε σε μείωση της επαγωγής του HIF-2α από το CoCl₂ (Εικόνα 31). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τον HIF-1α, όπου το NAC ομοίως ανέστειλε την επαγωγή του μόνο από το CoCl₂ (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Επίδραση του αντιοξειδωτικού NAC στην επαγωγή των HIF-2α και HIF-1α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, στον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξία ή παρουσία των διαφόρων επαγωγέων. Η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC, 5 mM) προστέθηκε 2 ώρες πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Για τον έλεγχο της συμμετοχής των ROS στην επαγωγή του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl₂ χρησιμοποιήθηκαν και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η γλουταθειόνη και το Trolox, το οποίο είναι ανάλογο της βιταμίνης Ε. Όταν προστέθηκαν στα κύτταρα Huh7 τα αντιοξειδωτικά γλουταθειόνη και Trolox προκλήθηκε αναστολή της επαγωγής του HIF-2α από το CoCl₂ καθώς και από την υποξία, το οποίο δεν είχε παρατηρηθεί από το NAC. Επιπλέον η δράση της γλουταθειόνης και του Trolox στην περίπτωση της υποξίας και του CoCl₂ ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 32).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η παραγωγή ή η παρουσία των ROS είναι απαραίτητη για την επαγωγή του HIF-2α που προκαλείται από την υποξία και από το CoCl₂.



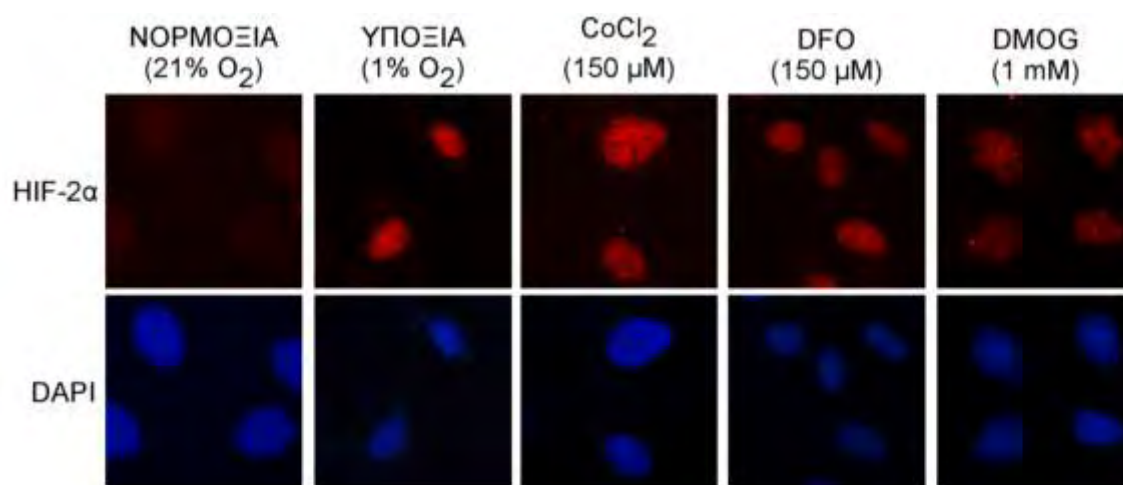
Εικόνα 32: Επίδραση των αντιοξειδωτικών NAC, γλουταθειόνη και trolox στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν για 4 ώρες σε υποξία ή παρουσία CoCl₂. Το NAC (15 mM και 25 mM) προστέθηκε 2 ώρες πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Η γλουταθειόνη (10 mM και 20 mM) προστέθηκε 1 ώρα πριν την προσθήκη των επαγωγέων. Το Trolox (0.1 mM και 1 mM) προστέθηκε ταυτόχρονα με τους επαγωγείς. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΟΥ HIF-2α ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Huh7

3.2.2.1. Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Είναι γνωστό ότι ο HIF-2α, για να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, μετακινείται στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το ενεργό σύμπλοκο, του HIF-2. Με σκοπό να ελεγχθεί εάν ο HIF-2α που επάγεται από τους διάφορους επαγωγείς υποξικού στρες εντοπίζεται στον πυρήνα, κύτταρα Huh7

καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία ή υποξία ή παρουσία CoCl_2 , ή DFO ή DMOG για 4 ώρες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων σε καλυπτρίδες και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του HIF-2 α . Παρατηρήθηκε ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου ο HIF-2 α είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμος. Αντίθετα, σε συνθήκες υποξίας καθώς και μετά την προσθήκη CoCl_2 ή DFO ή DMOG για 4 ώρες τα επίπεδα του HIF-2 α αυξήθηκαν σημαντικά και σε όλες τις περιπτώσεις ο HIF-2 α εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοφθορισμός με αντισώμα έναντι στον HIF-2 α κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν για 4 ώρες σε νορμοξία ή υποξία ή παρουσία των διάφορων επαγωγέων. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

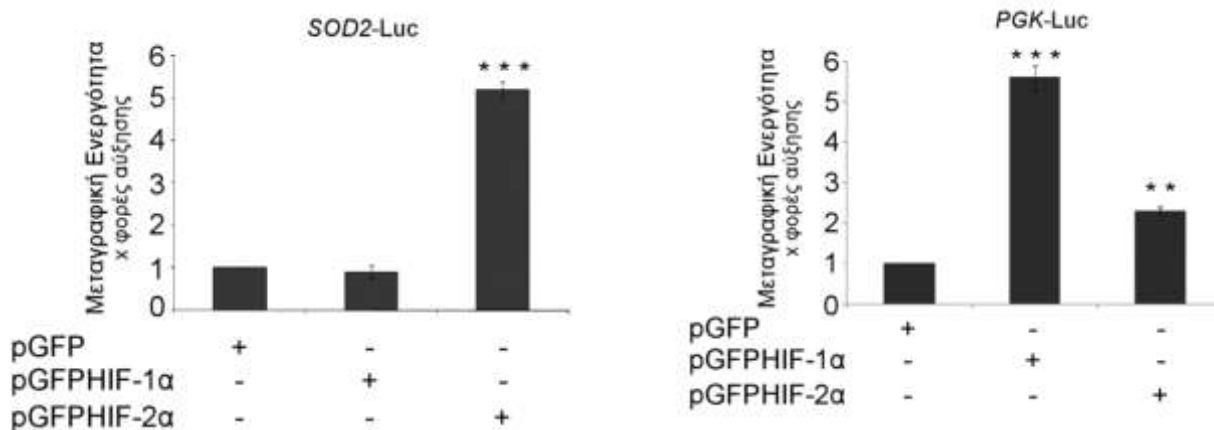
3.2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Huh7

3.2.3.1. Εύρεση ειδικών μεταγραφικών στόχων για τον HIF-2 και τον HIF-1 σε κύτταρα Huh7.

Αφού μελετήθηκε η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2 α σε κύτταρα Huh7, το επόμενο ερώτημα ήταν αν ο επαγόμενος HIF-2 είναι μεταγραφικά ενεργός σε όλες τις περιπτώσεις επαγωγής και να συγκριθεί με τον HIF-1. Για να αξιολογηθεί η μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-2 διακριτά από εκείνη του HIF-1 αναζητήθηκαν ειδικοί

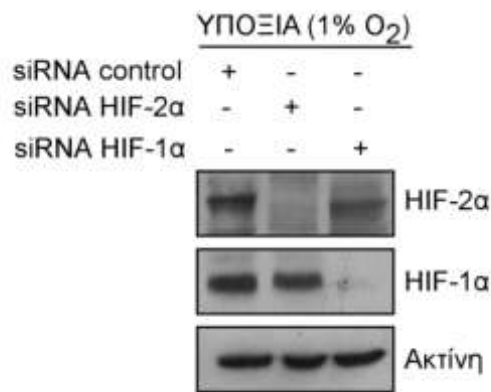
μεταγραφικοί στόχοι για τον HIF-1 και HIF-2 στα κύτταρα Huh7. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το γονίδιο της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου (*SOD2*) ρυθμίζεται σε συνθήκες υποξίας από τον HIF-2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ το γονίδιο της κινάσης του φωσφογλυκερινικού οξέος (*PGK*) επάγεται ειδικά από τον HIF-1 (Hu, CJ et al., 2003, Scortegagna, M et al., 2003, Hu, CJ et al., 2007). Επειδή εξειδίκευση των στόχων των HIF εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου, έγινε έλεγχος εάν οι υποκινητές των γονιδίων της *SOD2* και της *PGK* είναι ειδικοί στόχοι του HIF-2 και του HIF-1, αντίστοιχα, σε κύτταρα Huh7. Ο έλεγχος αυτός έγινε με πειράματα υπερέκφρασης και αποσιώπησης του HIF-1α και του HIF-2α παρουσία των πλασμιδιακών κατασκευών *pGL2-SOD2-Luc* και *pGL3-PGK-Luc* και προσδιορισμού της μεταγραφικής ενεργότητας (λεπτομέρειες αναφέρονται στα Υλικά και Μέθοδοι).

Για τα πειράματα υπερέκφρασης, το πλήρες cDNA του HIF-2α κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα *pGFP-C1*, προκειμένου να κωδικοποιεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα τον HIF-2α σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Το cDNA του HIF-1α ήταν διαθέσιμο στο εργαστήριο κλωνοποιημένο στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα. Στη συνέχεια, ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων Huh7 με τις κατασκευές *pGFP*, *pGFP-HIF-1α*, *GFP-HIF-2α* καθώς και τα πλασμίδια αναφοράς *pGL2-SOD2-Luc* και *pCI-Renilla* ή *pGL3-PGK-Luc* και *pCI-Renilla*. Έπειτα από τη λύση των κυττάρων μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης ως μέτρου της μεταγραφικής δραστηριότητας των HIFs έναντι των αντίστοιχων υποκινητών. Παρατηρήθηκε ότι όταν υπερεκφράστηκε ο *GFP-HIF-2α* αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά η μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2*, ενώ η υπερέκφραση του *GFP-HIF-1α* δεν την επηρέασε καθόλου. Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση του *GFP-HIF-1α* (και σε πολύ μικρότερο βαθμό η υπερέκφραση του *GFP-HIF-2α*) ενεργοποίησαν την μεταγραφή από τον υποκινητή του *PGK* (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Επίδραση του HIF-1α και HIF-2α στην μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* 24 ώρες μετά από διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με πλασμίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες GFP ή GFP-HIF-1α ή GFP-HIF-2α και πλασμίδια αναφοράς. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) $P < 0,005$, ** $P < 0,01$).

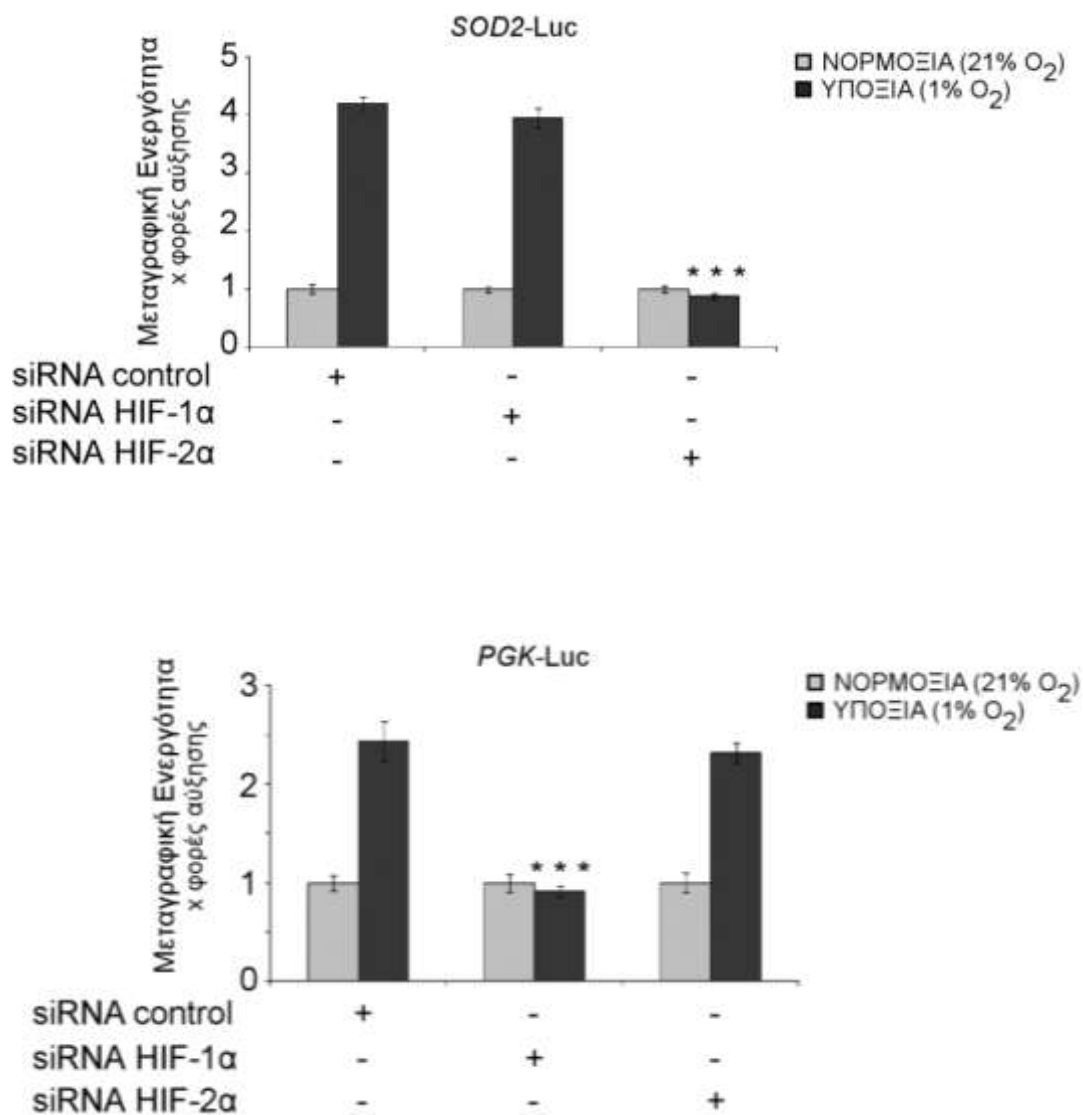
Η διερεύνηση των μεταγραφικών στόχων έγινε επίσης με αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με τη χρήση «μικρών μορίων RNA παρέμβασης» (Small interfering RNA, siRNA). Αρχικά για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης, τα κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με siRNA που στοχεύει επιλεκτικά τον HIF-1α ή τον HIF-2α ή με μάρτυρά siRNA (που δεν αναστέλλει την έκφραση κάποιου γονιδίου), επώαστηκαν σε υποξία και με ανοσοαποτύπωση αναλύθηκε η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α. Παρουσία του siRNA-HIF-2α, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α μειώθηκαν σημαντικά ενώ τα επίπεδα του HIF-1α και της ακτίνης παρέμειναν σταθερά. Παρουσία του siRNA-HIF-1α, η έκφραση του HIF-1α μειώθηκε σημαντικά χωρίς να επηρεαστούν η έκφραση του HIF-2α και της ακτίνης (Εικόνα 35). Τα siRNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποτελεσματικά στην αποσιώπηση της έκφρασης των HIF-2α και HIF-1α στη συγκέντρωση των 20nM.



Εικόνα 35: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-2α και του HIF-1α με siRNA στην έκφραση του HIF-2α και του HIF-1α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, στον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος επιμολυσμένων με siRNA- HIF-2α (20 nM) ή με siRNA- HIF-1α (20 nM) κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων Huh7 με siRNA-HIF-1α ή με siRNA-HIF-2α (ή με μάρτυρα siRNA) και με πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc και pCI-Renilla ή pGL3-*PGK*-Luc και pCI-Renilla. Μετά από επώαση σε υποξία ή νορμοξία για 16 ώρες, μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Η αποσιώπηση του HIF-2α προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από την υποξία μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* (μειώθηκε στα επίπεδα της νορμοξίας), ενώ η αποσιώπηση του HIF-1α δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην επαγωγή της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* από την υποξία. Αντίθετα, η αποσιώπηση του HIF-1α προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από την υποξία μεταγραφής από τον υποκινητή του *PGK* (στα επίπεδα της νορμοξίας), ενώ η αποσιώπηση του HIF-2α δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην επαγωγή της μεταγραφής από τον υποκινητή του *PGK* από την υποξία (Εικόνα 36). Επομένως, από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι μόνο ο HIF-2α είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του υποκινητή του *SOD2*, ενώ μόνο ο HIF-1α είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του υποκινητή του *PGK* σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της υπερέκφρασης και της αποσιώπησης των HIF-2α και HIF-1α υποδεικνύουν πως ο υποκινητής του *SOD2* είναι ειδικός μεταγραφικός στόχος του HIF-2

και ο υποκινητής του *PGK* είναι ειδικός μεταγραφικός στόχος του HIF-1 σε κύτταρα Huh7.

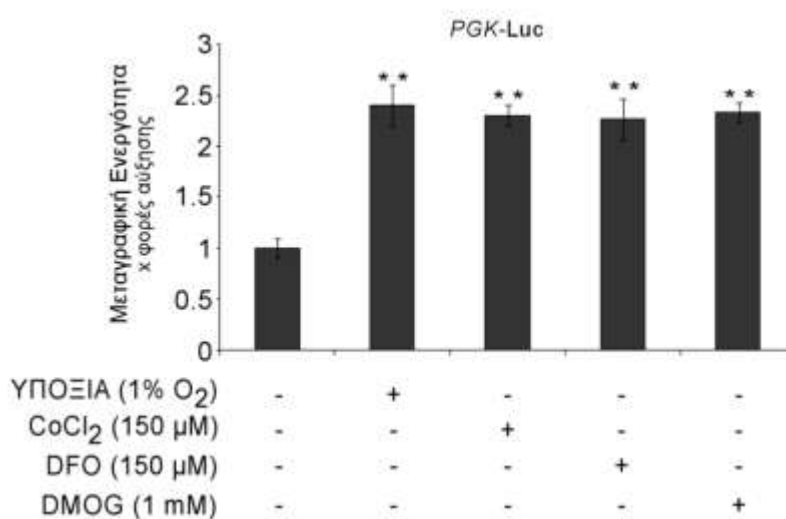
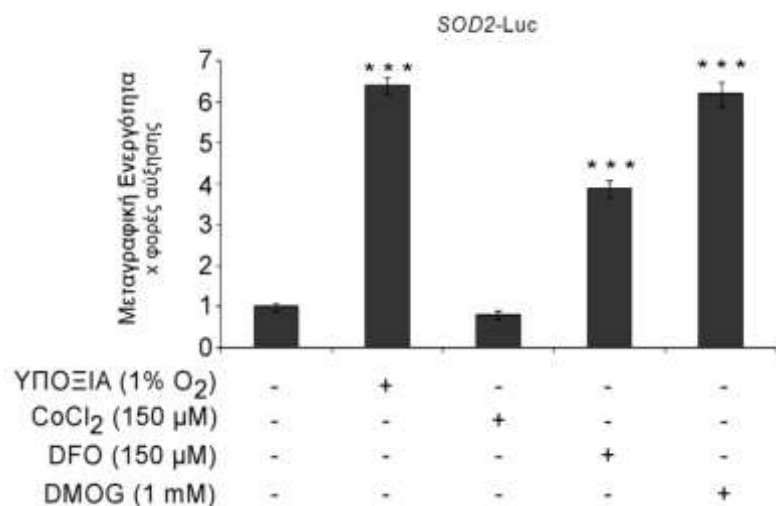


Εικόνα 36: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στην μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε επιμολυσμένα με siRNA- HIF-2α (20 nM) ή με siRNA- HIF-1α (20 nM) και πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

3.2.3.2. Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων του υποξικού στρες στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

Για να εξακριβωθεί αν ο HIF-2α που επάγεται στις διάφορες συνθήκες υποξικού στρες στα κύτταρα Huh7 είναι λειτουργικός, έγινε μέτρηση της μεταγραφικής του ενεργότητας χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο αναφοράς pGL2-SOD2-Luc που περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου της SOD2 πριν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) της λουσιφεράσης. Επίσης, έγινε σύγκριση με την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 στις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο αναφοράς pGL3-PGK-Luc που περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου του PGK πριν το ORF της λουσιφεράσης. Τα κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-SOD2-Luc και pCI-Renilla ή pGL3-PGK-Luc και pCI-Renilla και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή με CoCl₂ ή DFO ή DMOG για 16 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης η οποία αντιστοιχεί στην μεταγραφική ενεργότητα του κάθε HIF. Σε συνθήκες υποξίας, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του υποκινητή του SOD2 κατά 6 φορές περίπου σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με CoCl₂ η μεταγραφή από τον υποκινητή του SOD2 δεν αυξήθηκε σε σχέση με αυτή των κυττάρων στη νορμοξία. Όταν ως «μιμητές» της υποξίας χρησιμοποιήθηκαν η DFO και το DMOG η ενεργοποίηση του υποκινητή του SOD2 αυξήθηκε κατά 4 και 6 περίπου φορές αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία (Εικόνα 37). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τόσο η υποξία όσο και η DFO και το DMOG οδηγούν στην επαγωγή μεταγραφικά ενεργού HIF-2. Αντιθέτως, το CoCl₂ δεν επάγει την μεταγραφική δράση του HIF-2.

Συγκριτικά, η ενεργοποίηση του υποκινητή του PGK και κατά συνέπεια η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 αυξήθηκε τόσο από την υποξία όσο και από όλους τους άλλους επαγωγείς όπως το CoCl₂, τη DFO και το DMOG κατά 2,5 περίπου φορές σε σχέση με την νορμοξία (Εικόνα 37). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η υποξία, η DFO και το DMOG επάγουν την μεταγραφική ενεργότητα των HIF-2 και HIF-1, ενώ το CoCl₂ δεν επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 παρόλο που επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.

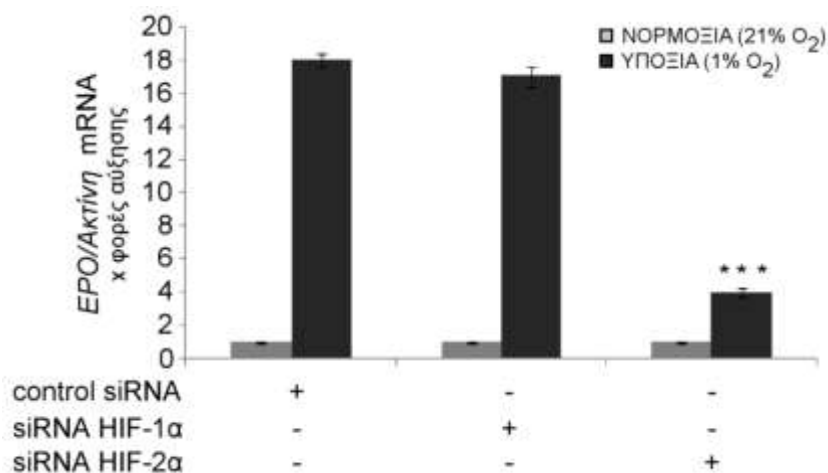


Εικόνα 37: Επίδραση των διαφόρων επαγωγέων υποξικού στρες στην μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή με διάφορους επαγωγείς για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005, ** P<0,01).

3.2.3.3. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης.

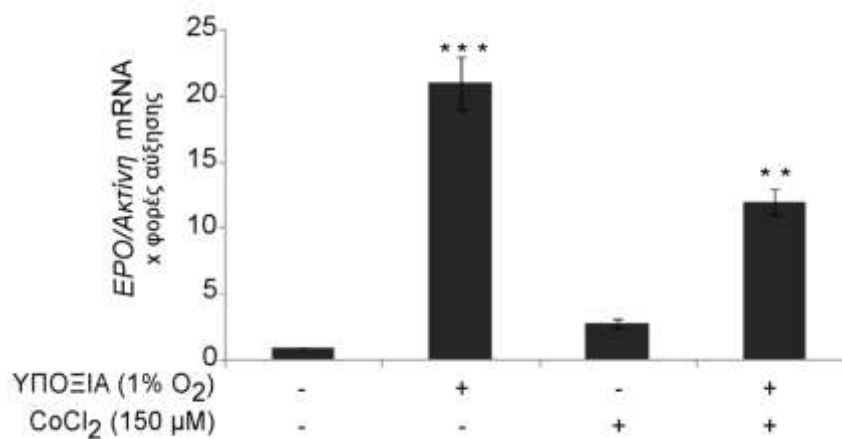
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το CoCl_2 δεν επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, ελέγχθηκε η επίδρασή του στη μεταγραφή και άλλων μεταγραφικών στόχων του HIF-2. Για αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί η μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, *EPO*, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενεργοποιείται στην υποξία ειδικά από τον HIF-2 σε νεφρικά και ηπατικά κύτταρα και αστροκύτταρα (Warnecke, C et al., 2004, Rankin, EB et al., 2007, Kapitsinou, PP et al., 2010).

Η μεταγραφή του *EPO* μελετήθηκε με τη μέθοδο της Real Time PCR. Αρχικά, ελέγχθηκε εάν η *EPO* αποτελεί γονίδιο στόχο του HIF-2α στα κύτταρα Huh7 με πειράματα αποσιώπησης του HIF-1α και του HIF-2α. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων Huh7 με siRNA-HIF-1α ή με siRNA-HIF-2α (ή με μάρτυρα siRNA) και μετά από επώαση σε υποξία ή νορμοξία για 16 ώρες, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του *EPO* και της *ακτίνης* με τη μέθοδο της RT-PCR. Η υποξία προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του *EPO* κατά 18 φορές περίπου σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του *EPO* σε κύτταρα Huh7. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας διατήρησε τα αυξημένα επίπεδα mRNA του *EPO* (Εικόνα 38). Επομένως, επιβεβαιώθηκε ότι ο HIF-2 αποτελεί κύριο ρυθμιστή της μεταγραφής της *EPO* στα κύτταρα Huh7 και η μέτρηση των επιπέδων mRNA του *EPO* αποτελεί ένα τρόπο εκτίμησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 σε κύτταρα Huh7.



Εικόνα 38: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στην μεταγραφή του *EPO* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του *EPO/ακτίνης* με RT-PCR σε επιμολυσμένα με siRNA-HIF-2α (20 nM) ή με siRNA-HIF-1α (20 nM) κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας, του CoCl₂ καθώς και της ταυτόχρονης δράσης και των δύο στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 μεταγραφή της *EPO* σε κύτταρα Huh7. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας για 16 ώρες τα επίπεδα mRNA του *EPO* αυξήθηκαν κατά 22 περίπου φορές σε σύγκριση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Αντίθετα, στα κύτταρα που επώαστηκαν με CoCl₂ για 16 ώρες δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων mRNA *EPO/ακτίνης* σε σχέση με εκείνα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Επιπλέον, η ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του CoCl₂ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 50% περίπου των επιπέδων mRNA του *EPO* που παρατηρήθηκαν σε συνθήκες μόνο υποξίας (Εικόνα 39). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι όχι μόνο το CoCl₂, σε αντίθεση με την υποξία, δεν επάγει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 μεταγραφή του *EPO*, αλλά, επιπλέον αναστέλλει την προκαλούμενη από την υποξία επαγωγή της μεταγραφής του *EPO*.

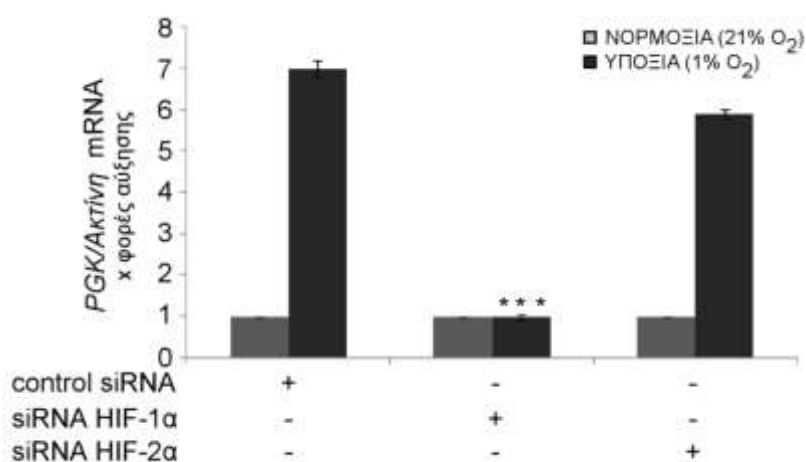


Εικόνα 39: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην μεταγραφή του *EPO* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του *EPO/ακτίνης* με RT-PCR σε κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή CoCl₂ ή και των δύο ταυτόχρονα για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005, ** P<0,01).

3.2.3.4. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην HIF-1 εξαρτώμενη μεταγραφή του γονιδίου του *PGK*.

Προκειμένου να συγκριθεί η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 με αυτή του HIF-1 στις παραπάνω συνθήκες, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1 *PGK* με τη μέθοδο της RT-PCR. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε με πειράματα αποσιώπησης του HIF-1α και του HIF-2α πως η μεταγραφή του *PGK* σε συνθήκες υποξίας ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον HIF-1. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των κυττάρων Huh7 με siRNA-HIF-1α ή με siRNA-HIF-2α (ή με μάρτυρα siRNA) και μετά από επώαση σε υποξία ή νορμοξία για 16 ώρες, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του *PGK* και της *ακτίνης* με τη μέθοδο της RT-PCR. Η υποξία προκάλεσε άυξηση των επιπέδων mRNA του *PGK* κατά 7 φορές περίπου σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του mRNA *PGK*. Αντιθέτως, η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας διατήρησε τα αυξημένα επίπεδα mRNA *PGK* (Εικόνα 40). Επομένως, η μέτρηση των επιπέδων mRNA του *PGK*

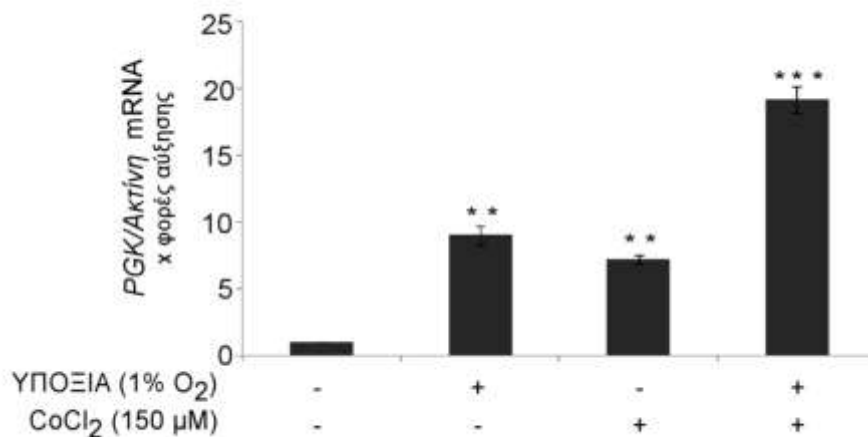
αποτελεί ένα τρόπο εκτίμησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε κύτταρα Huh7.



Εικόνα 40: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στην μεταγραφή της *PGK* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA της *PGK/ακτίνης* με RT-PCR σε επιμολυσμένα με siRNA-HIF-2α (20 nM) ή με siRNA-HIF-1α (20 nM) κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας, του CoCl₂ καθώς και της ταυτόχρονης δράσης και των δύο στην εξαρτώμενη από τον HIF-1 μεταγραφή της *PGK*. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας για 16 ώρες τα επίπεδα mRNA του *PGK* αυξήθηκαν περίπου 10 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Επιπλέον, όταν σαν επαγωγέας χρησιμοποιήθηκε το CoCl₂ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA *PGK* κατά 8 περίπου φορές σε σχέση με τα επίπεδα mRNA *PGK* σε συνθήκες νορμοξίας. Επίσης, όταν έγινε ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του CoCl₂, τα επίπεδα mRNA *PGK* αυξήθηκαν κατά 20 περίπου φορές σε σχέση με τα επίπεδα mRNA *PGK* σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 41). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υποξία και το CoCl₂ επάγουν την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και η ταυτόχρονη δράση της υποξίας και του CoCl₂ φαίνεται να είναι αθροιστική.

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 φαίνεται καθαρά ότι ο HIF-2 ρυθμίζεται διαφορετικά από το CoCl₂ από ότι ο HIF-1.

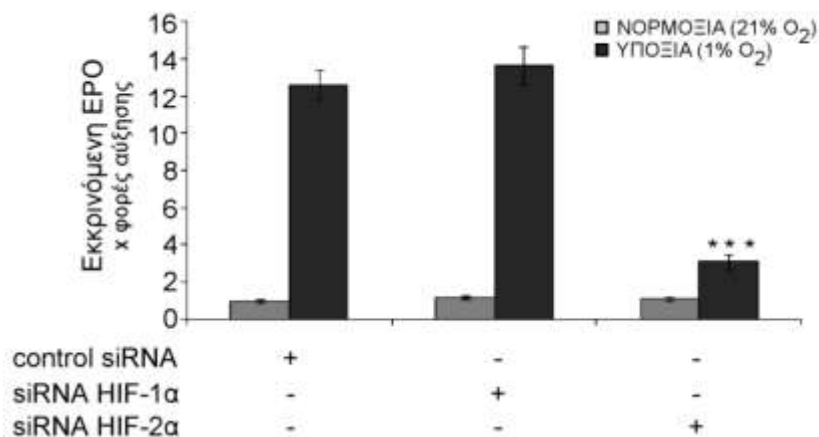


Εικόνα 41: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην μεταγραφή του *PGK* σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση των επιπέδων mRNA της *PGK/ακτίνης* με RT-PCR σε κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή CoCl₂ ή και των δύο ταυτόχρονα για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*** P<0,005, ** P<0,01).

3.2.3.5. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκκριση της ερυθροποιητίνης.

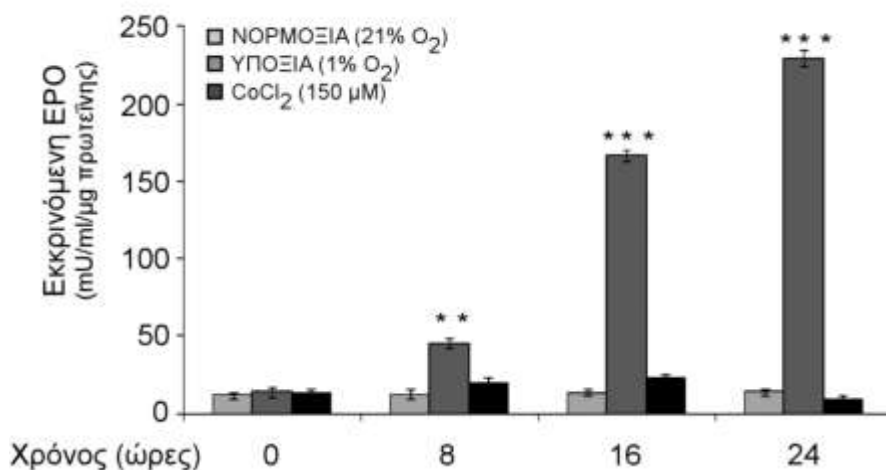
Για να διαπιστωθεί εάν η ανασταλτική δράση του CoCl₂ στη μεταγραφή της *EPO* ακολουθείται και από ανάλογη επίδραση στην έκκριση της ερυθροποιητίνης (EPO), μετρήθηκε η εκκρινόμενη EPO με τη μέθοδο της RIA. Αρχικά, διερευνήθηκε εάν η εκκρινόμενη EPO ρυθμίζεται ειδικά από τον HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και για αυτό πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της έκφρασης τόσο του HIF-2α όσο και του HIF-1α. Παρατηρήθηκε ότι η υποξία προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO κατά 12 περίπου φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α μείωσε στατιστικά σημαντικά τα αυξανόμενα από την υποξία επίπεδα της εκκρινόμενης EPO, ενώ αυτά δεν επηρεάστηκαν από την αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α (Εικόνα 42). Συνεπώς, σε

συνθήκες υποξίας, η έκκριση της EPO από κύτταρα Huh7 ρυθμίζεται κυρίως από τον HIF-2α και όχι από τον HIF-1α.



Εικόνα 42: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στην έκκριση της EPO σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της εκκρινόμενης EPO με RIA σε επιμολυσμένα με siRNA-HIF-2α (20 nM) ή με siRNA-HIF-1α (20 nM) κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η χρονοεξαρτώμενη επίδραση του CoCl₂ στην έκκριση της EPO από κύτταρα Huh7 και συγκρίθηκε με την χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας. Παρατηρήθηκε ότι ενώ σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO αυξήθηκαν στις 8 ώρες κατά 5 περίπου φορές, με μεγαλύτερη αύξηση στις 16 και 24 ώρες τα οποία έφτασαν και τις 22 περίπου φορές, το CoCl₂ δεν προκάλεσε καμία αύξηση στα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην έκκριση της EPO σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της εκκρινόμενης EPO με RIA σε κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή CoCl₂ για 8, 16 και 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01, *** P<0,005).

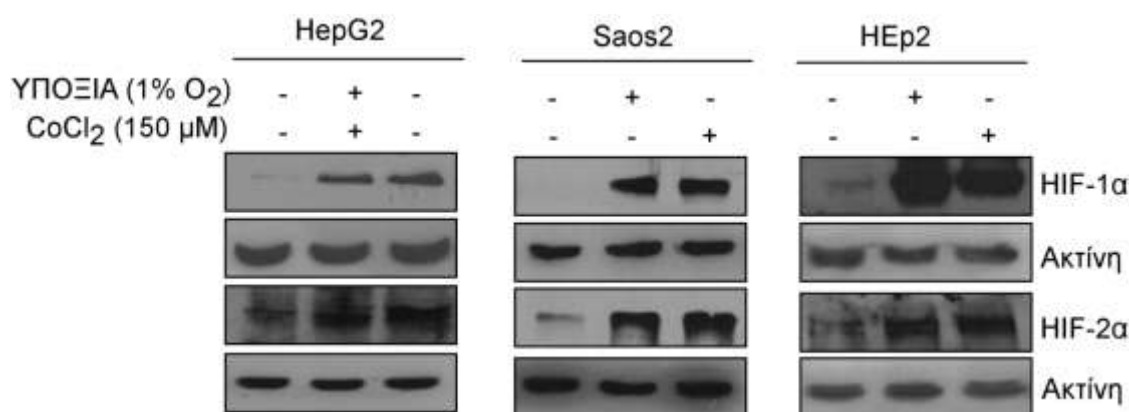
Συμπερασματικά, στα κύτταρα Huh7 η υποξία καθώς και οι «μιμητές» της υποξίας όπως χλωριούχο κοβάλτιο, DFO και DMOG, επάγουν την έκφραση του HIF-2α. Ωστόσο, όλοι, εκτός του χλωριούχου κοβαλτίου, επάγουν και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Συγκεκριμένα, η υποξία, η DFO και το DMOG επάγουν την μεταγραφή του υποκινητή της SOD2, ειδικό γονίδιο στόχο του HIF-2. Αντίθετα, το χλωριούχο κοβάλτιο δεν επάγει τη μεταγραφή κανενός ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-2 που μελετήθηκε, δηλαδή δεν επάγει ούτε την μεταγραφή του υποκινητή της SOD2, ούτε τα επίπεδα mRNA της ερυθροποιητίνης, ούτε την έκκριση της ερυθροποιητίνης σε κύτταρα Huh7.

3.2.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΟΒΑΛΤΙΟ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.

3.2.4.1. Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην έκφραση του HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα HepG2, Saos2 και Hep2

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η προκαλούμενη από το CoCl_2 αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α εξαρτάται από το τύπο του κυττάρου, μελετήθηκε η δράση του CoCl_2 και σε άλλες κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν μία ακόμη σειρά ηπατοκαρκινώματος, τα κύτταρα HepG2, καθώς και κύτταρα του καρκίνου του λάρυγγα, HEp2, και κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos-2.

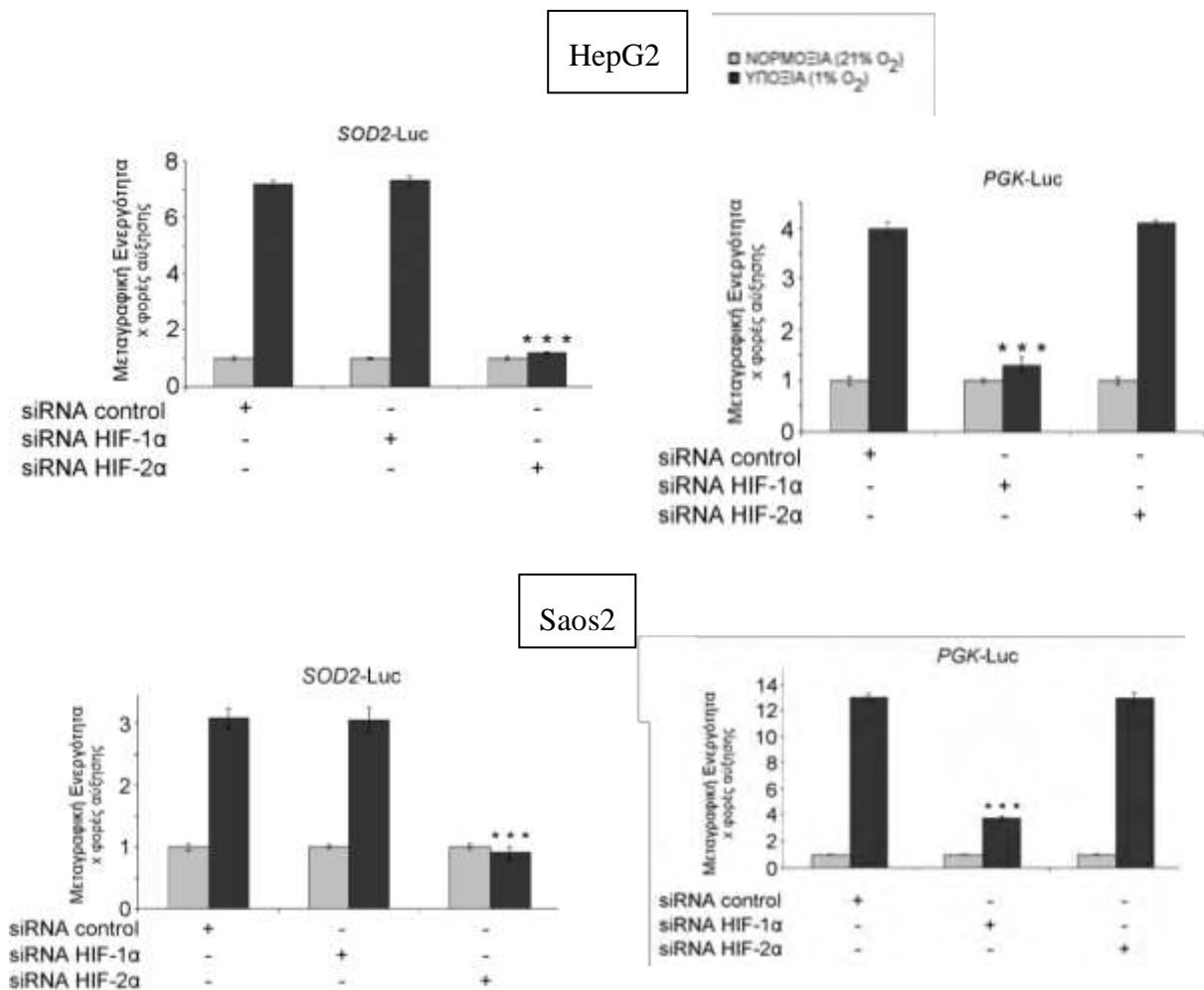
Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση του HIF-2α αλλά και του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl_2 . Παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις κυτταρικές σειρές εκφράζουν και τις δύο πρωτεΐνες, HIF-1α και HIF-2α σε αυτές τις συνθήκες (Εικόνα 44)

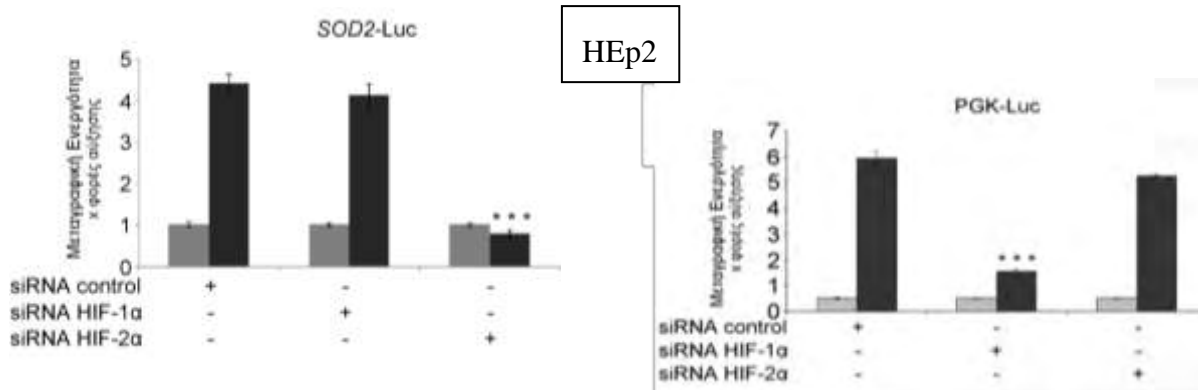


Εικόνα 44: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχου κοβαλτίου στην έκφραση του HIF-1α και HIF-2α σε κύτταρα HepG2, Saos2 και HEp2. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, τον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2, Saos2 και HEp2 που καλλιιεργήθηκαν για 16 ώρες σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl_2 . Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.2.4.2. Επίδραση της υποξίας και του γλωριούχου κοβαλτίου στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 και του HIF-2.

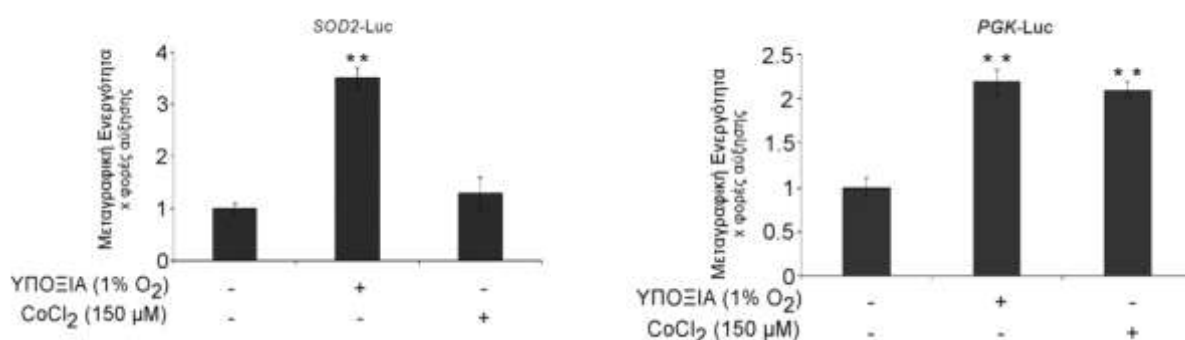
Για την μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και του HIF-2 σε κύτταρα HepG2, Saos2 και HEp2, αρχικά με πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης των HIF επιβεβαιώθηκε και στις τρεις κυτταρικές σειρές ότι η μεταγραφή από τον υποκινητή της *SOD2* ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον HIF-2 ενώ η μεταγραφή από τον υποκινητή της *PGK* ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον HIF-1 (Εικόνα 45).





Εικόνα 45: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στην μεταγραφή από τον υποκινητή του SOD2 και τον υποκινητή του PGK σε κύτταρα HepG2, Saos2 και HEp2. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του SOD2 και τον υποκινητή του PGK σε επιμολυσμένα με siRNA- HIF-2α (20 nM) ή με siRNA- HIF-1α (20 nM) και πλασμίδια αναφοράς κύτταρα HepG2, Saos2 και HEp2 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

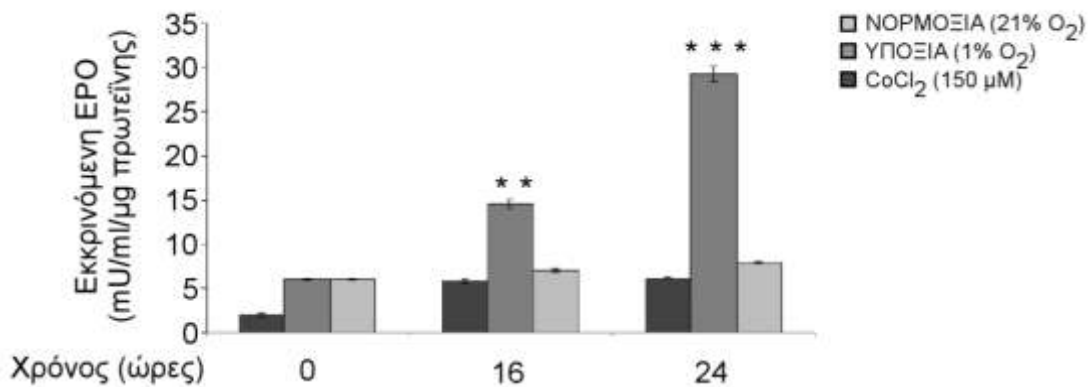
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας και του CoCl₂ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και του HIF-1 στις τρεις κυτταρικές σειρές. Στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2, η μεταγραφική ενεργότητα των HIF-2 και HIF-1 αυξήθηκε σε συνθήκες υποξίας, ενώ παρουσία CoCl₂ αυξήθηκε μόνο η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (Εικόνα 46). Επομένως, το CoCl₂ δεν επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, αλλά μόνο την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα HepG2, όπως παρατηρήθηκε και στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα Huh7.



Εικόνα 46: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην μεταγραφή από τον υποκινητή του SOD2 και τον υποκινητή του PGK σε κύτταρα HepG2. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του SOD2 και τον υποκινητή του PGK σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα HepG2 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή παρουσία CoCl₂ για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο

όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** $P < 0,005$, * $P < 0,01$).

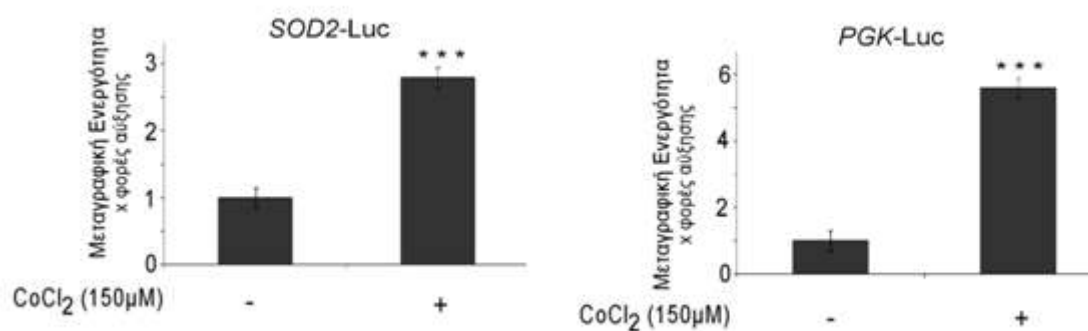
Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με μέτρηση της εκκρινόμενης EPO σε κύτταρα HepG2 υπό συνθήκες υποξίας ή παρουσία CoCl_2 . Ενώ σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO αυξήθηκαν στις 16 ώρες κατά 3 περίπου φορές και στις 24 ώρες κατά 6 περίπου φορές, το CoCl_2 δεν προκάλεσε καμία αύξηση στα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO (Εικόνα 47).



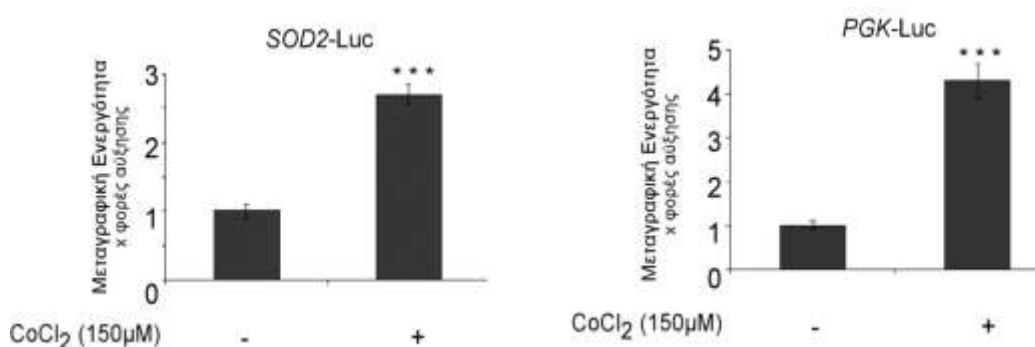
Εικόνα 47: Επίδραση της υποξίας και του χλωριούχο κοβαλτίου στην έκκριση της EPO από κύτταρα HepG2. Μέτρηση της εκκρινόμενης EPO με RIA από κύτταρα HepG2 έπειτα από επώση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) ή CoCl_2 για 16 και 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** $P < 0,005$, * $P < 0,01$).

Στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, Saos2 και HEp2, παρατηρήθηκε ότι παρουσία CoCl_2 η μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* αυξήθηκε κατά 2,5 περίπου φορές και η μεταγραφή από τον υποκινητή του *PGK* αυξήθηκε κατά 4 φορές περίπου και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 48).

Saos2



HEp2



Εικόνα 48: Επίδραση του χλωριούχο κοβαλτίου στην μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε κύτταρα Saos2 και HEp2. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* και τον υποκινητή του *PGK* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Saos2 και HEp2 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή παρουσία CoCl_2 (150 μM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) $P < 0,005$.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το CoCl_2 , σε αντίθεση με την υποξία, δεν επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, ενώ επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στις άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, Saos2 και HEp2, τόσο το CoCl_2 όσο και η υποξία επάγουν την μεταγραφική ενεργότητα και των δύο HIF.

Πίνακας 1 : Συγκεκριρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων με υποξία ή κοβάλτιο στις διάφορες κυτταρικές σειρές.

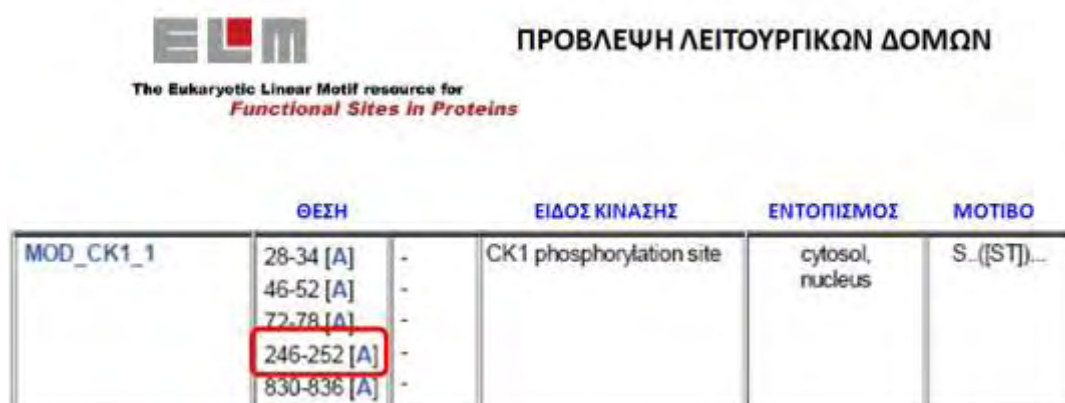
Τύπος κυττάρων	ΥΠΟΞΙΑ	ΚΟΒΑΛΤΙΟ	
ΗΠΑΤΙΚΑ (Huh7, Hep G2)	Επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α	Ναι	Ναι
	Επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α	Ναι	Ναι
	Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α απαιτεί ROS	Ναι	Ναι
	Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α απαιτεί την PI3K	Ναι	Ναι
	Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α απαιτεί τις ERK1/2	Ναι	Ναι
	Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α	Ναι	Ναι
ΜΗ ΗΠΑΤΙΚΑ (Saos2, HEp2)	Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α	Ναι	Όχι
	Επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α	Ναι	Ναι
	Επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α	Ναι	Ναι
	Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α	Ναι	Ναι
	Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α	Ναι	Ναι

3.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α

Η μεταμεταφραστική ρύθμιση του HIF-2α δεν έχει επαρκώς μελετηθεί. Αποδίδουν στον HIF-2α μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όμοιες με αυτές του HIF-1α λόγω της μεγάλης τους ομολογίας. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζεΐνης 1 και τις κινάση ERK1/2, κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν τον HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008, Kalousi, A et al., 2010)

3.3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1 (CK1).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την κινάση καζεΐνης 1 (Casein Kinase 1, CK1) στη σερίνη 247 της αλληλουχίας ²⁴⁴SRHS²⁴⁷ με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική του ενεργότητα λόγω του μη διμερισμού του με τον ARNT (Kalousi, A et al., 2010). Ο HIF-2α παρουσιάζει απόλυτη ομολογία σε εκείνη την περιοχή ²⁴⁶SRHS²⁴⁹, η οποία αποτελεί επίσης πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από την CK1 (Εικόνα 49). Για αυτό μελετήθηκε εάν ο HIF-2α ρυθμίζεται παρόμοια ή διαφορετικά από την CK1.



The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins

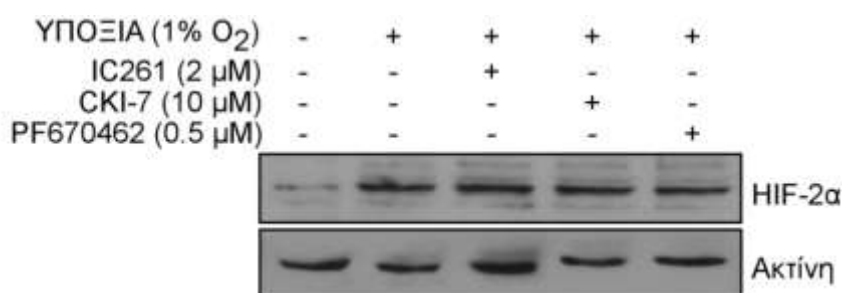
	ΘΕΣΗ		ΕΙΔΟΣ ΚΙΝΑΣΗΣ	ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ	ΜΟΤΙΒΟ
MOD_CK1_1	28-34 [A]	-	CK1 phosphorylation site	cytosol, nucleus	S..([ST])...
	46-52 [A]	-			
	72-78 [A]	-			
	246-252 [A]	-			
	830-836 [A]	-			

Εικόνα 49: Πρόβλεψη αμινοξικών δομών στην αλληλουχία του HIF-2α που πιθανό φωσφορυλιώνονται από την CK1 σε ένα μοτίβο S (ST) αμινοξέων (www.elm.eu.org)

3.3.1.1. Επίδραση της αναστολής της κινάσης της καζεΐνης 1 (CK1) στην έκφραση και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.

Η αναστολή της CK1 πραγματοποιήθηκε με ειδικούς αναστολείς όπως IC261, ο CKI-7 και ο PF-670462. Ο IC261 είναι ειδικός αναστολέας για τις ε και δ ισομορφές της CK1 με $IC_{50}=2\ \mu\text{M}$ (IC_{50} : η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή της δράσης ενός ενζύμου), ο CKI-7 είναι γενικός αναστολέας όλων των ισομορφών της CK1 με $IC_{50}=10\ \mu\text{M}$, ενώ ο PF-670462 είναι ισχυρός και ειδικός αναστολέας για τις ε και δ ισομορφές της CK1 με $IC_{50}=7,7$ και $14\ \text{nM}$ αντίστοιχα.

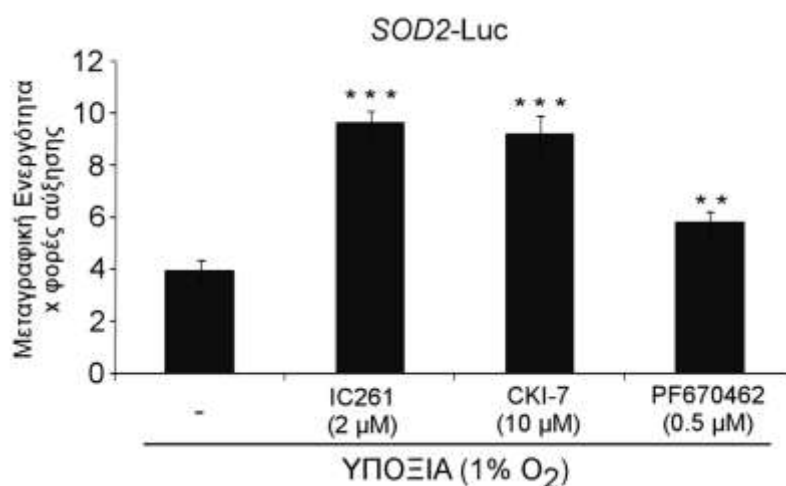
Προκειμένου να ελεγχθεί εάν η CK1 επηρεάζει την έκφραση του HIF-2α, έγινε επώαση των κυττάρων Huh7 με τους αναστολείς της CK1, IC261 και CKI-7 και PF-670462 σε υποξία, ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση. Οι αναστολείς της CK1 IC261, CKI-7 και PF-670462 δεν προκάλεσαν καμία μεταβολή στην έκφραση του HIF-2α κάτω από υποξικές συνθήκες (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Επίδραση των αναστολέων της CK1 στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων IC261 (2 μM) και CKI-7 (10 μM) για 16 ώρες ή 6 ώρες για τον PF-670462 (0.5 μM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν η αναστολή της CK1 επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 η οποία εκτιμήθηκε μετρώντας την μεταγραφή από τον υποκινητή της *SOD2*. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh7 επιμολυσμένα με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc και pCI-Renilla, επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων IC261 (2 μM) και CKI-7 (10 μM) για 16 ώρες ή 6 ώρες για τον PF-670462 (0,5 μM) και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης. Η παρουσία των

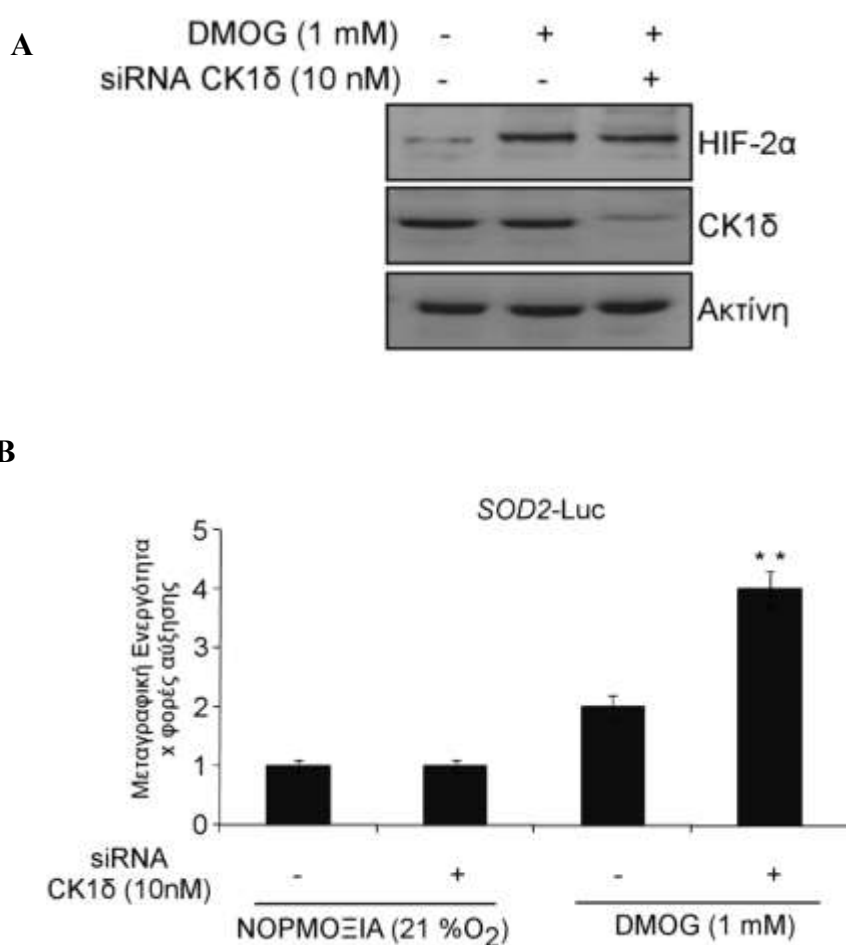
αναστολέων της CK1 κατά την υποξία αύξησε στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* σε σύγκριση με την επώαση σε υποξία απουσία των αναστολέων (Εικόνα 51). Επομένως, η αναστολή της CK1 προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 χωρίς να επηρεάσει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 51: Επίδραση των αναστολέων της CK1 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων IC261 (2 μM) και CKI-7 (10 μM) για 16 ώρες ή 6 ώρες για τον PF-670462 (0,5 μM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005, ** P<0,01).

Για να επιβεβαιωθεί ότι η κινάση που ευθύνεται για την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 είναι όντως η CK1 έγινε αποσιώπηση της έκφρασης της με τη χρήση siRNA. Αρχικά, για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ, κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με siRNA που στοχεύει ειδικά τη δ ισομορφή της CK1 ή με μάρτυρα siRNA (το οποίο δεν αναστέλλει την έκφραση κάποιου γονιδίου), επώαστηκαν παρουσία DMOG και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση της CK1δ. Παρουσία του siRNA-CK1δ, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της CK1δ μειώθηκαν σημαντικά ενώ τα επίπεδα του HIF-2α και η ακτίνη παρέμειναν σταθερά (Εικόνα 52A).

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων Huh7 με siRNA-CK1δ (ή με αρνητικό δείγμα siRNA) και με πλασμίδια αναφοράς. Μετά από επώαση σε νορμοξία ή παρουσία DMOG για 16 ώρες, μετρήθηκε η μεταγραφή του υποκινητή της *SOD2*. Η αποσιώπηση της έκφρασης της CK1δ παρουσία DMOG προκάλεσε αύξηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* κατά περίπου δύο φορές (Εικόνα 52B). Λαμβάνοντας υπόψη και τις δύο πειραματικές προσεγγίσεις, συμπεραίνουμε ότι η αναστολή της δράσης της CK1 αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε συνθήκες υποξικού στρες.

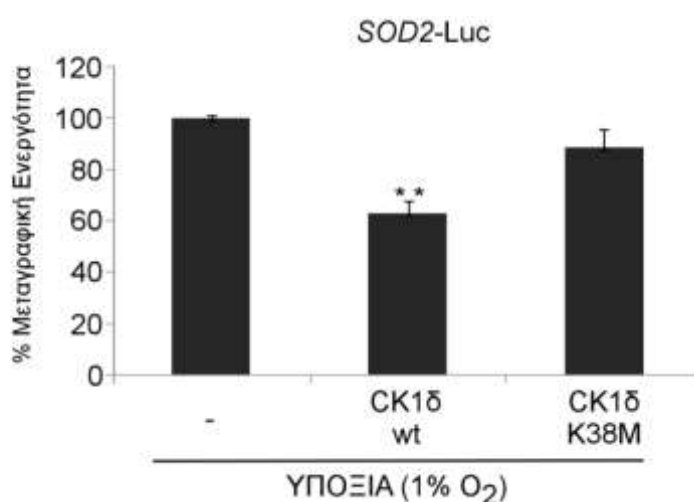


Εικόνα 52: Επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της CK1δ με siRNA στην έκφραση και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, την CK1δ και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος επιμολυσμένων με siRNA-CK1δ (10 nM) κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν παρουσία DMOG (1mM) για 4 ώρες. Β. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* σε επιμολυσμένα με siRNA-CK1δ (10 nM) και πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από

επώαση σε νορμοξία ή παρουσία DMOG (1mM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01)

3.3.1.2. Επίδραση της υπερέκφρασης της CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης της CK1 στην ενεργότητα του HIF-2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης της CK1δ: ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την αγρίου τύπου μορφή της CK1δ, η οποία είναι ιδιοσυστατικά ενεργή και ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί για τη CK1δ η οποία φέρει τη μετάλλαξη K38M στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης που την καθιστά ανενεργή (και οι δύο κλώνοι αποκτήθηκαν από τον Dr. Uwe Knippschild, Πανεπιστήμιο Ulm, Γερμανία). Η υπερέκφραση της ενεργής κινάσης CK1δ μείωσε τη μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* κατά περίπου 40%. Αντίθετα, η υπερέκφραση της ανενεργής μορφής της κινάσης δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση (10%) της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2*. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι η καταλυτική δράση της κινάσης CK1δ προκαλεί αναστολή στη δράση του HIF-2 (Εικόνα 53).

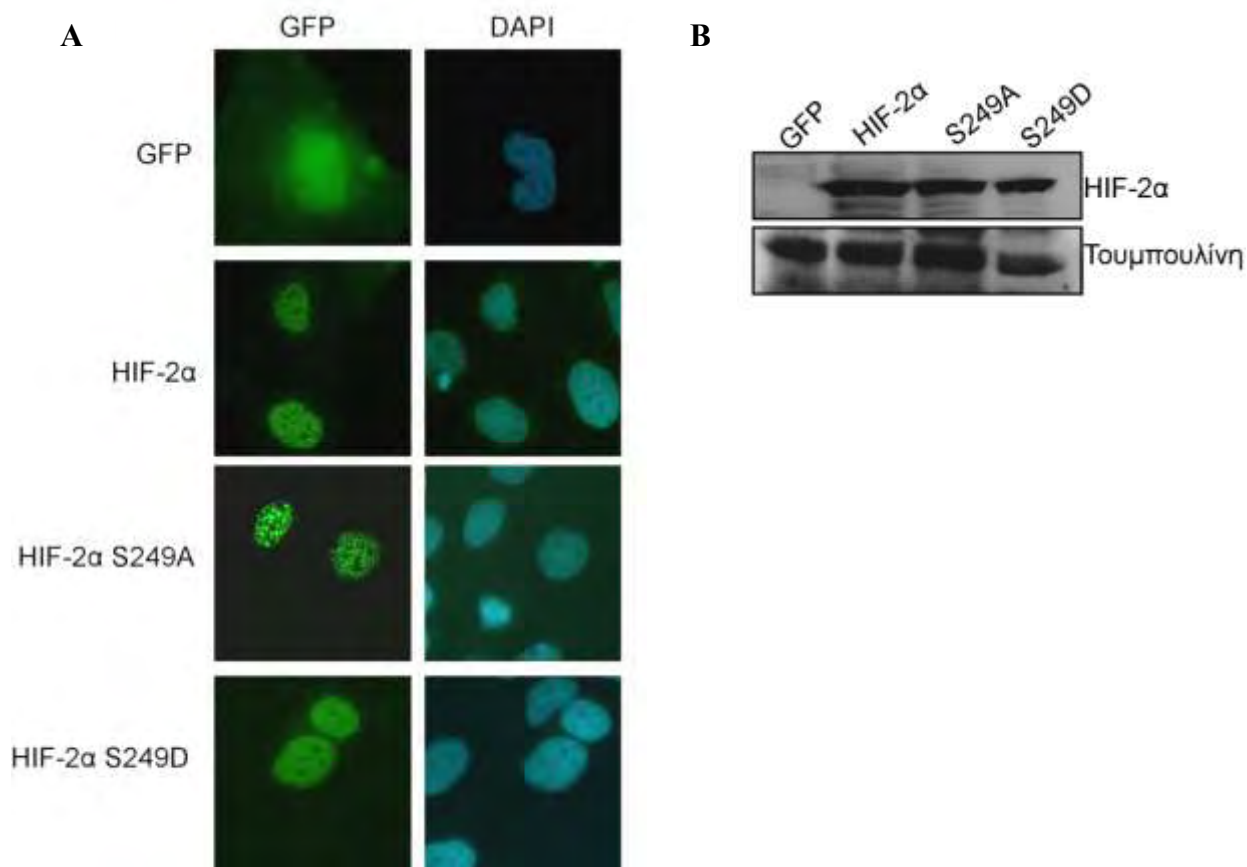


Εικόνα 53: Επίδραση της υπερέκφρασης της CK1δ στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια που κωδικοποιούν την ενεργό και ανενεργό μορφή της κινάσης CK1δ και πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε

υποξία (1% O₂) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01)

3.3.1.3. Επίδραση των μεταλλάξεων S249A και S249D στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.

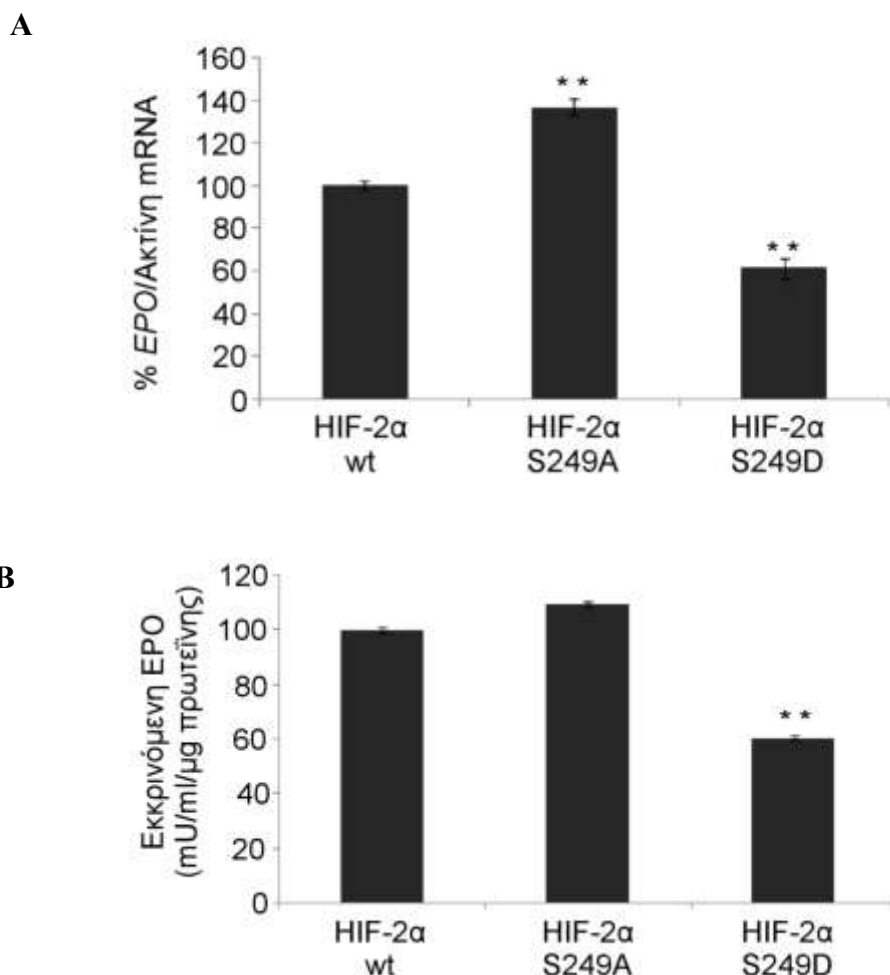
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Ser²⁴⁷ του HIF-1α είναι αυτή που φωσφορυλιώνεται από την CK1δ (Kaloussi, 2010). Ο HIF-1α και ο HIF-2α παρουσιάζουν 77% ομολογία στην PAS-B περιοχή τους και επιπλέον η ίδια αλληλουχία που αναγνωρίζει η CK1 στον HIF-1α υπάρχει και στον HIF-2α (²⁴⁶SRHS²⁴⁹). Επομένως, υπάρχει η πιθανότητα να φωσφορυλιώνεται και ο HIF-2α από τη CK1 σε αυτή την αλληλουχία. Για να ελεγχθεί εάν η Ser²⁴⁹ του HIF-2α είναι η υποψήφια σερίνη για φωσφορυλίωση έγινε μετατροπή της σε αλανίνη (S249A), ένα αμινοξύ το οποίο δεν φωσφορυλιώνεται. Επίσης έγινε μετατροπή της ίδιας σερίνης του HIF-2α σε ασπαρτικό οξύ (S249D). Η καρβοξυλική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού είναι δυνατό να «μιμηθεί» το αρνητικό φορτίο της φωσφορικής ομάδας που προστίθεται στη σερίνη κατά τη φωσφορυλίωση και για αυτό η μετάλλαξη S249D ορίζεται ως φωσφομιμητική μετάλλαξη. Η μετάλλαξη έγινε με τη μέθοδο στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης (site-directed mutagenesis) όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Υλικά και Μέθοδοι). Η μεταλλαγμένες μορφές HIF-2α-S249A και HIF-2α-S249D κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 και χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση κυττάρων Huh7. Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού σε κύτταρα Huh7, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός, ο οποίος είναι πυρηνικός, των μεταλλαγμένων μορφών HIF-2α-S249A και HIF-2α-S249D δεν διαφέρουν από το μη μεταλλαγμένο «άγριου τύπου» HIF-2α (Εικόνα 54A,B).



Εικόνα 54: Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού των **HIF-2α-S249A** και **HIF-2α-S249D**. Α. Κύτταρα Huh7 που επιμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των GFP, GFP-HIF-2α, GFP-HIF-2α-S249A και GFP-HIF-2α-S249D και εν συνεχεία μονιμοποιήθηκαν για μικροσκοπία φθορισμού ή Β. τα ολικά εκχυλίσματά τους αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στην GFP και την τουμπουλίνη.

Κατόπιν, μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στην μεταγραφή της *EPO* καθώς και στην έκκριση της πρωτεΐνης από κύτταρα Huh7. Συγκεκριμένα, κύτταρα επιμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των GFP, GFP-HIF-2α, GFP-HIF-2α-S249A και GFP-HIF-2α-S249D και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA *EPO* και τα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO. Παρατηρήθηκε ότι όταν η σερίνη 249 μεταλλάχθηκε σε αλανίνη, τα επίπεδα mRNA του *EPO* αυξήθηκαν κατά περίπου 30% σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-2α, ενώ η φωσφομιμητική μετάλλαξη του HIF-2α προκάλεσε μείωση κατά 40% περίπου (Εικόνα 55Α). Επίσης, παρατηρήθηκε

μία χαρακτηριστική μείωση κατά 40% από τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (S249D) του HIF-2α στα επίπεδα της εκκρινόμενης EPO, ενώ η μεταλλαγμένη μορφή S249A του HIF-2α αύξησε κατά 10% τα εκκρινόμενα επίπεδα της EPO σε σχέση με του αγρίου τύπου HIF-2α (Εικόνα 55B).



Εικόνα 55: Επίδραση των μεταλλάξεων S249A και S249D στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Α. Μέτρηση των mRNA επιπέδων της EPO/ακτίνης με RT-PCR, και Β. των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO σε κύτταρα Huh7 έπειτα από διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες GFP-HIF-2α ή τις μεταλλαγμένες μορφές του. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** P<0,01)

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι είναι πολύ πιθανόν ο HIF-2α να φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 249 από την CK1 η απόδειξη του οποίου χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

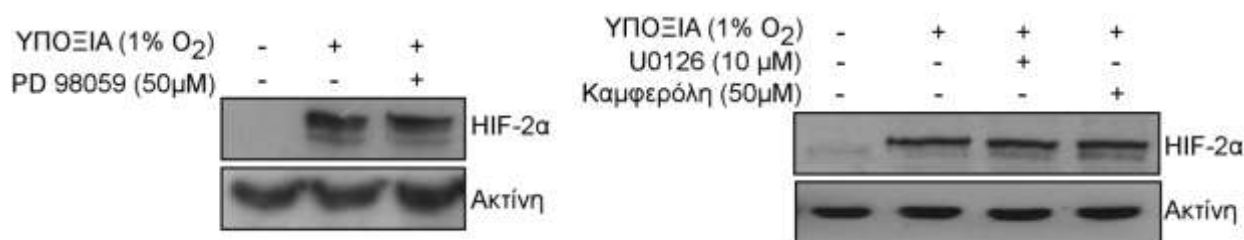
3.3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2

Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK (ERK1/2) στις σερίνες 641 και 643 (Mylonis, I et al., 2006). Επιπλέον βρέθηκε ότι ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής είναι να «καλύπτει» ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES), αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (Mylonis, I et al., 2008). Έτσι ο φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 HIF-1α παραμένει στον πυρήνα και μπορεί να προσδεθεί με τον ARNT για να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του.

Για να διαπιστωθεί εάν και ο HIF-2α ρυθμίζεται από το μονοπάτι των MAPK, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής των ERK1/2 στην επαγωγή του HIF-2α. Για την αναστολή των ERK1/2 χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί αναστολείς, ο PD98059 ειδικός αναστολέας της MEK1 (IC₅₀: 4 μM) και της MEK2 (IC₅₀: 50 μM), ο U0126 ειδικός αναστολέας της MEK1 (IC₅₀: 7 nM) και της MEK2 (IC₅₀: 58 nM) με πιο ισχυρή δράση από το PD98059, και η καμφερόλη η οποία είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές με ποικίλες δράσεις αλλά και ισχυρός αναστολέας του μονοπατιού των ERK1/2 με IC₅₀= 4,75 μM (Mylonis, I et al., 2010) .

3.3.2.1. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

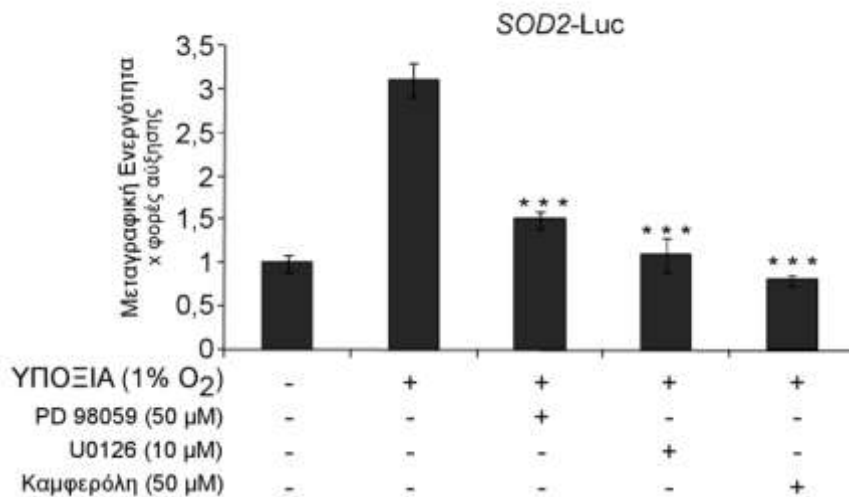
Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής των ERK1/2 στην έκφραση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7. Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας η παρουσία των αναστολέων PD98059 ή U0126 ή της καμφερόλης δεν μεταβάλλει τα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α (Εικόνα 56).



Εικόνα 56: Επίδραση των αναστολέων του μονοπατιού των ERK1/2 στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων PD98059 (50 μM), U0126 (10 μM) και καμφερόλη (50 μM) για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

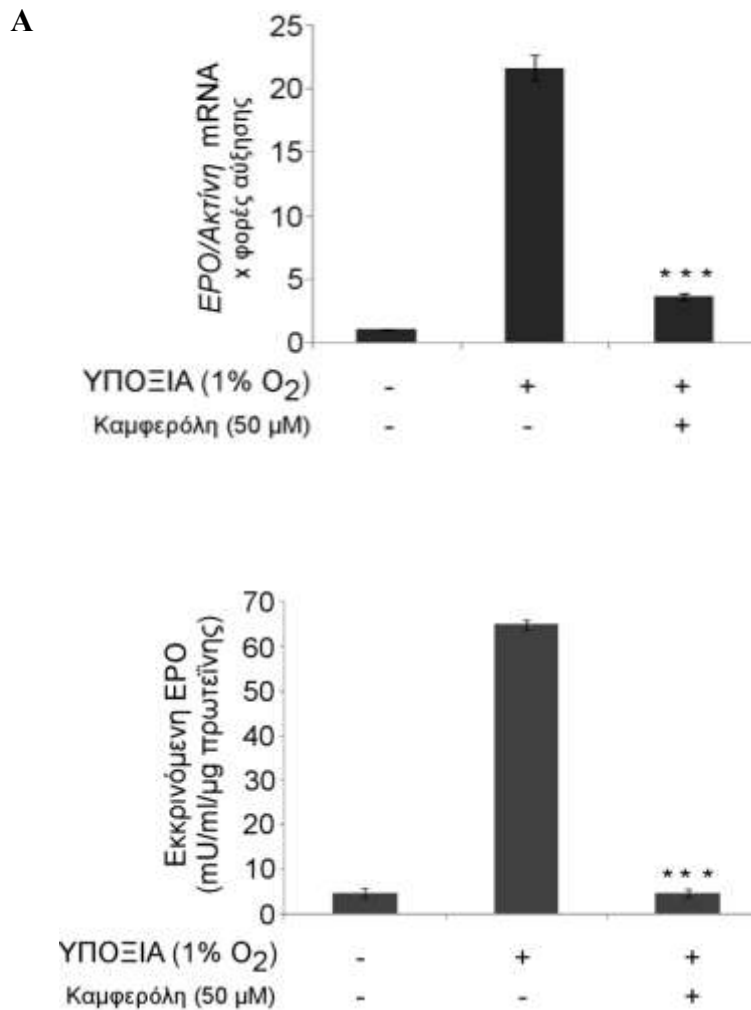
3.3.2.2. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7.

Για να διαπιστωθεί εάν η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, μετρήθηκε η μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* σε κύτταρα Huh7. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh7 επιμολυσμένα με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc και pCI-Renilla, επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων PD98059, U0126 ή της καμφερόλης για 8 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης. Η παρουσία των αναστολέων των ERK1/2 κατά την υποξία μείωσε στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφή από τον υποκινητή της *SOD2* συγκριτικά με την επώαση των κυττάρων σε υποξία απουσία των αναστολέων (Εικόνα 57). Επομένως, η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 προκάλεσε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 χωρίς να επηρεάσει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 57: Επίδραση των αναστολέων του μονοπατιού των ERK1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων PD98059 (50 μM), U0126 (10 μM) και καμφερόλης (50 μM) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Για την επαλήθευση του παραπάνω αποτελέσματος, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 από την καμφερόλη στα επίπεδα mRNA της *EPO* καθώς και στην έκκριση της EPO από κύτταρα Huh7 σε συνθήκες υποξίας. Η επαγωγή του HIF-2α έγινε για 8 ώρες σε υποξία παρουσία ή απουσία της καμφερόλης. Παρατηρήθηκε ότι η καμφερόλη προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA της *EPO* και στην εκκρινόμενη EPO (Εικόνα 58A, B). Επομένως, η καμφερόλη ανέστειλε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7.

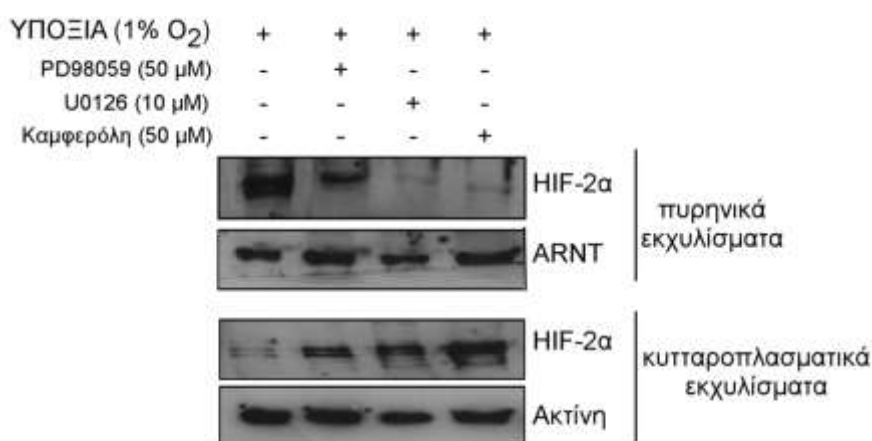


Εικόνα 58: Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Α. Μέτρηση των mRNA επιπέδων της *EPO/ακτίνης* με RT-PCR, και Β. των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO σε κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της καμφερόλης (50 μM) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Από τις τρεις παραπάνω πειραματικές προσεγγίσεις είναι φανερό ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 προκαλεί αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2

3.3.2.3. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 σε κύτταρα Huh7.

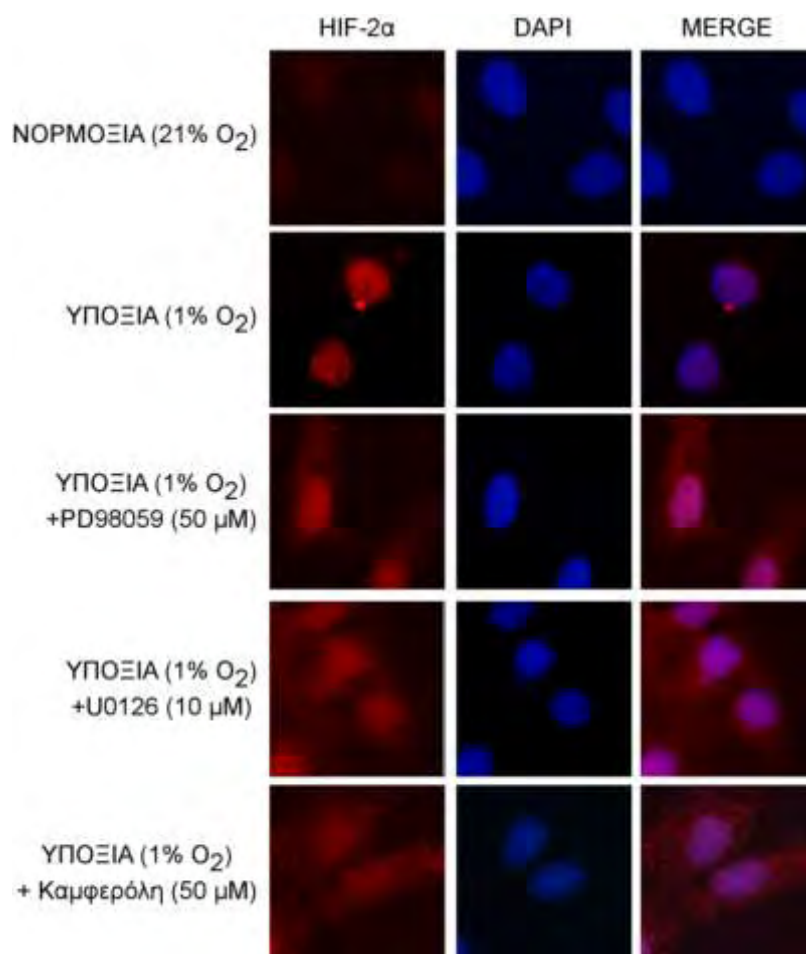
Ο μεταγραφικά ενεργός HIF-2 εντοπίζεται στον πυρήνα. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή του HIF-2α, απομονώθηκαν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από κύτταρα Huh7 που είχαν επωαστεί σε υποξία απουσία ή παρουσία των αναστολέων PD98059, U0126 ή καμφερόλης για 6 ώρες και έγινε ανίχνευση του HIF-2α με ανοσοαποτύπωση. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α ανιχνεύτηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα, ενώ η προσθήκη του αναστολέα PD98059 προκάλεσε μείωση της έκφρασης του HIF-2α στα πυρηνικά εκχυλίσματα και αύξηση στα κυτταροπλασματικά. Ακόμη πιο μεγάλη μείωση της έκφρασης του HIF-2α στα πυρηνικά εκχυλίσματα παρατηρήθηκε παρουσία των αναστολέων U0126 ή της καμφερόλης, με ανάλογη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-2α στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα των Huh7 κυττάρων (Εικόνα 59).



Εικόνα 59: Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, την ακτίνη και τον ARNT πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων PD98059 (50 μM), U0126 (10 μM) και καμφερόλης (50 μM) για 6 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με μονιμοποίηση των κυττάρων σε καλυπτρίδες και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του HIF-2α. Παρατηρήθηκε ότι ο

HIF-2α σε συνθήκες υποξίας βρίσκεται αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού των ERK1/2 ο HIF-2α εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 60).

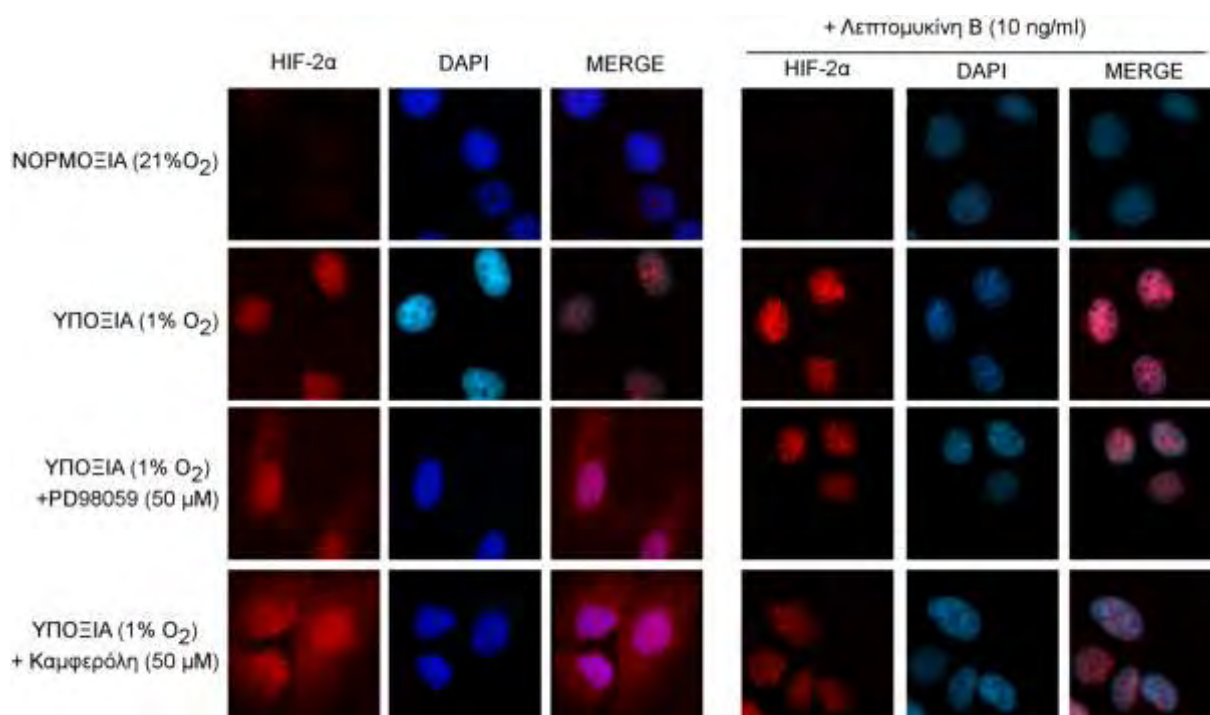


Εικόνα 60: Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Ανοσοφθορισμός με αντισώμα έναντι στον HIF-2α κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων PD 98059 (50μM), U0126 (10 μM) και καμφερόλη (50 μM) για 6 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πειράματα, συμπεραίνουμε ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 σε συνθήκες υποξίας προκαλεί μείωση του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-2α, χωρίς να μεταβάλλονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, με αποτέλεσμα ο HIF-2 να είναι μεταγραφικά ανενεργός.

Ο πυρηνικός αποκλεισμός του HIF-2α από την αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 μπορεί να οφείλεται είτε σε μείωση του ρυθμού εισόδου είτε σε αύξηση του

ρυθμού εξόδου του HIF-2α από τον πυρήνα των κυττάρων. Προκειμένου να διευκρινιστεί αυτό χρησιμοποιήθηκε η Λεπτομυκίνη Β (LMB), η οποία είναι ειδικός αναστολέας της CRM1/εξπορτίνης 1, δηλαδή αναστέλλει την έξοδο των πρωτεϊνών από τον πυρήνα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα Huh7 επώαστηκαν στην υποξία παρουσία των αναστολέων PD98058 ή της καμφερόλης απουσία ή παρουσία της LMB και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και ο HIF-2α ανιχνεύθηκε με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Παρατηρήθηκε ότι η LMB ταυτόχρονα με τους αναστολείς του μονοπατιού των ERK1/2 μεταβάλλει την κατανομή του HIF-2α και προκαλεί την επανασυγκέντρωση του HIF-2α στον πυρήνα (Εικόνα 61). Επομένως, οι ERK1/2 συμβάλλει στην διατήρηση του HIF-2α στον πυρήνα μειώνοντας τον ρυθμό εξόδου του από τον πυρήνα.

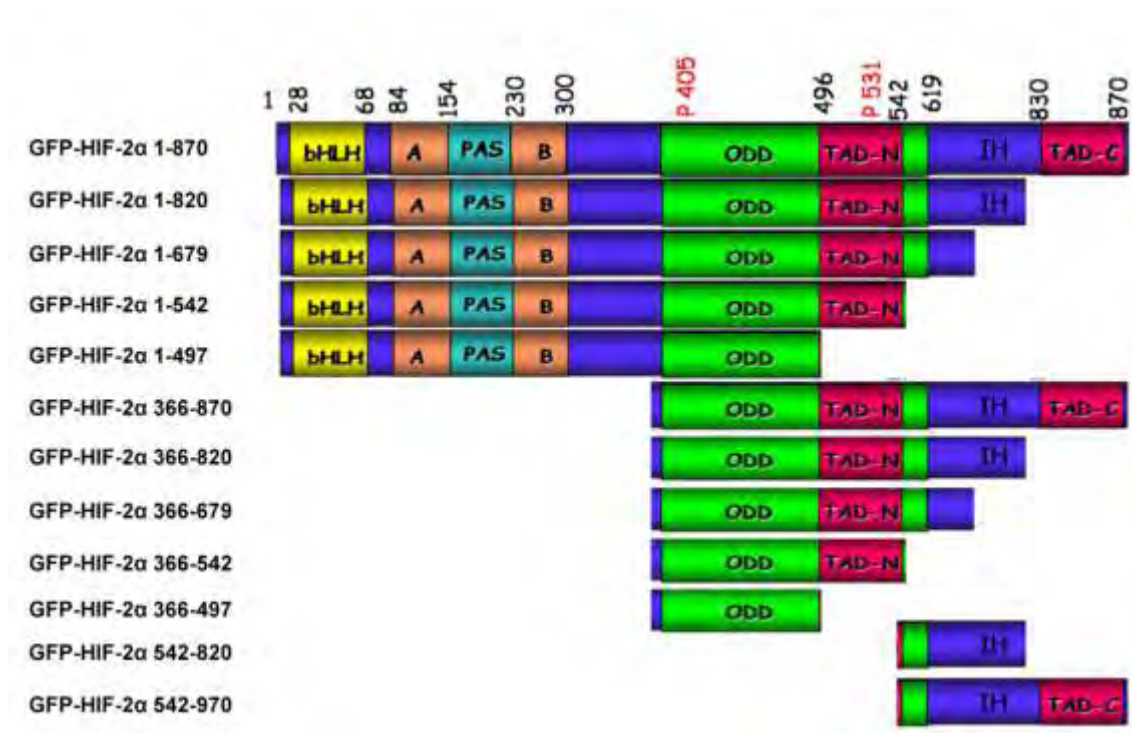


Εικόνα 61: Επίδραση της αναστολής πυρηνικής εξόδου πρωτεϊνών και της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι στον HIF-2α κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν υποξία (1% O₂) παρουσία των αναστολέων PD98059 (50 μM) και καμφερόλης (50 μM) απουσία ή παρουσία Λεπτομυκίνης Β για 6 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.3.2.4. Επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό τμημάτων του HIF-2α σε κύτταρα Huh7.

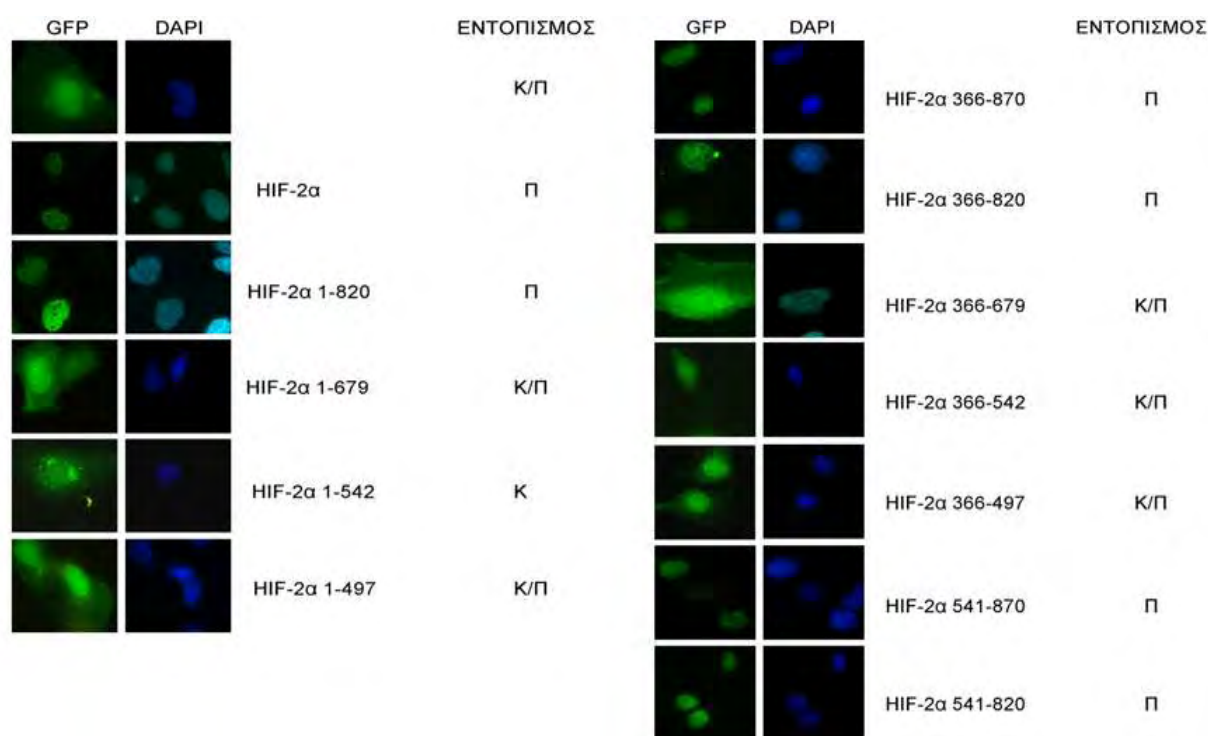
Η μεταφορά μίας πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα προϋποθέτει μία ή περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη οι οποίες ονομάζονται σήματα πυρηνικής εξόδου (nuclear export signals, NES). Τα NES αναγνωρίζονται από την CRM1/εξπορτίνη 1. Επομένως ο HIF-2α για να εξέλθει από τον πυρήνα θα πρέπει να έχει ένα ή περισσότερα NES, τα οποία ωστόσο δεν είναι ακόμη χαρακτηρισμένα.

Για να διερευνηθεί η περιοχή του HIF-2α που πιθανόν περιέχει κάποιο σήμα πυρηνικής εξόδου το οποίο επηρεάζεται από τη δράση των ERK1/2, κατασκευάστηκαν τα ακόλουθα πρωτεϊνικά τμήματα του HIF-2α και μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 με ταυτόχρονη αναστολή της εξόδου από τον πυρήνα. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν τα τμήματα του HIF-2α: 1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 366-870, 366-820, 366-679, 366-542, 366-497, 542-870 και 542-820 (σύμφωνα με την αρίθμηση της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2α) (Εικόνα 62).



Εικόνα 62: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του HIF-2α που κατασκευάστηκαν σαν πρωτεΐνες σύντηξης με GFP. Στην πρώτη σειρά, απεικονίζεται ο πλήρους μήκους HIF-2α με σημασμένες τις διάφορες δομικές περιοχές του. Ακολουθεί, η απεικόνιση των τμημάτων: 1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 366-870, 366-820, 366-679, 366-542, 366-497, 542-870 και 542-820 (αρίθμηση σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία).

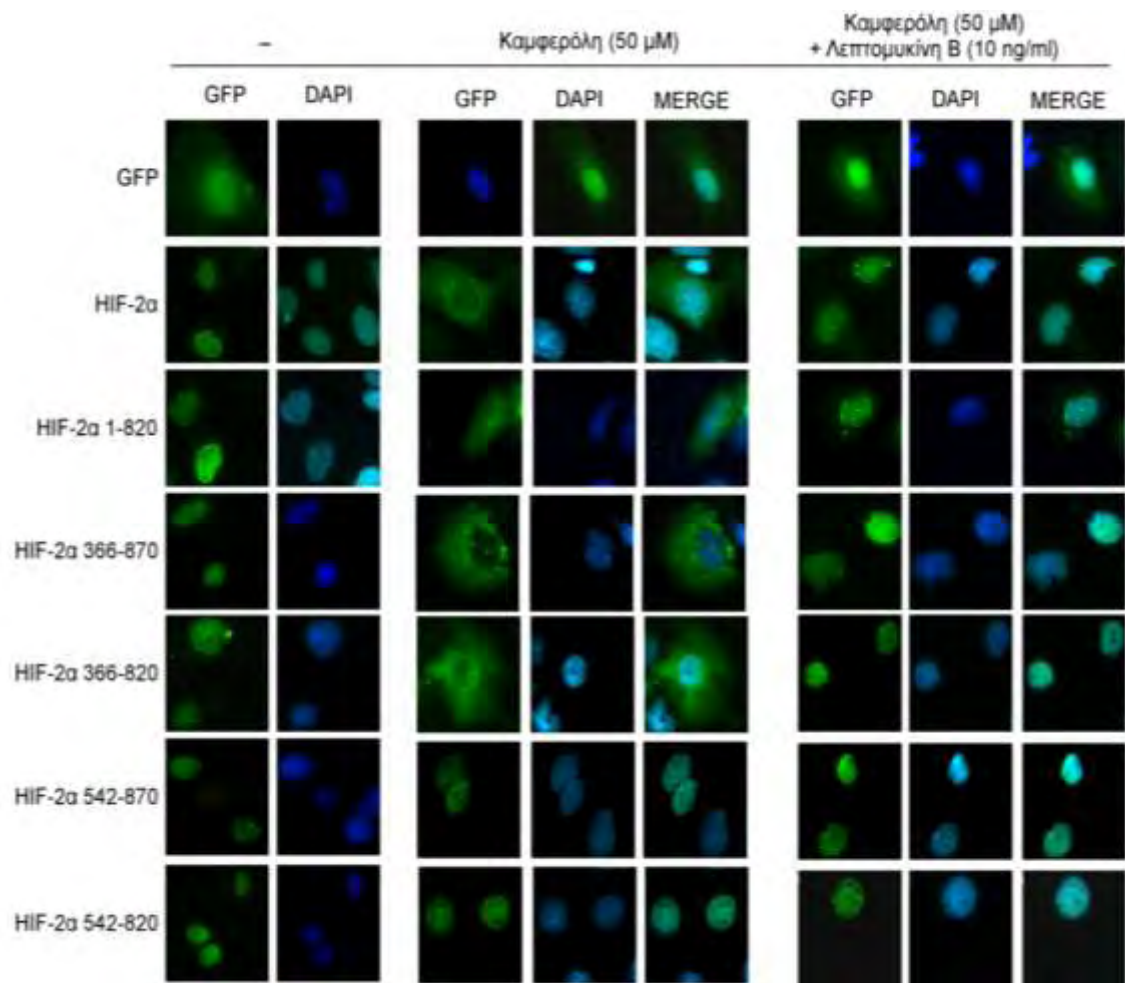
Αρχικά, ενισχύθηκαν με PCR οι αλληλουχίες cDNA που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά τμήματα του HIF-2α. Στη συνέχεια, αυτές κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1, ο οποίος χρησιμοποιείται για την έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους με μικροσκοπία φθορισμού. Στη συνέχεια, ακολούθησε διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με τις κατασκευές GFP-HIF-2α πλήρους μεγέθους καθώς και με τα GFP-HIF-2α επιμέρους τμήματα, μονιμοποίηση των κυττάρων σε καλυπτρίδες και έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των κατασκευών με μικροσκοπία φθορισμού. Παρατηρήθηκε ότι ο πλήρους μεγέθους HIF-2α εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα όπως και το μεγάλο πρωτεϊνικό τμήμα του 1-820. Επίσης αποκλειστικά στον πυρήνα εντοπίζονται και μικρότερα τμήματα του HIF-2α όπως: 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820. Τα υπόλοιπα τμήματα του HIF-2α εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα απ' ότι στον πυρήνα (Εικόνα 63).



Εικόνα 63: Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του πλήρους μεγέθους HIF-2α και των τμημάτων του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Μικροσκοπία φθορισμού κυττάρων Huh7 που επιμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των GFP και GFP-HIF-2α τμημάτων: 1-870 (HIF-2α), 1-820, 1-679, 1-542, 1-497, 366-870, 366-820, 366-679, 366-542, 366-497, 542-870 και 542-820. Κ: κυτταροπλασματικός, Π: πυρηνικός εντοπισμός.

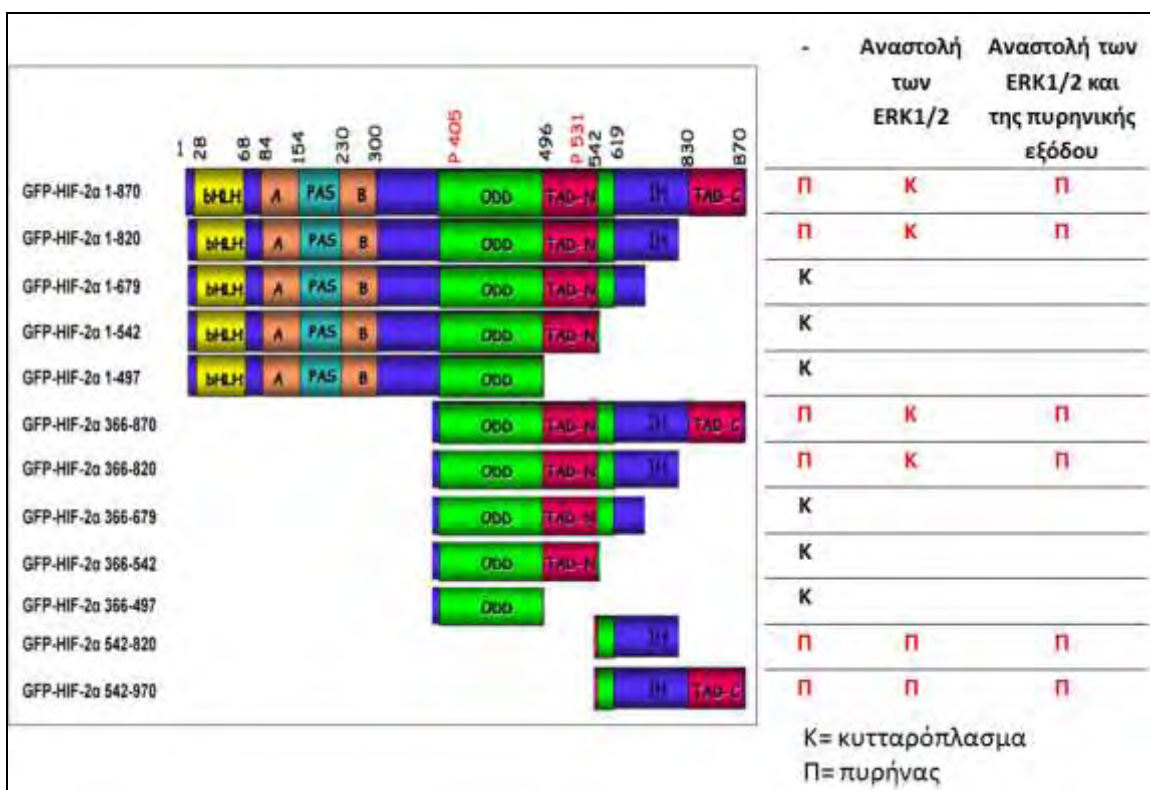
Τα τμήματα του HIF-2α 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820 εντοπίζονται στον πυρήνα όπως και ο πλήρους μεγέθους HIF-2α διότι αυτά περιέχουν το χαρακτηρισμένο σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) στην αλληλουχία ⁷⁰⁵KLKLR(27 aa)KRMKN στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α (Luo, JC and Shibuya, M 2001).

Στη συνέχεια για να διαπιστωθεί ποια περιοχή του HIF-2α περιέχει πιθανόν κάποιο σήμα πυρηνικής εξόδου, το οποίο επηρεάζεται και από τη δράση της ERK1/2, τα κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια για την έκφραση των GFP-HIF-2α πλήρους μεγέθους και GFP-HIF-2α τμημάτων: 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820 και ακολούθησε επώαση παρουσία καμφερόλης με ή χωρίς λεπτομυκίνη B ώστε να ανασταλεί η έξοδος από τον πυρήνα. Παρατηρήθηκε ότι, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α, τα τμήματα 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820 εντοπίζονταν στον πυρήνα χωρίς κάποια επίδραση. Η παρουσία καμφερόλης στα κύτταρα προκάλεσε τον εντοπισμό του πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και των τμημάτων 1-820, 366-870 και 366-820 στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα τμήματα του HIF-2α 542-870 και 542-820 δεν επηρεάστηκαν από τη δράση της καμφερόλης με αποτέλεσμα να εξακολουθούν να εντοπίζονται αποκλειστικά στον πυρήνα. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν ταυτόχρονα παρουσία λεπτομυκίνης B και καμφερόλης πλήρους μεγέθους HIF-2α, τα τμήματα 1-820, 366-870, και 366-820 εντοπίστηκαν πάλι στον πυρήνα (Εικόνα 64). Συνεπώς, η περιοχή 366-542 πιθανόν να περιέχει ένα ή περισσότερα NES.



Εικόνα 64: Επίδραση της αναστολής πυρηνικής εξόδου πρωτεϊνών και της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 α και των HIF-2 α τμημάτων σε κύτταρα Huh7. Μικροσκοπία φθορισμού κυττάρων Huh7 που επιμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των GFP και GFP-HIF-2 α τμημάτων: 1-870 (HIF-2 α), 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820 παρουσία της καμφερόλης (50 μ M) απουσία ή παρουσία λεπτομυκίνης B για 6 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

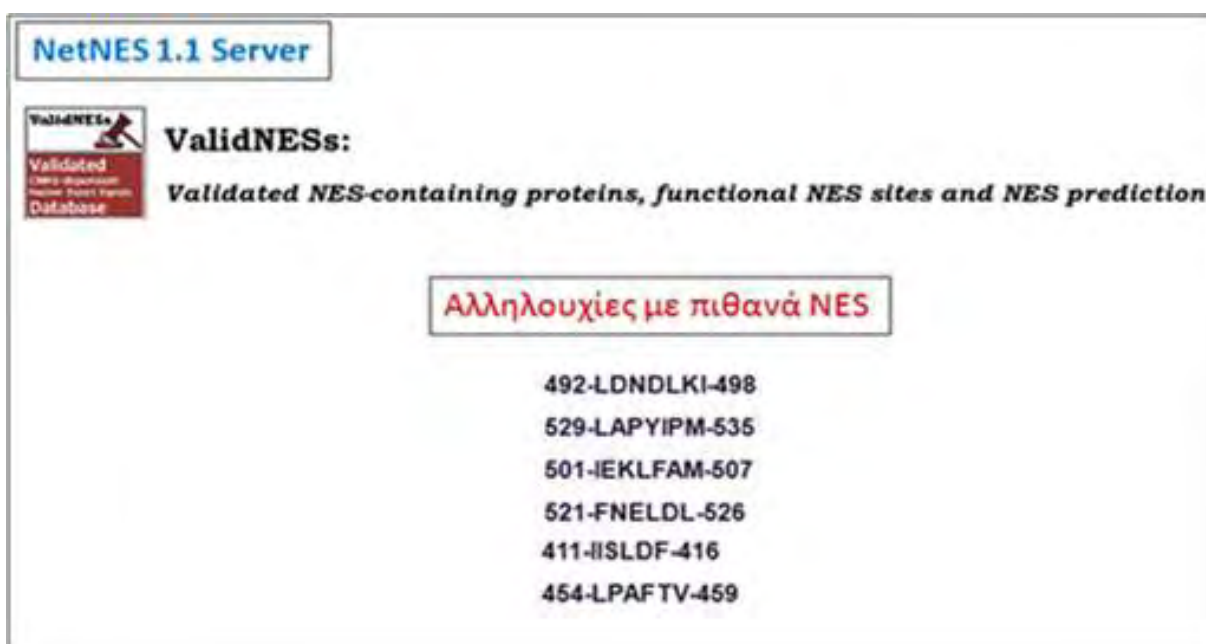
Πίνακας 2 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων μικροσκοπίας φθορισμού με αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 και αναστολή της πυρηνικής εξόδου σε κύτταρα Huh7.



Από τις πειραματικές προσεγγίσεις της μελέτης της ρύθμισης του HIF-2α από τις ERK1/2 συμπεραίνουμε ότι οι ERK1/2 συμβάλλουν στην διατήρηση του HIF-2α στον πυρήνα μειώνοντας τον ρυθμό εξόδου του από τον πυρήνα μέσω άμεσης ή έμμεσης επίδρασης στην περιοχή 366-542 του HIF-2α. Αυτή η περιοχή είναι πολύ πιθανό να περιέχει σήμα πυρηνικής εξόδου, NES το οποίο επηρεάζεται από τη δράση των ERK1/2.

3.3.2.5. Ανάλυση της περιοχής 366-542 με προγράμματα βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη πιθανών NES και πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2.

Για την εύρεση αλληλουχιών με πιθανά NES, αναλύθηκε ο πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και η περιοχή με αμινοξέα 366-542 με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής NETNES, το οποίο προβλέπει πλούσια σε λευκίνη NES (la Cour, T et al., 2004), καθώς και με το πιο πρόσφατο πρόγραμμα NESsential, το οποίο εκτός από τη πρωτοταγή δομή λαμβάνει υπόψη και τις εγγενείς αναδιαμορφώσεις της πρωτεΐνης (Fu, SC et al., 2011) (Εικόνα 65). Επίσης, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α αναλύθηκε με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ELM για την πρόβλεψη αλληλουχιών που αποτελούν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Εικόνα 66).



The image shows a screenshot of the NetNES 1.1 Server interface. At the top left, there is a box labeled "NetNES 1.1 Server". Below it, on the left, is the ValidNESs logo, which includes a red square with a white microscope icon and the text "ValidNESs Validated NES-containing Protein Sites Database". To the right of the logo, the text "ValidNESs:" is displayed in bold, followed by the subtitle "Validated NES-containing proteins, functional NES sites and NES prediction". In the center of the page, there is a red-bordered box containing the text "Αλληλουχίες με πιθανά NES" in red. Below this box, a list of protein sequences is shown: 492-LDNDLKI-498, 529-LAPYIPM-535, 501-IEKLFAM-507, 521-FNELDL-526, 411-IISLDF-416, and 454-LPAFTV-459.

Εικόνα 65: Πρόβλεψη αμινοξικών δομών στην αλληλουχία του 366-542 HIF-2α που είναι πιθανά NES με τα προγράμματα βιοπληροφορικής NetNES και ValidNESs.

	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΘΕΣΗ	ΕΙΔΟΣ ΚΙΝΑΣΗΣ	ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ	ΜΟΤΙΒΟ
MOD_ProDKin_1	LAPTPGD GSTTPSA SCSTPNS TPNSPED FQLSPIC	403-409 [A] 466-472 [A] 478-484 [A] 481-487 [A] 540-546 [A]	Proline-Directed Kinase (e.g. MAPK) phosphorylation site in higher eukaryotes.	cytosol, nucleus	...((ST))P-
	PQSTPQH	556-562 [A]			
	APHSPFL	578-584 [A]			
	QASTPLS	623-629 [A]			
	PPVSPPH	669-675 [A]			
	DVLSPPM	693-699 [A]			
	SASPPGE	787-793 [A]			

Εικόνα 66: Πρόβλεψη αμινοξικών δομών στην αλληλουχία του HIF-2α που είναι πιθανό να φωσφορυλιώνονται από τις ERK κινάσες σε ένα μοτίβο (S,T)P αμινοξέων (www.elm.eu.org). Το κοκκίνο πλαίσιο περιλαμβάνει τις αλληλουχίες που εντοπίζονται στη περιοχή 366-542 του HIF-2α.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των προγραμμάτων βιοπληροφορικής υποδεικνύει ότι η περιοχή 366-542 του HIF-2α περιέχει αλληλουχίες με πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, οι οποίες εντοπίζονται είτε πολύ κοντά είτε αλληλεπικαλύπτονται με αλληλουχίες με πιθανά NES. Εάν, πράγματι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 σε κάποια ή κάποιες από αυτές τις θέσεις θα πρέπει να διερευνηθεί με πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης.

3.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

Η λειτουργία του πρωτεασώματος αποτελεί το κύριο μέσο αποικοδόμησης των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α. Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των α υπομονάδων του HIF, την είσοδό τους στον πυρήνα και την επαγωγή των γονιδίων στόχων του, όπως του VEGF. Η βορτεζομίδη αποτελεί τον πρώτο αναστολέα του πρωτεασώματος με διαπιστωμένη αντικαρκινική δράση σε κλινικό επίπεδο στο πολλαπλό μυέλωμα. Η μελέτη της δράσης της βορτεζομίδης σε άλλες μορφές καρκίνου όπως ο καρκίνος του προστάτη, έδειξε πως η παρουσία της βορτεζομίδης μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης του VEGF. Το παράδοξο αυτό φαινόμενο αποτέλεσε έναυσμα για την μελέτη του μηχανισμού δράσης της βορτεζομίδης στην έκφραση και τη δραστηριότητα του HIF-1α και του HIF-2α.

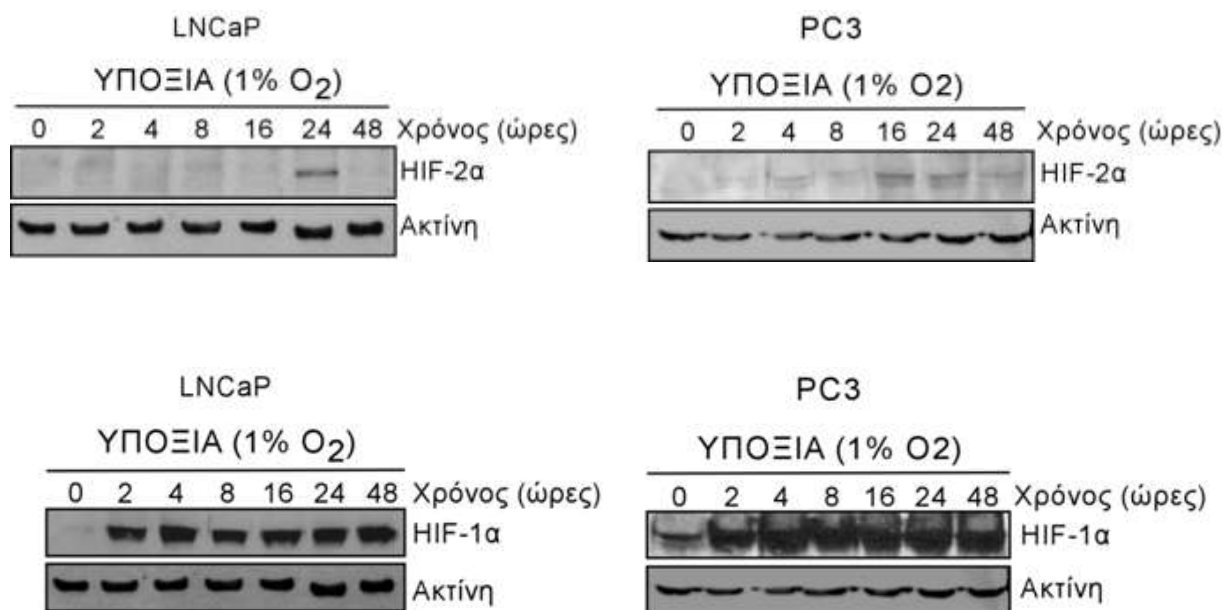
3.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Για την μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στον HIF-1α και HIF-2α στον καρκίνο του προστάτη επιλέχθηκαν δύο κυτταρικές σειρές α) τα κύτταρα LNCaP τα οποία αποτελούν ένα μοντέλο ορμονο-εξαρτώμενου και ήπιας μορφής καρκίνου και β) τα κύτταρα PC3 τα οποία αποτελούν μοντέλο ορμονο-ανεξάρτητου και επιθετικής μορφής καρκίνου του προστάτη.

3.4.1.1. Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας στην έκφραση των HIF-2α και HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.

Για να διαπιστωθεί εάν τα κύτταρα LNCaP και PC3 εκφράζουν τους HIF-2α και HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση της έκφρασης τους. Στα κύτταρα LNCaP ο HIF-2α εκφράστηκε μόνο μετά από 24 ώρες υποξίας σε πολύ χαμηλά επίπεδα και εξαφανίστηκε πάλι στις 48 ώρες. Στα κύτταρα PC3 ο HIF-2α ήταν οριακά ανιχνεύσιμος από τις 4 έως στις 8 ώρες στην υποξία και εκφράστηκε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα στις 16-24 ώρες. Αντίθετα, ο HIF-1α ήταν έντονα επαγμένος από τη 2η ώρα σε συνθήκες υποξίας και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48 ώρες και στις

δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 67). Συγκριτικά, ο HIF-2α και ο HIF-1α παρουσιάζουν διαφορετική κινητική έκφρασης σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη, με τον HIF-2α να εκφράζεται οριακά, γεγονός που πιθανόν να υποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3 και για αυτό η μελέτη επικεντρώθηκε σε αυτόν.



Εικόνα 67: Κινητική ανάλυση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α και του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, στον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για διαφορετικούς χρόνους σε υποξία (1%O₂). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.

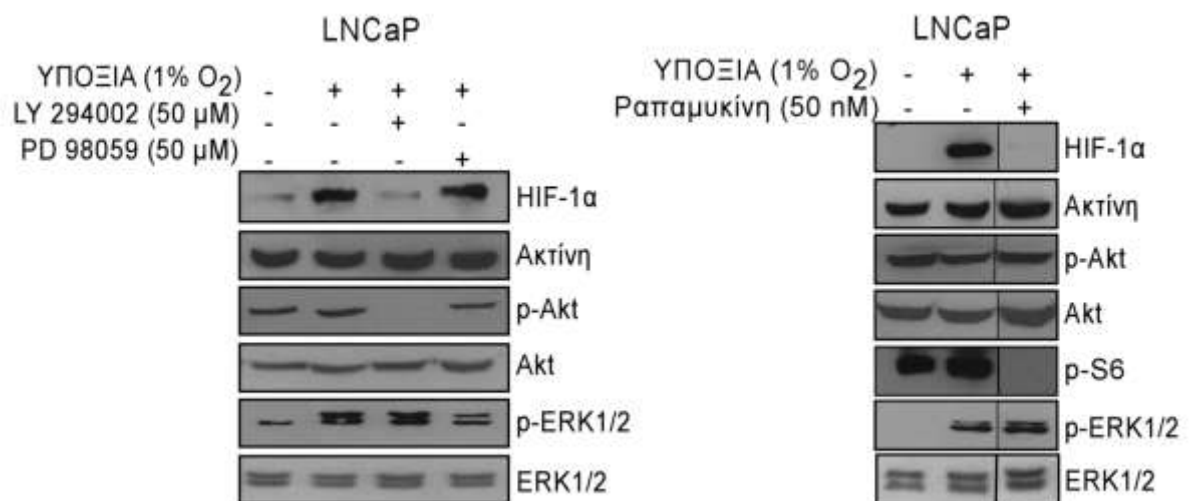
3.4.1.2. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt/mTOR και ERK1/2 στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.

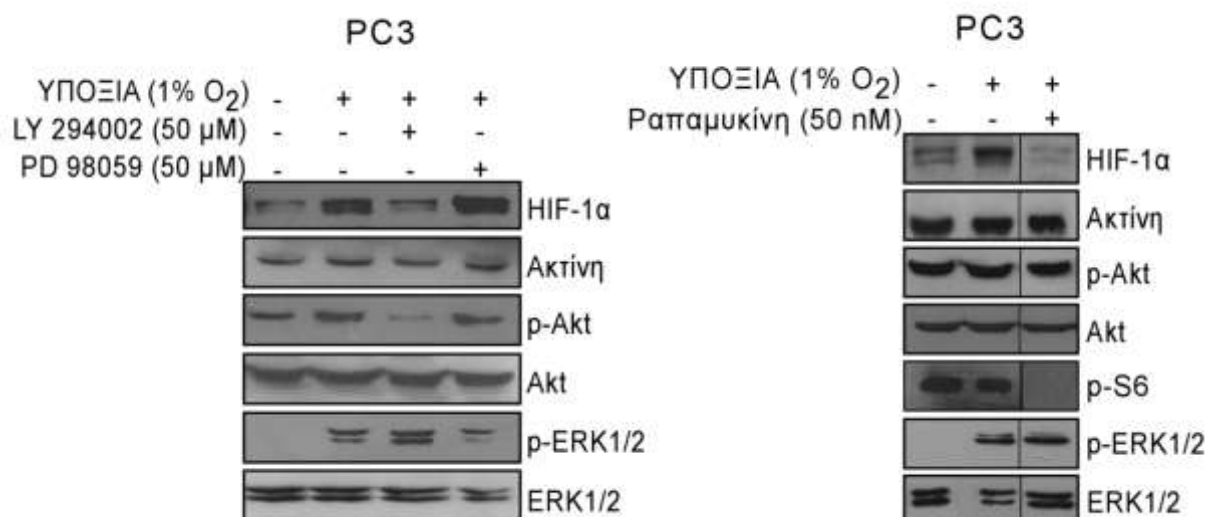
Στην συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος του μονοπατιού της PI3K στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Παρατηρήθηκε ότι το μονοπάτι της PI3K ήταν ενεργό τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας και στις δύο κυτταρικές σειρές όπως διαπιστώθηκε από τα υψηλά επίπεδα της φωσφορυλίωσης της Akt. Η αναστολή του μονοπατιού της PI3K/Akt με τον ειδικό αναστολέα της PI3K, LY294002, όπως ήταν

αναμενόμενο, μείωσε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt και προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.

Για την επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκε ένας άλλος αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K/Akt/mTOR, η ραπαμυκίνη, η οποία ως αναστολέας του mTOR (βρίσκεται καθοδικά της PI3K και της Akt) παρατηρήθηκε ότι ανέστειλε την φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 και όχι της Akt. Η ραπαμυκίνη, όπως και το LY294002, ανέστειλε σημαντικά την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α από την υποξία στα κύτταρα LNCaP και PC3 (Εικόνα 68). Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α από την υποξία απαιτεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt/mTOR τόσο στα κύτταρα LNCaP όσο και στα PC3.

Η μελέτη του μονοπατιού των MAPK στις ίδιες συνθήκες αποκάλυψε ότι η υποξία επάγει την φωσφορυλίωση των p44/42 MAPK (ERK1/2), αλλά η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 με το PD98059 δεν επηρέασε τα επίπεδα της έκφρασης του HIF-1α στην υποξία και στα κύτταρα LNCaP και PC3 (Εικόνα 68). Επομένως, το μονοπάτι των ERK1/2 δεν εμπλέκεται στην επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α στα κύτταρα LNCaP και PC3.



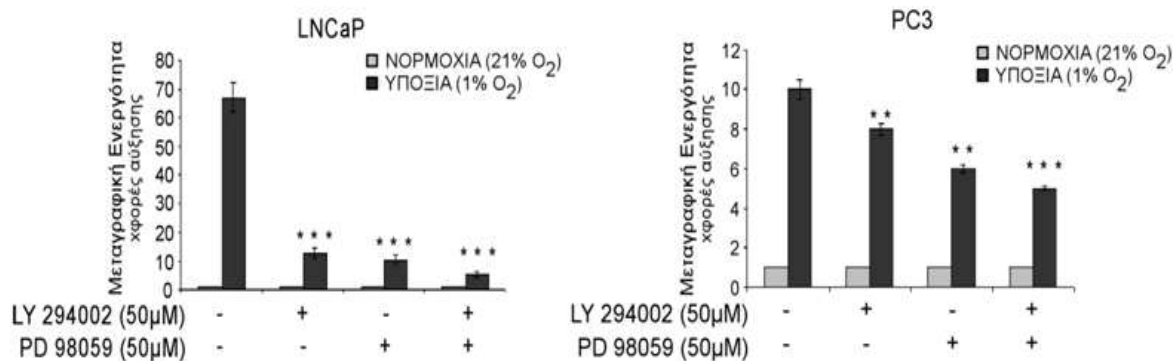


Εικόνα 68: Επίδραση των μονοπατιών PI3K/Akt/mTOR και ERK 1/2 στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, την p-MAPK, την MAPK, την p-Akt, την Akt, την p-S6 και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία. Οι αναστολείς LY294002 (50 μM) ή PD98059 (50 μM) ή Ραπαμυκίνη (50 nM) και προστέθηκαν 15 λεπτά πριν την επώαση σε υποξία. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.4.1.3. Ρόλος των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής των μονοπατιών της PI3K/Akt και των MAPK στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Συγκεκριμένα, κύτταρα LNCaP και PC3 επιμολυσμένα με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5xHRE-Luc και pCI-Renilla, επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) παρουσία ή απουσία των αναστολέων LY294002 (50 μM) ή PD98059 (50 μM) ή και των δύο μαζί για 16 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης. Η υποξία προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 κατά 70 περίπου φορές σε κύτταρα LNCaP και κατά 10 περίπου φορές σε κύτταρα PC3 (Εικόνα 69). Η προσθήκη των αναστολέων των μονοπατιών, είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό, προκάλεσε σημαντική μείωση της επαγόμενης από την υποξία μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η μείωση παρουσιάζεται πιο έντονα στα κύτταρα LNCaP (Εικόνα 69). Επομένως, τα μονοπάτια της PI3K/Akt και της ERK1/2 επηρεάζουν την μεταγραφική

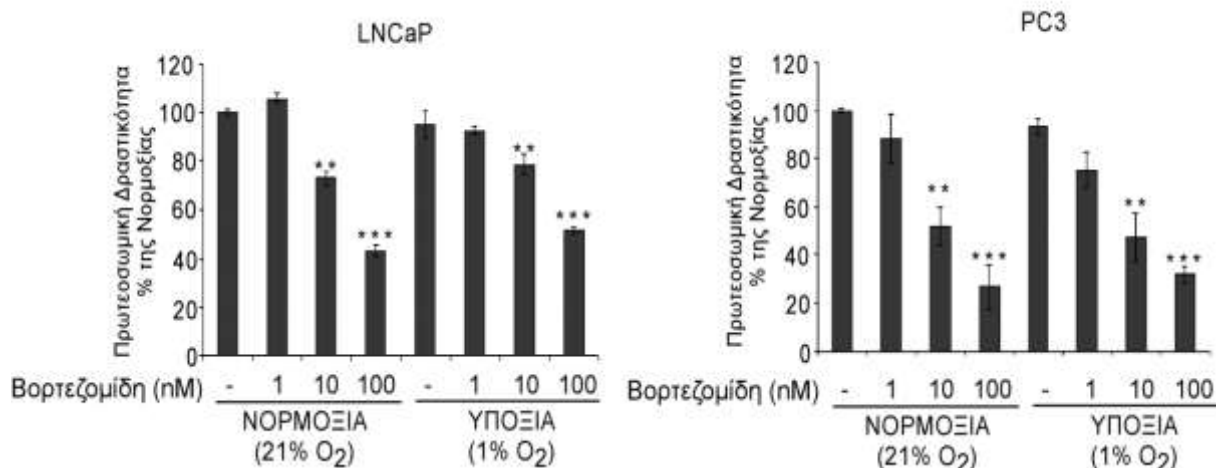
ενεργότητα του HIF-1 και ο ρόλος τους διαφαίνεται να είναι πιο σημαντικός στα κύτταρα LNCaP.



Εικόνα 69: Επίδραση των μονοπατιών PI3K/Akt και ERK 1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α 24 ώρες σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία. Οι αναστολείς LY294002 (50 μM) ή/και PD98059 (50 μM) προστέθηκαν 15 λεπτά πριν την επώαση σε υποξία. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερισκοί τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005, ** P<0,01).

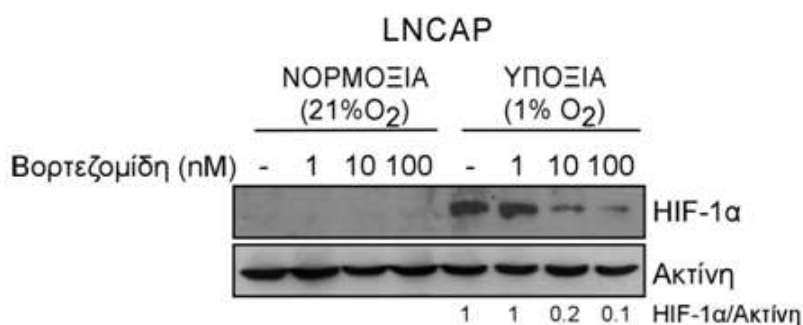
3.4.1.4. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος, βορτεζομίδη, στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.

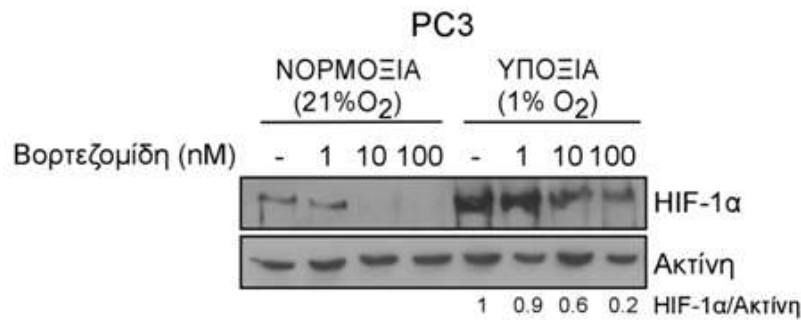
Για τη μελέτη της δράσης της βορτεζομίδης επιλέχθηκαν τρεις χαμηλές, μη τοξικές συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 nM. Αρχικά ελέγχθηκε εάν αυτές οι συγκεντρώσεις είναι ικανές να αναστείλουν την πρωτεασωμική δραστηριότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα LNCaP και PC3 επώαστηκαν σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM) για 16 ώρες και μετρήθηκε η πρωτεασωμική δραστηριότητα 20S των κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι η βορτεζομίδη σε συγκέντρωση 10 nM και 100 nM προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος τόσο στην νορμοξία όσο και στην υποξία και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 70).



Εικόνα 70: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην πρωτεασωμική δραστηκότητα των κυττάρων LNCaP και PC3. Μέτρηση της πρωτεασωμικής δραστηκότητας των κυττάρων LNCaP και PC3 που επωάστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της Βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (*** P<0,005, ** P<0,01).

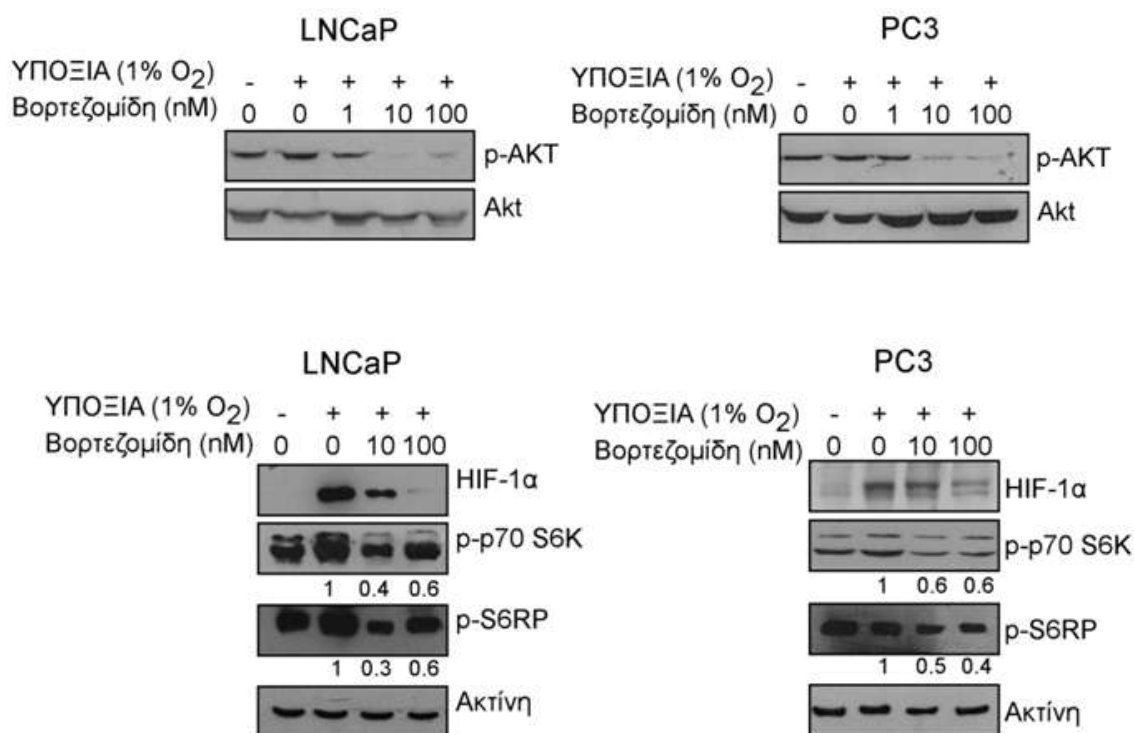
Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της βορτεζομίδης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Στην νορμοξία, στα κύτταρα PC3 η οριακή έκφραση HIF-1α μειώθηκε μετά τη προσθήκη βορτεζομίδης σε συγκέντρωση 10 nM και 100 nM. Μετά από 16 ώρες σε συνθήκες υποξίας, όπου τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν σημαντικά, η βορτεζομίδη μείωσε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1α και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 71).





Εικόνα 71: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της Βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

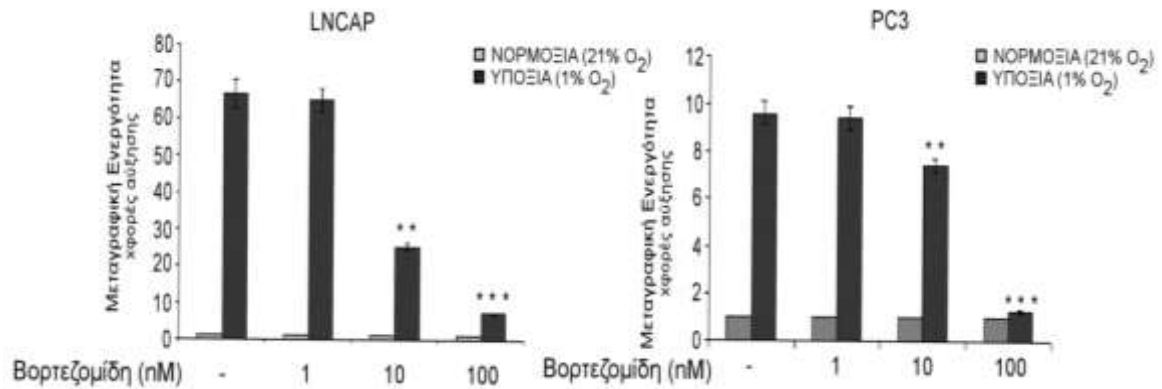
Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί παράδοξο διότι η βορτεζομίδη, ως αναστολέας πρωτεασώματος, θα έπρεπε να προκαλεί μείωση της αποικοδόμησης του HIF-1α με αναμενόμενο αποτέλεσμα την συσσώρευση του στο κύτταρο. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης υποδηλώνει ότι η βορτεζομίδη δεν επιδρά στην σταθεροποίηση του HIF-1α αλλά σε κάποιο άλλο στάδιο της ρύθμισης του. Για αυτό μελετήθηκε το στάδιο της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α το οποίο ελέγχεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt. Σε συνθήκες υποξίας, η βορτεζομίδη προκάλεσε σημαντική μείωση στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης Akt στη συγκέντρωση των 10 nM και 100 nM με δοσοεξεργτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ τα επίπεδα της Akt παρέμειναν σταθερά (Εικόνα 72). Επίσης, η βορτεζομίδη προκάλεσε μερική μείωση και στη φωσφορυλίωση των στόχων της Akt, όπως της κινάσης p70s6 και της ριβοσωμική πρωτεΐνης S6 (Εικόνα 72). Επομένως, η βορτεζομίδη αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt και κατά συνέπεια μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α.



Εικόνα 72: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt σε κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στην p-Akt, την Akt, τον HIF-1α, την p-p70S6K, την p-S6RP και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LNCaP και PC3 που επωάστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

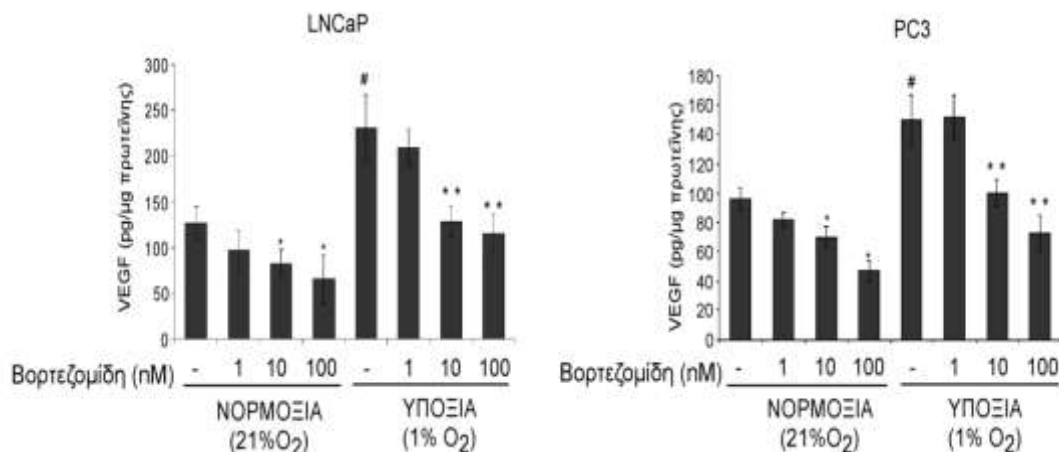
3.4.1.5. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος, βορτεζομίδη, στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3.

Για την μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1, τα κύτταρα LNCaP και PC3 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια αναφοράς pGL3-5xHRE-Luc και pCI-Renilla, επωάστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) απουσία ή παρουσία Βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM) για 16 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε ότι η επαγόμενη από την υποξία μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μειώθηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βορτεζομίδης (Εικόνα 73).



Εικόνα 73: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α 24 ώρες σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) $P < 0,005$, ** $P < 0,01$).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δράση της βορτεζομίδης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, μελετήθηκε η παραγωγή και έκκριση του VEGF, ο οποίος αποτελεί γονίδιο στόχο του HIF-1, σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης σε κύτταρα LNCaP και PC3. Σε συνθήκες υποξίας τα εκκρινόμενα επίπεδα του VEGF αυξήθηκαν κατά 2 περίπου φορές σε σχέση με την νορμοξία, ενώ η παρουσία της βορτεζομίδης ανέστειλε αυτή την αύξηση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Επίσης η βορτεζομίδη μείωσε και τα εκκρινόμενα επίπεδα του VEGF της νορμοξίας (Εικόνα 74).



Εικόνα 74: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στη παραγωγή και έκκριση του VEGF σε κύτταρα LNCaP και PC3. Μέτρηση των επιπέδων VEGF σε θρεπτικό υλικό κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (** $P < 0,005$, ** $P < 0,01$).

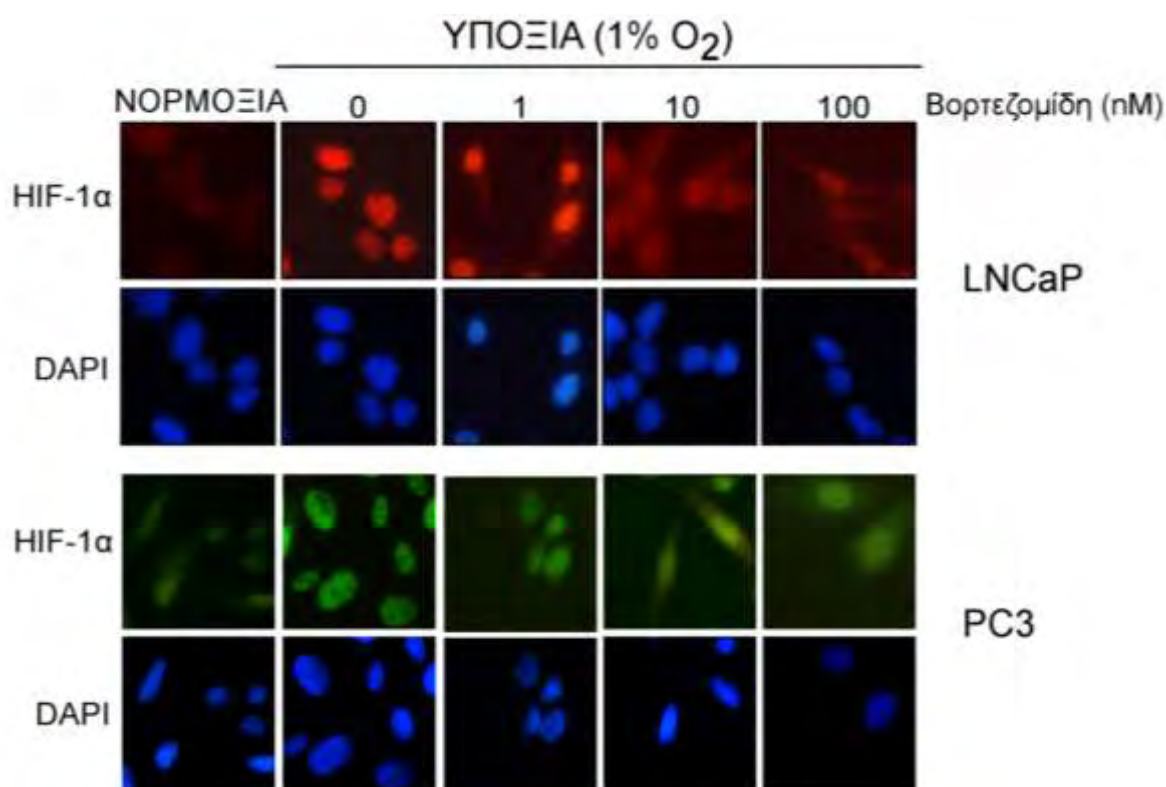
Στα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 από τα 100 nM βορτεζομίδη ήταν πιο ισχυρή από ότι η αναστολή της έκφρασης του (Εικόνες 73, 71 αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη του HIF-1α που υπάρχει σε συνθήκες υποξίας παρουσία βορτεζομίδης 100 nM δεν είναι ενεργή. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί όταν αναστέλλεται το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK (Mylonis, I et al., 2008, Mylonis, I et al., 2010). Για να ελεγχθεί η συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK, τα κύτταρα LNCaP και PC3 επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της Βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM) και ακολούθησε ανοσοανίχνευση της φωσφορυλιωμένης και μη μορφής των ERK1/2. Παρατηρήθηκε πως η βορτεζομίδη προκάλεσε σημαντική μείωση της επαγόμενης από την υποξία φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Εικόνα 75). Επομένως, η βορτεζομίδη αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2.



Εικόνα 75: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2 σε κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στην p-ERK1/2 και τις ERK1/2 ολικού εκχυλίσματος κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM). Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.4.1.6. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3.

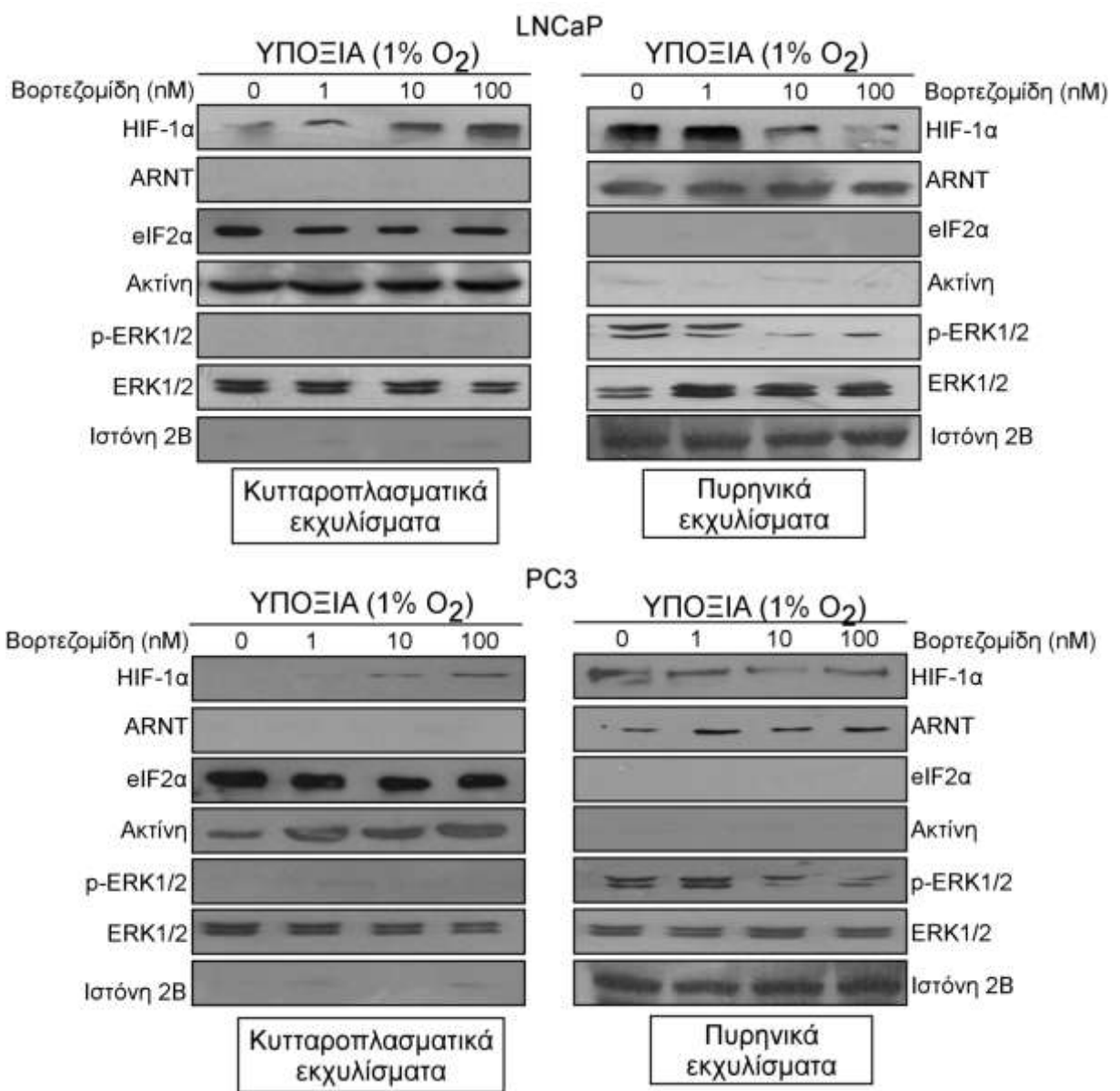
Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας απέδειξαν την άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 και ότι η αναστολή της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-1α και μείωση της συγκέντρωσής του στον πυρήνα μειώνοντας την μεταγραφική του ενεργότητα. Προκειμένου να διερευνηθεί η δράση της βορτεζομίδης στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α, κύτταρα LNCaP και PC3, που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM), μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό η υποκυτταρική κατανομή του HIF-1α. Παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α είναι καθαρά πυρηνικός σε συνθήκες υποξίας, ενώ παρουσία βορτεζομίδης το σήμα στον πυρήνα εξασθένησε και ο HIF-1α κατανεμήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Εικόνα 76).



Εικόνα 76: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι στον HIF-1α κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM) για

16 ώρες. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε DAPI ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με ανοσοαποτύπωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλίσματων των κυττάρων και έδειξε ότι ενώ στην υποξία ο HIF-1α βρίσκεται στο πυρηνικό κλάσμα, η επίδραση στις ίδιες συνθήκες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βορτεζομίδης προκάλεσε τη μείωση των πυρηνικών επιπέδων του HIF-1α με ταυτόχρονη αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων που συνοδεύτηκε με μείωση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 (Εικόνα 77).



Εικόνα 77: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδης στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α κύτταρα LNCaP και PC3. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-1α, την ακτίνη, τον

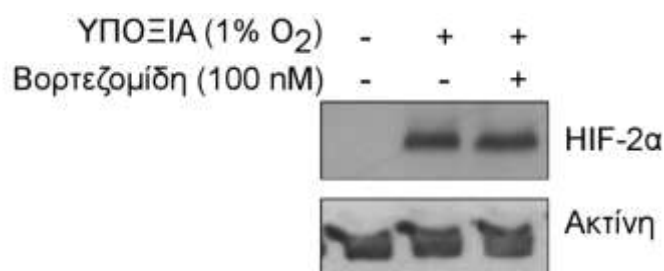
ANRT, τον eIF2α, τις p-ERK1/2, τις ERK1/2 και την Ιστονή 2B πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων LNCaP και PC3 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης (1, 10 και 100 nM) για 16 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπερασματικά, η βορτεζομίδα προκαλεί αναστολή του μονοπατιού της PI3k/Akt και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α. Επίσης η βορτεζομίδα προκαλεί απενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 γεγονός που εξηγεί τη μείωση της πυρηνικής συγκέντρωσης του HIF-1α και την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητάς του και τη μείωση της έκκρισης του VEGF.

3.4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ Huh7.

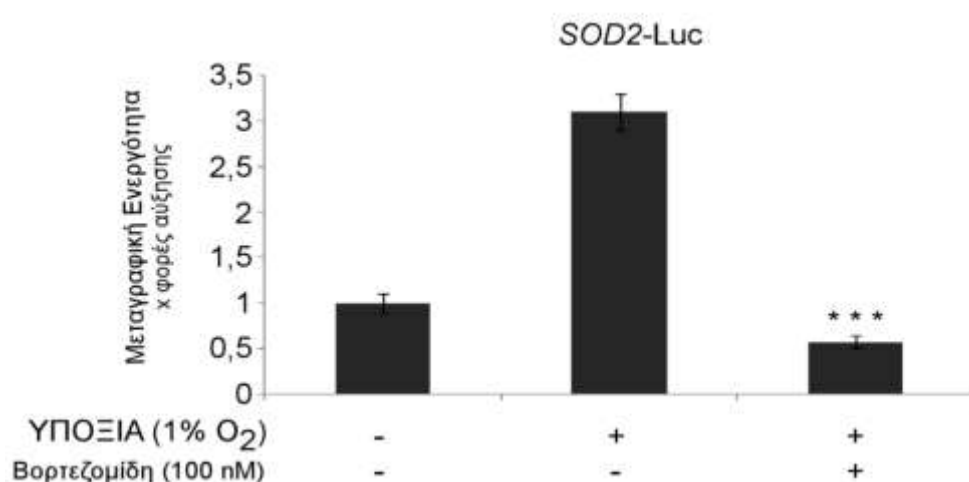
Για να μελετηθεί ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α από την αναστολή του πρωτεασώματος τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 τα οποία εκφράζουν τον HIF-1α αλλά και τον HIF-2α.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδα στην έκφραση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7. Τα επαγόμενα από την υποξία πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α δεν επηρεάστηκαν παρουσία βορτεζομίδης (Εικόνα 78).



Εικόνα 78: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδα στην έκφραση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α και την ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης (100 nM) για 16 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

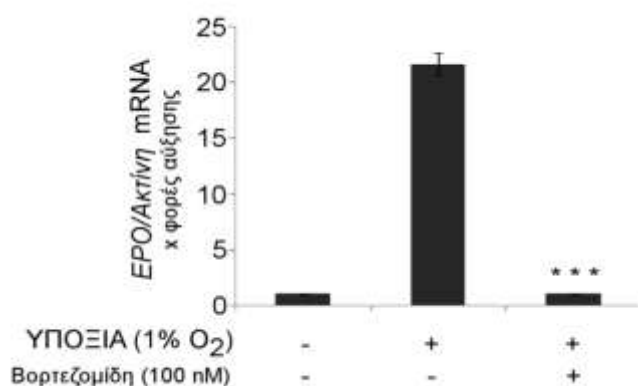
Για να διαπιστωθεί εάν αναστολή του πρωτεασώματος επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, μετρήθηκε η μεταγραφή του υποκινητή της *SOD2* σε κύτταρα Huh7. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh7 επιμολυσμένα με τα πλασμίδια αναφοράς pGL2-*SOD2*-Luc και pCI-Renilla, επώστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης για 16 ώρες και μετρήθηκε η δράση της λουσιφεράσης. Η παρουσία της βορτεζομίδης κατά την υποξία μείωσε στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφή από τον υποκινητή της *SOD2* σε σύγκριση με την επώση σε υποξία απουσία του αναστολέα (Εικόνα 79).



Εικόνα 79: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7. Μέτρηση της μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* σε επιμολυσμένα με πλασμίδια αναφοράς κύτταρα Huh7 έπειτα από επώση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης (100 nM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

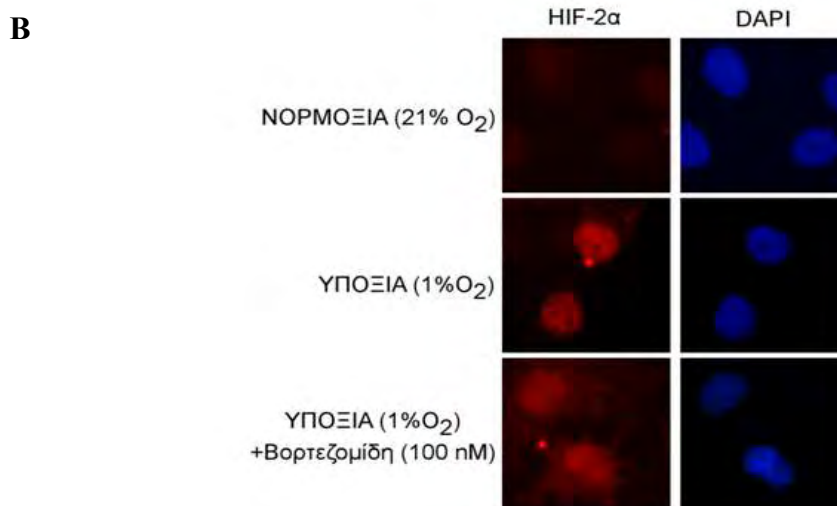
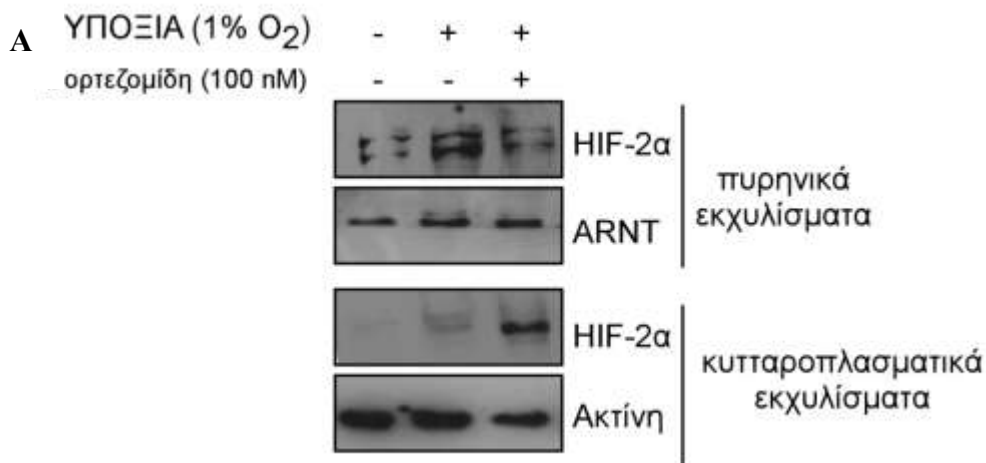
Για την επαλήθευση του παραπάνω αποτελέσματος, μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στα επίπεδα mRNA της *EPO* καθώς και στην έκκριση της *EPO* από κύτταρα Huh7 σε συνθήκες υποξίας. Η επαγωγή του HIF-2α έγινε για 16 ώρες σε υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης. Παρατηρήθηκε ότι η βορτεζομίδη προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα mRNA της *EPO* και

στην εκκρινόμενη EPO (Εικόνα 80). Επομένως, η βορτεζομίδη ανέστειλε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα Huh7.



Εικόνα 80: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2β σε κύτταρα Huh7. Α. Μέτρηση των mRNA επιπέδων της *EPO/ακτίνης* με RT-PCR, και Β. των επιπέδων της εκκρινόμενης EPO σε κύτταρα Huh7 έπειτα από επώαση σε νορμοξία ή υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της Βορτεζομίδης (100 nM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (***) P<0,005).

Επίσης ελέγχθηκε εάν η βορτεζομίδη επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α. Κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν για 16 ώρες σε νορμοξία ή υποξία απουσία ή παρουσία της βορτεζομίδης (100 nM), είτε μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό η υποκυτταρική κατανομή του HIF-2α, είτε απομονώθηκαν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα και έγινε ανίχνευση του HIF-2α με ανοσοαποτύπωση. Και στις δύο πειραματικές προσεγγίσεις παρατηρήθηκε ότι στην υποξία ο HIF-2α είναι καθαρά πυρηνικός ωστόσο παρουσία βορτεζομίδης το σήμα στον πυρήνα εξασθενεί και ο HIF-2α κατανέμεται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Εικόνα 81).



Εικόνα 81: Επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στον HIF-2α, την ακτίνη και τον ARNT πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων, Β. Ανοσοφθορισμό κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε υποξία (1% O₂) παρουσία ή απουσία της βορτεζομίδης (100 nM) για 16 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπερασματικά, σε κύτταρα Huh7 η βορτεζομίδη ανέστειλε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του, σε συνθήκες υποξίας. Αυτό συνέβει διότι η βορτεζομίδη μείωσε την πυρηνική συγκέντρωση του HIF-2α με ταυτόχρονη αύξησή του στο κυτταρόπλασμα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κύτταρα αποκρίνονται στο στρες της υποξίας με την ενεργοποίηση ομοιοστατικών μηχανισμών, καθοριστικό ρόλο στους οποίους παίζουν δύο μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία, οι HIF-1α και HIF-2α. Ο HIF-1α έχει εκτενώς μελετηθεί, η έκφραση του είναι ευρέως διαδεδομένη και σε αυτόν αποδίδεται το μεγαλύτερο μέρος της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που επάγονται από την υποξία. Ωστόσο από την βιβλιογραφία, γίνεται φανερή η εξίσου σημαντική συμμετοχή του HIF-2α του οποίου η έκφραση είναι ιστοειδική, εκφράζεται πιο ισχυρά στο ήπαρ και στο ενδοθήλιο και η δράση του στους παραπάνω ιστούς διαφαίνεται να υπερέχει έναντι του HIF-1α. Παρόλο που οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν πολλές δομικές ομοιότητες καθώς και κοινή οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση από το μονοπάτι των PHDs/VHL και του FIH, η πρόσφατη βιβλιογραφία δείχνει ότι έχουν μοναδικούς μεταγραφικούς στόχους και διαφορετική επίδραση σε καταστάσεις όπως η ογκογένεση και η αγγειογένεση. Επιπλέον, ο HIF-2α φαίνεται να συμβάλει αποφασιστικά στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων μεταξύ αυτών και του ήπατος, στην κυτταρική ομοιοστασία των οποίων ο ρόλος του HIF-2α δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

Παρά την ύπαρξη μεγάλου αριθμού εργασιών στη βιβλιογραφία για τον HIF-1α και πιο πρόσφατα για τον HIF-2α, η διεθνής γνώση εξακολουθεί να είναι αποσπασματική και μερικές φορές αμφιλεγόμενη. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί σε μια συστηματική και λεπτομερειακή μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του HIF-2α καθώς και μια συγκριτική διερεύνηση της λειτουργίας του προκειμένου να διασαφηνιστεί ο ρόλος του HIF-2α στην κυτταρική ομοιοστασία.

Κατά συνέπεια, η παρούσα διατριβή εξέτασε τις ακόλουθες κατευθύνσεις. Πρώτον, τη διαλεύκανση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α στην υποξία και στη νορμοξία παρουσία ενώσεων που «μιμούνται» την υποξία, όπως το κοβάλτιο, και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν σε αυτή την επαγωγή σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Δεύτερον, τη κατανόηση της επιλεκτικής έκφρασης των επαγόμενων γονιδίων από τον HIF-2α σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία κοβαλτίου. Τρίτον, τη διερεύνηση της ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζεΐνης 1 και τις ERK1/2 σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Τέταρτον, την επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος βορτεζομίδη στους HIF-1α και HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και κύτταρα Huh7, αντίστοιχα.

4.1 Μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α από την υποξία ή τους «μιμητέν» της υποξίας σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7

Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος είναι ο πέμπτος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως και η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου λόγω καρκίνου. Χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη και κακή πρόγνωση, αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα χρόνιας ηπατίτιδας ή κίρρωσης του ήπατος και είναι ένας από τους πλέον αγγειοβριθείς συμπαγείς όγκους. Σημείο κλειδί της κακοήθους εξαλλαγής αποτελεί το υποξικό μικροπεριβάλλον, όπου τα καρκινικά κύτταρα με την βοήθεια των HIFs προσαρμόζονται στις χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 και γίνονται ανθεκτικά. Η υπερέκφραση του HIF-1α και του HIF-2α είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, στον οποίο κυρίως έχει μελετηθεί η επαγωγή του HIF-1α (Mylonis, I and Simos, G 2012). Παρόλο που η έκφραση των αγγειογενετικών γονιδίων στα ηπατοκύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από τον HIF-2, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο HIF-2 έχει κυρίαρχο ρόλο στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (Rankin, EB et al., 2008), πολύ λίγα είναι γνωστά για τον μηχανισμό της επαγωγής του. Για αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί η επαγωγή του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

Αρχικά μελετήθηκε, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, η επαγωγή του HIF-2α σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου καθώς και η χρονοεξάρτηση της επαγωγής σε 1% O_2 (υποξία). Η επαγωγή του HIF-2α συγκρίθηκε με την έκφραση του HIF-1α στις ίδιες συνθήκες. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο HIF-1α και ο HIF-2α παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου καθώς και σε μικρής ή μεγάλης διάρκειας υποξία (Keith, B et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, κύτταρα νευροβλαστώματος που αποδιαφοροποιούνται και έχουν χαρακτηριστικά στελεχιαίων κυττάρων καθώς και σε στελεχιαία κύτταρα γλοιώματος έδειξαν ότι ο HIF-2α επάγεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O_2 από ότι ο HIF-1α και, ότι η έκφραση του HIF-2α παραμένει αυξημένη σε μεγάλης χρονικής διάρκειας υποξία, ενώ η έκφραση του HIF-1α είναι παροδική (Uchida, T et al., 2004, Nilsson, H et al., 2005, Holmquist-Mengelbier, L et al., 2006, Li, Z et al., 2009). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν καθαρά ότι αυτό δεν αποτελεί ένα γενικό αλλά μάλλον κυτταροειδικό κανόνα αφού σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος οι HIF-2α και HIF-1α παρουσιάζουν ίδιο πρότυπο έκφρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, με την επαγωγή και των δύο πρωτεϊνών να γίνεται εμφανής σε 6% O_2 με μέγιστο αποτέλεσμα σε 2% O_2 . Στη μελέτη της χρονοεξαρτώμενης

επαγωγής από την υποξία βρέθηκε ότι οι HIF-2α και ο HIF-1α εμφανίζονται στις 2 πρώτες ώρες. Ο HIF-2α παρουσιάζει μία σταθερή έκφραση μέχρι τις 16 ώρες, ενώ ο HIF-1α εμφανίζει μέγιστη έκφραση στις 16 ώρες. Τέλος, η έκφραση και των δύο βαθμιαία μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 48 ώρες. Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης και των δύο HIF-α ισομορφών σε παρατεταμένη υποξία πιθανόν να αντιπροσωπεύει μία ομοιοστατική προσαρμογή στη συνεχή μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην επαγωγή των γονιδίων των PHDs από τους HIFs (Berra, E et al., 2003, Aprelikova, O et al., 2004, Nakayama, K et al., 2004), είτε στην παραγωγή αντινοσηματικού mRNA του HIF-α (Rossignol, F et al., 2002, Bertozzi, D et al., 2011), είτε στην επαγωγή άλλων ισομορφών του HIF-2α, οι οποίες ανταγωνίζονται το διμερισμό με τον ARNT και λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές (Lee, JW et al., 2004). Η ίδια αρνητική ρύθμιση από την παρατεταμένη υποξία, είχε παρατηρηθεί στο εργαστήριο σε κύτταρα HeLa για τον HIF-1α (Triantafyllou, A et al., 2006). Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δεν συμφωνούν με τη γενική παραδοχή της βιβλιογραφίας, πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό είδος των υπό μελέτη κυττάρων. Συμπερασματικά, η διαφορετική επαγωγή του HIF-2α και του HIF-1α σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, καθώς και σε διαφορετικής διάρκειας υποξία, παρατηρείται σε κύτταρα τα οποία είναι, είτε αποδιαφοροποιημένα, είτε ευαίσθητα σε μικρές αλλαγές της πίεσης του οξυγόνου και όχι σε πλήρως διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα.

Ο HIF-1α αποικοδομείται με έναν χρόνο ημιζωής μικρότερο από 5 λεπτά σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) (Semenza, GL 2009). Για την αποικοδόμηση του HIF-2α στη νορμοξία είναι γενικά αποδεκτό ότι πιθανόν να ισχύει το ίδιο, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί πειραματικά. Έτσι, στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο χρόνος ημιζωής του HIF-2α στη νορμοξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και βρέθηκε ότι μετά από επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας και επαναφορά τους σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, η πρωτεΐνη του HIF-2α που έχει επαχθεί, έχει χρόνο ημιζωής μικρότερο των 10 λεπτών.

Στην συνέχεια, δοκιμάστηκαν οι διάφοροι «μιμητές» της υποξίας όπως το κοβάλτιο, η δεσφερριτοξαμίνη και η διμεθυλοξαλυλο-γλυκίνη (DMOG) σε διαφορετικούς χρόνους για να προσδιοριστεί η κινητική της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α, η οποία και συγκρίθηκε με εκείνη του HIF-1α στις ίδιες συνθήκες. Σε όλες τις περιπτώσεις επαγωγής, τα κύτταρα Huh7 εμφάνισαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του HIF-2α, όμως, σε αντίθεση με το κοβάλτιο και τη δεσφερριτοξαμίνη, η παρατεταμένη παρουσία του DMOG

(24-48 ώρες) μείωσε την έκφραση του HIF-2α. Μία υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι μετά από χρονικό διάστημα 24-48 ωρών το DMOG δεν είναι πλέον δραστικό. Η κινητική της έκφρασης του HIF-1α παρουσία κοβαλτίου, ή δεσφериοξαμίνης ή DMOG ήταν παρόμοια με την κινητική της έκφρασης του HIF-2α.

Σε αντίθεση με το κοβάλτιο, ο μηχανισμός επαγωγής του HIF από τη δεσφериοξαμίνη και το DMOG είναι γνωστός. Η δεσφериοξαμίνη δεσμεύει το Fe^{+2} που απαιτούν οι υδροξυλάσες (PHDs και FIH) των HIF-1/2α, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές (Zagorska, A and Dulak, J 2004), ενώ το DMOG είναι ειδικός αναστολέας των πρόλυλο-υδροξυλασών και οδηγεί στη σταθεροποίηση των HIF-1/2α εξαιτίας της μη υδροξυλίωσης και άρα της μη πρωτεόλυσής τους από το πρωτεάσωμα (Asikainen, TM et al., 2005). Η βασική θεωρία στη βιβλιογραφία σχετικά με την επαγωγή του HIF-α από το κοβάλτιο είναι πως το κοβάλτιο, ως δισθενές μέταλλο, προκαλεί την παρεμπόδιση της δράσης των πρόλυλο-υδροξυλασών είτε λόγω του ανταγωνισμού του με το Fe^{+2} για τις θέσεις πρόσδεσης στο ενεργό τους κέντρο (Maxwell, P and Salnikow, K 2004), είτε λόγω οξειδωσης του ασκορβικού οξέος (Salnikow, K et al., 2004, Fong, GH and Takeda, K 2008). Υπάρχουν ωστόσο μελέτες που υποστηρίζουν πως το κοβάλτιο πιθανόν να έχει και άλλους ρόλους εκτός της αναστολής των πρόλυλο-υδροξυλασών. Έχει δειχθεί πως το κοβάλτιο μπορεί να ενωθεί απευθείας με τον HIF-2α. Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει τη σύνδεση του HIF-2α με τον VHL οδηγώντας έτσι στη σταθεροποίηση του (Yuan, Y et al., 2003). Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός δράσης του κοβαλτίου περιλαμβάνει την επαγωγή της σύνθεσης του HIF-1α μέσω των μονοπατιών της PI3K και των ROS (Chachami, G et al., 2004, Triantafyllou, A et al., 2006). Συνεπώς, ο ακριβής ρόλος του κοβαλτίου στην επαγωγή του HIF-α δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος και επειδή, οι υψηλότερες ποσότητες του κοβαλτίου που φυσιολογικά συναντώνται στον οργανισμό εντοπίζονται στο ήπαρ, στα νεφρά, στην καρδιά και στην σπλήνα (Simonsen, LO et al., 2012), μελετήθηκε ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία κοβαλτίου στο σύστημα του ηπατοκυτταρικού καρκίνου και συγκρίθηκε με τον μηχανισμό επαγωγής του HIF-2α παρουσία δεσφериοξαμίνης ή DMOG. Ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α συγκρίθηκε επίσης με εκείνον του HIF-1α στις ίδιες συνθήκες.

Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-2α στην υποξία ή από το κοβάλτιο και να συγκριθεί με τους άλλους επαγωγείς του υποξικού στρες χρησιμοποιήθηκε αρχικά η ακτινομυκίνη, η οποία αποτελεί ειδικό αναστολέα της μεταγραφής. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η υποξία, η δεσφериοξαμίνη και το DMOG

σταθεροποιούν τον HIF-1α και τον HIF-2α μετα-μεταγραφικά, χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδα του mRNA τους (Wiesener, MS et al., 2003, Triantafyllou, A et al., 2006). Αυτό επιβεβαιώθηκε στη παρούσα διατριβή, και επιπλέον βρέθηκε ότι η ακτινομυκίνη δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα επαγωγής του HIF-2α που προκαλούνται και από το κοβάλτιο. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τον HIF-1α. Επομένως, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος για την επαγωγή του HIF-2α από κοβάλτιο, όπως και από την υποξία, τη δεσφериοξαμίνη και το DMOG δεν απαιτείται η σύνθεση νέου mRNA του αλλά αυτή οφείλεται σε ένα μετα-μεταγραφικό στάδιο.

Στη συνέχεια της διερεύνησης της δράσης της υποξίας και του κοβαλτίου στην επαγωγή του HIF-2α και αφού αποκλείστηκε το γεγονός ότι οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του, εξετάστηκε αν η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-2α είναι απαραίτητη για την παρατηρούμενη επαγωγή, ελέγχοντας την επίδραση ενός αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, του κυκλοεξιμιδίου. Τα αποτελέσματα στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος δείχνουν πως η επαγωγή του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας ή παρουσία κοβαλτίου, σε αντίθεση με την δεσφериοξαμίνη και το DMOG, απαιτεί συνεχιζόμενη πρωτεϊνοσύνθεση. Παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα διατριβή σχετικά με την ανάγκη της συνεχιζόμενης πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-2α από το κοβάλτιο έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, για την επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο σε κύτταρα HeLa ή σε πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών (Wiesener, MS et al., 2003, Chachami, G et al., 2004, Triantafyllou, A et al., 2006), και για την επαγωγή του HIF-2α από τον ινσουλινόμορφο παράγοντα ανάπτυξης 1 (Insulin-like growth Factor-1, IGF-1) σε κύτταρα σαρκώματος Kaposi (Catrina, SB et al., 2006). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες με αντίθετα αποτελέσματα για το κοβάλτιο, σύμφωνα με τις οποίες δεν απαιτείται νέα πρωτεϊνοσύνθεση αλλά σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF πιθανόν μέσω της αναστολής της δράσης των προλυλο-υδροξυλασών τους, σε διαφοροποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών για την επαγωγή του HIF-1α (Chachami, G et al., 2007), και σε κύτταρα ιδιοπαθούς, πολλαπλού, μελαγχρωματικού σαρκώματος του δέρματος (σάρκωμα Kaposi) για την επαγωγή της πρωτεΐνης HIF-1α και HIF-2α από το κοβάλτιο (Catrina, SB et al., 2006). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υποξία και το κοβάλτιο επάγουν τον HIF-2α με τη πιθανή εμπλοκή διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Κατά τη διερεύνηση του μηχανισμού της επαγωγής του HIF-2α από το κοβάλτιο σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, βρέθηκε ότι εμπλέκονται τα μονοπάτια των MAP κινασών και της PI3K, ενώ στην επαγωγή του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας εμπλέκεται

μόνο το μονοπάτι της PI3K. Γενικά, είναι γνωστό ότι τα μονοπάτια της PI3K και των ERK1/2 κινασών ενέχονται στην ενεργοποίηση της μετάφρασης, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το κοβάλτιο μπορεί να επάγει το μονοπάτι των ERK1/2 κινασών (Kim, HJ et al., 2003, Lan, A et al., 2011). Ωστόσο, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την επαγωγή του HIF-2α από το κοβάλτιο ή άλλη χημική ένωση μέσω του μονοπατιού των ERK1/2 κινασών. Έχει περιγραφεί μόνο ότι ο IGF-1 επάγει τον HIF-2α μέσω του μονοπατιού της PI3K, με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφραση του VEGF σε κύτταρα οστεοβλάστη (Akeno, N et al., 2002). Επίσης, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-2α εξαρτάται από το mTORC2, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την PI3K, και όχι από το mTORC1 το οποίο ενεργοποιείται από την PI3K (Toschi, A et al., 2008, Nayak, BK et al., 2012). Όσον αφορά την επαγωγή του HIF-1α από ορμόνες όπως η αγγειοτενσίνη II, η θρομβίνη, η ινσουλίνη και η ενδοθηλίνη σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στα μακροφάγα, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται το μονοπάτι της PI3K (Bilton, RL and Booker, GW 2003).

Στην επαγωγή του HIF-2α από το κοβάλτιο φαίνεται να εμπλέκονται και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) αφού η κατεργασία των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος με το αντιοξειδωτικό NAC οδηγεί σε αναστολή της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-2α από το κοβάλτιο, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε συνθήκες υποξίας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το NAC μειώνει τα επαγόμενα από το κοβάλτιο ROS (Lan, A et al., 2011), καθώς και ότι αναστέλει την επαγωγή του HIF-1α δεσμεύοντας τα ROS (Shatrov, VA et al., 2003). Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας και άλλα αντιοξειδωτικά όπως το Trolox και η γλουταθειόνη. Συγκεκριμένα, όταν σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος προστέθηκαν τα αντιοξειδωτικά γλουταθειόνη και Trolox προκλήθηκε αναστολή της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α από το CoCl_2 καθώς και από την υποξία, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε από το NAC. Έχει επίσης προταθεί πως τα ROS είναι δυνατόν μέσω του μονοπατιού της PI3K να οδηγούν στην επαγωγή του HIF-2α σε κύτταρα με ανενεργό VHL (Maranchie, JK and Zhan, Y 2005, Block, K et al., 2007). Επομένως, είναι πολύ πιθανό η ύπαρξη των ROS ή η παραγωγή τους από το κοβάλτιο να είναι απαραίτητη για τη δράση του μονοπατιού της PI3K και την επαγωγή του HIF-2α από κοβάλτιο σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και για την υποξία αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α επάγεται από τα ROS που παράγονται είτε στα

μιτοχόνδρια, (Guzy, RD et al., 2005, Mansfield, KD et al., 2005), είτε μέσω της ενεργής οξειδάσης του NADPH (Block, K et al., 2007).

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή βρέθηκε ότι το κοβάλτιο δρα αυξάνοντας τη μετάφραση του HIF-2α μέσω των ROS και του μονοπατιού της PI3K και των ERK1/2, και όχι απενεργοποιώντας τις PHDs. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ένα νέο μηχανισμό του κοβαλτίου στην επαγωγή του HIF-2α, τουλάχιστον στην περίπτωση των κυττάρων του ηπατοκαρκινώματος. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν παρατηρηθεί στο εργαστήριο για την επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο σε άλλα κύτταρα (Chachami, G et al., 2004, Triantafyllou, A et al., 2006). Επίσης, φαίνεται ότι η υποξία επάγει τον HIF-2α μετα-μεταγραφικά, με συμμετοχή των ROS και του μονοπατιού της PI3K.

4.2. Διερεύνηση της επίδρασης της υποξίας και των «μιμητών» της υποξίας στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

Εφόσον, ο HIF-2α δεν έχει αποικοδομηθεί στο πρωτεάσωμα, μετακινείται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το ενεργό σύμπλοκο, HIF-2α/ARNT, και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Στη παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε με πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού ότι σε συνθήκες υποξίας, παρουσία κοβαλτίου, DFO και DMOG, ο HIF-2α εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος. Συνεπώς, διερευνήθηκε στη συνέχεια εάν ο επαγόμενος και πυρηνικός HIF-2 είναι μεταγραφικά ενεργός σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις επαγωγής και συγκρίθηκε με τον HIF-1. Το ετεροδιμερές HIF-α/ARNT, που σχηματίζεται στον πυρήνα, για να επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία, τα HRE. Η αλληλουχία των HRE είναι πανομοιότυπη για τις δύο isoμορφές, HIF-1 και HIF-2. Ωστόσο, ο HIF-1 και ο HIF-2 επάγουν κοινά καθώς και ειδικά γονίδια στόχους μέσω συνεργασίας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Για αυτό, προκειμένου να αξιολογηθεί διακριτά η μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-2 από εκείνη του HIF-1 και κατά προέκταση ξεχωριστά ο ρόλος του κάθε παράγοντα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, αναζητήθηκαν ειδικά γονίδια στόχοι για τον HIF-1 και HIF-2 στα κύτταρα Huh7. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το γονίδιο της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου (*SOD2*)

ρυθμίζεται σε συνθήκες υποξίας από τον HIF-2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Scortegagna, M et al., 2003, Nanduri, J et al., 2009) ενώ το γονίδιο της κινάσης του φωσφογλυκερινικού οξέος (*PGK*) επάγεται ειδικά από τον HIF-1 (Scortegagna, M et al., 2003, Hu, CJ et al., 2007, Nanduri, J et al., 2009, Keith, B et al., 2012). Η ρύθμιση της επαγωγής των ειδικών γονιδίων στόχων για κάθε HIF φαίνεται πως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου. Συνεπώς κρίθηκε απαραίτητο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας να ελεγχθεί η εξειδίκευση της μεταγραφής του *SOD2* και του *PGK* από τον HIF-2 και τον HIF-1, αντίστοιχα, σε κύτταρα Huh7. Για αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του HIF-2α σε πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα καθώς και σταδιοποίηση της μεθοδολογίας siRNA για τη επιλεκτική αποσιώπηση των HIF-1α και HIF-2α. Στην συνέχεια, με πειράματα υπερέκφρασης και αποσιώπησης των HIF-1α και HIF-2α και με τη χρήση των πλασμιδιακών κατασκευών pGL2-SOD2-Luc και pGL3-PGK-Luc προσδιορίστηκε η δράση της λουσιφεράσης και βρέθηκε ότι ο υποκινητής του *SOD2* αποτελεί ειδικό μεταγραφικό στόχο του HIF-2, ενώ ο υποκινητής του *PGK* αποτελεί ειδικό στόχο του HIF-1 σε κύτταρα Huh7. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7 προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την πλασμιδιακή κατασκευή pGL2-SOD2-Luc, ενώ του HIF-1 χρησιμοποιώντας την κατασκευή pGL3-PGK-Luc. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι είναι η πρώτη φορά που ελέγχθηκε και αποδείχθηκε με αποσιώπηση των HIF-1α και HIF-2α μέσω siRNA η εξειδίκευση της δράσης του HIF-2 για τον υποκινητή του *SOD2*. Ο έλεγχος αυτός έχει πραγματοποιηθεί στη βιβλιογραφία, μόνο με υπερέκφραση του HIF-2α σε διάφορες κυτταρικές σειρές καθώς και σε ποντίκια *HIF-2α^{-/-}* (Scortegagna, M et al., 2003, Oktay, Y et al., 2007, Dioum, EM et al., 2009).

Μελετώντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 υπό την επίδραση της υποξίας και των «μιμητών» της υποξίας, παρατηρήθηκε ότι, ενώ η υποξία, η δεσφεριοξαμίνη και το DMOG οδηγούν στην επαγωγή ενός μεταγραφικά ενεργού HIF-2, το CoCl_2 δεν επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Επίσης, κατά τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις επαγωγής, ο HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι ο HIF-2 έχει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων στο ήπαρ και κυρίως της *SOD2*, διότι τα ποντίκια *HIF-2α^{-/-}* παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ROS στο ήπαρ λόγω της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου της *SOD2* (Scortegagna, M et al., 2003). Το

κοβάλτιο πιθανόν να αποτελεί σημαντικό στοιχείο ενός κυκλικού μονοπατιού, στο οποίο ο μη μεταγραφικά ενεργός HIF-2 προκαλεί αύξηση των επιπέδων των ROS λόγω μείωσης της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων, και τα ROS με την σειρά τους είναι απαραίτητα για την επαγωγή της έκφρασης του HIF-2α από το κοβάλτιο.

Ακόμη, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι το κοβάλτιο δεν επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7, επιλέχθηκε να μελετηθεί η μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, *EPO*. Η *EPO* είναι ο κύριος αυξητικός αιμοποιητικός παράγοντας, διεγείρει την ερυθροποίηση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής, νεογνικής κι ενήλικης ζωής και η υποξία αποτελεί το κυρίαρχο φυσιολογικό ερέθισμα για την παραγωγή της. Παλαιότερη βιβλιογραφία υποστήριζε ότι το γονίδιο της *EPO* επάγονταν σε συνθήκες υποξίας από τον HIF-1, διότι ο HIF-1 ανακαλύφθηκε έπειτα από ανάλυση του μοριακού μηχανισμού επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης από την υποξία (Semenza, GL and Wang, GL 1992, Semenza, GL 2007). Ωστόσο, στη συνέχεια αποδείχτηκε με *in vivo* και *in vitro* πειράματα ότι ο HIF-2 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της επαγωγής της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας στα νεφρά και στο ήπαρ (Haase 2010). Συγκεκριμένα, βιώσιμα ενήλικα ποντίκια *HIF-2α^{-/-}* παρουσίαζαν, εκτός των άλλων, αναιμία και εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα νεφρικής και ηπατικής ερυθροποιητίνης (Scortegagna, M et al., 2003, Scortegagna, M et al., 2005, Gruber, M et al., 2007, Rankin, EB et al., 2007). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της *EPO* σε συνθήκες υποξίας εξαρτάται από τον HIF-2α και όχι από τον HIF-1 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B, κύτταρα νευροβλαστώματος Kelly και σε αστροκύτταρα (Warnecke, C et al., 2004, Chavez, JC et al., 2006, Rankin, EB et al., 2007). Στη παρούσα διατριβή, αρχικά, βρέθηκε με πειράματα αποσιώπησης των HIF-1α και HIF-2α, ότι η μεταγραφή της *EPO* σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 ρυθμίζεται αποκλειστικά από τον ο HIF-2. Επιπλέον, με την ίδια πειραματική προσέγγιση, ότι η μεταγραφή του γονιδίου της *PGK* ρυθμίζεται μόνο από τον HIF-1. Κατά συνέπεια, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα Huh7 μπορεί να αξιολογηθεί με τη μέτρηση των επιπέδων mRNA της *EPO*, και αντίστοιχα η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με την μέτρηση των επιπέδων mRNA του *PGK*.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 παρουσία κοβαλτίου ή σε συνθήκες υποξίας και συγκρίθηκε με εκείνη του HIF-1 στις ίδιες συνθήκες. Παρατηρήθηκε ότι το κοβάλτιο, σε αντίθεση με την υποξία, δεν μπορεί να επάγει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 μεταγραφή της *EPO* σε κύτταρα Huh7. Επίσης, το

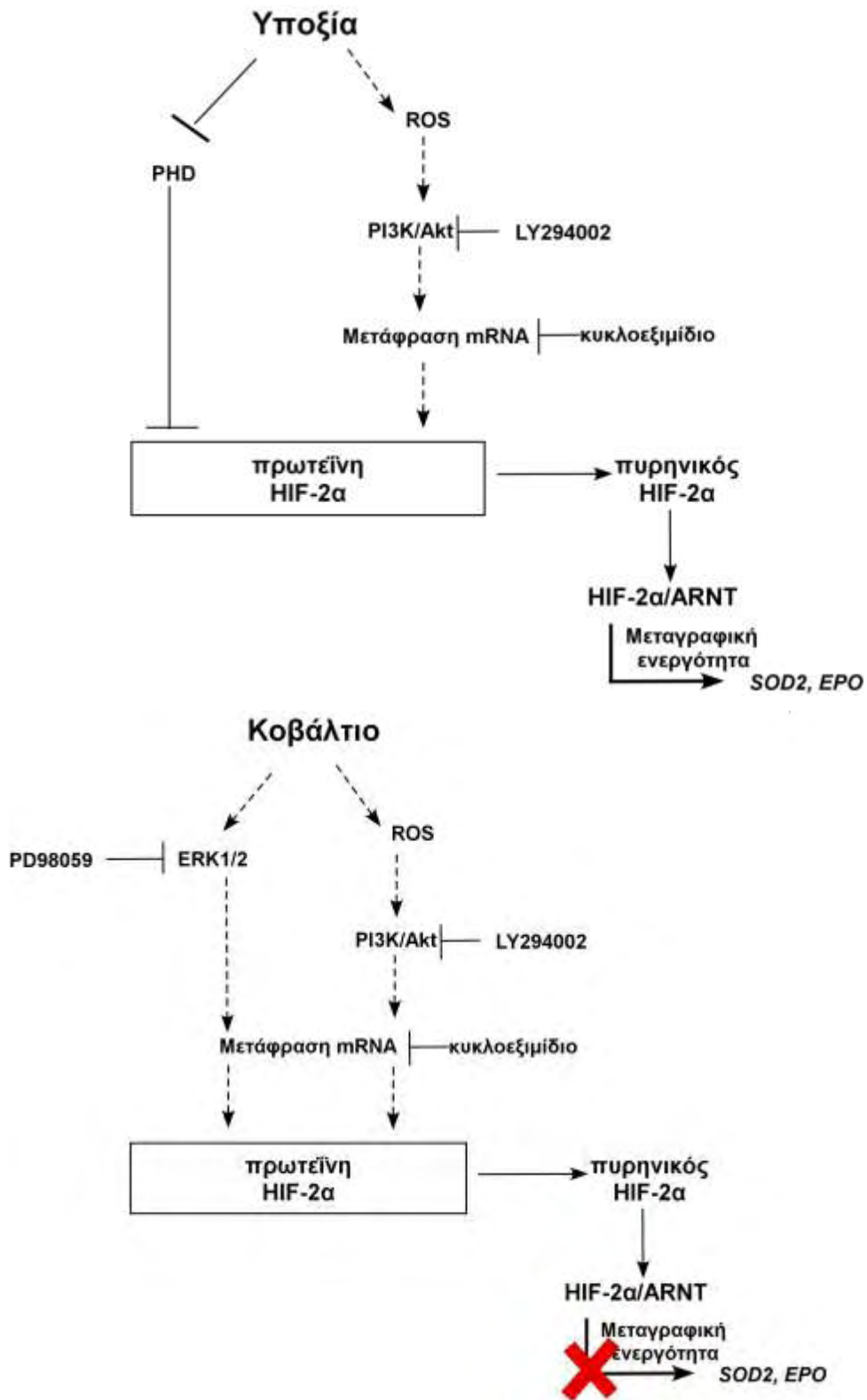
κοβάλτιο αναστέλλει την προκαλούμενη από την υποξία επαγωγή της μεταγραφής του *EPO*, όταν γίνεται ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του κοβαλτίου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η ανασταλτική δράση του κοβαλτίου στη μεταγραφή του *EPO* συνοδεύεται και από την αναστολή της εκκρινόμενης *EPO*, η οποία ρυθμίζεται ειδικά από τον HIF-2α σε κύτταρα Huh7. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, σε αντίθεση με του HIF-2, δεν αναστέλλεται από το κοβάλτιο. Συγκεκριμένα, το κοβάλτιο, όπως και η υποξία, επάγει την εξαρτώμενη από τον HIF-1 μεταγραφή του *PGK* και η ταυτόχρονη δράση του κοβαλτίου με την υποξία φαίνεται να είναι αθροιστική.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο μηχανισμός της επαγωγής των HIF-1 και HIF-2 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου. Προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η ανασταλτική δράση του κοβαλτίου στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 αποτελεί ένα καθολικό φαινόμενο ή είναι ειδικό για τα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, μελετήθηκε η επαγωγή του HIF-2 σε μία άλλη σειρά ηπατοκαρκινώματος τα κύτταρα HepG2, καθώς και σε μη ηπατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως στα καρκινικά κύτταρα του λάρυγγα Hep2 και σε κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos2. Αρχικά, βρέθηκε ότι και οι τρεις κυτταρικές σειρές εκφράζουν τους HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και παρουσία κοβαλτίου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το κοβάλτιο, όπως και η υποξία, επάγει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και του HIF-1 σε αυτά τα κύτταρα. Συνεπώς, το κοβάλτιο δρα διαφορετικά σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και σε μη ηπατικά καρκινικά κύτταρα και αναστέλλει ειδικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 στα ηπατικά κύτταρα.

Το κοβάλτιο χρησιμοποιείται ευρέως ως «μιμητής» της υποξίας για την μελέτη της επαγωγής της έκφρασης και μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs. Έτσι, το γεγονός ότι ο HIF-2 που επάγεται παρουσία κοβαλτίου στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος δεν είναι μεταγραφικά ενεργός, προκάλεσε ιδιαίτερη έκπληξη. Βέβαια, η έκφραση μεταγραφικά ανενεργού HIF-2α έχει παρατηρηθεί σε εμβρυϊκά κύτταρα ινοβλαστών ποντικίου, στα οποία όμως ο HIF-2α δεν μετατοπίζεται στο πυρήνα αλλά παρέμενε στο κυτταρόπλασμα χωρίς όμως να αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα (Park, SK et al., 2003). Αυτό, ωστόσο, δεν συμβαίνει στην περίπτωση του κοβαλτίου, όπου παρατηρείται είσοδος του HIF-2α στον πυρήνα των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος. Μία άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι ο πυρηνικός HIF-2α διμερίζεται με τον ARNT, και το σύμπλοκο HIF-2/ARNT συνδέεται στα HRE των γονιδίων στόχων χωρίς όμως να επάγει την μεταγραφή τους. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, η αναστολή της δράσης του HIF-2 πιθανόν να οφείλεται σε παρεμπόδιση

της αλληλεπίδρασης του HIF-2 με τα στοιχεία της μεταγραφής μέσω ενός ειδικού καταστολέα του HIF-2α (Hu, CJ et al., 2006). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ακόμη ότι για τη βέλτιστη και κυτταροειδική ρύθμιση των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2 απαιτείται η συνεργασία του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, ο HIF-2α αλληλεπιδρά με πολλά μέλη της οικογένειας των ETS, όπως με τον Ets-1 και τον Elk-1, κάτι το οποίο προσδίδει εξειδίκευση στην ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Aprelikova, O et al., 2006), (Elvert, G et al., 2003, Hu, CJ et al., 2007, Le Bras, A et al., 2007). Ένας άλλος μεταγραφικός συνενεργοποιητής που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-2α είναι ο NF-kB essential modulator (NEMO), ο οποίος ενισχύει μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 βοηθώντας στην καλύτερη στρατολόγηση του CBP/p300 (Bracken, CP et al., 2005). Επίσης, η αποκετυλίωση του HIF-2α από την σιρτουΐνη-1 αυξάνει την εξαρτώμενη από τον HIF-2 σύνθεση της EPO in vivo και in vitro (Dioum, EM et al., 2009). Επιπλέον μία πολύ πρόσφατη μελέτη, έδειξε για πρώτη φορά ότι ο USF2 είναι απαραίτητος για την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-2, όπως της EPO, του PAI-1 και του CITED-2 στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και στελεχιαία εμβρυϊκά κύτταρα (Pawlus, MR et al., 2012). Συνεπώς, το κοβάλτιο θα μπορούσε να δρα αναστέλλοντας οποιοδήποτε από τους παραπάνω μηχανισμούς στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2.

Συνοψίζοντας, η υποξία φαίνεται να επάγει μεταγραφικά ενεργό HIF-2 σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη, η έκφραση της οποίας όμως απαιτεί συνεχιζόμενη πρωτεϊνοσύνθεση και εξαρτάται από τα ROS και το μονοπάτι της PI3k/Akt (Εικόνα 82). Ωστόσο, το κοβάλτιο φαίνεται να επάγει την έκφραση του HIF-2α ενεργοποιώντας τη μετάφραση του mRNA του με συμμετοχή των ROS και των μονοπατιών της PI3K και των ERK1/2. Παρόλο αυτά, το κοβάλτιο δεν επάγει την μεταγραφή των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2α όπως του SOD2 και της EPO σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Εικόνα 82), αλλά μόνο την μεταγραφή του ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-1α, PGK. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η «χημική» υποξία όπως το κοβάλτιο δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμη με την πραγματική μειωμένη συγκέντρωση του οξυγόνου, παρόλο που και οι δύο συνθήκες επάγουν την έκφραση του HIF-2α.



Εικόνα 82: Σχηματικά μοντέλα του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τη υποξία και το κοβάλτιο σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

4.3. Μελέτη της μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του HIF-2α

Οι HIF-1α και HIF-2α ρυθμίζονται από διάφορους οξυγονο-εξαρτώμενους και οξυγονο-ανεξάρτητους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς, υποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα της προσαρμογής των κυττάρων στα διάφορα ερεθίσματα. Η οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση φαίνεται πως είναι κοινή για τους HIF-1α και HIF-2α. Όσον αφορά τις οξυγονο-ανεξάρτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, σουμυλίωση, S-νιτροζυλίωση και φωσφορυλίωση, υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι άλλες είναι ειδικές για τον HIF-1α και άλλες ειδικές για τον HIF-2α. Ίσως αυτό εξηγεί και ένα μέρος της διαφορετικής τους λειτουργίας. Ωστόσο, η μετα-μεταφραστική ρύθμιση του HIF-2α δεν έχει επαρκώς μελετηθεί. Γενικά αποδίδονται στον HIF-2α μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α λόγω της μεγάλης τους ομολογίας. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζεΐνης 1 και την κινάση ERK1/2, δύο κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν τον HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008, Kalousi, A et al., 2010).

4.3.1. Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από την κινάση της καζεΐνης 1 (CK1).

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου αποκαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α από τη φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στην PAS-B περιοχή της αμινοτελικής του επικράτειας και στη σερίνη 247 της αλληλουχίας ²⁴⁴SRHS²⁴⁷ από την CK1δ. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 247 του HIF-1α από την CK1δ εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT οδηγώντας σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1 (Kalousi, A et al., 2010). Ο HIF-1α και ο HIF-2α παρουσιάζουν 74% ομολογία στην PAS-B περιοχή τους και επιπλέον η ίδια αλληλουχία που αναγνωρίζει η CK1 στον HIF-1α υπάρχει και στον HIF-2α (²⁴⁶SRHS²⁴⁹), η οποία συμφωνεί με τη γενικότερη ομόφωνη αλληλουχία S/T(P)-X1-2-S/T που αναγνωρίζει η CK1. Επίσης δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να συσχετίζουν την CK1 με τον HIF-2α. Για αυτό στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά η πιθανή ρύθμιση του HIF-2α από την CK1 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

Αρχικά, βρέθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας δεν επηρεάστηκε από την αναστολή της CK1, είτε αυτή γίνεται με τη χρήση ειδικών χημικών αναστολέων της CK1δ είτε με εξειδικευμένη αποσιώπηση της δ ισομορφής με

siRNA. Η αναστολή της CK1 προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 αυξάνοντας την μεταγραφή από τον υποκινητή του *SOD2* σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της ενεργής μορφής της CK1δ, μείωσε σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, ενώ η υπερέκφραση της ανενεργούς μορφής της CK1δ (K38M) δεν την επηρέασε σημαντικά. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 επηρεάζεται αρνητικά από την CK1 χωρίς να επηρεάζεται η έκφραση του HIF-2α. Επίσης, φαίνεται ότι η καταλυτική δράση της κινάσης είναι απαραίτητη για την αναστολή της δράσης του HIF-2. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τον μηχανισμό δράσης της CK1 στον HIF-1α (Kalousi, A et al., 2010).

Η Ser²⁴⁷ του HIF-1α της αλληλουχίας ²⁴⁴SRHS²⁴⁷ είναι αυτή που φωσφορυλιώνεται από την CK1δ. Η αντίστοιχη αλληλουχία στον HIF-2α είναι η ²⁴⁶SRHS²⁴⁹ με την Ser²⁴⁹ ως πιθανή υποψήφια σερίνη για φωσφορυλίωση από την CK1. Για να ελεγχθεί αυτό, πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη της σερίνης 249 του HIF-2α σε αλανίνη (S249A), ένα αμινοξύ το οποίο δεν φωσφορυλιώνεται. Επίσης, έγινε μετατροπή της ίδιας σερίνης του HIF-2α σε ασπαρτικό (S249D). Η καρβοξυλική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού είναι δυνατό να «μμηθεί» το αρνητικό φορτίο της φωσφορικής ομάδας που προστίθεται στη σερίνη κατά τη φωσφορυλίωση και για αυτό η μετάλλαξη S249D ορίζεται ως φωσφομιμητική μετάλλαξη. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α που έφερε τις δύο αντίστοιχες μεταλλάξεις σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλαγμένες μορφές HIF-2α-S249A και HIF-2α-S249D είχαν παρόμοια αποτελέσματα έκφρασης και εντοπίζονταν στο πυρήνα όπως ο μη μεταλλαγμένος «άγριου τύπου» HIF-2α. Κατόπιν, μελετήθηκε η επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α στην μεταγραφή της *EPO* καθώς και στα εκκρινόμενα επίπεδα της ερυθροποιητίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Παρατηρήθηκε ότι η μετατροπή της σερίνης 249 σε αλανίνη αύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, αυξάνοντας σημαντικά τα επίπεδα mRNA της *EPO*, ενώ η μορφή του HIF-2α με τη φωσφομιμητική μετάλλαξη S249D μείωσε σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, μειώνοντας τα επίπεδα mRNA της *EPO* καθώς και τα εκκρινόμενα επίπεδα της *EPO*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1, και αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι πιθανόν ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την CK1 στη σερίνη 249. Για να αποδειχθεί αυτό, απαραίτητο είναι η περαιτέρω επιβεβαίωση με πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης.

Η προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου είχε αποδείξει ότι η CK1δ επηρεάζει αρνητικά τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT οδηγώντας σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1 (Kalousi, A et al., 2010). Αν και οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν 74% ομολογία στην PAS-B περιοχή τους, βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο HIF-1α συνδέεται πιο ισχυρά με τον ARNT από ότι ο HIF-2α, το οποίο ενισχύει τους διαφορετικούς ρόλους που έχουν στην επαγωγή διαφορετικών γονιδίων (Konietzny, R et al., 2009). Μια άλλη μελέτη, επίσης αναφέρει την εύρεση διαφόρων μορίων-τεχνητών προσδεμάτων που συνδέονται στην PAS-B περιοχή του HIF-2α, και όχι του HIF-1α, και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του με τον ARNT (Scheuermann, TH et al., 2009). Επιπλέον, έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία ότι η PAS-B περιοχή του HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση D1 (PKD1) στη θρεονίνη 324, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1, αλλά ενισχύοντας την αλληλεπίδραση του με την MYC. Η φωσφορυλίωση αυτή δεν συμβαίνει στο μόριο του HIF-1α και η αλληλεπίδρασή του με την Sp1 δεν επηρεάζεται (To, KK et al., 2006). Ο ακριβής μηχανισμός της αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 από την CK1 δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί. Η CK1 εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ρυθμίζοντας αναπτυξιακές διαδικασίες, στο μονοπάτι των κερκάδιων ρυθμών, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της τροποποίησης της p53, στην απόπτωση και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την CK1 αποτελεί την πρώτη απόδειξη ότι η CK1 παίζει ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία (Kalousi, A et al., 2010). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ενισχύουν τον ρυθμιστικό ρόλο της CK1 στο μονοπάτι της υποξίας και για πρώτη φορά δείχνεται ότι η CK1 μέσω φωσφορυλίωσης ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.

4.3.1. Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τις κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK1/2)

Στη παρούσα διατριβή, κατά την διερεύνηση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 δεν επηρέασε τα αυξημένα από την υποξία πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α. Το αποτέλεσμα αυτό δεν αποτέλεσε έκπληξη επειδή παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και για τον

HIF-1α. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 δεν επηρεάζει την έκφραση και την σταθερότητα του HIF-1α, ούτε την σύνδεση του HIF-1α στο DNA. Το μονοπάτι των ERK1/2 ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (Hur, E et al., 2001, Sutton, KM et al., 2007, Mylonis, I and Simos, G 2012). Είναι γνωστό ότι ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, και μελέτες του εργαστηρίου αποκάλυψαν τις ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης καθώς και τον ρόλο αυτής. Συγκεκριμένα, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στις σερίνες 641 και 643 από τις ERK1/2 και βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής είναι να «καλύπτει» ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES), αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008). Με αυτό τον τρόπο, ο φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 HIF-1α παραμένει στον πυρήνα και μπορεί να προσδεθεί με τον ARNT για να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Με βάση αυτές τις μελέτες και το γεγονός ότι ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος αποτελεί παράδειγμα καρκίνου που παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού Ras-MAPK-ERK, αποδείχτηκε ενδιαφέρον η μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από το μονοπάτι των ERK1/2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7.

Για την μελέτη του μονοπατιού των ERK1/2 εκτός από τους γνωστούς ειδικούς αναστολείς, PD98059 και U0126, χρησιμοποιήθηκε και η καμφερόλη, η οποία είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές που έχει απομονωθεί από το τσάι, το μπρόκολο, το γκρέιπφρουτ, και άλλες φυτικές πηγές. Η καμφερόλη έχει αντιοξειδωτική, αντι-φλεμμονώδη, αντι-μικροβιακή καθώς και αντικαρκινική δράση μέσω αναστολής διάφορων μονοπατιών όπως και του NFκB (Calderon-Montano, JM et al., 2011). Μία πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου αποκάλυψε τη δράση της καμφερόλης ως αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2 με $IC_{50} = 4,75 \mu M$. Μέσω αυτής τη δράσης, η καμφερόλη αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Mylonis, I et al., 2010).

Αρχικά, στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 με χρήση των αναστολέων PD98059 ή U0126 ή καμφερόλης δεν επηρέασε τα αυξημένα από την υποξία πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος με τρεις διαφορετικούς τρόπους, μετρώντας α) την μεταγραφή από

τον υποκινητή του *SOD2*, β) τα επίπεδα mRNA της *EPO* και γ) τα εκκρινόμενα επίπεδα της *EPO*. Παρατηρήθηκε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 μειώθηκε σε συνθήκες υποξίας παρουσία των αναστολέων του μονοπατιού των ERK1/2. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία, εκτός από την γενική παραδοχή ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 μειώνει τη δράση του HIF-1 (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2010, Mylonis, I et al., 2012), με μία παλιά μελέτη που υποστηρίζει ότι το μονοπάτι των ERK1/2 εμπλέκεται στην επαγωγή της δραστηριότητας του HIF-2 σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος των επινεφριδίων αρουραίου (Conrad, PW et al., 1999). Η ίδια μελέτη επίσης αναφέρει ότι οι ERK1/2 δε φωσφορυλιώνουν τον HIF-2α αλλά ρυθμίζουν την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από την καλμοδουλίνη (Conrad, PW et al., 1999). Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν άλλες αναφορές για την επίδραση του μονοπατιού των ERK1/2 στη δράση του HIF-2.

Η συνέχεια της διερεύνησης του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τις ERK1/2 στηρίχτηκε στις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου που, όπως ειπώθηκε παραπάνω, αναφέρουν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 ενισχύει την παραμονή του στον πυρήνα και την μετέπειτα δράση του (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008). Για να εξακριβωθεί εάν συμβαίνει το ίδιο στον HIF-2α, μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α υπό την επίδραση των αναστολέων του μονοπατιού των ERK1/2 ή και με ταυτόχρονη επίδραση της λεπτομυκίνης B, ειδικό αναστολέα της CRM1/εξπορτίνης 1, σε συνθήκες υποξίας. Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 σε συνθήκες υποξίας προκαλεί μείωση του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-2α και παράλληλη αύξηση του στο κυτταρόπλασμα, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία της λεπτομυκίνης B επανασυγκεντρώνει τον HIF-2α στον πυρήνα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι οι ERK1/2 συμβάλουν στη διατήρηση του HIF-2α στον πυρήνα μειώνοντας τον ρυθμό πυρηνικής εξαγωγής και φαίνεται να είναι παρόμοιο με το μηχανισμό δράσης των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α.

Στη παρούσα διατριβή, αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά ότι οι ERK1/2 ενισχύουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 επιδρώντας στη μεταφορά του HIF-2α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την διατήρηση του στον πυρήνα. Η ρύθμιση της εξόδου του HIF-2α από τον πυρήνα από το μονοπάτι των ERK1/2, γεγονός αρκετά σύνηθες σε πυρηνικές πρωτεΐνες και ιδιαίτερα σε μεταγραφικούς παράγοντες, μπορεί να είναι είτε έμμεση, μέσω φωσφορυλίωσης κάποιας πρωτεΐνης, είτε άμεση μέσω φωσφορυλίωσης του ίδιου του HIF-2α, πιθανόν επηρεάζοντας σήματα πυρηνικής εξόδου

του HIF-2α. Γενικά, η μεταφορά μίας πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα προϋποθέτει μία ή περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη οι οποίες ονομάζονται σήματα πυρηνικής εξόδου (nuclear export signals, NES) τα οποία αναγνωρίζονται από την CRM1/εξπορτίνη 1. Επομένως ο HIF-2α για να εξέλθει από τον πυρήνα θα πρέπει να έχει ένα ή περισσότερα NES, τα οποία ωστόσο δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστά.

Στη συνέχεια, για να χαρτογραφηθεί η περιοχή που πιθανόν περιέχει σήμα πυρηνικής εξόδου και πιθανόν επηρεάζεται από το μονοπάτι των ERK1/2, προσδιορίστηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός επιμέρους τμημάτων του HIF-2α υπό την επίδραση καμφερόλης, η οποία ανέστειλε το μονοπάτι των ERK1/2, μόνη της ή μαζί με λεπτομυκίνη Β σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι τα τμήματα του HIF-2α που μελετήθηκαν δεν εντοπίστηκαν όλα αποκλειστικά στον πυρήνα όπως ο πλήρους μεγέθους HIF-2, αλλά μόνο τα πρωτεϊνικά τμήματα 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820. Τα υπόλοιπα τμήματα, που δεν περιλαμβάνουν το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α, βρίσκονταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα παρά στον πυρήνα. Το αποτέλεσμα αυτό μαρτυρά την ύπαρξη ενός ή περισσότερων σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Στο μόριο του HIF-2α έχουν αναγνωριστεί βάσει ομολογίας αλληλουχιών δύο NLS, ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 14-50) το οποίο είναι δομικά όμοιο με αυτό της νουκλεοπλασμίνης και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 705-742) το οποίο θεωρούνταν ότι είναι ανάλογο με αυτό του SV40 (Kallio, PJ et al., 1998), ενώ άλλοι απέδειξαν ότι είναι ένα διμερές NLS (bipartite-type NLS) που αποτελείται από δύο περιοχές βασικών αμινοξέων, και όχι από μία, και τα ενδιάμεσα αμινοξέα από τις δυο αυτές βασικές περιοχές είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του NLS (Luo, JC and Shibuya, M 2001). Ωστόσο έχει δειχθεί πειραματικά ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS είναι λειτουργικό και αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των αμπορτινών (Depping, R et al., 2008). Επομένως, μόνο τα καρβοξυτελικά τμήματα του HIF-2α τα οποία περιέχουν το καρβοξυτελικό και λειτουργικό NLS εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος.

Η διερεύνηση συνεχίστηκε μόνο με τα πρωτεϊνικά τμήματα 1-820, 366-870, 366-820, 542-870 και 542-820 του HIF-2α, από τα οποία, μόνο τα τμήματα 1-820, 366-870 και 366-820 επηρεάστηκαν από την αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 με καμφερόλη και εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα, όπως και ο πλήρης μεγέθους HIF-2α, ενώ τα τμήματα 542-870 και 542-820 δεν επηρεάστηκαν από την αναστολή του μονοπατιού των

ERK1/2 με καμφερόλη και παρέμειναν στο πυρήνα. Η ταυτόχρονη δράση της καμφερόλης με λεπτομυκίνη B, επανασυγκέντρωσε τα τμήματα 1-820, 366-870 και 366-820 καθώς και τον πλήρη μεγέθους HIF-2α στον πυρήνα των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος. Επομένως, η περιοχή 366-542 πιθανόν να περιέχει ένα ή περισσότερα NES τα οποία επηρεάζονται άμεσα ή έμμεσα από την δράση των ERK1/2.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε ολόκληρη η πρωτεϊνική αλληλουχία του HIF-2α καθώς και η περιοχή 366-542 του HIF-2α με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής NetNES 1.1 Server, το οποίο προβλέπει πλούσια σε λευκίνη NES (la Cour, T et al., 2004) καθώς και με το πιο πρόσφατο πρόγραμμα NESsential το οποίο εκτός από τη πρωτοταγή δομή λαμβάνει υπόψη και εγγενείς αναδιαμορφώσεις της πρωτεΐνης (Fu, SC et al., 2011). Τα αποτελέσματα των προγραμμάτων αυτών προτείνουν διάφορες πιθανές αλληλουχίες NES, ωστόσο αυτές που εντοπίζονται στην περιοχή 366-542 αναφέρονται στα αποτελέσματα (βλέπε, Αποτελέσματα, Εικόνα 65). Επίσης, με προγράμματα βιοπληροφορικής όπως το ELM αναζητήθηκαν αλληλουχίες που περιέχουν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Όλες οι αλληλουχίες που βρέθηκαν στον HIF-2α βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 403-793 (βλέπε, Αποτελέσματα, Εικόνα 66). Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των προγραμμάτων βιοπληροφορικής υποδεικνύει ότι η περιοχή 366-542 του HIF-2α περιέχει πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, οι οποίες εντοπίζονται είτε πολύ κοντά είτε αλληλεπικαλύπτονται με αλληλουχίες με πιθανά NES. Εάν, πράγματι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 σε κάποια ή κάποιες από αυτές τις θέσεις θα πρέπει να διερευνηθεί με πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης στα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα του HIF-2α και οι κινάσες ERK1/2 ως ένζυμο.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα από τα πειράματα μελέτης της μεταγραφικής ενεργότητας και υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2, αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι το μονοπάτι των ERK1/2 ενισχύει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-2 διατηρώντας τον στο πυρήνα. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος και πιθανόν να συσχετίζονται με τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την υπεραγγειακή του φύση που ενισχύεται από το συνεχώς ενεργό μονοπάτι Ras-MAPK-ERK και τη συμμετοχή του HIF-2α.

4.3. Μελέτη της επίδρασης της αναστολής του πρωτεασώματος στην επαγωγή των HIF-1 και HIF-2

Είναι γνωστό ότι η λειτουργία του πρωτεασώματος αποτελεί το κύριο τρόπο αποικοδόμησης των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας, μέσω αλληλεπίδρασης με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL, η οποία είναι συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Επομένως, η αναστολή του πρωτεασώματος θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των HIF-1α και HIF-2α, και κατόπιν την είσοδό τους στον πυρήνα και την επαγωγή των γονιδίων στόχων τους. Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία και η αναστολή του έχει εδραιωθεί ως ισχυρή και υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο αναστολέας του πρωτεασώματος βορτεζομίδη, ο οποίος έχει εγκριθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και σε ασθενείς με λέμφωμα στα κύτταρα μανδύα (Mantle Cell Lymphoma). Η αντικαρκινική δράση της βορτεζομίδης έχει μελετηθεί σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα με διάφορους τύπους καρκινικού όγκου όπως ο καρκίνος του προστάτη (Papandreou, CN and Logothetis, CJ 2004, Chen, D et al., 2011) και βρέθηκε ότι η παρουσία της βορτεζομίδης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF και αναστέλλει την αγγειογένεση (Williams, S et al., 2003). Το αποτέλεσμα αυτό είναι παράδοξο από τη στιγμή που η χρήση ενός αναστολέα πρωτεασώματος σε καρκινικά κύτταρα όπως του προστάτη αναμένεται να προκαλέσει σταθεροποίηση των HIFs και κατά συνέπεια αύξηση της έκφρασης του VEGF. Επιπλέον είναι γενικά αποδεκτό ότι ο καρκίνος του προστάτη εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α σε σύγκριση με το φυσιολογικό επιθήλιο του προστάτη. Για το λόγο αυτό στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης της βορτεζομίδης στην έκφραση και στην δραστικότητα του HIF-1α και του HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη.

Η επίδραση της βορτεζομίδης μελετήθηκε σε δύο καλά χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη, τα κύτταρα LNCaP και τα κύτταρα PC3. Τα κύτταρα LNCaP αποτελούν ένα μοντέλο ορμονο-εξαρτώμενου, μη μεταστατικού και ήπιας μορφής καρκίνου που εκφράζει τον «αγρίου» τύπου p53, αντιπροσωπεύοντας τα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη. Τα κύτταρα PC3, που δεν εκφράζουν την p53, αποτελούν μοντέλο ορμονο-ανεξάρτητου και επιθετικής μορφής καρκίνου, αντιπροσωπεύοντας τα προχωρημένα στάδια του καρκίνου του προστάτη (Voutsadakis,

IA and Papandreou, CN 2012). Τα αρχικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α εκφράζεται οριακά, ενώ ο HIF-1α εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα LNCaP και PC3. Αυτό πιθανόν να υποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3 και για αυτό η μελέτη επικεντρώθηκε σε αυτόν.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν τα μονοπάτια που ενέχονται στην επαγωγή του HIF-1 στα ίδια κύτταρα, και βρέθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας το μονοπάτι της PI3K/Akt/mTOR εμπλέκεται στην επαγωγή τόσο της έκφρασης όσο και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 ρυθμίζεται και από το μονοπάτι των ERK1/2. Βιβλιογραφικές αναφορές επίσης υποστηρίζουν ότι ο καρκίνος αυτός χαρακτηρίζεται από απάλωψη ή μετάλλαξη της PTEN, με αποτέλεσμα η συνεχώς ενεργή Akt να προκαλεί αύξηση στην έκφραση του HIF-1α (Jiang, BH et al., 2001, Majumder, PK et al., 2004), (Fang, J et al., 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη συμμετέχει άμεσα ή έμμεσα το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/MAPK (McCubrey, JA et al., 2007, Ruscica, M et al., 2007), το οποίο είναι υπεύθυνο τόσο για τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α όσο και την επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε άλλους τύπους καρκινικών κυττάρων (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008).

Η μελέτη του μηχανισμού δράσης της βορτεζομίδης στην έκφραση του HIF-1α σε κύτταρα LNCaP και PC3, αποκάλυψε ότι η βορτεζομίδα μειώνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1α μέσω αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/p70S6K/S6RP και στις δύο κυτταρικές σειρές. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η βορτεζομίδα μπορεί να αναστείλει το μονοπάτι της PI3K/Akt και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Chen, KF et al., 2008, Yang, F et al., 2012), αλλά για πρώτη φορά με την παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι η βορτεζομίδα μέσω του μονοπατιού αυτού μειώνει την έκφραση του HIF-1α. Ωστόσο, υπάρχει μία μελέτη που υποστηρίζει ότι η μετάφραση και έκφραση του HIF-1α αναστέλλεται από την βορτεζομίδα μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 2α (eIF2α) σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη (Zhu, K et al., 2009).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν, επίσης, ότι η βορτεζομίδα αναστέλλει, εκτός από το μονοπάτι της PI3K/Akt, και το μονοπάτι των ERK1/2 στα

κύτταρα LNCaP και PC3. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας, η βορτεζομίδη προκαλεί μείωση του πυρηνικού εντοπισμού του HIF-1α με παράλληλη αναστολή της ενεργότητας των ERK1/2 και αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-1 στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, η παρουσία της βορτεζομίδης σε συνθήκες υποξίας μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα LNCaP και PC3. Αν και έχουν γίνει διάφορες μελέτες για τη δράση της βορτεζομίδης στην ERK1/2 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου όπως στον καρκίνο του μαστού (Codony-Servat, J et al., 2006), σε λευχαιμία (Esparis-Ogando, A et al., 2005, Zhou, X et al., 2013) και σε πολλαπλό μυέλωμα (Hideshima, T et al., 2003), τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, που αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο της συζήτησης, και υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 ενισχύει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω της διατήρησης του HIF-1α στον πυρήνα, ενώ η αναστολή αυτής της φωσφορυλίωσης οδηγεί σε εξαρτώμενη από την CRM1 έξοδο του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και μείωσης της δράσης του (Mylonis, I et al., 2006, Mylonis, I et al., 2008, Triantafyllou, A et al., 2008, Mylonis, I et al., 2010).

Επίσης, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της βορτεζομίδης που χρησιμοποιήθηκαν μειώνουν την πρωτεασωμική δραστηριότητα των κυττάρων LNCaP και PC3 σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε συνθήκες υποξίας. Ως επακόλουθο αυτής της μείωσης της δράσης του πρωτεασώματος αναμένονταν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α μέσω αναστολής της αποικοδόμησης του. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του HIF-1α στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δράση της βορτεζομίδης στον HIF-1α είναι ανεξάρτητη της σταθεροποίησης του. Αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι η βορτεζομίδη αναστέλλει τα μονοπάτια της PI3K/Akt και των ERK1/2, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκφραση της πρωτεΐνης και τη δραστηριότητα του HIF-1α, αντίστοιχα, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη. Η βορτεζομίδη πιθανόν δρα στα μονοπάτια αυτά είτε άμεσα ως αναστολέας κινασών, είτε έμμεσα μέσω άγνωστων, μέχρι στιγμής, πρωτεϊνών που δεν αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα εξαιτίας της βορτεζομίδης.

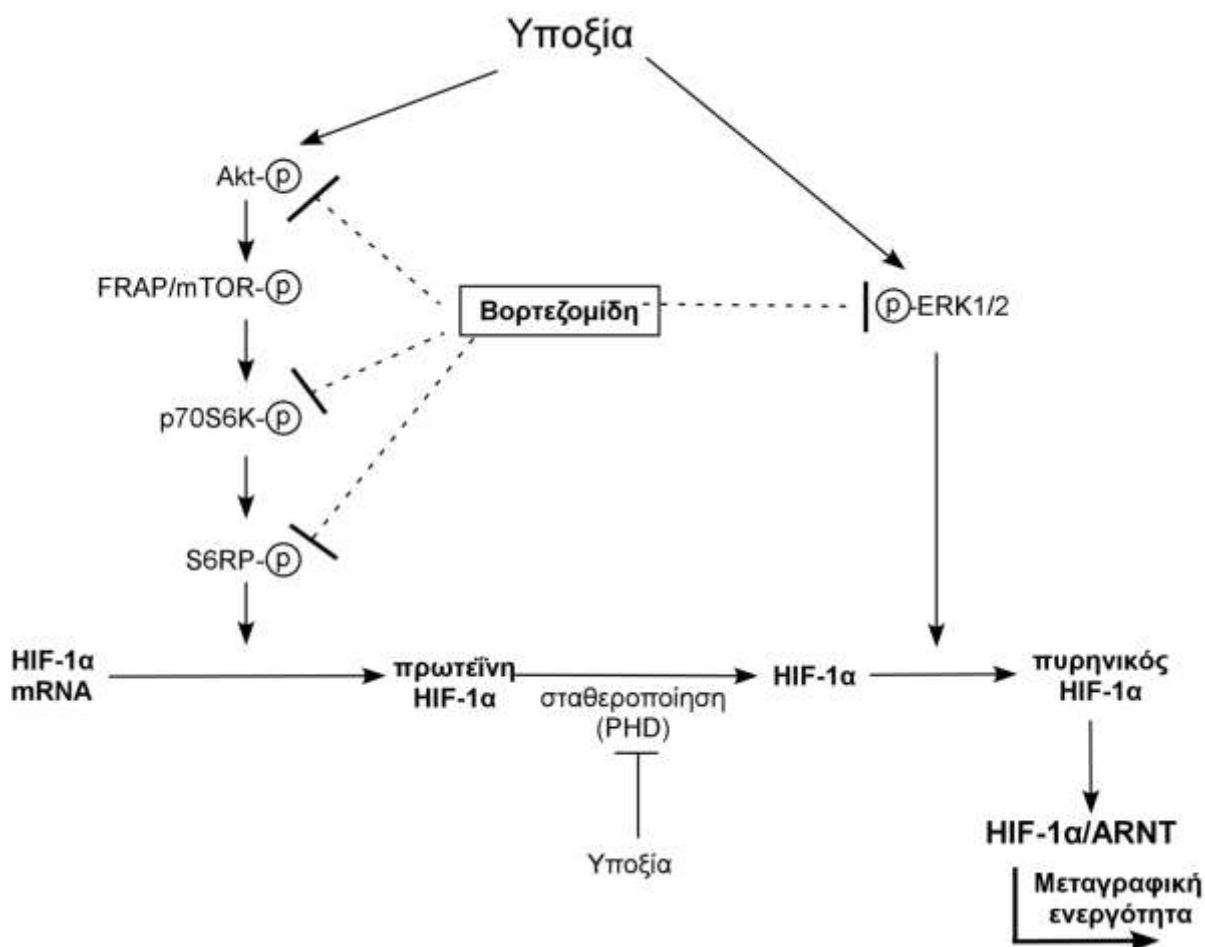
Για την αναστολή της δράσης του HIF-1 από τη βορτεζομίδη έχουν προταθεί και άλλοι μηχανισμοί, οι οποίοι δεν είναι πλήρως κατανοητοί και τα αποτελέσματα των μελετών αντιφατικά. Συγκεκριμένα, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, οστεοσαρκώματος και γλοιώματος βρέθηκε ότι η βορτεζομίδη αναστέλλει την

μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω αναστολής της C-TAD περιοχής χωρίς να επηρεάζεται η σύνδεση του HIF-1 με τον συμπαράγοντα της μεταγραφής p300 (Kaluz, S et al., 2006, Birle, DC and Hedley, DW 2007). Ενώ, σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, υποστηρίζεται ότι η βορτεζομίδη ενισχύει την σύνδεση του FIIH με τον HIF-1α εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-1 με τον p300 και προκαλώντας την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (Shin, DH et al., 2008). Τα αποτελέσματα, όμως, της παρούσας διατριβής αποδεικνύουν ότι η βορτεζομίδη δρα σε πιο πρώιμο στάδιο μειώνοντας τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα LNCaP και τα PC3 εμφάνισαν κάποια διαφορετικά χαρακτηριστικά που αντιπροσωπεύουν την ορμονο-εξαρτώμενη και ορμονο-ανεξάρτητη αντίστοιχα κατάσταση του καρκίνου του προστάτη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα PC3, και όχι τα LNCaP, εκφράζουν χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α στη νορμοξία. Μία πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι τα κύτταρα PC3 λόγω της επιθετικής τους μορφής και του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού, παρουσιάζουν έναν ενεργό HIF-1α ακόμη και στη νορμοξία (Zhong, H et al., 2004). Επίσης, αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι τα κύτταρα PC3 δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και έκκρισης του VEGF σε συνθήκες υποξίας σε σύγκριση με τη νορμοξία, σε αντίθεση με τα κύτταρα LNCaP. Η αυξημένη δραστηριότητα του HIF-1 και η έκκριση του VEGF σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα LNCaP μπορεί να οφείλεται και, εν μέρει, στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt/HIF-1α από τα ανδρογόνα (Boddy, JL et al., 2005). Επιπλέον, η βορτεζομίδη καθώς και οι ειδικοί αναστολείς των μονοπατιών της PI3K και ERK1/2 ήταν λιγότερο αποτελεσματικοί στην αναστολή της επαγόμενης από την υποξία μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και της έκκρισης του VEGF σε κύτταρα PC3 σε σύγκριση με τα κύτταρα LNCaP, το οποίο μπορεί να οφείλεται επίσης στο προχωρημένο στάδιο και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη σε ορμονο-ανεξάρτητο.

Συνεπώς, για πρώτη φορά στη παρούσα διατριβή αποκαλύπτεται ο διπλός μηχανισμός δράσης της βορτεζομιδης σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη, αναστέλλοντας τα μονοπάτια της PI3K/Akt και των ERK1/2. Η ταυτόχρονη στόχευση και των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών θεωρείται πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη, στον οποίο τα μονοπάτια της PI3K/Akt/mTOR και των ERK1/2 συντονισμένα απορυθμίζονται (Kinkade, CW et al., 2008). Συνοψίζοντας, η βορτεζομίδη επιδρά αρνητικά στον HIF-1α με διπλό τρόπο, εφόσον ταυτόχρονα

αναστέλλει την εξαρτώμενη από την Akt πρωτεϊνική του σύνθεση και την εξαρτώμενη από τις ERK1/2 συγκέντρωση του στον πυρήνα γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-1 (Εικόνα 83). Τα νέα αυτά δεδομένα συνεισφέρουν στην κατανόηση της αντικαρκινικής δράσης της βορτεζομίδης και στηρίζουν την περαιτέρω κλινική εφαρμογή του στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.



Εικόνα 83: Σχηματικό μοντέλο του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-1α από τη βορτεζομίδα σε συνθήκες υποξίας σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη.

Πέρα από τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της βορτεζομίδης στη ρύθμιση του HIF-1α, μένει αναπάντητο το ερώτημα εάν η βορτεζομίδα δρα με παρόμοιο τρόπο στη ρύθμιση του HIF-2α. Για αυτό, στη συνέχεια έγιναν τα πρώτα βήματα της μελέτης του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τη βορτεζομίδα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, τα οποία εκφράζουν και τις δύο ισομορφές του HIF. Παρατηρήθηκε ότι η βορτεζομίδα δεν επηρέασε την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-2α αλλά

μείωσε τη μεταγραφική του ενεργότητα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Συγκεκριμένα, η βορτεζομίδη μείωσε τα επίπεδα μεταγραφής από τον υποκινητή του *SOD2* και την μεταγραφή της *EPO* σε συνθήκες υποξίας. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η βορτεζομίδη μειώνει τον εντοπισμό του HIF-2α στον πυρήνα με ταυτόχρονη αύξηση του στο κυτταρόπλασμα στα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, στο μηχανισμό δράσης της βορτεζομιδης στη ρύθμιση του HIF-2, πιθανόν δεν εμπλέκεται το μονοπάτι της PI3k/Akt επειδή δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση των επιπέδων της έκφρασης του HIF-2α. Ωστόσο, πολύ πιθανόν η βορτεζομίδη να αναστέλλει το μονοπάτι των ERK1/2 με αποτέλεσμα να μειώνεται ο πυρηνικός εντοπισμός του HIF-2α και η δραστηριότητα του. Παρόμοιο τρόπο δράσης με την βορτεζομίδη στην μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 έχει αποδειχθεί για τον ειδικό αναστολέα των ERK1/2, PD98059, καθώς και για την καμφερόλη, η οποία αναστέλλει επίσης το μονοπάτι των ERK1/2, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος. Συνεπώς, η βορτεζομίδη πολύ πιθανόν μέσω του ίδιου μηχανισμού της αναστολής της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 με τον HIF-1α να αναστέλλει και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2.

Συμπερασματικά, στη παρούσα διδακτορικής διατριβή διαλευκάνθηκαν άγνωστες πτυχές του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η χημική υποξία, όπως το κοβάλτιο, ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο τη μεταγραφή των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2 και συνεπώς τη μεταγραφική του ενεργότητα σε σχέση με την πραγματική υποξία. Επίσης, βρέθηκαν για πρώτη φορά νέοι μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης του HIF-2 από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ERK1/2 και της CK1. Επιπλέον, στη παρούσα διατριβή βρέθηκε ένας νέος μηχανισμός δράσης της βορτεζομιδης, ενός αναστολέα πρωτεασώματος με εφαρμοσμένη αντικαρκινική δράση, στον οποίο εμπλέκονται τα μονοπάτια της PI3K/Akt και των ERK1/2 με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των HIFs. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας εργασίας χαρακτηρίστηκαν ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των HIF-1α και HIF-2α, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τον διακριτό τους ρόλο στη κυτταρική ομοιοστασία. Η νέα αυτή γνώση αναμένεται να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της κυτταρικής, φυσιολογικής και ιστοειδικής απόκρισης στην υποξία και δίνει την δυνατότητα να αναπτυχθούν στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003 29 Suppl 1: 3-9
- Akeno N, Robins J, Zhang M, Czyzyk-Krzeska MF, Clemens TL. Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2alpha. *Endocrinology* 2002 143: 420-425
- Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 2004 92: 491-501
- Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res* 2006 66: 5641-5647
- Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, Ho WB, Arend M, Brenner M, Gunzler V, White CW. Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005 38: 1002-1013
- Basner RC. Continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2007 356: 1751-1758
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008 18: 207-250
- Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Gorlach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007 18: 4691-4697
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J* 2003 22: 4082-4090
- Bertout JA, Patel SA, Fryer BH, Durham AC, Covello KL, Olive KP, Goldschmidt MH, Simon MC. Heterozygosity for hypoxia inducible factor 1alpha decreases the incidence of thymic lymphomas in a p53 mutant mouse model. *Cancer Res* 2009 69: 3213-3220
- Bertozzi D, Iurlaro R, Sordet O, Marinello J, Zaffaroni N, Capranico G. Characterization of novel antisense HIF-1alpha transcripts in human cancers. *Cell Cycle* 2011 10: 3189-3197
- Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. *Eur J Biochem* 2003 270: 791-798
- Birle DC, Hedley DW. Suppression of the hypoxia-inducible factor-1 response in cervical carcinoma xenografts by proteasome inhibitors. *Cancer Res* 2007 67: 1735-1743

- Block K, Gorin Y, Hoover P, Williams P, Chelmicki T, Clark RA, Yoneda T, Abboud HE. NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression. *J Biol Chem* 2007 282: 8019-8026
- Boddy JL, Fox SB, Han C, Campo L, Turley H, Kanga S, Malone PR, Harris AL. The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a, and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005 11: 7658-7663
- Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 27: 755-761
- Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, Peet DJ. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem* 2006 281: 22575-22585
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem* 2005 280: 14240-14251
- Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 2005 17: 1-9
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007 19: 223-229
- Brown ST, Nurse CA. Induction of HIF-2alpha is dependent on mitochondrial O2 consumption in an O2-sensitive adrenomedullary chromaffin cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008 294: C1305-1312
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2005 1: 409-414
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000 103: 1009-1017
- Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* 2011 11: 298-344
- Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 2010 40: 509-520
- Catrina SB, Botusan IR, Rantanen A, Catrina AI, Pyakurel P, Savu O, Axelson M, Biberfeld P, Poellinger L, Brismar K. Hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha are expressed in kaposi sarcoma and modulated by insulin-like growth factor-I. *Clin Cancer Res* 2006 12: 4506-4514
- Chachami G, Hatziefthimiou A, Liakos P, Ioannou MG, Koukoulis GK, Bonanou S, Molyvdas PA, Simos G, Paraskeva E. Exposure of differentiated airway smooth muscle cells to serum stimulates both induction of hypoxia-inducible factor-1{alpha}

and airway responsiveness to ACh. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 293: L913-922

- Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 390: 235-240
- Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces HIF-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 31: 544-551
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95: 11715-11720
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000 275: 25130-25138
- Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006 26: 9471-9481
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2011 11: 239-253
- Chen KF, Yeh PY, Yeh KH, Lu YS, Huang SY, Cheng AL. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2008 68: 6698-6707
- Chen R, Xu M, Hogg RT, Li J, Little B, Gerard RD, Garcia JA. The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *J Biol Chem* 2012 287: 30800-30811
- Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1 α . *FEBS Lett* 2007 581: 1542-1548
- Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006 5: 665-675
- Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002 8: 702-710
- Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. EPAS1 transactivation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 1999 274: 33709-33713

- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006 20: 557-570
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 2006 66: 3688-3698
- Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Kohler M. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta* 2008 1783: 394-404
- Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 37: 535-540
- Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 2009 324: 1289-1293
- Doedens A, Johnson RS. Transgenic models to understand hypoxia-inducible factor function. *Methods Enzymol* 2007 435: 87-105
- Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 2003 278: 7520-7530
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 94: 4273-4278
- Esparis-Ogando A, Alegre A, Aguado B, Mateo G, Gutierrez N, Blade J, Schenkein D, Pandiella A, San Miguel JF. Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias. *Int J Cancer* 2005 114: 665-667
- Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, Virudachalam S, Bold RJ. Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF-kappaB inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005 56: 46-54
- Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal* 2007 19: 2487-2497
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997 63: 51-60
- Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* 2007 27: 3253-3265

- Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* 2008 15: 635-641
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006 396: 517-527
- Fu SC, Imai K, Horton P. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. *Nucleic Acids Res* 2011 39: e111
- Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 2004 118: 781-794
- Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 105: 4745-4750
- Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007 11: 335-347
- Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 2007 17: 71-77
- Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem* 2002 277: 23508-23514
- Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 104: 2301-2306
- Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007 12: 9-22
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 2005 1: 401-408
- Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010 299: F1-13
- Hansen AE, Kristensen AT, Law I, Jorgensen JT, Engelholm SA. Hypoxia-inducible factors--regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis. *Vet Comp Oncol* 2011 9: 16-37
- He C, Sun XP, Qiao H, Jiang X, Wang D, Jin X, Dong X, Wang J, Jiang H, Sun X. Downregulating hypoxia-inducible factor-2alpha improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2012 103: 528-534
- Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 2003 22: 8386-8393

- Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2003 278: 30772-30780
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 1997 272: 8581-8593
- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L, Pahlman S. Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006 10: 413-423
- Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covelto KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol* 2006 26: 3514-3526
- Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell* 2007 18: 4528-4542
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003 23: 9361-9374
- Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol* 2001 59: 1216-1224
- Ikezoe T, Yang Y, Saito T, Koeffler HP, Taguchi H. Proteasome inhibitor PS-341 down-regulates prostate-specific antigen (PSA) and induces growth arrest and apoptosis of androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Sci* 2004 95: 271-275
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001 292: 464-468
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998 12: 149-162
- Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004 43: 649-659
- Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011 589: 1251-1258
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002 111: 709-720

- Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001 12: 363-369
- Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008 30: 393-402
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J* 1998 17: 6573-6586
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999 274: 6519-6525
- Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human HIF-1. *J Cell Sci* 2010 123: 2976-2986
- Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Proteasomal inhibition attenuates transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) via specific effect on the HIF-1alpha C-terminal activation domain. *Mol Cell Biol* 2006 26: 5895-5907
- Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta* 2008 395: 6-13
- Kanaya K, Kamitani T. pVHL-independent ubiquitination of HIF1alpha and its stabilization by cobalt ion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 306: 750-755
- Kanaya K, Tsai AL, Kamitani T. Cobalt- and nickel-binding property of cullin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 290: 294-299
- Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, Epstein JA, Moores SL, Erickson-Miller CL, Haase VH. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010 116: 3039-3048
- Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2012 12: 9-22
- Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S. SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem* 2009 284: 4123-4131
- Kim HJ, Yang SJ, Kim YS, Kim TU. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase activation in human cervical cancer HeLa cells. *J Biochem Mol Biol* 2003 36: 468-474
- Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 2008 118: 3051-3064
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 2005 17: 675-689

- Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol* 2008 28: 7081-7095
- Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* 2011 71: 4015-4027
- Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* 2012 37: 364-372
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004 279: 9899-9904
- Koivunen P, Tiainen P, Hyvarinen J, Williams KE, Sormunen R, Klaus SJ, Kivirikko KI, Myllyharju J. An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha. *J Biol Chem* 2007 282: 30544-30552
- Konietzny R, Konig A, Wotzlaw C, Bernadini A, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Molecular imaging: into in vivo interaction of HIF-1alpha and HIF-2alpha with ARNT. *Ann N Y Acad Sci* 2009 1177: 74-81
- la Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 2004 17: 527-536
- Lan A, Liao X, Mo L, Yang C, Yang Z, Wang X, Hu F, Chen P, Feng J, Zheng D, Xiao L. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells. *PLoS One* 2011 6: e25921
- Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J* 2004 383: 429-437
- Le Bras A, Lionneton F, Mattot V, Lelievre E, Caetano B, Spruyt N, Soncin F. HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene* 2007 26: 7480-7489
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004 36: 1-12
- Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 2007 26: 63-74
- Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 2009 15: 501-513

- Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* 2010 38: 864-878
- Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* 2008 15: 642-649
- Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 2007 25: 207-217
- Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 2007 6: 656-659
- Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene* 2001 20: 1435-1444
- Luo W, Zhong J, Chang R, Hu H, Pandey A, Semenza GL. Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem* 2010 285: 3651-3663
- Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E. MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem* 2007 20: 995-1006
- Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW, Zhong H. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002 62: 2478-2482
- Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA, Sellers WR. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004 10: 594-601
- Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J Biol Chem* 2007 282: 14073-14082
- Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab* 2005 1: 393-399
- Maranchie JK, Zhan Y. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005 65: 9190-9193
- Martini M, Teofili L, Cenci T, Giona F, Torti L, Rea M, Foa R, Leone G, Larocca LM. A novel heterozygous HIF2AM535I mutation reinforces the role of oxygen sensing pathway disturbances in the pathogenesis of familial erythrocytosis. *Haematologica* 2008 93: 1068-1071

- Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaultont S, Peyssonnaud C. HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest* 2009 119: 1159-1166
- Maxwell P, Salnikow K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004 3: 29-35
- McCubrey JA, Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell WH, Wong EW, Lehmann BD, Terrian DM, Basecke J, Stivala F, Libra M, Evangelisti C, Martelli AM. Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2007 47: 64-103
- 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* 2003 116: 1319-1326
- Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan CM. ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* 2000 90: 253-261
- Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 2009 284: 16767-16775
- Moore BS, Eustaquio AS, McGlinchey RP. Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 2008 12: 434-440
- Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 2: 202-210
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009 417: 1-13
- Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem* 2008 283: 27620-27627
- Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2006 281: 33095-33106
- Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 398: 74-78
- Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci* 2012 125: 3485-3493
- Mylonis I, Simos G, The involvement of the ERK-hypoxia-angiogenesis signaling axis and HIF-1 in hepatocellular carcinoma., in: W.-Y. Lau (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma-Basic Research*, in Tech, 2012.

- Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, Bowtell DD, Ronai Z. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004 117: 941-952
- Nakayama K, Ronai Z. Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* 2004 3: 1345-1347
- Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, Kumar GK, Garcia JA, Prabhakar NR. Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 106: 1199-1204
- Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, Gorin Y, Block K. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2012
- Nilsson H, Jogi A, Beckman S, Harris AL, Poellinger L, Pahlman S. HIF-2alpha expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Exp Cell Res* 2005 303: 447-456
- Oktay Y, Dioum E, Matsuzaki S, Ding K, Yan LJ, Haller RG, Szweda LI, Garcia JA. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *J Biol Chem* 2007 282: 11750-11756
- Papandreou CN, Logothetis CJ. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* 2004 64: 5036-5043
- Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. *Mol Cell Biol* 2003 23: 4959-4971
- Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ* 2008 15: 628-634
- Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hu CJ. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF2alpha) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2012 32: 4595-4610
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 97: 8386-8391
- Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 2006 577: 705-716
- Percy MJ. Familial erythrocytosis arising from a gain-of-function mutation in the HIF2A gene of the oxygen sensing pathway. *Ulster Med J* 2008 77: 86-88
- Percy MJ, Beer PA, Campbell G, Dekker AW, Green AR, Oscier D, Rainey MG, van Wijk R, Wood M, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS. Novel exon 12 mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Blood* 2008 111: 5400-5402

- Percy MJ, Chung YJ, Harrison C, Mercieca J, Hoffbrand AV, Dinardo CL, Santos PC, Fonseca GH, Gualandro SF, Pereira AC, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS. Two new mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Am J Hematol* 2012 87: 439-442
- Petrella BL, Brinckerhoff CE. PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009 8: 1389-1401
- Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* 2006 387: 1337-1346
- Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 2012 92: 967-1003
- Qing G, Simon MC. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 2009 19: 60-66
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007 117: 1068-1077
- Rankin EB, Rha J, Unger TL, Wu CH, Shutt HP, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene* 2008 27: 5354-5358
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008 453: 807-811
- Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, Tilby MJ, Pearson DG, Ottley CJ, Stratford IJ, Dive C. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2009 101: 1290-1297
- Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 2006 66: 184-191
- Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012 66: 105-143
- Rossignol F, Vache C, Clottes E. Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 2002 299: 135-140
- Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* 2005 118: 301-311
- Ruscica M, Dozio E, Motta M, Magni P. Modulatory actions of neuropeptide Y on prostate cancer growth: role of MAP kinase/ERK 1/2 activation. *Adv Exp Med Biol* 2007 604: 96-100
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 1998 17: 3005-3015

- Ryu JH, Li SH, Park HS, Park JW, Lee B, Chun YS. Hypoxia-inducible factor alpha subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem* 2011 286: 6963-6970
- Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 2004 279: 40337-40344
- Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 2007 14: 420-426
- Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, Guo Y, Bruick RK, Gardner KH. Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 106: 450-455
- Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 2011 117: e207-217
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 338: 617-626
- Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 2003 35: 331-340
- Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 2005 105: 3133-3140
- Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 2003 102: 1634-1640
- Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002 64: 993-998
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007 2007: cm8
- Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 2009 24: 97-106
- Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992 12: 5447-5454
- Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J, Brune B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* 2003 101: 4847-4849
- Shin DH, Chun YS, Lee DS, Huang LE, Park JW. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 2008 111: 3131-3136

- Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 9: 285-296
- Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci Total Environ* 2012 432: 210-215
- Sutton KM, Hayat S, Chau NM, Cook S, Pouyssegur J, Ahmed A, Perusinghe N, Le Floch R, Yang J, Ashcroft M. Selective inhibition of MEK1/2 reveals a differential requirement for ERK1/2 signalling in the regulation of HIF-1 in response to hypoxia and IGF-1. *Oncogene* 2007 26: 3920-3929
- Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev* 2010 24: 491-501
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998 12: 3320-3324
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997 11: 72-82
- To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 α from HIF-2 α in NBS1 repression. *Embo J* 2006 25: 4784-4794
- Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* 2008 283: 34495-34499
- Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S. Cobalt induces HIF-1 α in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res* 2006 40: 847-856
- Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1 α but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radic Biol Med* 2008 44: 657-670
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem* 2004 279: 14871-14878
- van de Sluis B, Groot AJ, Vermeulen J, van der Wall E, van Diest PJ, Wijmenga C, Klomp LW, Vooijs M. COMMD1 Promotes pVHL and O₂-Independent Proteolysis of HIF-1 α via HSP90/70. *PLoS One* 2009 4: e7332
- van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, van Diest PJ, Hofker MH, Wijmenga C, Klomp LW, Cho KR, Fearon ER, Vooijs M, Burstein E. COMMD1 disrupts HIF-1 α /beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest* 2010 120: 2119-2130

- van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res* 2010 38: 1922-1931
- van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 2008 412: 477-484
- Veschini L, Belloni D, Foglieni C, Cangi MG, Ferrarini M, Caligaris-Cappio F, Ferrero E. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 2007 109: 2565-2570
- Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 1: post-translational regulation. *J Cell Mol Med* 2009 13: 3006-3018
- Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: transcriptional regulation. *J Cell Mol Med* 2009 13: 3019-3031
- Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in glioma cell cycle control. *Cell Div* 2012 7: 18
- Voutsadakis IA, Papandreou CN. The ubiquitin-proteasome system in prostate cancer and its transition to castration resistance. *Urol Oncol* 2012 30: 752-761
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. HIF 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92: 5510-5514
- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *Faseb J* 2004 18: 1462-1464
- Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 2009 66: 3539-3554
- Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008 15: 621-627
- Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *Faseb J* 2003 17: 271-273
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 1998 92: 2260-2268
- Williams S, Pettaway C, Song R, Papandreou C, Logothetis C, McConkey DJ. Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2003 2: 835-843
- Xia X, Kung AL. Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol* 2009 10: R113

- Yang F, Jove V, Chang S, Hedvat M, Liu L, Buettner R, Tian Y, Scuto A, Wen W, Yip ML, Van Meter T, Yen Y, Jove R. Bortezomib induces apoptosis and growth suppression in human medulloblastoma cells, associated with inhibition of AKT and NF- κ B signaling, and synergizes with an ERK inhibitor. *Cancer Biol Ther* 2012 13: 349-357
- Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 2003 549: 105-109
- Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* 2008 217: 674-685
- Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 2003 278: 15911-15916
- Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 2004 51: 563-585
- Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2004 28: 88-93
- Zhou X, Fang Y, Jing H, Zhong L, Luo P, Song H, Yang B, He Q. Involvement of mitogen-activated protein kinase in signal transducer and activator of transcription-1 mediated differentiation induced by bortezomib in acute myeloid leukemia cells. *Mol Carcinog* 2013 52: 18-28
- Zhu K, Chan W, Heymach J, Wilkinson M, McConkey DJ. Control of HIF-1 α expression by eIF2 α phosphorylation-mediated translational repression. *Cancer Res* 2009 69: 1836-1843
- Zimmer M, Ebert BL, Neil C, Brenner K, Papaioannou I, Melas A, Tolliday N, Lamb J, Pantopoulos K, Golub T, Iliopoulos O. Small-molecule inhibitors of HIF-2 α translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell* 2008 32: 838-848