

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**Διπλωματική Εργασία**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ (TUMOR NECROSIS  
FACTOR-TNF)- $\alpha$  ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΑ  
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ**

**Τριανταφύλλου Ελένη-Αναστασία**

Βιολόγος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Παρασκευά Ευφροσύνη  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας  
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Εργαστήριο Φυσιολογίας  
Διευθυντής: Καθηγητής Π.-Α. Μολυβδάς  
Λάρισα 2013

### Τριμελής επιτροπή:

- *Παρασκευά Ευφροσύνη*, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- *Γερμενής Αναστάσιος*, Καθηγητής Ανοσολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- *Μυλωνής Ηλίας*, Λέκτορας Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινικές Εφαρμογές στη Μοριακή Ιατρική». Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της:

Την κ. Παρασκευά Ευφροσύνη, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας για την ανάθεση της ερευνητικής αυτής εργασίας και φυσικά για την επιστημονική της καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία που είχαμε και τη βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Την ευχαριστώ επίσης για το χρόνο που διέθεσε στη διόρθωση της παρούσας εργασίας. Οι συμβουλές της τόσο στο πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο της εργασίας ήταν για μένα ιδιαίτερα πολύτιμες και θα με ακολουθούν και στη συνέχιση της ερευνητικής μου πορείας.

Τον κ. Μολυβδά Πασχάλη-Αδάμ, Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για τη διεκπεραίωση της εργασίας μου σε ένα άριστο περιβάλλον.

Τον κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Ανοσολογίας Επιστημονικό υπεύθυνο του ΠΜΣ για το χρόνο αξιολόγησης της παρούσας εργασίας και για τη λειτουργία αυτού του αξιόλογου μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τον κ. Μυλωνή Ηλία, λέκτορα Βιοχημείας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, για το χρόνο αξιολόγησης της εργασίας και για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε εργαστηριακές τεχνικές οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουν.

Όλους τους διδάσκοντες των υποχρεωτικών μαθημάτων του ΠΜΣ, καθώς και τους διδάσκοντες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για τις σημαντικές γνώσεις που με ιδιαίτερη προθυμία μου μετέφεραν στο μάθημα κατ' επιλογήν.

Την κ. Σταματίου Ροδόπη, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο εργαστήριο Φυσιολογίας για την συνεργασία της και τις χρήσιμες υποδείξεις της σε εργαστηριακές τεχνικές.

Τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, κ. Λυμπεροπούλου Αγγελική μεταδιδακτορική ερευνήτρια, κ. Μπεφάνη Χριστίνα διδάκτορα και τα υπόλοιπα μέλη υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Φυσιολογίας και του εργαστηρίου Βιοχημείας για τη συνεργασία που είχαμε και τη βοήθεια τους σε εργαστηριακά θέματα.

Τον κ. Μακαντάση Ιωάννη για τη βοήθεια του σε τεχνικά θέματα και την κ. Νούτσου Βασιλική για τη δική της συμβολή ως γραμματέας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας.

Την οικογένεια μου για την ασταμάτητη συμπαράσταση, την κατανόηση και τη φροντίδα που μου προσφέρει ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τα άτομα του συγγενικού και φιλικού περιβάλλοντος μου για τη διαρκή ηθική υποστήριξη.

Λάρισα, 2013

Τριανταφύλλου Ελένη-Αναστασία

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες.....	7
<b>Περίληψη.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Η δομή του αναπνευστικού συστήματος.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού και η φυσιολογική λειτουργία τους.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού στη φυσική και την προσαρμοστική ανοσία.....	14
<b>1.3. Φλεγμονή του αναπνευστικού και παθήσεις στις οποίες εμπλέκονται τα επιθηλιακά κύτταρα.....</b>	<b>15</b>
1.3.1. NF-κB.....	15
1.3.2. Κυτταροκίνες.....	17
1.3.2.1. Κυτταρική σηματοδότηση και βιολογική δράση του TNFα.....	19
1.3.2.2.Ο ρόλος του TNFα κατά τη χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών.....	20
1.3.3. Επιθηλιακά κύτταρα και φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού.....	22
1.3.3.1. Άσθμα.....	22
1.3.3.2. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.....	23
1.3.3.3. Καρκίνος του πνεύμονα.....	24
1.3.3.4. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις.....	26
<b>1.4. Υποξία και HIFs.....</b>	<b>28</b>
1.4.1. Ρύθμιση και ρόλος του HIF-1α.....	30
1.4.2. Η επίδραση της υποξίας στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού.....	32
<b>1.5 Υποξία/ HIF-1α και φλεγμονή.....</b>	<b>33</b>
1.5.1. Η επίδραση της φλεγμονής στον HIF-1.....	35
1.5.2. Λειτουργική διάδραση (Cross talk) HIF και NF-κB.....	36
<b>1.6. Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών στη σχέση της χρόνιας φλεγμονής με τον καρκίνο.....</b>	<b>37</b>
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>39</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Καλλιέργεια κυττάρων.....</b>	<b>40</b>

<b>3.2. Κατεργασία των κυττάρων.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας-πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.....</b>	<b>42</b>
3.5.1. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	42
3.5.1.1. Λύση των κυττάρων και παρασκευή εκχυλίσματος πρωτεϊνών.....	42
3.5.1.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα.....	43
3.5.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	44
3.5.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	47
3.5.4. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών.....	48
<b>3.6. Απομόνωση ολικού RNA .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA.....</b>	<b>51</b>
<b>3.8. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή.....</b>	<b>51</b>
<b>3.9. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.....</b>	<b>53</b>
3.9.1. Καμπύλη ενίσχυσης- Threshold- Τιμή Ct.....	56
3.9.2. Ανάλυση καμπύλης τήξης.....	57
3.9.3. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA.....	58
<b>3.10. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....</b>	<b>58</b>
<b>3.11. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....</b>	<b>59</b>
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 Η επίδραση του TNF<math>\alpha</math> στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....</b>	<b>60</b>
4.1.1. Ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B.....	61
4.1.2. Έκφραση των HIF-1 $\alpha$ mRNA και RANTES mRNA.....	62
4.1.3. Έλεγχος των επιπέδων της HIF-1 $\alpha$ πρωτεΐνης.....	64
<b>4.2 Η επίδραση του TNF<math>\alpha</math> στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού A549 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....</b>	<b>68</b>
4.2.1. Ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B.....	69
4.2.2. Έλεγχος των επιπέδων της HIF-1 $\alpha$ πρωτεΐνης.....	70

<b>4.3. Η επίδραση του TNF<math>\alpha</math> στη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....</b>	<b>71</b>
4.3.1. Επαγωγή του VEGF.....	71
4.3.2.Επαγωγή των παραγόντων της φλεγμονής RANTES, IL-6, ICAM, VCAM.....	72
<b>4.4. Επίδραση του TNF<math>\alpha</math> στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....</b>	<b>75</b>
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>72</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>82</b>

## Συντομογραφίες

ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

AHR (airway hyperresponsiveness): βρογχική υπεραπαντητικότητα

CBP (CREB-binding protein): συνδεδεμένη με τον CREB πρωτεΐνη

CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας κυστικής ίνωσης

COX-2 (cyclooxygenase 2): κυκλοξυγενάση 2

EGF (epidermal growth factor): επιδερμικός παράγοντα αύξησης

EMT (epithelial-mesenchymal transition): μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά

FGF (fibroblast growth factor): παράγοντας αύξησης ινοβλαστών

GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor): παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων

HIFs (Hypoxia Inducible Factors): παράγοντες επαγόμενοι από την υποξία

ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1): ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης 1

IL (interleukin): ιντερλευκίνη

IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ): ιντερφερόνη  $\gamma$

MMPs (matrix metalloproteinases): μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας

MUC (mucin): βλεννίνη

NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B): πυρηνικός παράγοντας- $\kappa$ B

NO (nitric oxide) : μονοξείδιο του αζώτου

NSCLC (non- small cell lung cancer): μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

PHDs (prolyl hydroxylase domain proteins): προλυλ-υδροξυλάσες

ROS (reactive oxygen species): ενεργές ρίζες οξυγόνου

SCLC (small cell lung cancer): μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

TGF (tumour growth factor): παράγοντας αύξησης όγκων

TNF (tumour necrosis factor) - $\alpha$ : παράγοντας νέκρωσης όγκων - $\alpha$

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1): μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1

VEGF (vascular endothelial growth factor): αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

## Περίληψη

Το επιθήλιο του αναπνευστικού λειτουργεί ως ένας φυσικοχημικός προστατευτικός φραγμός στην είσοδο βλαβερών μορίων και μικροοργανισμών. Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές της φλεγμονώδους απόκρισης και των διαδικασιών αναδιαμόρφωσης, που παρατηρούνται σε πνευμονικές παθήσεις όπως το άσθμα, η ΧΑΠ και ο καρκίνος του πνεύμονα. Η φλεγμονή και η υποξία, που συνυπάρχουν στις παθήσεις του αναπνευστικού, επιδρούν στη δομή και τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων και τα ενεργοποιούν με στόχο να παράγουν αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του TNF $\alpha$  και της υποξίας σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, όσον αφορά στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, στον έλεγχο των επιπέδων του HIF-1 $\alpha$  mRNA και πρωτεΐνης, καθώς και στη μεταγραφική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού, με την έκφραση του αυξητικού παράγοντα VEGF και παραγόντων της φλεγμονής, όπως των κυτταροκινών RANTES και IL-6, και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM. Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση του TNF $\alpha$  σε νορμοξία και σε υποξία στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι σειρές καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού H1299 και A549. Τα κύτταρα επώαστηκαν για τον ενδεδειγμένο χρόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία (20% O $_2$ ) ή σε υποξία (1% O $_2$ ) και απουσία ή παρουσία TNF $\alpha$ . Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ώστε να προσδιοριστεί η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B και η επαγωγή των επιπέδων της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης. Η υποκυτταρική ανίχνευση του HIF-1 $\alpha$  πραγματοποιήθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Παράλληλα, απομονώθηκε ολικό RNA, έγινε ανάστροφη μεταγραφή και τα επίπεδα mRNA των *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF*, *RANTES*, *IL-6*, *ICAM* και *VCAM* προσδιορίστηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Τέλος, η κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκαν με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.

Ο TNF $\alpha$  σε συνθήκες νορμοξίας ενεργοποίησε τον NF- $\kappa$ B, όπως παρατηρούμε από την αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας. Σε συνθήκες υποξίας, απουσία και παρουσία TNF $\alpha$ , δεν ανιχνεύτηκε φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας. Αν και ο TNF $\alpha$  σε νορμοξία προκάλεσε μικρή επαγωγή του HIF-1 $\alpha$  mRNA, δεν αύξησε τα επίπεδα της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης. Η επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας δεν επηρέασε την έκφραση του HIF-1 $\alpha$  mRNA, αλλά προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης. Η αύξηση αυτή δεν μεταβλήθηκε σημαντικά παρουσία TNF $\alpha$ . Επίσης ο TNF $\alpha$  δεν επηρέασε την έκφραση του VEGF, γονιδίου στόχου του HIF-1. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA του VEGF



αυξήθηκαν σε συνθήκες υποξίας απουσία ή παρουσία TNFα. Ο TNFα, σε νορμοξία και σε υποξία, οδήγησε σε σημαντική επαγωγή της έκφρασης των παραγόντων φλεγμονής RANTES, ICAM και VCAM, αλλά όχι της IL-6. Σε συνθήκες υποξίας όχι μόνο δεν αυξήθηκε η έκφραση των υπό μελέτη παραγόντων της φλεγμονής, αλλά αντίθετα μειώθηκε η επίδραση του TNFα στην επαγωγή του VCAM, σε σχέση με τη νορμοξία. Τέλος, ο αριθμός των κυττάρων H1299 δε μεταβλήθηκε κατά την επώαση τους σε υποξία αλλά ούτε υπό την επίδραση του TNFα, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Συμπερασματικά, σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, ο TNFα δε φαίνεται να επιδρά στην έκφραση του HIF-1α, αλλά αυξάνει σημαντικά την έκφραση των παραγόντων της φλεγμονής. Η υποξία προκαλεί αύξηση των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης και του VEGF mRNA, αλλά δεν αυξάνει την έκφραση των δεικτών της φλεγμονής που εξετάσαμε. Τέλος, ούτε ο TNFα ούτε η υποξία φαίνεται να επιδρούν στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υποξία και ο TNFα επιδρούν με ανεξάρτητο τρόπο στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού.

## Abstract

The epithelium of the respiratory system serves as a physicochemical protective barrier against noxious molecules and pathogens. The respiratory epithelial cells are considered as essential controllers of inflammatory and regenerative responses in lung diseases such as asthma, COPD, and lung cancer. Inflammation and hypoxia that coexist in these respiratory diseases affect the normal structure and function of epithelial cells and activate them to secrete growth factors and cytokines.

Our aim was to investigate the effect of hypoxia and TNF $\alpha$ -induced inflammation on respiratory epithelial cells, regarding NF- $\kappa$ B activation, induction of HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein, their transcriptional activity via VEGF, and inflammatory mediators, such as cytokines RANTES and IL-6 and adhesion molecules ICAM and VCAM. Another aim was to estimate the effect of hypoxia and TNF $\alpha$  in survival and proliferation of respiratory epithelial cells. To this end we used the respiratory epithelial cancer cell lines H1299 and A549. Cells were incubated for the appropriate time in culture medium without FBS in normoxia (20% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>), with or without TNF $\alpha$ . The NF- $\kappa$ B pathway activation and HIF-1 $\alpha$  protein induction were investigated by Western blot. Intracellular detection of HIF-1 $\alpha$  was assessed by immunofluorescence microscopy. In parallel, total RNA was extracted, reverse transcribed and mRNA levels of *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF*, *RANTES*, *IL-6*, *ICAM* and *VCAM* were determined by quantitative Real-Time PCR. Cell survival and proliferation was estimated using the colorimetric method of MTS.

Our results indicate that TNF $\alpha$  activated NF- $\kappa$ B in normoxia, as shown by the increase in phosphorylation of the p65 NF- $\kappa$ B subunit. However, this increase in phosphorylation of p65 was not detected under hypoxia. In addition, although TNF $\alpha$  induced HIF-1 $\alpha$  mRNA in normoxia, it failed to increase HIF-1 $\alpha$  protein levels. Under hypoxia, HIF-1 $\alpha$  protein but not HIF-1 $\alpha$  mRNA levels were increased. VEGF expression was induced only in cells treated under hypoxia. TNF $\alpha$  treatment had no effect on VEGF mRNA levels. Treatment with TNF $\alpha$  under normoxia or hypoxia induced significantly RANTES, ICAM and VCAM but not IL-6 mRNA. Although hypoxia alone did not affect positively the expression of the above inflammatory mediators, it was found to decrease TNF $\alpha$ -induced VCAM mRNA levels in normoxia. In addition, H1299 cell number was not affected either by incubation under hypoxic conditions or by treatment with TNF $\alpha$ .

In conclusion, TNF $\alpha$  in normoxia does not affect HIF-1 $\alpha$  expression, but increases the expression of inflammatory mediators in respiratory epithelial cancer cells. Hypoxia increases levels of HIF-1 $\alpha$  protein and VEGF mRNA, but does not induce the expression of

inflammatory mediators. Finally, neither TNF $\alpha$  nor hypoxia affects cell survival and proliferation. Our results indicate that TNF $\alpha$  and hypoxia act independently one from another in respiratory epithelial cancer cells.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Η δομή του αναπνευστικού συστήματος**

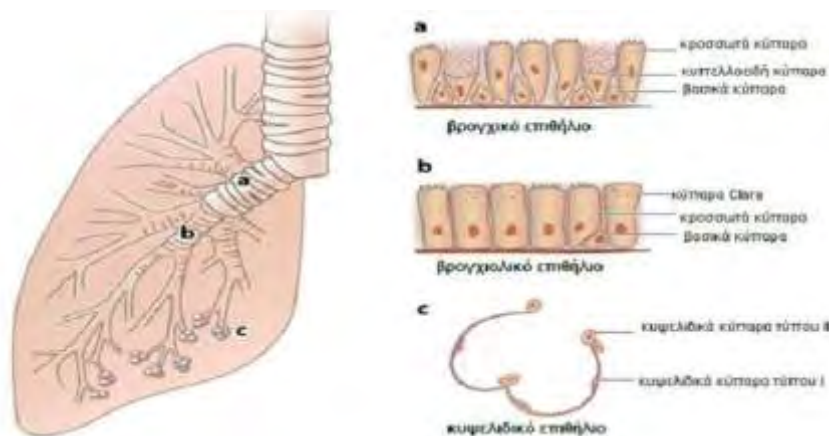
Το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από τους πνεύμονες, το σύνολο των αεραγωγών που καταλήγουν στους πνεύμονες, από το θωρακικό τοίχωμα και από τους αναπνευστικούς μύες οι οποίοι αυξομειώνοντας το μέγεθος τους ρυθμίζουν τη μετακίνηση του αέρα κατά την αναπνοή. Ο εισπνεόμενος αέρας περνά από τη ρινική κοιλότητα και το φάρυγγα και εισέρχεται στην τραχεία, η οποία διακλαδίζεται σε δύο βρόγχους, ο καθένας από τους οποίους εισέρχεται στον αντίστοιχο πνεύμονα. Οι βρόγχοι διακλαδίζονται περαιτέρω στα βρογχιόλια και στα τελικά βρογχιόλια, αποτελώντας τη ζώνη αγωγής του αέρα. Στη συνέχεια, διαδοχικά εκτείνονται τα αναπνευστικά βρογχιόλια, οι κυψελιδοκοί πόροι και οι κυψελίδες, που αποτελούν την αναπνευστική ζώνη, όπου γίνεται και η ανταλλαγή αερίων. Οι κυψελίδες περιβάλλονται από τριχοειδή αγγεία. Οι αεραγωγοί, όπως και τα αιμοφόρα αγγεία περιβάλλονται από λείους μύες οι οποίοι με τη συστολή τους και τη χάλαση τους μεταβάλλουν τη διάμετρο των αεραγωγών (Barret et al., 2010).

### **1.2. Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού και η φυσιολογική λειτουργία τους**

Οι αεραγωγοί του αναπνευστικού συστήματος, δηλαδή οι σωλήνες μέσα από τους οποίους ο αέρας διακινείται μεταξύ του περιβάλλοντος και των βρόγχων, επενδύονται από επιθηλιακό ιστό. Γενικά, το επιθήλιο αποτελεί ένα φυσικοχημικό φραγμό για εισπνεόμενα μικρόβια, τοξικούς παράγοντες και ξένες ουσίες (Barret et al., 2010).

Στην επιφάνεια του επιθηλιακού ιστού οι υποκατηγορίες επιθηλιακών κυττάρων που συναντώνται είναι τα κροσσωτά, τα καλυκοειδή, τα βασικά και τα κύτταρα Clara. Τα καλυκοειδή κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν βλέννα πάνω στην οποία προσκολλώνται ουσίες από σωματίδια και παθογόνα βακτήρια, που εισέρχονται με τον εισπνεόμενο αέρα. Τα κροσσωτά κύτταρα, τα οποία στον φυσιολογικό ιστό είναι διαφοροποιημένα και δε διαιρούνται, σχηματίζουν τους κροσσούς, οι οποίοι μετακινούν τη βλέννα προς το φάρυγγα και απομακρύνουν τις βλαβερές ουσίες, διατηρώντας, έτσι, καθαρούς τους πνεύμονες. Τα βασικά κύτταρα, που είναι υπεύθυνα και για την ψευδοστρωματοποιημένη μορφολογία του αναπνευστικού επιθηλίου συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στη βασική μεμβράνη και θεωρούνται πρόδρομοι των υπολοίπων επιθηλιακών κυτταρικών τύπων του αναπνευστικού. Τα κύτταρα Clara είναι λιγότερο μελετημένα και παράγουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα στους κατώτερους αεραγωγούς (Mills et al., 1999).

Επιπλέον, επιθηλιακός ιστός καλύπτει και το τοίχωμα των κυψελίδων, αποτελούμενος από δύο τύπους επιθηλιακών κυττάρων. Τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, που είναι επίπεδα και καλύπτουν το 95% της επιφάνειας και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, που είναι μεγαλύτερα και με εξειδικευμένες δράσεις, όπως η παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα (Barret et al., 2010). Τα κυψελιδικά κύτταρα σχηματίζουν ένα στενό φραγμό επιλεκτικότητας που περιορίζει τη μεταφορά των λιπο-αδιάλυτων μορίων από και προς τον διάμεσο χώρο (Jain and Sznajder, 2005)



Εικ.1 Οι τύποι επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού (προσαρμογή από: Wetsel et al., 2011)

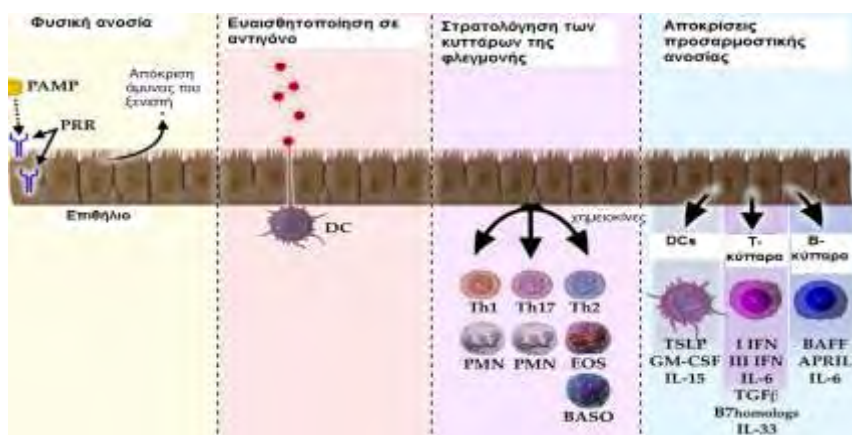
Ο φυσικός φραγμός διαπερατότητας των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού διατηρείται από εξειδικευμένες περιοχές σύνδεσης της μεμβράνης τους, τους στενοσυνδέσμους, τους συνδέσμους πρόσφυσης και τα δεσμοσώματα. Οι στενοσυνδέσμοι αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της παρακυττάριας διαπερατότητας και κίνησης των ιόντων και διαλυμένων ουσιών και αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, μόρια προσκόλλησης και οκκλουδίνες. Οι σύνδεσμοι πρόσφυσης συνδέουν μηχανικά τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνοι για την έναρξη του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης μέσω πρωτεϊνών, όπως η E-καδερίνη. Τα δεσμοσώματα συνδέουν το δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων (Hackett, 2012).

Χαρακτηριστικό των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών είναι η πλαστικότητα του φαινοτύπου τους κατά τη διάρκεια επιδιόρθωσης και αναγέννησης. Σε περίπτωση τραυματισμού του επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών, τα κροσσωτά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλακώδη κύτταρα, ώστε να διατηρηθεί η ακεραιότητα του επιθηλιακού ιστού. Αυτή είναι μια προστατευτική αλλά παροδική λειτουργία και έπειτα τα πλακώδη κύτταρα επαναδιαφοροποιούνται σε εκκριτικά ή κροσσωτά (Puchelle et al., 2006).

Επιπλέον τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με τα γειτονικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα με τους ινοβλάστες, καθώς και με την εξωκυττάρια ουσία, σε περίπτωση αποκατάστασης της βλάβης του ιστού (Mills et al., 1999).

### 1.2.1. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού στη φυσική και την προσαρμοστική ανοσία

Το επιθήλιο του αναπνευστικού αντιπροσωπεύει την περιοχή πρώτης επαφής με παθογόνους παράγοντες. Η αναγνώριση των παθογόνων παραγόντων, που περιέχουν ειδικά σήματα, ονομαζόμενα PAMPs, (Pathogen-associated molecular patterns: μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα) διαμεσολαβείται από υποδοχείς τους οποίους φέρουν τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, με κύριους τους TLRs (Toll-like receptors: υποδοχείς τύπου Toll), και PRRs (Pattern recognition receptors: υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων). Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού ενεργοποιούνται και εξουδετερώνουν τους εισερχόμενους παθογόνους μικροοργανισμούς εκκρίνοντας διάφορα ένζυμα (λυσοζύμη, φωσφολιπάσες), πεπτίδια (ντιφενσίνες), κολλεκτίνες, αναστολείς πρωτεασών, βλεννίνες, πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα και μικρά μόρια, όπως ROS (reactive oxygen species: ενεργές ρίζες οξυγόνου) και NO (nitric oxide: μονοξείδιο του αζώτου) (Schleimer et al., 2007).



Εικ.2 Η συμβολή των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού στη φυσική και τη προσαρμοστική ανοσία (προσαρμογή από: Schleimer et al., 2007)

Εκτός από το ρόλο τους στη φυσική ανοσία, τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συμβάλλουν στην έναρξη και τη διεξαγωγή αποκρίσεων της προσαρμοστικής ανοσίας. Αρχικά, τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού μπορούν να ενεργοποιήσουν τα δενδριτικά κύτταρα ύστερα από την επίδραση κάποιου αντιγόνου. Με την έκκριση χημειοτακτικών παραγόντων μπορούν να στρατολογήσουν τα κοκκιοκύτταρα και τα T-

λεμφοκύτταρα και επιπλέον, με την έκκριση παραγόντων της φλεγμονής μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση των κυττάρων της φλεγμονής (Schleimer et al., 2007) (Εικ.2).

### **1.3. Φλεγμονή του αναπνευστικού και παθήσεις στις οποίες εμπλέκονται τα επιθηλιακά κύτταρα**

Η φλεγμονή αποτελεί μια φυσιολογική απόκριση του οργανισμού σε ποικίλα αίτια, όπως οι μολύνσεις και η βλάβη του ιστού. Η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων, τα οποία απελευθερώνουν κυτταροκίνες, επηρεάζοντας τη λειτουργία των άλλων κυττάρων. Για την ομοίωση του οργανισμού πρέπει να υπάρχει ισορροπία των μηχανισμών που την προάγουν και των μηχανισμών που την καταστέλλουν. Η αδυναμία καταστολής της οξείας φλεγμονής εγκαθιστά μια φλεγμονή χρόνια που χαρακτηρίζεται από συνεχή διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και επιδιόρθωση του κατεστραμμένου ιστού (Moldoveanu et al., 2009).

Η φλεγμονή στους πνεύμονες μπορεί να προκύψει από παθογόνους μικροοργανισμούς ή από έκθεση σε τοξίνες, ρυπαντές, βλαβερές ουσίες και αλλεργιογόνα. Η οξεία φλεγμονή παρατηρείται σε παθήσεις όπως η πνευμονία, ενώ η χρόνια φλεγμονή κατά το άσθμα και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Κύριοι μεσολαβητές της χρόνιας φλεγμονής είναι τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα, καθώς και οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και από τα διάφορα δομικά κύτταρα του ιστού (Moldoveanu et al., 2009).

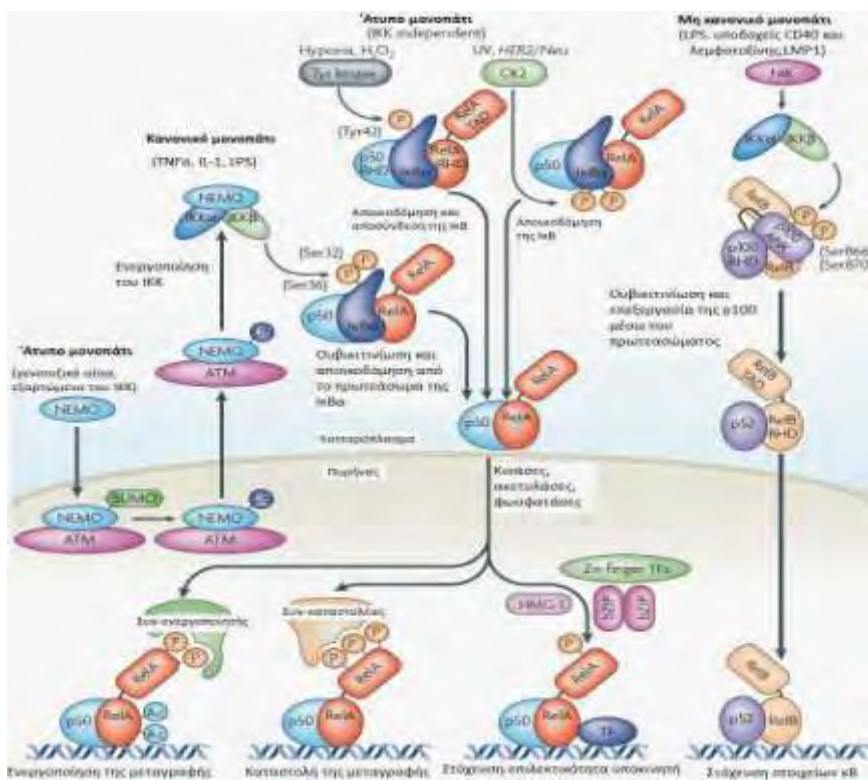
#### **1.3.1. NF-κB**

Ο NF-κB (nuclear factor κB-πυρηνικός παράγοντας κB) είναι μεταγραφικός παράγοντας που θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής της φλεγμονής, καθώς η ενεργοποίησή του απαιτείται για τις διαδικασίες της (Barnes and Karin, 1997).

Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν 5 μέλη της οικογένειας των NF-κB: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) and p52/p100 (NF-κB2). Τα αίτια που μπορούν να ενεργοποιήσουν τον NF-κB είναι διάφορες κυτταροκίνες, ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C, ιοί και οξειδωτικές ουσίες. Ο NF-κB προάγει την έκφραση περισσότερων από 200 γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και απόπτωση, την κυτταρική προσκόλληση, τη διαφοροποίηση, ανοσολογικές διαδικασίες τη φλεγμονή, την ιστική αναδιαμόρφωση (Perkins, 2007).

Υπάρχουν αρκετά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB. Το κανονικό μονοπάτι περιλαμβάνει πιο συχνά τις υπομονάδες p50 και p65 ή c-Rel και ενεργοποιείται ως απόκριση σε κυτταροκίνες που προάγουν τη φλεγμονή όπως TNFα (tumour necrosis factor α –

παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$ ), IL-1 (interleukin 1-ιντερλευκίνη 1) ή προϊόντα βακτηρίων, όπως LPS (lipopolysaccharide: λιποπολυσακχαρίτης). Σε φυσιολογικά κύτταρα τα διμερή του NF- $\kappa$ B διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα από τον αναστολέα των  $\kappa$ Bs (I $\kappa$ Bs), ο οποίος καλύπτει την αλληλουχία NLS (nuclear localization sequence: αλληλουχία εντόπισης στον πυρήνα) της πρωτεΐνης NF- $\kappa$ B. Η κινάση IKK $\beta$ , που αποτελεί μέρος του συμπλόκου IKK, το οποίο αποτελείται και από τις υπομονάδες IKK $\alpha$ , IKK $\gamma$  ή NEMO (NF- $\kappa$ B essential modifier: απαραίτητος τροποποιητής του NF- $\kappa$ B) φωσφορυλιώνει 2 κατάλοιπα σερίνης στον I $\kappa$ B. Ο I $\kappa$ B έπειτα πολυουβικινιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, με επακόλουθη την απελευθέρωση του NF- $\kappa$ B και τη μετατόπιση του στον πυρήνα. Υπάρχουν επίσης και άτυπα μονοπάτια ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B εξαρτώμενα και μη από το IKK σύμπλοκο. Οι υπομονάδες του NF- $\kappa$ B μπορούν να υποστούν φωσφορυλίωση από κινάσες και άλλες τροποποιήσεις από φωσφατάσες και ακετυλάσες με αποτέλεσμα είτε την ενεργοποίηση είτε την καταστολή της μεταγραφικής τους δράσης. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οδηγεί στην στόχευση των υπομονάδων του NF- $\kappa$ B σε συγκεκριμένους υποκινητές γονιδίων (Perkins, 2007).



Εικ.3 Τα διάφορα μονοπάτια ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B (προσαρμογή από Perkins, 2007)



Τέλος, το μη κανονικό μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί από υποδοχείς CD40 και λεμφοτοξίνης-β και οδηγεί στην ενεργοποίηση του IKKα από τη NIK (NF-κB inducing kinase: κινάση που επάγει τον NF-κB), καθώς και τη φωσφορυλίωση της p100. Μέσω αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα της p100 προκύπτει η p52, η οποία ετεροδιμερίζεται με την RelB και στοχεύουν πλέον σε στοιχεία κB (Εικ.3) (Perkins, 2007).

Ο NF-κB παίζει σημαντικό ρόλο στην περίπτωση φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως είναι μολύνσεις, αλλεργίες και ο καπνός του τσιγάρου, καθώς προάγει τα την έκκριση κυτταροκινών από τα μακροφάγα. Ο NF-κB είναι κυρίως ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων της φλεγμονής και αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Τα ίδια τα προϊόντα των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NF-κB, όπως ο TNFα και η IL-1β, ενεργοποιούν επίσης τον NF-κB, διαιωρίζοντας τη φλεγμονώδη απόκριση (Barnes and Karin, 1997).

### **1.3.2. Κυτταροκίνες**

Κατά τη φλεγμονή επικρατεί αυξημένη ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και απελευθέρωση κυτταροκινών. Αναλυτικά, ένας τρόπος διάκρισης των κυτταροκινών τις ομαδοποιεί α) σε λεμφοκίνες, οι οποίες εκκρίνονται από τα T-λεμφοκύτταρα και ρυθμίζουν την ανοσία, β) σε κυτταροκίνες οι οποίες διευρύνουν την φλεγμονώδη απόκριση, γ) σε αυξητικούς παράγοντες, που προωθούν την κυτταρική επιβίωση και τις δομικές αλλαγές των αεραγωγών, δ) σε χημειοκίνες, που προσελκύουν τα κύτταρα της φλεγμονής, και ε) σε αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που ρυθμίζουν αρνητικά τη φλεγμονή. Οι κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της χρόνιας φλεγμονής του άσθματος και της ΧΑΠ στρατολογώντας, ενεργοποιώντας και προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων της φλεγμονής (Barnes, 2008) (Πιν.1).

Από τις κυτταροκίνες αυτές ο TNFα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή των αεραγωγών.

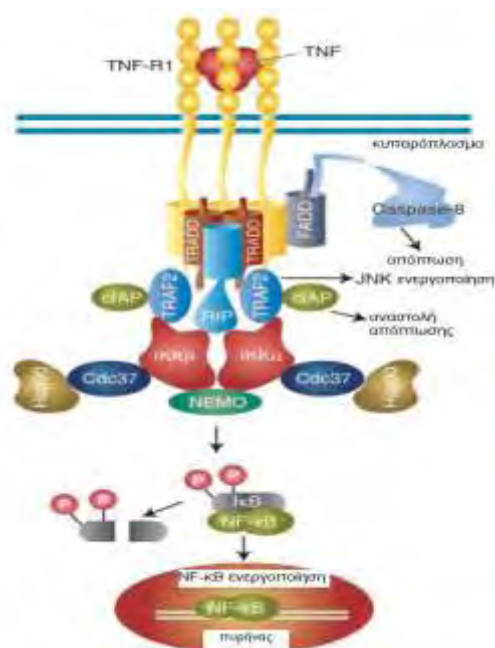
Πίν.1 Οι κυριότερες κυτταροκίνες των φλεγμονωδών παθήσεων των αεραγωγών και η δράση τους (προσαρμογή από: Barnes, 2008)

<u>Δεμοκίνες</u>	
IL-4	↑ IgE, ↑Th2 κυττάρων
IL-5	↑ ηωσινοφίλων
IL-9	↑ μαστοκυττάρων
IL-13	↑ IgE, αναδιαμόρφωση αεραγωγών
<u>Υπερ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες</u>	
IL-1β	↑ φλεγμονής
IL-6	↑ φλεγμονής
TNFα	↑ φλεγμονής
<u>Παράγοντες ανάπτυξης</u>	
EGF	↑υπερέκκριση βλέννας
GM-CSF	↑ ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων
NGF	↑AHR
TGF-β	Ίνωση
VEGF	Αγγειογένεση
<u>Χημειοκίνες</u>	
CCR2 αγωνιστές	↑ μονοκυττάρων
CCR3 αγωνιστές	↑ ηωσινοφίλων
CCR4 αγωνιστές	↑Th2 κυττάρων
CXCR5 αγωνιστές/RANTES	↑T-λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων
<u>Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες</u>	
IL-10	↓ φλεγμονής

### 1.3.2.1. Κυτταρική σηματοδότηση και βιολογική δράση του TNFα

Ο TNFα είναι μια κυτταροκίνη με πλειοτροπική δράση που συμβάλλει στη ρύθμιση της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. Χαρακτηρίζεται ως μια κυτταροκίνη πρώιμης απόκρισης και σχετίζεται με γεγονότα αναγνώρισης, στρατολόγησης, απομάκρυνσης και επιδιόρθωσης κατά τη βλάβη του ιστού (Thomas and Heywood, 2002).

Ο TNFα συντίθεται αρχικά ως μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 26 kDa. Το εξωκυττάριο τμήμα του κόβεται στην κυτταρική επιφάνεια από μια ειδική μεταλλοπρωτεΐνάση, την TACE (TNF-α converting enzyme), που ονομάζεται και ADAM 17. Προκύπτει, έτσι, μια διαλυτή ομοτριμερής πρωτεΐνη 17 kDa, που αποτελείται από 157 αμινοξέα (Thomas and Heywood, 2002).



Εικ.4 Η κυτταρική σηματοδότηση του TNF μέσω του TNFR-1 (προσαρμογή από: Chen and Goeddel, 2002)

Η κυτταρική λειτουργία του TNFα επιτελείται κυρίως μέσω των υποδοχέων του TNFR-1 (p55) και TNFR-2 (p75) (Darnay and Aggarwal 1997). Η πλειονότητα των βιολογικών δράσεων του TNFα αποδίδονται στην πρόσδεση του στον TNFR-1, με τελικό αποτέλεσμα όχι μόνο την απόπτωση αλλά και την ενεργοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή, όπως του NF-κB και c-Jun. Αναλυτικότερα, η σύνδεση του ομοτριμερούς TNFα στον TNFR-1 οδηγεί στον τριμερισμό του TNFR-1, στην απελευθέρωση της ανασταλτικής πρωτεΐνης SODD (silencer of death domains: αποσιωπητή περιοχών θανάτου) και το σχηματισμό ενός συμπλόκου που

περιλαμβάνει τα μόρια-προσαρμοστές: TRADD (TNF receptor-associated death domain protein: πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με τον TNF-R), TRAF2 (TNF-R-associated factor 2: συνδεδεμένος με τον TNF-R παράγοντας 2), RIP (receptor-interacting protein: πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα), FADD (Fas-associated death domain protein: πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου, συνδεδεμένη με τον Fas). Τα μόρια-προσαρμοστές με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλα ένζυμα, όπως την κασπάση 8 οδηγώντας σε απόπτωση, ή την ανασταλτική κινάση IKKβ, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB και τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του (Chen and Goeddel, 2002) (Εικ. 4).

### 1.3.2.2. Ο ρόλος του TNFα κατά τη χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών

Ο TNFα καθιστά τη φλεγμονή στους αεραγωγούς χρόνια. Στους αεραγωγούς, ο TNFα παράγεται, κυρίως, από μακροφάγα και μονοκύτταρα. Ωστόσο, και άλλα κύτταρα έχουν εμπλακεί στην έκκριση του, όπως τα μαστοκύτταρα, που ευαισθητοποιούνται κατά την αλλεργική αντίδραση, τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Στόχοι του TNFα αποτελούν τα κύτταρα της φλεγμονής, καθώς και τα δομικά κύτταρα των αεραγωγών.

Στους αεραγωγούς, ο TNFα θεωρείται υπεύθυνος για την επιδείνωση της φλεγμονώδους απόκρισης. Βασικές δράσεις του TNFα είναι η ενεργοποίηση ουδετερόφιλων, η επαγωγή της απελευθέρωσης χημειοτακτικών παραγόντων από τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα και η αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, ο TNFα συνεργιστικά με άλλες κυτταροκίνες όπως IL-4, IL-5 (interleukin-ιντερλευκίνη) μπορεί να υποκινήσει την περαιτέρω ενεργοποίηση των ηωσινοφίλων (Thomas, 2001). Ο TNFα παρεμποδίζει την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα και έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία των νεκρωτικών κυττάρων και η έκκριση τοξικών ουσιών αυξάνει την ενεργοποίηση των κυττάρων της φλεγμονής (Borges et al., 2009).

In vivo και in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι ο TNFα προάγει την παραγωγή ROS, από ενδοθηλιακά κύτταρα και ουδετερόφιλα. Συνέπεια είναι η πρόκληση οξειδωτικού στρες στους ιστούς του πνεύμονα και η επικείμενη ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NF-κB και της AP-1 (activator protein 1: πρωτεΐνης-ενεργοποιητή 1) (Barnes, 2008).

Ο TNFα αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως E-σελεκτίνη, ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1 - ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης κυττάρων), VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule 1 - μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων) σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού in vitro και προκαλεί αύξηση της προσκόλλησης

των ηωσινοφίλων στα κύτταρα αυτά. Διευκολύνεται, έτσι, η μετανάστευση των κυττάρων της φλεγμονής και συγκεκριμένα των κοκκιοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής (Barnes, 2008).

Σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα βρόγχων βρέθηκε ότι ο TNFα προκαλεί σημαντική απόπτωση (Kampf et al., 1999). Επιπλέον, σε επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών ο TNFα μπορεί να διεγείρει την έκκριση της βλέννας (Strieter et al., 1999; Thomas, 2001).

Ο TNFα ευθύνεται και για την υπεραπαντητικότητα των βρόγχων (AHR: airway hyperresponsiveness), βασικό σύμπτωμα του άσματος. Η επίδραση του TNFα μεσολαβείται με άμεση επίδραση στα λεία μυϊκά κύτταρα αυξάνοντας την ικανότητα τους για συστολή. Επιπλέον, ο TNFα με την ενεργοποίηση των κυττάρων ης φλεγμονής οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση μεσολαβητών, όπως ισταμίνη, ευαισθητοποιώντας τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών (Thomas, 2001).



Εικ.5 Η επίδραση του TNFα στα διάφορα κύτταρα κατά το άσμμα (προσαρμογή από: Brightling et al., 2007)

Ο TNFα συμβάλλει επίσης στην απόφραξη των αεραγωγών, καθώς αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και υποκινεί τη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες, οδηγώντας σε υποεπιθηλιακή ίνωση (Thomas, 2001) (Εικ.5).

### 1.3.3. Επιθηλιακά κύτταρα και φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού

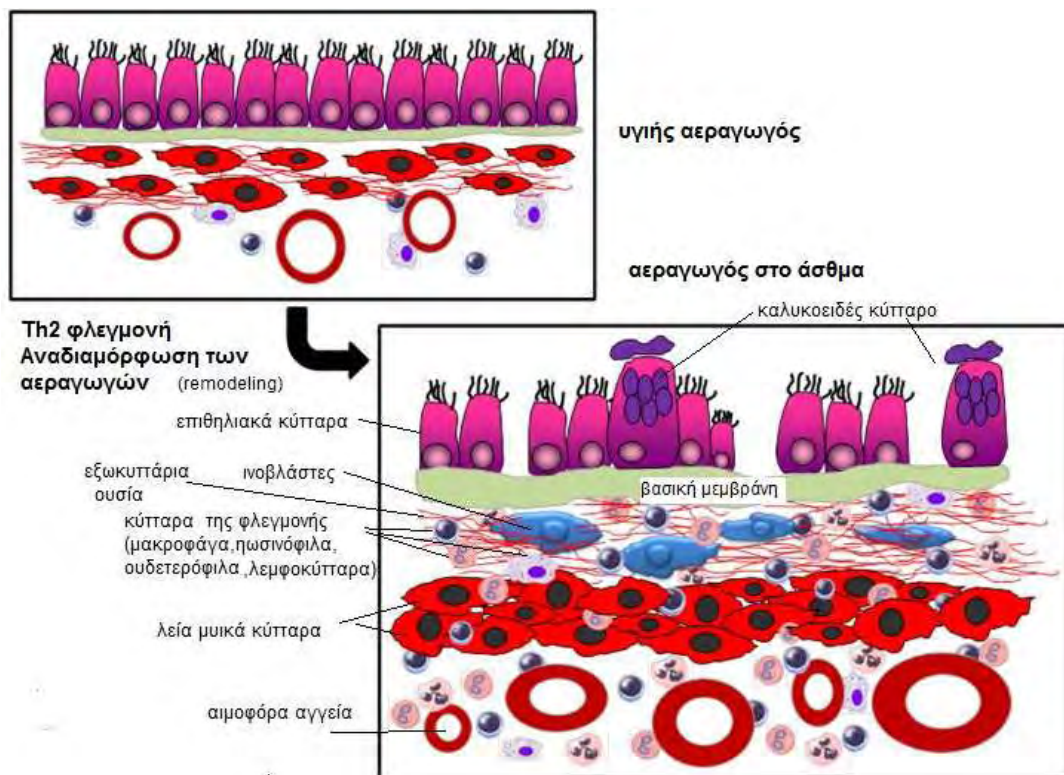
Το επιθήλιο των αεραγωγών θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής της χρόνιας φλεγμονής που χαρακτηρίζει πνευμονικές παθήσεις, όπως το άσθμα, η ΧΑΠ και ο καρκίνος του πνεύμονα.

#### 1.3.3.1. Άσθμα

Το άσθμα είναι μια χρόνια νόσος του αναπνευστικού που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και δομικές αλλαγές στους βρόγχους. Αίτια του άσθματος αποτελούν τα διάφορα αλλεργιογόνα και οι ιϊκές λοιμώξεις. Κατά το άσθμα παρουσιάζονται οξεία και χρόνια συμπτώματα συριγμού, υπερπαραγωγής βλέννας, και παράλληλα επικρατεί αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών και AHR (Holgate, 2008).

Το άσθμα χαρακτηρίζεται ως Th2 φλεγμονώδη απόκριση, καθώς υπάρχει αύξηση του αριθμού των CD4<sup>+</sup> βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, κυρίως του υποτύπου Th2. Τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες, όπως IL-4, IL-5, IL-9 και IL-13 (Th2 τύπου), κι έτσι διακρίνονται από τα Th1 κύτταρα, που εκκρίνουν IL-2 και IFN-γ (interferon γ: ιντερφερόνη γ). Ενώ σε ήπιο ως μέτριο άσθμα επικρατεί η Th2 φλεγμονή, δεδομένα δείχνουν ότι σε σοβαρό και χρόνιο άσθμα παρατηρείται Th1 φλεγμονή. Οι Th2 κυτταροκίνες οδηγούν στη διήθηση των ηωσινοφίλων, κυρίως, αλλά και άλλων κυττάρων της φλεγμονής, όπως βασεόφιλων και μαστοκυττάρων στους αεραγωγούς (Holgate, 2008).

Κατά το άσθμα, εκτός από την αλλεργική αντίδραση και τη φλεγμονή, παρατηρείται αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, ένας όρος που αναφέρεται στις αλλαγές στη σύνθεση, την ποσότητα και την οργάνωση των συστατικών του τοιχώματος των αεραγωγών, κατόπιν χρόνιας βλάβης και επιδιόρθωσης. Η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών κατά το άσθμα χαρακτηρίζεται από καταστροφή του επιθηλίου, υπερπλασία και μεταπλασία των καλυκοειδών επιθηλιακών κυττάρων, υπερπλασία και υπερτροφία των λείων μυών των βρόγχων και νεοαγγειογένεση, με παράλληλη πάχυνση των λείων μυών των αγγείων. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη πάχυνση του στρώματος κάτω ακριβώς από τη βασική μεμβράνη, η οποία ορίζεται ως υποεπιθηλιακή ίνωση και σχετίζεται με τη σοβαρότητα της ασθένειας. Υπεύθυνη είναι η ενεργοποίηση των ινοβλαστών και η διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες (Davies, 2009; Bai and Knight, 2005) (Εικ. 6).



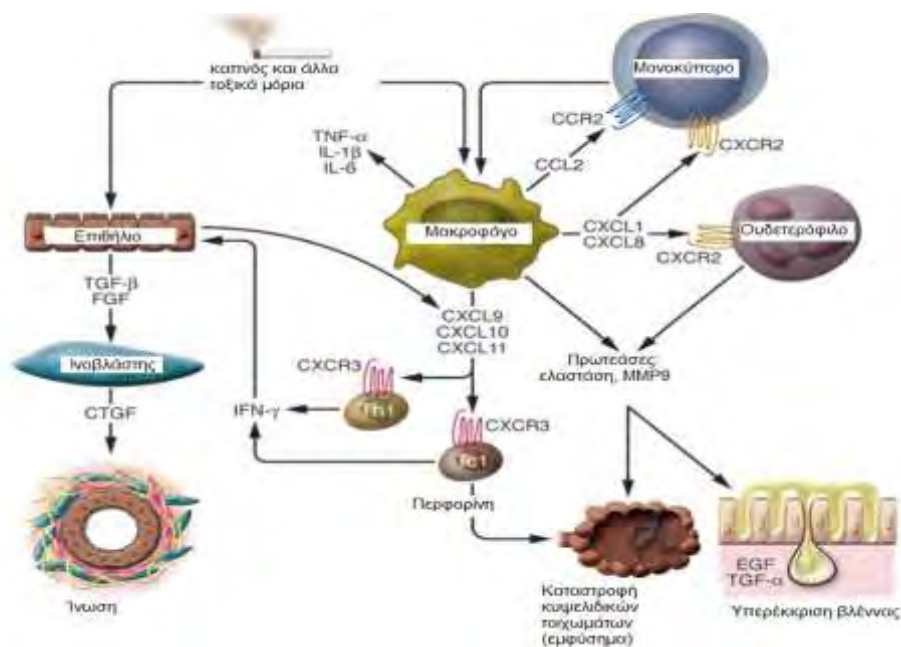
Εικ.6 Αλλαγές των κυττάρων κατά το άσθμα (προσαρμογή από: Rydell –Tormanen et al., 2013)

### 1.3.3.2. Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι μια πάθηση των πνευμόνων που χαρακτηρίζεται από απόφραξη των περιφερικών αεραγωγών, η οποία είναι εξελισσόμενη και μη πλήρως αναστρέψιμη και η οποία συνοδεύεται από φλεγμονή στους μικρούς αεραγωγούς και το πνευμονικό παρέγχυμα. Αίτιο της ΧΑΠ είναι η εισπνοή τοξικών μορίων, που προέρχονται κυρίως από το κάπνισμα, αλλά και άλλοι παράγοντες, όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, το περιβάλλον εργασίας και οι λοιμώξεις από παθογόνους μικροοργανισμούς (Stockley et al., 2009). Η ΧΑΠ περιλαμβάνει τη χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα. Η χρόνια βρογχίτιδα χαρακτηρίζεται από υπερέκκριση βλέννας και απόφραξη των μικρών αεραγωγών λόγω πάχυνσης των τοιχωμάτων τους και χρόνια διαδικασία αναδιαμόρφωσης του ιστού, που οδηγεί σε ίνωση. Το εμφύσημα χαρακτηρίζεται από καταστροφή των τοιχωμάτων των κυψελίδων και επικείμενη κατάρρευση των αεραγωγών (Houghton et al., 2005).

Κατά τη χρόνια φλεγμονή της ΧΑΠ, παρατηρείται αυξημένη προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων. Τα εισπνεόμενα τοξικά μόρια ενεργοποιούν άμεσα τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα να απελευθερώσουν αυξητικούς παράγοντες, όπως TGF- $\beta$  (tumour growth factor  $\beta$ - παράγοντας αύξησης όγκων  $\beta$ ) και FGFs (fibroblast growth factor: παράγοντας αύξησης

ινοβλαστών), οι οποίοι προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και οδηγούν σε ίνωση. Τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα απελευθερώνουν κυτταροκίνες που προάγουν τη φλεγμονή, όπως TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IL-6 και χημειοκίνες για την προσέλκυση και άλλων κυττάρων της φλεγμονής, όπως ουδετεροφίλων, Th1 λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Από τα κύτταρα της φλεγμονής παράγονται πρωτεάσες, όπως ελαστάση, MMPs (matrix metalloproteinases : μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας), καθώς και περφορίνες από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και καταστρέφονται, έτσι, τα τοιχώματα των αεραγωγών. Επιπλέον, ο εκκρινόμενος EGF (epidermal growth factor: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) και ο TGF- $\alpha$  προάγουν την παραγωγής βλέννας (Barnes 2008) (Εικ.7).



Εικ.7 Η διαδικασία της φλεγμονής κατά τη ΧΑΠ (προσαρμογή από: Barnes, 2008)

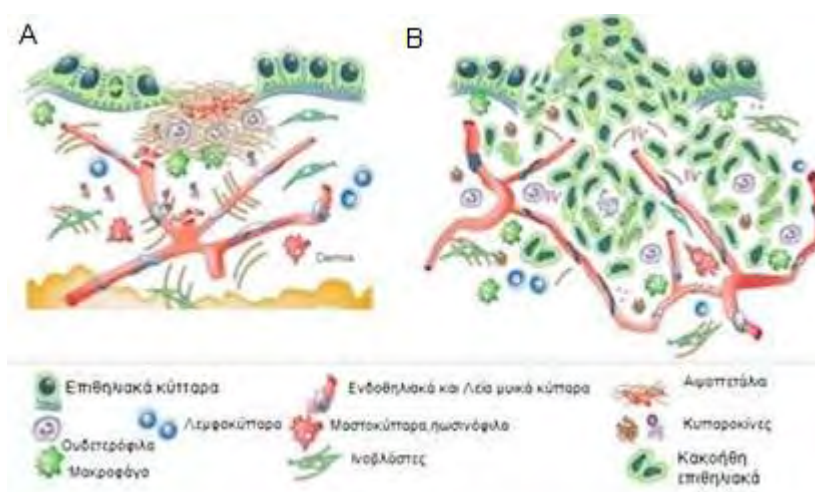
### 1.3.3.3. Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια νοσηρή κατάσταση δημιουργίας κακοήθους όγκου που προκύπτει από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο συχνός καρκίνος σε διάγνωση (80% των περιπτώσεων) και είναι μια από τις πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου (Jemal et al., 2009). Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό. Ωστόσο, χημικές ουσίες, όπως ο αμιάντος, το αρσενικό, η ατμοσφαιρική ρύπανση, αλλά και η ΧΑΠ ενέχονται στον αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα (Cooper 2005).



Ο καρκίνος του πνεύμονα σύμφωνα με το μέγεθος και τη μορφολογία των κακοηθών κυττάρων διακρίνεται στον SCLC (small cell lung cancer: μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα) και τον NSCLC (non-small cell lung cancer: μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα). Ο SCLC αποτελεί το 20-25% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, αναπτύσσεται και εξαπλώνεται γρήγορα και είναι ιδιαίτερα μεταστατικός. Τα κύτταρα συχνά εμφανίζουν νευροενδοκρινείς ιδιότητες. Ο NSCLC αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό καρκίνων του πνεύμονα (75-80%) και περιλαμβάνει τρεις κύριες υποκατηγορίες, το αδενοκαρκίνωμα, τον πλακώδη καρκίνο, και το καρκίνωμα των μεγάλων κυττάρων. Το αδενοκαρκίνωμα απαντάται στους μικρούς αεραγωγούς των πνευμόνων, ενώ ο πλακώδης καρκίνος και ο SCLC απαντώνται στους μεγάλους αεραγωγούς (Cooper, 2005).

Η έκθεση σε καρκινογόνα, όπως ο καπνός, προκαλούν μεταλλάξεις στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, που σχετίζονται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επιπλέον, δημιουργούνται χρωμοσωματικές βλάβες που οδηγούν σε απώλεια ετεροζυγωτίας (Wistuba et al., 2000). Οι πιο κοινές μεταλλάξεις στον καρκίνο του πνεύμονα αφορούν στα γονίδια *EGFR*, *KRAS*, *EML4-ALK* και *MET* (Luo and Lam, 2013).



Εικ. 8 Η φλεγμονή κατά την καρκινογένεση Α) Φυσιολογικός ιστός και έναρξη της φλεγμονής Β) Ανάπτυξη καρκίνου και συνύπαρξη φλεγμονής (προσαρμογή από: Coussens and Werb, 2002)

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου στον πνεύμονα χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Τα νεοπλαστικά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς επίσης οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν κυταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προάγουν τον

πολλαπλασιασμό, την επιβίωση καθώς και την EMT (epithelial to mesenchymal transition: μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά), που ευθύνεται για τη μετάσταση. Τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα εκφράζουν, επίσης, μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως συνθάσες των προσταγλανδινών και μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κB, με μη φυσιολογική ενεργοποίηση μονοπατιών, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της καρκινογένεσης (Peebles et al., 2007) (Εικ.8).

#### **1.3.3.4. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις**

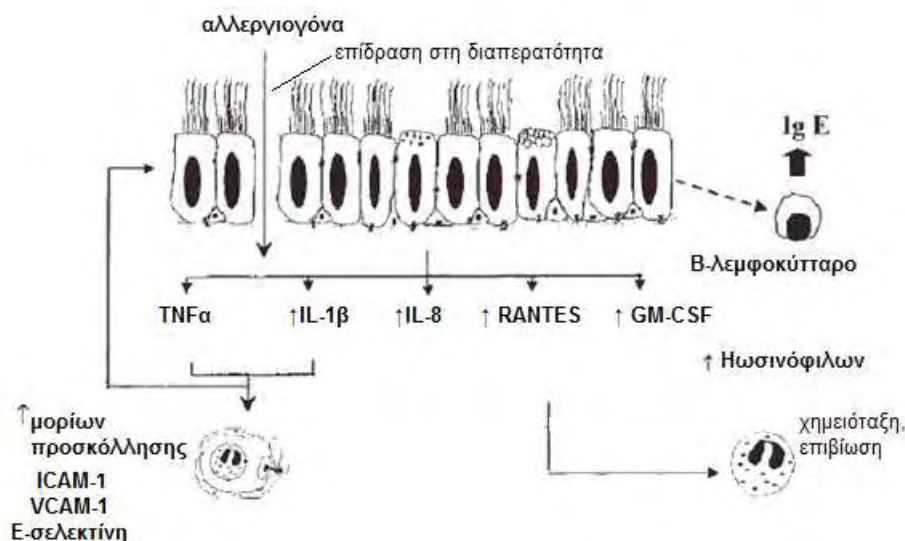
Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η φλεγμονή, αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία μπορούν να αλλάξουν τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων. Σε κατάσταση χρόνιας φλεγμονής, τα επιθηλιακά του αναπνευστικού εκτίθενται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε παράγοντες της φλεγμονής και τόσο η συνοχή τους όσο και ο μεταβολισμός τους αλλάζει. Βέβαια, κατά τη φλεγμονή τα επιθηλιακά κύτταρα δε αποτελούν μόνο παθητικούς αποδέκτες, αλλά έχουν και έναν ενεργό ρόλο στην έναρξη και την πρόοδο της.

Διάφορα αίτια, όπως τα αλλεργιογόνα και οι ιϊκές λοιμώξεις, που ευθύνονται για την παθολογία του άσθματος, επιδρούν στο επιθήλιο των αεραγωγών και προκαλούν βλάβη και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων (Holgate, 2008). Σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με άσθμα έχει παρατηρηθεί καταστροφή και απόρριψη του επιθηλίου (Chanez, 2005). Το επιθήλιο εμφανίζεται εύθραυστο λόγω καταστροφής των στενοσυνδέσμων και δεσμοσωμάτων. Αυξάνεται, έτσι, η διαπερατότητα του και διευκολύνεται περισσότερο η είσοδος των διάφορων βλαβερών μορίων. Οι ιοί με κυτταροτοξικό τρόπο καταστρέφουν το επιθήλιο και προκαλούν απελευθέρωση μεσολαβητών από τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη (Holgate, 2008). Επιπλέον, αρκετοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές προερχόμενοι από τα κύτταρα της φλεγμονής, όπως κατιονικές πρωτεΐνες, πρωτεολυτικά ένζυμα, MMPs και ROS είναι υπεύθυνοι για την αποδιοργανωμένη δράση και την καταστροφή του επιθηλίου των αεραγωγών. Αρκετά αλλεργιογόνα, με την παράλληλη παραγωγή των ROS, μπορούν να ενεργοποιήσουν τα επιθηλιακά κύτταρα μέσω του NF-κB (Lambrecht and Hammad, 2012).

Τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν μεσολαβητές που προάγουν τη φλεγμονή, όπως NO, μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, ενδοθηλίνες και κυτταροκίνες. Αν και το NO, παράγεται φυσιολογικά σε μικρές ποσότητες για τη διατήρηση της ομοιόστασης, ωστόσο όταν η παραγωγή του ξεπερνά το φυσιολογικό τότε προκαλεί φλεγμονή και καταστροφή του επιθηλίου. Οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος προάγουν τη συστολή

των λείων μυών και την παραγωγή βλέννας. Οι ενδοθηλίες επίσης εμπλέκονται στη συστολή των βρόγχων (Mills, 1999).

Τα ενεργοποιημένα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα κατά τη φλεγμονή παράγουν κυτταροκίνες, όπως IL-8, CCL5 ή RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted-ρυθμιζόμενη στην ενεργοποίηση, εκφραζόμενη και εκκρινόμενη από φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα), IL-6, IL-1β, IL-11 και οδηγούν στη στρατολόγηση των κυττάρων της φλεγμονής (Mills, 1999). Μια κυτταροκίνη που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και συμβάλλει στην εξέλιξη του άσθματος είναι η TSLP (thymic stromal lymphopoietin), η οποία ενεργοποιεί τους TLRs και στρατολογεί τα μαστοκύτταρα (Liu 2006). Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού μέσω των κυτταροκινών IL-1β και TNFα οδηγούν και σε αύξηση της έκφρασης άλλων κυτταροκινών (IL-8, RANTES), καθώς και μορίων προσκόλλησης, όπως ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνη, που παίζουν ρόλο στην πρόοδο της φλεγμονής. Τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της φλεγμονής μέσω του παράγοντα GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor: παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων) (Mills, 1999) (Εικ. 9).



Εικ.9 Η απελευθέρωση παραγόντων της φλεγμονής από το επιθήλιο κατά τη χρόνια φλεγμονή (προσαρμογή από: Mills et al., 1999)

Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συμβάλλουν στις διαδικασίες αποκατάστασης του ιστού κατά τη χρόνια φλεγμονή και αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα δομικά κύτταρα, όπως τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη απελευθερώνουν EGF, FGF-2, IGF-1 (insulin-like growth factor-1: ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης), τον PDGF (platelet-derived growth

factor : παράγοντα αύξησης που παράγεται από αιμοπετάλια), ενδοθηλίνη 1 και TGF-β2, υποκινώντας τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Υπό μελέτη βρίσκεται η προώθηση της EMT στους αεραγωγούς μέσω αλλεργιογόνων. Διάφορα αλλεργιογόνα σε συνδυασμό με τον TGF-β επιδρώντας σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να μειώσουν την έκφραση της β-καδερίνης και να αυξήσουν την έκφραση μεσεγγυματικών δεικτών, όπως βιμεντίνη, φιμπρονεκτίνη και β-κατενίνη. Μέσω της EMT δημιουργείται ένα περιβάλλον πρόσφορο για τη συνέχιση της φλεγμονής και τη χρόνια αναδιαμόρφωση των αεραγωγών (Heijink et al., 2010).

Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών ευθύνονται για την αυξημένη παραγωγή βλέννας κατά τη χρόνια φλεγμονή. Ο εκκρινόμενος από τα επιθηλιακά κύτταρα EGF ενεργοποιεί τον υποδοχέα του, EGFR. Ο EGFR έχει δράση κινάσης τυροσίνης και έχει βρεθεί ότι αυξάνει την έκκριση της βλέννας κατά το άσθμα. Ο TGF-α ενεργοποιεί τον EGFR μέσω φωσφορυλίωσης, επάγοντας την έκφραση των γονιδίων βλεννινών (*MUC5AC* και *MUC5B*). Επιπλέον, οι Th2 κυτταροκίνες, αλληλεπιδρώντας με τον EGFR προάγουν την μεταπλασία των κροσσωτών κυττάρων σε καλυκοειδή, τα οποία εκκρίνουν βλέννα. Στα επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών από ασθενείς με άσθμα, η έκφραση του EGFR και των *MUC5AC* είναι αυξημένη (Temman, et al., 2007; Cohn, 2006). Παράλληλα, στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, μειώνεται η δράση του διαύλου CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: ρυθμιστής της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας κυστικής ίνωσης). Ο CFTR στα κροσσωτά κύτταρα συνδέεται με την αύξηση της βλέννας και την επικείμενη παθοφυσιολογία της ΧΑΠ. Τα κύτταρα που παράγουν βλέννα πολλαπλασιάζονται και υφίστανται υπερπλασία (Puchelle et al., 2006).

#### 1.4. Υποξία και HIFs

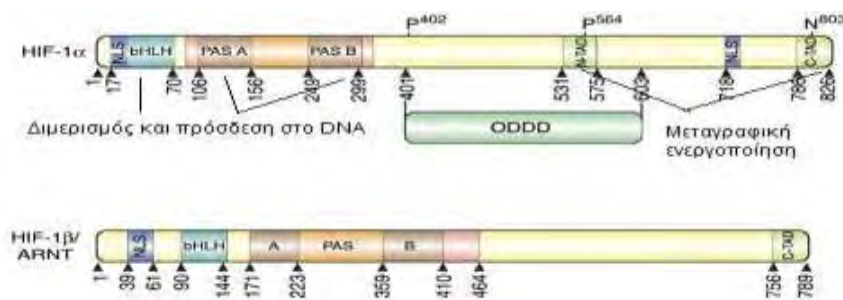
Ως υποξία ορίζεται η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό. Η υποξία περιλαμβάνει μια οξεία φάση, κατά την οποία συμβαίνουν γρήγορες και παροδικές αποκρίσεις μέσω μεταφραστικών τροποποιήσεων των υπαρχουσών πρωτεϊνών, και μια χρόνια φάση στην οποία συμβαίνουν καθυστερημένες αλλά με διάρκεια αλλαγές στη μεταγραφή των γονιδίων και στην πρωτεϊνοσύνθεση (Semenza, 2010).

Η υποξία στους πνεύμονες μπορεί να προκύψει φυσιολογικά, ύστερα από έκθεση του οργανισμού σε υψηλό υψόμετρο είτε σε παθολογικές καταστάσεις, όπως κατά τη ΧΑΠ λόγω του ανεπαρκή αερισμού των κυψελίδων ή κατά το πνευμονικό οίδημα (Ushida et al., 2004).

Η προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία διαμεσολαβείται από την οικογένεια των HIFs (Hypoxia Inducible Factors: παράγοντες που επάγονται από την υποξία). Οι HIFs

διαμεσολαβούν στις πρωταρχικές αποκρίσεις σε υποξικό στρες σε φυσιολογικά και μετασηματισμένα κύτταρα. Οι HIFs είναι πρωτεΐνες της μορφής bHLH-PAS (basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM: έλικα-βρόγχος-έλικα). Οι HIFs σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα που αποτελούνται από μια ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο  $\alpha$  υπομονάδα (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) και μια σταθερή  $\beta$  υπομονάδα (HIF1 $\beta$ , επίσης γνωστή ως ARNT), που εκφράζεται συνεχώς. Οι διμερείς HIFs προσδένονται σε HREs, που περιέχουν μια συντηρημένη RCGTG αλληλουχία στους υποκινητές ή προαγωγείς των γονιδίων στόχων τους (Keith et al., 2012).

Στα θηλαστικά απαντώνται 3 ισομορφές του HIF $\alpha$ , και συγκεκριμένα οι HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (ή EPAS1), και ο HIF-3 $\alpha$  (ή IPAS). Ο HIF-1 $\alpha$  ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας των HIF που αναγνωρίστηκε. Ανάλυση της δομής του HIF1 $\alpha$  έδειξε ότι περιλαμβάνει 4 διακριτές περιοχές για πρόσδεση στο DNA και διμερισμό, μια PAS περιοχή για διμερισμό και ειδικότητα για τα γονίδια στόχους, μια περιοχή ODD (Oxygen Dependent Degradation Domain: περιοχή εξαρτώμενης από το οξυγόνο αποικοδόμησης) και δύο περιοχές trans-ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Majmundar et al., 2010) (Εικ. 10).



Εικ.10 Η δομή των δύο υπομονάδων του HIF-1 (προσαρμογή από: Rezvani et al., 2011)

Ο HIF-2 είναι το δεύτερο μέλος της οικογένειας των HIFs που αναγνωρίστηκε και παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων με τον HIF-1 σε ποσοστό 48%. Ο HIF-2 είναι δομικά όμοιος με τον HIF-1 $\alpha$  στις περιοχές bHLH, PAS και ODD. Όπως και ο HIF-1 $\alpha$ , έτσι και ο HIF-2 $\alpha$  ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και προάγει τη γονιδιακή έκφραση. Το τρίτο μέλος της οικογένειας των HIF, ο HIF-3 $\alpha$  περιλαμβάνει μια bHLH, PAS περιοχή με 57% και 53% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία με τον HIF-1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$ , αντίστοιχα, και μια ODD περιοχή με 61% ομοιότητα με την αντίστοιχη του HIF1 $\alpha$ . Ομοίως και ο HIF-3 $\alpha$  μπορεί να διμεριστεί με τον ARNT και να προσδεθεί σε HREs in vitro. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-3 $\alpha$  πιθανόν παρεμποδίζει τη δράση των HIF-1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$  μέσω μιας ανασταλτικής PAS περιοχής (Majmundar et al., 2010).

Ο HIF-1α εκφράζεται πάντοτε σε όλα τα κύτταρα και έτσι αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Σε αντίθεση με τον HIF-1α, οι HIF-2α και HIF-3α παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση και εντοπίζονται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, σε πνευμονοκύτταρα τύπου II, σε νεφρικά διάμεσα κύτταρα, σε ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα και σε κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (Majmundar et al., 2010).

#### 1.4.1. Ρύθμιση και ρόλος του HIF-1α

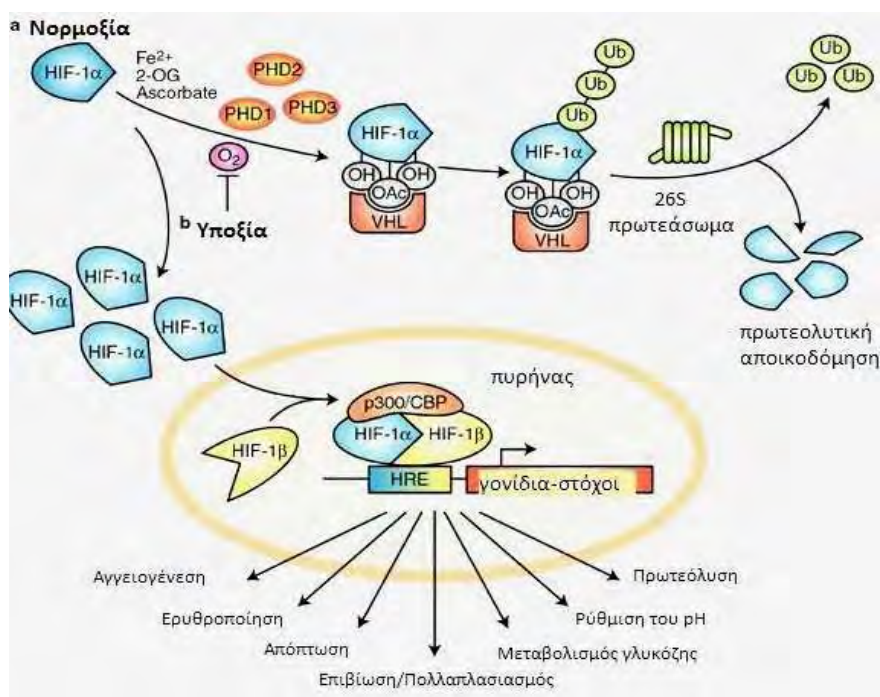
Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης (P402 και P564 στον HIF-1α ανθρώπου) από ειδικά ένζυμα τις PHDs (prolyl hydroxylase domain proteins: προλυλ-υδροξυλάσες). Οι PHDs χρησιμοποιούν  $O_2$  και α-κετογλουταρικό ως υποστρώματα σε μια ενζυμική αντίδραση στην οποία ένα άτομο οξυγόνου εισέρχεται στον HIF-1α και το άλλο στο α-κετογλουταρικό για να παραχθεί ηλεκτρικό οξύ και  $CO_2$ . Αυτό οφείλεται στο  $Fe(II)$  που υπάρχει στο καταλυτικό τους κέντρο. Η υδροξυλίωση του HIF-1α προκαλεί τη σύνδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης, VHL (von Hippel–Lindau), η οποία αλληλεπιδρά με την elongin C και στρατολογώντας τη λιγάση E3 της ουβικιτίνης οδηγεί τον HIF-1α για ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Semenza, 2010). Σε κατάσταση υποξίας η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις υδροξυλάσες αναστέλλεται και αποτρέπεται η αποικοδόμηση του. Επομένως, ο HIF-1α σταθεροποιείται, διμερίζεται με το HIF-1β και μετακινείται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων (Semenza, 2010; Chachami et al., 2009; Mylonis et al., 2008) (Εικ.11).

Όσον αφορά στη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α, ο FIH-1 (Factor inhibiting HIF-1α - παράγοντας που αναστέλλει τον HIF-1α) είναι μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και εμποδίζει τη μεταγραφική του δράση. Σε νορμοξία, ο FIH-1 υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (N803 στον HIF-1α ανθρώπου), και μπλοκάρει την αλληλεπίδραση του με τους συνενεργοποιητές CBP (CREB-binding protein-συνδεόμενη με τον CREB πρωτεΐνη) και p300. Ο ρόλος των CBP/p300 είναι να σταθεροποιούν το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής και δρώντας ως ακετυλοτρασφεράσες των ιστονών να επιτρέπουν την πρόσβαση της πολυμεράσης στο DNA, ώστε να το μεταγράψει σε RNA. Η υδροξυλίωση του HIF λειτουργεί ως ένας «αισθητήρας του οξυγόνου», καθώς η συγκέντρωση του οξυγόνου συνδέεται με τη ρύθμιση της μεταγραφής του HIF (Semenza, 2010).

Η σταθερότητα του HIF-1α μπορεί να επηρεαστεί και από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχει βρεθεί ότι οι αναστολείς της hsp 90 (heat shock protein - πρωτεΐνης θερμικού σοκ) και αναστολείς των ακετυλασών των ιστονών προάγουν την αποικοδόμηση

του HIF-1α με ένα ανεξάρτητο από το pVHL τρόπο. Ο HIF-1α μπορεί επίσης να σουμοϋλιωθεί, αλλά δεν είναι γνωστό αν αυτό αυξάνει ή μειώνει την αποικοδόμηση του (Kaelin and Ratcliffe 2008).

Παρόλο που η υποξία είναι ο βασικός ενεργοποιητής του, ο HIF-1α μπορεί να επαχθεί και σε νορμοξία από ROS, ιόντα μετάλλων και αυξητικούς παράγοντες. Τα μιτοχόνδρια μπορούν να λειτουργήσουν ως αισθητήρες της υποξίας και σε μέτρια υποξία μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ROS, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία των PHDs και την αποικοδόμηση του HIF-1α (Majmundar et al., 2010). Η δράση του HIF-1 μπορεί να υποκινηθεί από χηλικές ενώσεις σιδήρου, όπως η DFO (desferioxamine: δεσφεριοξαμίνη) και το CoCl<sub>2</sub> (χλωριούχο κοβάλτιο), που αναστέλλουν τις υδροξυλάσες. Η δράση των υδροξυλασών παρεμποδίζεται και από το DMOG (dimethyloxalylglycine-διμεθυλο-οξαλυλ-γλυκίνη), που αποτελεί ανταγωνιστή του α-κετογλουταρικού (Semenza, 2012).



Εικ.11 Ρύθμιση της επαγωγής του HIF-1α (προσαρμογή από: Carroll and Ashcroft, 2005)

Οι HIFs ως μεταγραφικοί παράγοντες υποκινούν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων τους, με ιστοειδικό τρόπο προκειμένου τα κύτταρα να προσαρμοστούν στην έλλειψη οξυγόνου. Οι HIFs προάγουν την ερυθροποίηση, ώστε να αυξηθεί η μεταφορά οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρα, μέσω γονιδίων στόχων τους, όπως η *EPO* και η *Transferrin*. Επιπλέον, οι HIFs προάγουν την αγγειογένεση, κυρίως μέσω του γονιδίου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor-VEGF), κι έτσι ενεργοποιούνται

και πολλαπλασιάζονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην υποξική περιοχή. Οι HIFs μεταβάλλουν το μεταβολισμό καθιστώντας τον εξαρτώμενο από τη γλυκόλυση, με την έκφραση ενζύμων της γλυκόλυσης και μεταφορέων γλυκόζης, όπως *GLUT-1*. Τέλος, οι HIFs μπορούν να συμβάλλουν και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Πίν.2). Η υποξία και οι HIFs εμπλέκονται σε διαδικασίες ανάπτυξης του οργανισμού αλλά και στην παθοφυσιολογία ασθενειών, όπως και στον καρκίνο (Ke and Costa, 2006).

Πίν.2 Τα βασικά γονίδια-στόχοι του HIF (προσαρμογή από: Ke and Costa, 2006)

<u><b>Ερυθροποίηση/Μεταβολισμός του σιδήρου</b></u>	<u><b>Μεταβολισμός της γλυκόζης</b></u>
Erythropoietin (EPO)	Adenylate kinase-3
Transferrin (Tf)	Aldolase-A,C (ALDA,C)
Transferrin receptor (Tfr)	Carbonic anhydrase-9
Ceruloplasmin	Enolase-1 (ENO1)
<u><b>Αγγειογένεση</b></u>	Glucose transporter-1,3 (GLU1,3)
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)
Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF)	Hexokinase 1,2 (HK1,2)
Leptin (LEP)	Lactate dehydrogenase-A (LDHA)
Transforming growth factor-β3 (TGF-β3)	Pyruvate kinase M (PKM)
Nitric oxide synthase (NOS2)	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)
<u><b>Αγγειακός τόνος</b></u>	<u><b>Κυτταρικός πολλαπλασιασμός - επιβίωση</b></u>
Heme oxygenase 1	Insulin-like growth factor-2 (IGF2)
Endothelin 1 (ET1)	Transforming growth factor-α (TGF- α)
Adrenomedulin (ADM)	<u><b>Απόπτωση</b></u>
α <sub>1β</sub> -Adrenergic receptor	Adrenomedullin (ADM)
	Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3)
	Nip3-like protein X (NIX)

#### 1.4.2. Η επίδραση της υποξίας στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού

Διάφορες μελέτες επίδρασης της υποξίας έχουν διεξαχθεί σε κυψελιδικά κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα (A549) η έκθεση σε συνθήκες υποξίας προκαλεί επαγωγή του HIF-1α και αλλαγές στη λειτουργία τους. Η επίδραση της υποξίας σε



κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μειώνει την κατανάλωση οξυγόνου για πρωτεϊνοσύνθεση, με επικείμενη την αλλαγή του μεταβολισμού σε αναερόβια γλυκόλυση μέσω της αύξησης των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης γονιδίων όπως *GLUT-1*, *GAPDH* και *HK-1*. Επιπλέον, στα κυψελιδικά κύτταρα μέσω του HIF-1 επάγεται η έκφραση του VEGF, ώστε με τη νεοαγγειογένεση να αυξηθεί η παροχή οξυγόνου. Έχει επίσης παρατηρηθεί μείωση της μεταφοράς νατρίου στα επιθηλιακά κύτταρα, πιθανόν μέσω της αναστολής της Na-K ATPάσης, κυρίως σε περίπτωση πνευμονικού οιδήματος (Jain and Sznajder, 2005; Clerici and Planes, 2009). Η υποξία οδηγεί και σε αλλαγές στον κυτταροσκελετό, καθώς μέσω της παραγωγής ROS, επηρεάζονται, συγκεκριμένα, τα ενδιάμεσα ινίδια λόγω αποικοδόμησης των κερατινών. Συνεπώς, αυξάνεται η διαπερατότητα του επιθηλίου (Na et al., 2010).

Η υποξία έχει βρεθεί ότι επηρεάζει και την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε κυψελιδικά κύτταρα, τα οποία εκφράζονται και σε φυσιολογικές συνθήκες. Η έκθεση σε υποξία αύξησε τα επίπεδα mRNA και σε μικρότερο βαθμό τα επίπεδα πρωτεΐνης των μορίων προσκόλλησης I-CAM και V-CAM (Clerici and Planes, 2009).

Η σηματοδότηση μέσω των HIFs επιδρά και στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού, συμμετέχοντας στην υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων κατά τη ΧΑΠ. Ο HIF-1α συνδέεται με την υπερέκφραση των βλεννινών (MUCs) και την υπερέκκριση βλέννας (Poloshukin et al., 2011). Δύο κύριες βλεννίνες που υπερεκφράζονται είναι οι MUC5B και MUC5AC (εκκρινόμενες) και σχετίζονται με την μεταπλασία των Clara και κροσσωτών κυττάρων σε καλυκοειδή κύτταρα. Τα μονοπάτια που εμπλέκονται περιλαμβάνουν την IL-13 και τον EGF (Curran and Cohn, 2009). Η ενεργοποίηση του EGF προκαλεί την πρόσδεση του HIF-1α στον υποκινητή του MUC5AC (Evans et al., 2009; Young et al., 2007). Σε καρκίνους του πνεύμονα, επίσης, υπάρχουν αυξημένα επίπεδα των MUC1, MUC3 και MUC4 (μεμβρανικές) (Jonkheere and Seuningen, 2010).

Η υποξία μπορεί να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο και την επιβίωση των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών. Σε πρωτογενή κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, η υποξία μέσω του HIF-1 αύξησε την απόπτωση και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό (Krick et al. 2005). Η υποξία αυξάνει την απόπτωση και σε A549 κύτταρα και η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη παρουσία των κυτταροκινών IL-6 και IL-8 (Strassberg et al., 2004).

### **1.5. Υποξία/ HIF-1 και φλεγμονή**

Η υποξία και η φλεγμονή παρατηρήθηκε ότι είναι αλληλοεξαρτώμενες καταστάσεις. Η υποξία μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή. Από την άλλη πλευρά, οι ιστοί με φλεγμονή γίνονται και υποξικοί (Eltzschig and Carmeliet, 2011). Για παράδειγμα, σε πειραματόζωα τα

οποία εκτέθηκαν σε οξεία υποξία παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και συγκέντρωση κυττάρων της φλεγμονής στους πνεύμονες και σε άλλα όργανα (Eltzschig et al., 2004; Murdoch et al., 2005). Επίσης, σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης οργάνων ή ισχαιμίας προέκυψε φλεγμονή (Kruger et al., 2009; Hart et al 2011). Στο περιβάλλον της φλεγμονής, υπάρχει ανισορροπία στο μεταβολισμό μεταξύ της παροχής οξυγόνου και της κατανάλωσης του. Συγκεκριμένα, επικρατεί αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από τα κύτταρα της φλεγμονής και σε ορισμένες περιπτώσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ παράλληλα υπάρχει μειωμένη παροχή οξυγόνου λόγω αγγειοπάθειας (Koeppen et al., 2011; Safronova and Morita, 2010).

Η έκθεση σε υποξία και ο HIF-1α συμβάλλουν στη φλεγμονή επηρεάζοντας τη δράση των κυττάρων της φλεγμονής. Έχειδειχθεί ότι σε μακροφάγα ο HIF-1 μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με υποδοχείς της επιφάνειας τους, την ωρίμανση τους και την αλλαγή του μεταβολισμού τους σε γλυκολυτικό, προκειμένου να επιβιώσουν στο φλεγμονώδες περιβάλλον. Επιπλέον, ο HIF-1α αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών, όπως IL-1β, CXCL8 και VEGF. Ο HIF-1α συμβάλλει και στην ενεργοποίηση και άλλων κυττάρων της φλεγμονής, όπως τα δενδριτικά και τα μαστοκύτταρα (Imtiyaz and Simon, 2010).

Ο HIF-1 εμπλέκεται σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής του αναπνευστικού, όπως στο άσθμα. Η έκθεση σε κοβάλτιο κυρίως σε συγκεκριμένους χώρους εργασίας μπορεί να προκαλέσει άσθμα και απόφραξη των πνευμόνων. Το κοβάλτιο μιμείται τη δράση της υποξίας καθώς σταθεροποιεί τον HIF. Η απώλεια του HIF-1α προερχόμενου από κυψελιδικά κύτταρα τύπου II και Clara κύτταρα προκάλεσε σε πειραματόζωα φαινότυπο άσθματος, καθώς άλλαξε την παραγωγή κυτταροκινών προς την Th2 φλεγμονή και επέφερε αυξημένους αριθμούς ηωσινοφίλων. Επομένως, ο HIF-1 συμβάλλει στη φυσική ανοσία και στη ρύθμιση της φλεγμονής στους πνεύμονες (Saini et al, 2010)

Η υποξία μπορεί να διευκολύνει τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς επίσης και τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών. Σε μοντέλο με πειραματόζωα ο συνδυασμός υποξίας και χορήγησης του αλλεργιογόνου ωαλβουμίνη, συνεργιστικά, αυξάνει την έκφραση του HIF-1 σε βρογχικά κύτταρα των αεραγωγών, οδηγεί σε αύξηση κυτταροκινών (IL-1β, IL-5, IL-13), TGF-β, καθώς επίσης και σε αυξημένη διήθηση ηωσινοφίλων (Baek, 2013). Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι στο άσθμα ο HIF-1α οδηγεί σε υπερέκφραση χημειοκινών, όπως η CCL2 (Baay-Guzman et al., 2012).

### 1.5.1. Η επίδραση της φλεγμονής στον HIF-1

Εκτός από την οξυγονο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση, ο HIF μπορεί να επαχθεί και από κυτταροκίνες της φλεγμονής σε κατάσταση νορμοξίας, σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι κυτταροκίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής ευαίσθητους στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Haddad and Harb, 2005).

Η επίδραση της φλεγμονής στον HIF-1 έχει μελετηθεί περισσότερο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού. Σε πρωτογενή φλεγμονώδη κύτταρα κατά την έναρξη της φλεγμονής, πριν το περιβάλλον γίνει εξ' ολοκλήρου υποξικό, ο TNF $\alpha$  αυξάνει τη συσσώρευση της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης και τα επίπεδα HIF-1 $\alpha$  mRNA (Albina et al., 2001). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι σε μακροφάγα οι Th1 (IFN- $\gamma$ ) και Th2 κυτταροκίνες (IL-4) μπορούν με διαφορετικό τρόπο να επάγουν την έκφραση του HIF-1 $\alpha$  και του HIF-2 $\alpha$  mRNA, αντίστοιχα (Takeda et al., 2010).

Σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (HepG2) η IL-1 $\beta$  και ο TNF $\alpha$  έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την πρόσδεση του HIF-1 $\alpha$  στο DNA σε νορμοξία, αλλά η δράση τους είναι εντονότερη σε υποξία. Η αύξηση της ενεργότητας του HIF-1 $\alpha$  από την IL-1 $\beta$  αποδίδεται στην αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης, ενώ η επίδραση από τον TNF $\alpha$  πιθανόν οφείλεται στην παράλληλη ενεργοποίηση και άλλων πρωτεϊνών (Hellwig-Burgel et al., 1999). Αυτή ήταν και η πρώτη έρευνα συσχέτισης του HIF-1 $\alpha$  με τη φλεγμονή. Επιπλέον, σε κύτταρα HepG2 ο TGF- $\beta$  οδήγησε σε συσσώρευση και αυξημένη ενεργότητα του HIF-1, μέσω αύξησης της σταθερότητας της HIF-1 $\alpha$ , καθώς αναστέλλει την έκφραση των PHDs (Mac Mahon et al., 2006)

Σε λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών η κατεργασία με TNF- $\alpha$  αυξάνει τα επίπεδα HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης και mRNA σε νορμοξία και σε υποξία. Στην επαγωγή του HIF-1 $\alpha$  συμβάλλει η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B. Ωστόσο, η επίδραση με TNF- $\alpha$  προκαλεί μείωση στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 $\alpha$  σε υποξία, επειδή παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1 $\alpha$  με τον HIF-1 $\beta$  (Tsapournioti et al., 2012).

Σε επιθήλιο εντέρου αρουραίων (IEC-6), η επίδραση μίγματος κυτταροκινών IFN- $\gamma$ , TNF, και IL-1 $\beta$  σε υποξία αύξησε τα επίπεδα της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης αλλά όχι το mRNA. Επιπλέον, προκλήθηκε πρόσδεση του στο DNA και έκφραση γονιδίων στόχων που σχετίζονται με τη γλυκόλυση (Scharte, 2003). Σε διάφορους άλλους τύπους επιθηλιακών κυττάρων, όπως σε εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα HEK-293, σε κύτταρα από καρκίνο μαστού MCF7 και σε καρκινικά κυψελιδικά A549, η επίδραση με TNF $\alpha$  αύξησε σε μεγάλο βαθμό την έκφραση της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης, χωρίς να παρατηρηθούν αλλαγές στα επίπεδα του HIF-1 $\alpha$  mRNA. Βρέθηκε ότι παράλληλα ενεργοποιούνταν και το μονοπάτι του NF- $\kappa$ B (Jung et al 2003).

Σε βρογχικά κύτταρα βρέθηκε ότι συνεργιστικά η IL-4 και ο TNF $\alpha$  σε υποξία αν και δεν προκαλούν συσσώρευση της πρωτεΐνης, ενεργοποιούν τον HIF-1 $\alpha$  μέσω αύξησης της μεταγραφής και μετάφρασης. Ενδιάμεσα, ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K, καθώς και του NF- $\kappa$ B. Επίσης, σε νορμοξία και σε υποξία η IL-4 και ο TNF $\alpha$  επάγουν και την έκφραση του VEGF (Jiang et al., 2010). Σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, βρέθηκε ότι ο TNF $\alpha$  οδηγεί σε σταθεροποίηση και μετατόπιση του HIF-1 στον πυρήνα, καθώς επίσης υποκινεί την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, μέσω ενός μηχανισμού εμπλοκής των ROS (Haddad and Land, 2001).

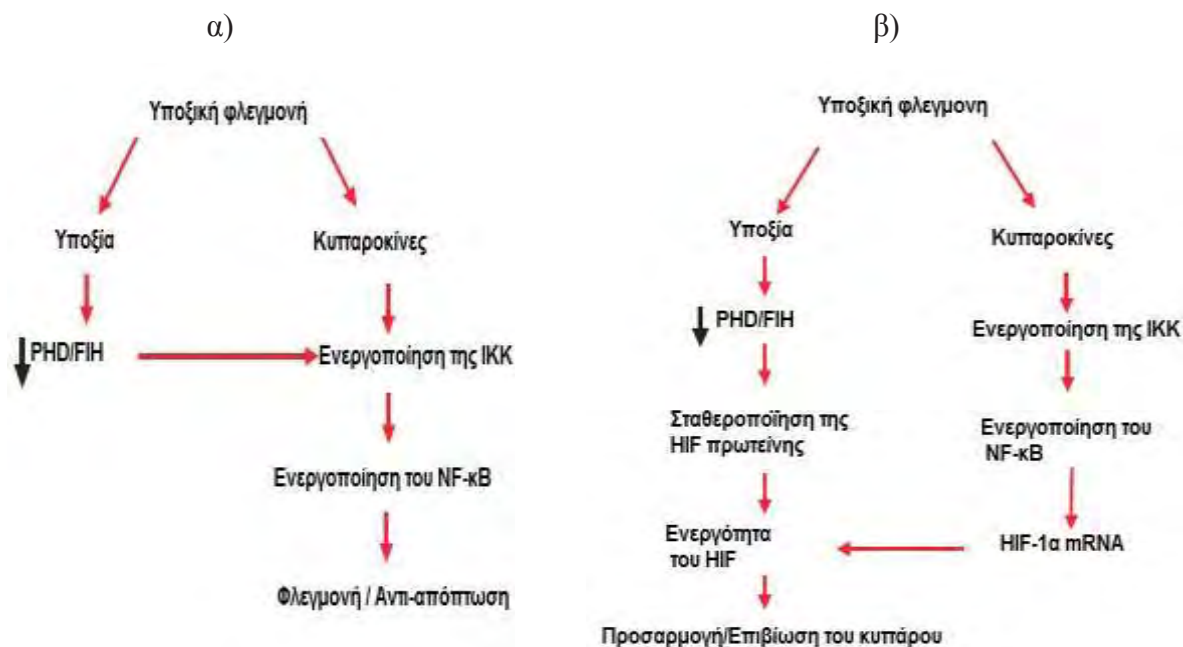
Συμπερασματικά, οι παράγοντες της φλεγμονής με ιστοειδικό τρόπο μπορούν να επάγουν τον HIF-1 $\alpha$  με αύξηση της σύνθεσης του, δηλαδή με αύξηση της μεταγραφής ή και με αύξηση της μετάφρασης του mRNA του. Επιπλέον, οι διάφοροι παράγοντες της φλεγμονής μπορούν να επιδράσουν στον HIF-1 και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο με αύξηση της σταθεροποίησης του, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις επιδρούν θετικά ή αρνητικά στην ενεργότητα του.

### **1.5.2. Λειτουργική διάδραση (Cross talk) HIF και NF- $\kappa$ B**

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF και NF- $\kappa$ B πέρα από την ανεξάρτητη λειτουργία τους μπορούν αλληλεπιδρώντας να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων στόχων τους σε συνθήκες υποξίας και φλεγμονής. Δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει ένας θετικός κύκλος ανατροφοδότησης μεταξύ των δύο μεταγραφικών παραγόντων.

Αν και η υποξία είναι ένα ισχυρό αίτιο ενεργοποίησης του HIF-1 $\alpha$ , αποτελεί ένα πιο ήπιο αίτιο και για την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B *in vivo* και *in vitro* (Fitzpatrick et al 2010). Η απώλεια δράσης των υδροξυλασών κατά την υποξία οδηγεί σε ενεργοποίηση των IKK, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η καταστολή του NF- $\kappa$ B (Cummins et al., 2006). Η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B σε υποξία έχει ως πρωταρχικό στόχο να εμποδίσει την απόπτωση του κυττάρου, ώστε αυτό να επιβιώσει κατά το υποξικό στρες. Ωστόσο μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και διαφόρων ενζύμων ο NF- $\kappa$ B προάγει περαιτέρω την υποξική φλεγμονή. Ο ίδιος ο HIF-1 $\alpha$  μπορεί να ρυθμίσει τη σηματοδότηση του NF- $\kappa$ B. Η αυξημένη έκφραση του HIF-1 $\alpha$  σε κερατινοκύτταρα ποντικών συνοδεύεται και από αυξημένη ενεργότητα του NF- $\kappa$ B και επικείμενη αυξημένη έκφραση των γονιδίων –στόχων του NF- $\kappa$ B, που προάγουν τη φλεγμονή. Η έκφραση των γονιδίων-στόχων του NF- $\kappa$ B που προάγουν τη φλεγμονή εξαρτάται από την υποξία και την επαγωγή του HIF-1 $\alpha$  (Scorteganga et al., 2008) (Εικ.12 α).

Ο HIF-1 εκτός από την υποξία μπορεί να επαχθεί και μια πληθώρα παραγόντων της φλεγμονής, όπως το LPS, ο TNF $\alpha$ , οι ROS και η καταστροφή των μικροσωληνίσκων, με εξαρτώμενο από τον NF- $\kappa$ B μηχανισμό. Ο NF- $\kappa$ B μπορεί να ενεργοποιήσει τον HIF-1 $\alpha$  σε επίπεδο mRNA. Ανάλυση του HIF-1 $\alpha$  υποκινητή έδειξε μια πιθανή θέση πρόσδεσης του NF- $\kappa$ B που τοποθετείται 197-188 βάσεις από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής. Ο NF- $\kappa$ B είναι σημαντικός για την έκφραση βασικών επιπέδων του *HIF-1 $\alpha$*  γονιδίου (van Uden et al., 2008; Rius et al., 2008) (Εικ.12 β). Ο NF- $\kappa$ B είναι σημαντικός και για την εξαρτώμενη από την υποξία έκφραση παραγόντων της φλεγμονής, όπως η COX-2 (cyclooxygenase 2-κυκλοξυγενάση 2) (Fitzpatrick et al., 2010, Scortegagna et al., 2008). Σε πνεύμονες αρουραίων με ΧΑΠ, ο NF- $\kappa$ B μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του HIF-1 $\alpha$  σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης και να συμβάλει στην εξέλιξη της ασθένειας (Jiang et al 2010).



Εικ. 12 α) Η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B κατά την υποξική φλεγμονή, β) Η ενεργοποίηση του HIF-1 $\alpha$  μέσω του NF- $\kappa$ B κατά την υποξική φλεγμονή στα κύτταρα του ανοσοποιητικού (προσαρμογή από: Taylor, 2008)

### 1.6. Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών στη σχέση της χρόνιας φλεγμονής με τον καρκίνο

Η έννοια της σχέσης φλεγμονής και καρκίνου εισήχθη για πρώτη φορά το 1863 από τον Rudolf Virchow, ο οποίος παρατήρησε λευκοκύτταρα σε νεοπλαστικούς ιστούς. Η χρόνια φλεγμονή με τις επακόλουθες αλλαγές στο μικρο-περιβάλλον που προέρχονται από

αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες, κυτταροκίνες και ROS προσφέρει ένα εύφορο έδαφος για την de novo ανάπτυξη επιθηλιακού καρκίνου.

Η χρόνια έκθεση του πνεύμονα σε καπνό τσιγάρου και σε χημικά οδηγεί σε χρόνια βλάβη του ιστού λόγω αλλαγών στην αρχιτεκτονική του επιθηλίου, καθώς και υπερπλασία και πλακώδη μεταπλασία και προωθεί γενετικές και επιγενετικές αλλαγές. Μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής οδηγεί σε μόνιμη ενεργοποίηση των στρωματικών κυττάρων και των κυττάρων της φλεγμονής και ακολούθως προάγει την ανάπτυξη όγκου. Ένα άλλο στοιχείο που υποστηρίζει αυτή τη σχέση είναι ότι η θεραπεία με αντι-φλεγμονώδη φάρμακα σχετίζεται με μειωμένο καρκίνο σε ορισμένους ιστούς (Wu 2009).

Η ΧΑΠ, που είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος, και ο καρκίνος του πνεύμονα έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται. Η χρόνια φλεγμονή της ΧΑΠ έχει στόχο την αποκατάσταση του ιστού μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, της μετανάστευσης με τη συμβολή αυξητικών παραγόντων, και κυτταροκινών. Οι διαδικασίες αυτές είναι κοινές και στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα και τα επιθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν βασικό ρόλο. Στους κοινούς μηχανισμούς χρόνιας φλεγμονής και καρκινογένεσης περιλαμβάνονται η παραγωγή των ROS κατά το οξειδωτικό στρες, η συμβολή της COX-2 στη φλεγμονή και η συνεχής ενεργοποίηση του NF-κΒ, μέσω του οποίου υπερεκφράζονται γονίδια-στόχοι του που προάγουν τη φλεγμονή. Η υποξία, που επικρατεί στο περιβάλλον ΧΑΠ αλλά και του αναπτυσσόμενου όγκου, μέσω της επαγωγής των HIF οδηγεί σε αγγειογένεση και αλλαγές στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Και στις δύο νόσους, τα επιθηλιακά κύτταρα προάγουν την υπερέκφραση των MMPs που αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα και διευκολύνουν τη μετανάστευση. Η έκφραση των πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής (Signal Transducers and Activators of Transcription - STATs), επίσης, είναι αυξημένη οδηγώντας σε μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ογκογένεση (Rooney and Sethi, 2011). Επιγενετικές αλλαγές, όπως η ακετυλίωση και η μεθυλίωση, είναι κοινοί μηχανισμοί της χρόνιας φλεγμονής και του καρκίνου, με βάση τις οποίες καταστέλλεται η έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αυξάνεται η έκφραση ογκογονιδίων (Yao and Rahman, 2009).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πνευμονικών παθήσεων, όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και ο καρκίνος του πνεύμονα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συμβάλλουν στη φλεγμονή αυτών των παθήσεων κατά τις χρόνιες διαδικασίες επιδιόρθωσης της βλάβης του ιστού, αλλά και στην υποξία, που συχνά συνυπάρχει με τη φλεγμονή.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, η επίδραση της φλεγμονής μέσω του TNF $\alpha$  ή/και της υποξίας στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, στην έκφραση του HIF-1 $\alpha$ , στη μεταγραφική δραστηριότητα των μέσω της έκφρασης του VEGF και παραγόντων της φλεγμονής, όπως των κυτταροκινών RANTES και IL-6, και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM, καθώς και στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων αναπνευστικού (H1299 και A549). Οι περισσότερες μελέτες διεξάγονται σε A549, ωστόσο στόχος μας ήταν να μελετηθούν εκτενέστερα και τα H1299. Τα πειράματα με τα καρκινικά κύτταρα θα μας δώσουν μια πρώτη εικόνα, ώστε σε επόμενο στάδιο η μελέτη να επεκταθεί και σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Σημαντική κρίνεται και η διερεύνηση της επίδρασης των επιθηλιακών κυττάρων στα λεία μυϊκά κύτταρα του αναπνευστικού κάτω από συνθήκες υποξίας και φλεγμονής. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών της φλεγμονής, της υποξίας και της αλληλεπίδρασης τους στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού θα συμβάλει στην βαθύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας αλλά και στην εύρεση νέων στρατηγικών θεραπείας χρόνιων πνευμονικών παθήσεων, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (H1299) (CRL-5803) και ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα από αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα (A549) (CCL-185). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO), το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε υγρανόμενο κλίβανο επώασης στους 37° C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Όλοι οι χειρισμοί της καλλιέργειας έγιναν σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να εκμηδενίζεται ο κίνδυνος των επιμολύνσεων. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε 48-72 ώρες. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80-100% της επιφάνειας της φλάσκας αποκολλούνταν από το υπόστρωμα και μεταφέρονταν σε άλλη επιφάνεια καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα πλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline –PBS).

#### PBS

NaCl            137 mM

KCl             2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>       8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>       1.46 mM

Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα 0.25% θρυψίνης- 0.53 mM EDTA και οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά στον κλίβανο επώασης, έως ότου τα κύτταρα αποκολληθούν από το υπόστρωμα.. Κατά την αποκόλληση έγινε προσθήκη θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν, ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα, και μοιράστηκαν σε φλάσκες ή σε τριβλία. Σε κάθε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup> προστίθεται θρεπτικό υλικό σε τελικό όγκο 15-20 ml, ενώ σε κάθε τριβλίο διαμέτρου 10 cm έως τα 8ml.

#### 3.2. Κατεργασία των κυττάρων

Για την κατεργασία των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τριβλία διαμέτρου 10 cm για μία ή δύο ημέρες μέχρι να αναπτυχθούν και να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας. Την επομένη μέρα τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα 1 x PBS και επώαστηκαν για μία ημέρα σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς FBS που περιείχε 100 U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη. Την ημέρα του πειράματος, μία ώρα πριν την προσθήκη των παραγόντων στα κύτταρα έγινε αλλαγή θρεπτικού (DMEM χωρίς FBS).



Η κατεργασία των κυττάρων έγινε στις παρακάτω συνθήκες για 4, 20 ή 24 ώρες:

Συνθήκη «control» : Επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο καλλιέργειας σε 20% O<sub>2</sub> και ατμοσφαιρικό αέρα.

Συνθήκη «TNFα» : Προσθήκη TNFα (10 ng/ml) και επώαση στον επωαστικό κλίβανο.

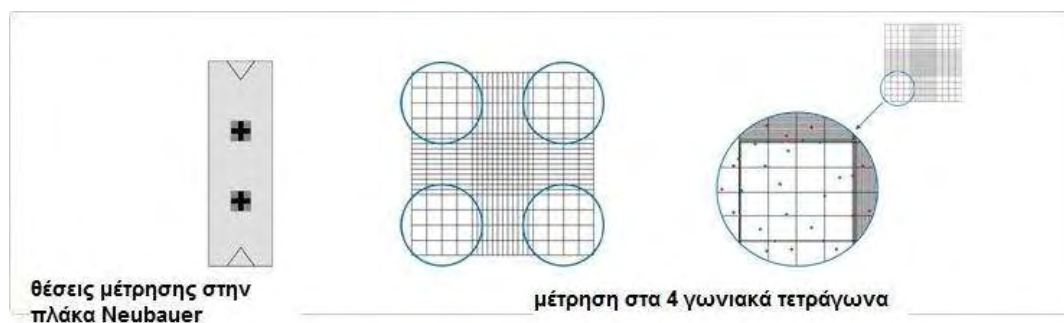
Συνθήκη «Υποξία» : Επώαση των κυττάρων μέσα σε ειδικό θάλαμο υποξίας (INVIVO2 200 hypoxia workstation) (Ruskin Life Sciences) σε συνθήκες 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> και 5% CO<sub>2</sub>.

Συνθήκη «Υποξία + TNFα » : Προσθήκη TNFα (10ng/ml) και επώαση στον θάλαμο της υποξίας.

### 3.3. Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue

Για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Trypan Blue (Sigma). Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιέργειας και επαναωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια, 100 μl κυττάρων αραιώθηκαν σε PBS, προστέθηκε το Trypan Blue και προστέθηκαν σε μια πλάκα-αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Με τη χρήση μικροσκοπίου μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε καθένα από τα 4 γωνιακά τετράγωνα όγκου 0,1 mm<sup>3</sup> και ο συνολικός αριθμός τους υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο (Εικ.13) :

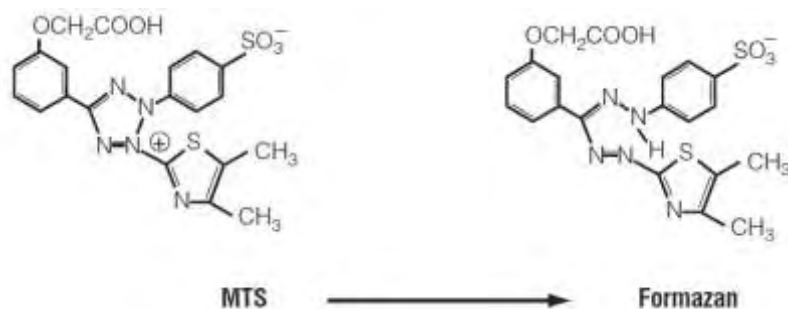
Αριθμός κυττάρων / ml= μέσος όρος κυττάρων στα 4 γωνιακά τετράγωνα X αραιώση X 10<sup>4</sup>.



Εικ.13 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με Trypan Blue (προσαρμογή από [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

### 3.4. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας-πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS

Για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος MTS (CellTiter 96 Aqueous, Promega). Το MTS tetrazolium (κίτρινο) ανάγεται από τα κύτταρα σε ένα έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης (μωβ) μέσω του NADPH ή NADH που παράγονται από δεϋδρογονάσες σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Εικ.14). Η ποσότητα της φορμαζάνης μετράται με οπτική απορρόφηση στα 490 nm και είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια.



Εικ.14 Αντίδραση μετατροπής MTS tetrazolium σε φορμαζάνη (προσαρμογή από [www.promega.com](http://www.promega.com))

Τοποθετήθηκαν 5000 κύτταρα H1299 σε τριβλίο 96 θέσεων, σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία ή απουσία FBS και επώαστηκαν όπως αναφέρεται σε κάθε πείραμα. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων, προστέθηκαν έπειτα 20μl MTS σε 100 μl θρεπτικού υλικού, έγινε επώαση των κυττάρων για 2 ώρες στους 37°C και τέλος μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 490nm με ειδικό φωτόμετρο.

### 3.5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western

#### 3.5.1. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων

##### 3.5.1.1. Λύση των κυττάρων και παρασκευή εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Στο τέλος της επίδρασης με τους παράγοντες, έγινε πλύση των κυττάρων με διάλυμα 1x PBS, που περιείχε τον αναστολέα πρωτεασών phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (100μg/ml). Ακολούθως, προστέθηκαν 100 μl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τριβλίο με τη χρήση ειδικής σπάτουλας.

### Lysis Buffer

Tris-Cl (pH 7.5) ή Hepes (pH 7.5)	25 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Triton X-100	1%
DTT	0.5 mM
PMSF	0.2 mM

Τα εκχυλίσματα των κυττάρων μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου eppendorf, αναρροφήθηκαν επαναλαμβανόμενα με πιπέττα, επώαστηκαν σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο. 5 μl του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Το υπόλοιπο υπερκείμενο (100-150 μl) χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για το σκοπό αυτό στο υπόλοιπο υπερκείμενο προστέθηκε διάλυμα Laemmli σε αναλογία 1:3.

### Διάλυμα Laemmli

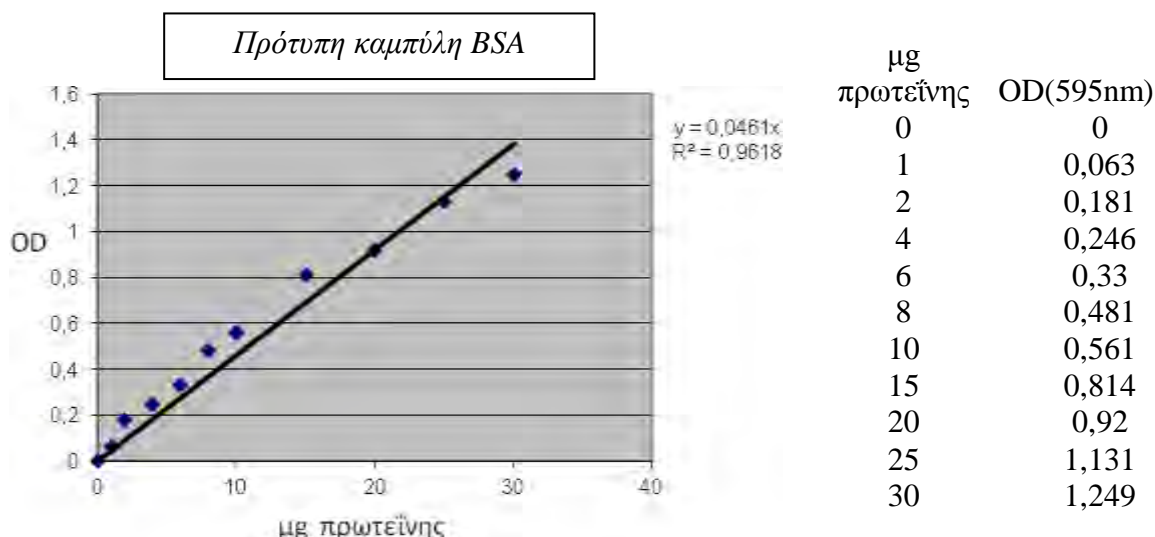
Tris-HCl pH 6.8	250 mM
SDS	9.2 %
Γλυκερόλη	40 %
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0.2 %
DTT	100 mM

Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

#### **3.5.1.2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα**

Η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford. Το αντιδραστήριο Biorad που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Σε όξινο περιβάλλον, η χρωστική προσδένεται στις πρωτεΐνες μέσω των βασικών αμινοξέων τους και ο αριθμός των προσδετών σε κάθε πρωτεΐνη είναι περίπου ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων που υπάρχουν στην πρωτεΐνη. Η πρόσδεση με την πρωτεΐνη προκαλεί αλλαγή του χρώματος της χρωστικής από

καφέ σε μπλε, στα 595 nm. Στα 5μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης από το εκχύλισμα κυττάρων προστέθηκαν 795 μl νερό και 200 μl από το αντιδραστήριο Biorad. Η απορρόφηση του δείγματος τελικού όγκου 1 ml μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 595 nm. Οι τιμές της απορρόφησης μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).



### 3.5.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης, που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια, όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $v$ ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και το συντελεστή τριβής ( $f$ ) ( $v = Ez / f$ ). Η ηλεκτροστατική δύναμη  $Ez$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής  $f$  εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

Ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα, που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, καθιστώντας ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμιδής, που χρησιμοποιήθηκε και στο παρόν πείραμα, είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδής που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-

δισ-ακρυλαμίδης (Bis ακρυλαμίδη -MBA). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι κατάλληλα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδη. Σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους.

Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης

Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, καθώς επιτελείται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel), με ύψος 2.5 cm, στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel), με ύψος 7.5 cm, το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα επιστοιβάξης. Στο πήκτωμα επιστοιβάξης οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται, ενώ στο πήκτωμα διαχωρισμού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Τα δύο πηκτώματα διαφέρουν ως προς τη σύσταση και το pH τους:

### **Πήκτωμα διαχωρισμού 8%**

30% Ακρυλαμίδιο/ 0.8% Bis Ακρυλαμίδιο	1.35 ml
4x Διάλυμα διαχωρισμού	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	4.2 ml
10% APS	20 μl
TEMED	10 μl

Διάλυμα διαχωρισμού

Tris-HCl pH 8.8 0.375M

EDTA 2 mM

SDS 0.1%

#### **Πήκτωμα επιστοιβαξης 4.5%**

30% Ακρυλαμίδιο/ 0.8% Bis Ακρυλαμίδιο 0.3 ml

4x Διάλυμα επιστοιβαξης 0.5 ml

H<sub>2</sub>O 1.17 ml

10% APS 12.5 μl

TEMED 12.5 μl

Διάλυμα επιστοιβαξης

Tris-HCl pH 6.8 0.125M

EDTA 2 mM

SDS 0.1%

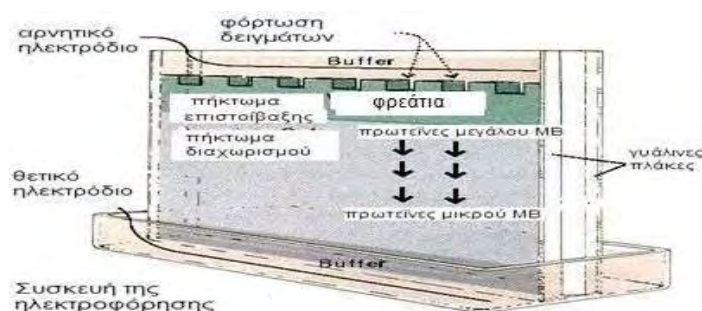
Το πήκτωμα επιστοιβαξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Επιπλέον, το ρυθμιστικό διάλυμα στο πήκτωμα επιστοιβαξης έχει pH, το πήκτωμα επιστοιβαξης έχει pH 6,8 και έτσι το δείγμα «παγιδεύεται» ανάμεσα σε ιόντα Cl<sup>-</sup>, τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή ζώνη. Αυτό συμβαίνει διότι η τιμή pK<sub>a</sub> της γλυκίνης είναι αρκετά υψηλότερη από το pH του πηκτώματος, και έτσι η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή. Τα ιόντα χλωρίου έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται, αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν, καθώς αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού κρατώντας τα σε κοντινή απόσταση. Έτσι σχηματίζεται μια «ζώνη» μέσα στην οποία βρίσκεται «παγιδευμένο» το δείγμα. Με λίγα λόγια, οι κινητικότητες των μορίων εξαρτώνται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο και όχι από το μέγεθος τους, διότι οι πόροι της πηκτής είναι αρκετά μεγάλοι. Όταν η «ζώνη» αυτή εισέλθει στο πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό (σταθερό pH και δυναμικό)

ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος. Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (pH περίπου 8,3):

#### Running Buffer

Tris base	0.25 M
Γλυκίνη	1.92 M
SDS	0.5 %

Στο πήκτωμα επιστοιβάξης τοποθετήθηκε σε αυτό ειδική οδοντωτή μήτρα (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα φρεάτια, όπου θα εισαχθούν τα δείγματα. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad) και προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Λίγο πριν τη φόρτωση τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά και τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις της πηκτής με σύριγγα τύπου Hamilton. Αναλύθηκαν 40 ή 50 μg πρωτεΐνης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό μηχανήμα και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V, 40mA, για 1 ώρα (Εικ.15).



Εικ.15 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (προσαρμογή από [www.chemistry.gatech.edu](http://www.chemistry.gatech.edu))

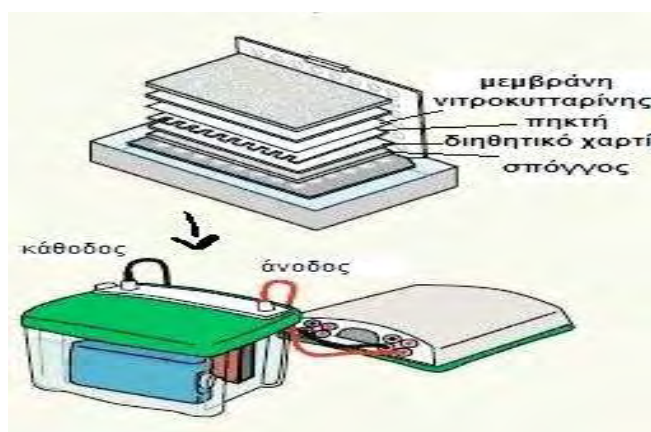
### **3.5.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν με την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου, σε υγρό περιβάλλον διαλύματος μεταφοράς. Σε ειδική διάταξη (cassette) τοποθετήθηκαν διαδοχικά ένας σπόγγος, ένα διηθητικό χαρτί στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα ακόμη χαρτί και ένας σπόγγος. Όλα αυτά τα υλικά είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer).

### Transfer buffer

γλυκίνη	39 mM
Tris Base	48 mM
SDS	0.037%
μεθανόλη	20%

Η διάταξη τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε 1 λίτρο διαλύματος μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε συνθήκες 100V, 350 mA για 1 ώρα. Στο διάλυμα γινόταν ανάδευση με μαγνήτη και υπήρχε πάγος για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του (Εικ.16).



Εικ.16 Διάταξη μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (προσαρμογή από [www.biorad.com](http://www.biorad.com))

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau S, προκειμένου να ελεγχθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών. Επίσης, σημειώθηκαν και οι ζώνες των μαρτύρων γνωστού μοριακού βάρους. Η μεμβράνη έπειτα πλύθηκε με απεσταγμένο νερό και με διάλυμα 1 X PBS-0,1% Tween 20.

#### **3.5.4. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών**

Οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με την ηλεκτροφόρηση βρίσκονται πλέον προσκολλημένες σε ένα στερεό υπόστρωμα που είναι η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρωτεΐνη-στόχος αναγνωρίζεται με τη χρήση ενός αντισώματος, που αντιδρά ειδικά με αντιγονικά επιτόπια τα οποία εκτίθενται από την πρωτεΐνη-στόχο που υπάρχει στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, για να ανιχνευτεί η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη IgG του πρώτου αντισώματος και



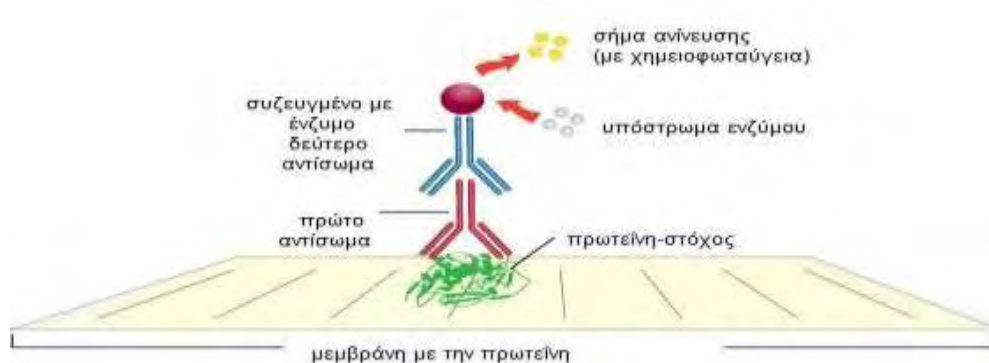
είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη, όπως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθεί η προσθήκη εξωγενούς υποστρώματος του ενζύμου δείκτη για την ανίχνευση της δεύτερης αυτής σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αρχικά επώαστηκε με ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα 1 X PBS-0,1% Tween 20 με 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, με σκοπό να κορεσθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Η μεμβράνη επώαστηκε για 17-19 ώρες στους 4 °C με το πρώτο αντίσωμα και έγιναν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα 1 X PBS-0,1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου και ανάδευση. Έπειτα, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν και πάλι πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του αδέσμευτου αντισώματος (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

<u>Πρώτο αντίσωμα</u>	Αραίωση	<u>Δεύτερο αντίσωμα</u>	Αραίωση
Anti-HIF-1α (Lyberopoulou et al., 2007)	1:1000	Anti rabbit IgG (Cell Signalling)	1:3000
Anti-tubulin	1:10000	Anti mouse HRD (Amersham)	1:3000
Anti-phospho-NFκB p65 (Ser536) (Cell Signaling)	1:1000	Anti rabbit IgG	1:3000

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 1 λεπτό με διάλυμα λουμινόλης (1.25 mM σε Tris-Cl 8.5), με κουμαρικό οξύ (6.8 mM σε DMSO) και 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το σήμα ανιχνεύτηκε σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Imager chemoluminescence) (Εικ.17). Στη χημειοφωταύγεια εκλύεται φως ως αποτέλεσμα της χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η υπεροξειδάση καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων.



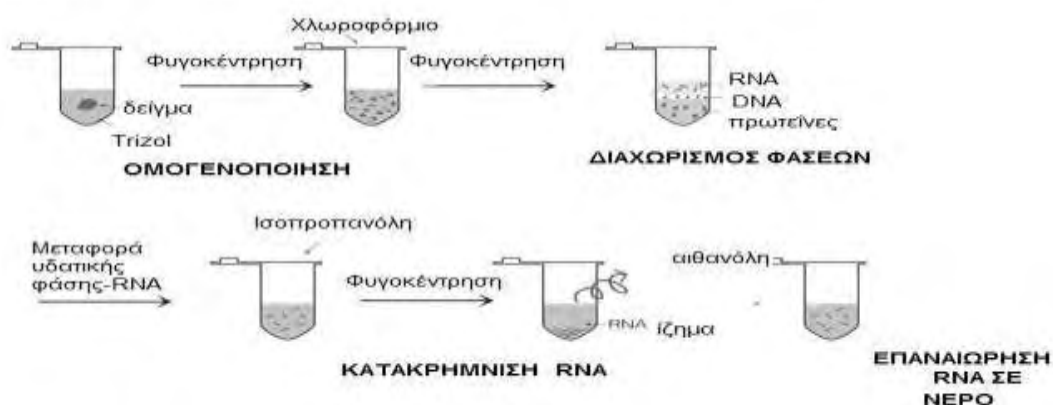
Εικ.17 Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου (προσαρμογή από [www.leinco.com](http://www.leinco.com))

### 3.6. Απομόνωση ολικού RNA

Μετά την κατεργασία των κυττάρων ακολούθησε απομόνωση RNA από τα κύτταρα. Στο τριβλίο με τα κύτταρα, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, προστέθηκε 1 ml διαλύματος TRIzol (Invitrogen), ώστε να λυθούν οι μεμβράνες των κυττάρων και τα ενδοκυττάρια συστατικά τους. Το αντιδραστήριο TRIzol είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και άλλων κατάλληλων συστατικών που διευκολύνουν την απομόνωση ολικού RNA. Επιπλέον, το αντιδραστήριο TRIzol αναστέλλει αποτελεσματικά τις RNάσες και διατηρεί έτσι την ακεραιότητα του RNA.

Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με ειδική σπάτουλα και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf, όπου και ομογενοποιήθηκαν. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση των δειγμάτων στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει η απομόνωση του RNA. Για την απομόνωση RNA τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 5 λεπτά στους  $8^{\circ}\text{C}$ , για την απομάκρυνση των αδιάλυτων συστατικών. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο, προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο, έγινε γρήγορη ανακίνηση για 15'' και επώαση του για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ , κι έτσι έγινε διαχωρισμός σε τρεις φάσεις: υπερκείμενη υδατική φάση, όπου βρίσκεται το RNA, ενδιάμεση, όπου βρίσκεται το DNA και οργανική, που περιέχει χλωροφόρμιο και πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης (περίπου 0,6 ml) μεταφέρθηκε με προσοχή σε σωληνάρια και σε αυτή προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης, ώστε να γίνει κατακρήμνιση του RNA. Αφού τα δείγματα αναδεύτηκαν σύντομα και επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 5 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και το ίζημα του RNA πλύθηκε με 1 ml αιθανόλης 75%. Ακολούθησε

φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και πάλι και έγινε στέγνωμα του δείγματος στον αέρα, με την εξάτμιση της αιθανόλης. Το ίζημα επαναωθήθηκε σε 30-50 μl αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύτηκε στους -80 °C (Εικ.18).



Εικ.18 Στάδια απομόνωσης του RNA (προσαρμογή από [www.komabiotech.com](http://www.komabiotech.com))

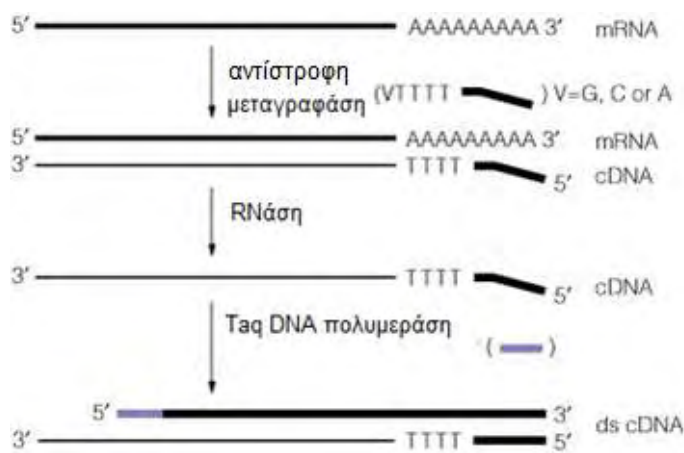
### 3.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA στα δείγματα έγινε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης OD στα 260 nm με τη χρήση ειδικών κυψελίδων (uvettes) και φασματοφωτόμετρου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε σύμφωνα με τον τύπο:  $OD_{260nm}1 = 40 \mu\text{g/ml}$ .

Επιπλέον, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm, όπου μέσω του λόγου  $OD_{260}/OD_{280}$  ελέγχθηκε η καθαρότητα του δείγματος.

### 3.8. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία μετατροπής του RNA σε συμπληρωματικό cDNA, μέσω του ενζύμου που καλείται αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια εξαρτώμενη από το RNA DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από ρετροϊό. Για τη διαδικασία απαιτούνται εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια DNA), οι οποίοι προσδένονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Τότε, η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιώντας τα 4 τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια συνθέτει το συμπληρωματικό DNA με εκμαγείο το mRNA. Η RNA αλυσίδα, έπειτα, καταβολίζεται σε πολλά σημεία από μια RNάση H. Τελικά, μια DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο DNA και τα εναπομείναντα τμήματα ενώνονται από μια λιγάση, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA (Εικ.19).



Εικ. 19 Σύνθεση του δίκλωνου cDNA (προσαρμογή από [www.promega.com](http://www.promega.com))

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε 1μg ολικού RNA σε τελικό όγκο 10 μl. Το αντιδραστήριο High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems International) και το πείραμα διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα, στα 10 μl με το RNA προστέθηκαν 10 μl μείγματος το οποίο περιείχε:

2 μl διαλύματος αντίστροφης μεταγραφής (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl) (10x RT buffer)

0,2 μl τυχαίων εκκινητών (10 x Random Primers)

0,8 μl τριφωσφοδεοριβονουκλεοτιδίων (25x dNTPs)

1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase)

dH<sub>2</sub>O –απαλλαγμένο από RNAάσες ως τον τελικό όγκο των 20 μl

Ως αρνητικός μάρτυρας πραγματοποιήθηκε αντίδραση με μείγμα RNA απουσία αντίστροφης μεταγραφάσης. Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 37 °C για 120 λεπτά
3. 85 °C για 5 δευτερόλεπτα
4. 4 °C - ψύξη

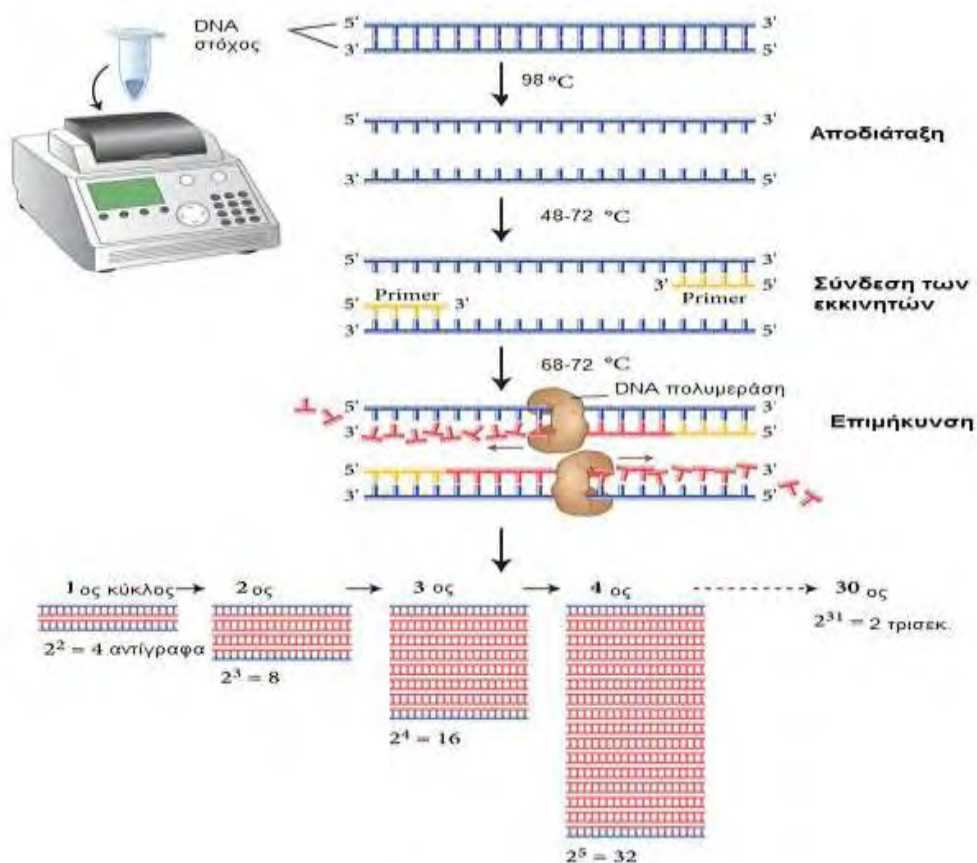
Στο τέλος του προγράμματος, τα δείγματα cDNA φυγοκεντρήθηκαν, προστέθηκαν 80μl αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C

### 3.9. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) βασίζεται στην κλασική PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA-στόχου. Η κλασική PCR περιλαμβάνει 3 διαδοχικά στάδια:

1. Αποδιάταξη των δυο αλυσίδων του δίκλωνου τμήματος DNA-στόχου σε υψηλή θερμοκρασία όπου μπορεί να δράσει η Taq DNA πολυμεράση (Denaturation).
2. Σύνδεση των εκκινητών στα άκρα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA (Annealing)
3. Επιμήκυνση των εκκινητών και δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων με τη δράση της Taq-πολυμεράσης (Extension).

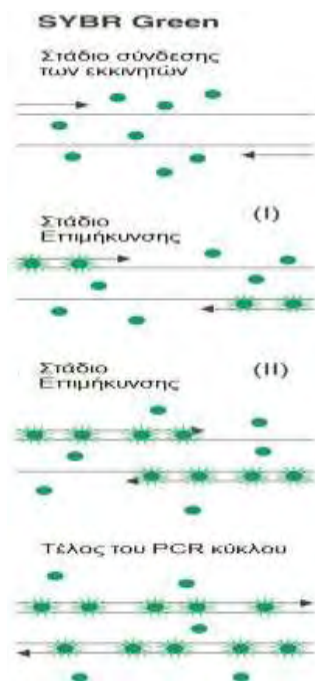
Ακολουθώς, το προϊόν ενός κύκλου χρησιμεύει ως εκμαγείο κι έτσι σε ιδανικές συνθήκες το επιθυμητό προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο (Εικ.20).



Εικ.20 Στάδια της κλασικής αντίδρασης PCR (προσαρμογή από [www.neb.com](http://www.neb.com))

Κατά την Real-Time PCR, η διαφορά έγκειται στο ότι η ποσότητα του προϊόντος ανιχνεύεται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, σε κάθε κύκλο, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο όπως άλλωστε δηλώνει και το όνομα της, και όχι στο τέλος της, όπως στην κλασική PCR. Η

ανίχνευση των προϊόντων μπορεί να γίνει με μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (πχ Sybr Green I) που ενσωματώνονται στη διπλή έλικα του DNA (μη ειδική σήμανση) (Εικ.21), ή με φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια, που επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο του συμπληρωματικού DNA στόχου (ειδική σήμανση). Η ποσότητα του φθορίζοντος σήματος είναι ανάλογη με τη ποσότητα του γονιδιακού προϊόντος που έχει πολλαπλασιαστεί με την αντίδραση.



Εικ.21 Η Real-Time PCR με τη χρήση Sybr Green I (προσαρμογή από [www.nature.com](http://www.nature.com))

Κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία, η ποσοτική real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Miniopticon RT-PCR (Biorad) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Syber Green mix (KapaBiosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I,  $MgCl_2$ , dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες για τον ανθρώπινο HIF-1 $\alpha$ , VEGF, IL-6, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, καθώς και για τη  $\beta$ -ακτίνη, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Τα επίπεδα του mRNA κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το ανθρώπινο mRNA της  $\beta$ -ακτίνης, η έκφραση του οποίου δε μεταβάλλεται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

Πίν.4 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη RT-PCR (Tsapournioti et al., 2013)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
HsHIF-1α F	TTTTTCAAGCAGTAGGAATTGGA
HsHIF-1α R	GTGATGTAGTAGCTGCATGATCG
HsVEGF sense EX3 F	CCCACTGAGGAGTCCAACATC
HsVEGF sense EX4 R	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC
HsIL-6 F	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
HsIL-6 R	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
HsRANTES F	CCTCATTGCTACTGCCCTCT
HsRANTES R	GGTGTGGTGTCCGAGGAATA
HsICAM-1 F	CCTTCCTCACCGTGTACTGG
HsICAM-1 R	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
HsVCAM-1 F	TGGACATAAGAACTGGAAAAGG
HsVCAM-1 R	CCACTCATCTCGATTTCTGGA
HS Actin F	CCAACCGCGAGAAGATGA
HS Actin R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Σε 5 μl δείγματος cDNA προστέθηκαν 15 μl μείγματος που περιείχε:

1 μl από τον εμπρόσθιο εκκινητή (Forward Primer 0.5 pMol/ul)

1 μl από τον ανάστροφο εκκινητή (Reverse Primer 0.5 Mol/ul)

10 μl Syber Green Mix

dH<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNAάσες έως τον τελικό όγκο των 20 μl

Έπειτα, στα δείγματα έγινε μια σύντομη φυγοκέντρηση και τοποθετήθηκαν σε πιάτο 48 θέσεων στον θερμοκυκλοποιητή. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: η αντίδραση cDNA που έγινε απουσία αντίστροφης μεταγραφάσης, καθώς και H<sub>2</sub>O αντί για δείγμα cDNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

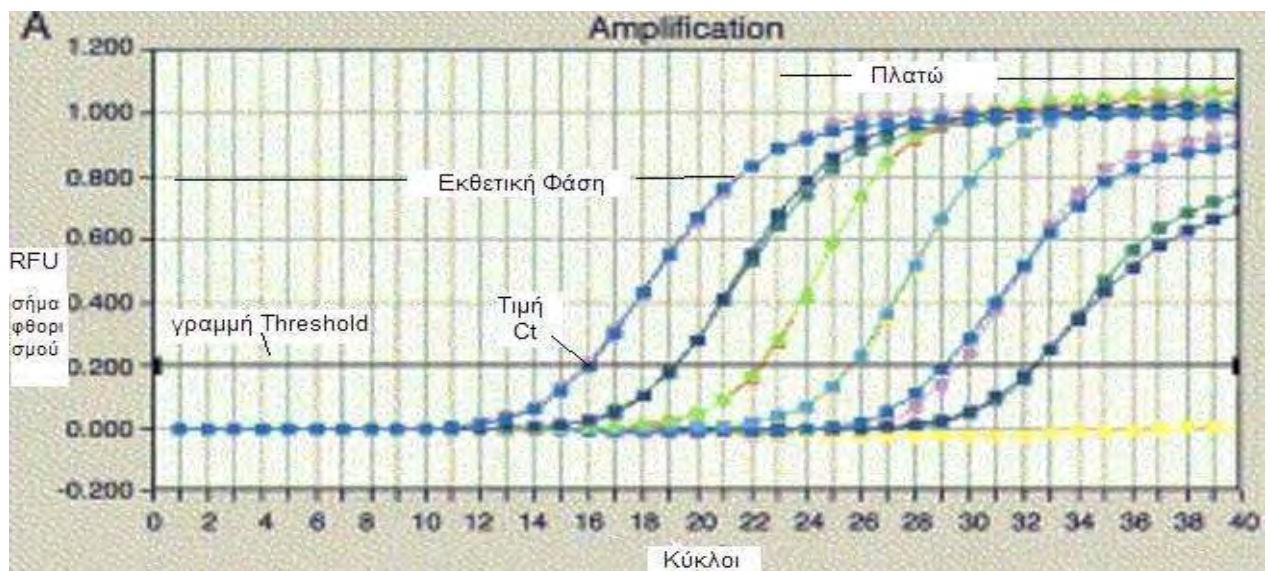
1. 50 °C για 2 λεπτά - ενεργοποίηση του Sybr Green
2. 95 °C για 10 λεπτά - ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης
3. 95 °C για 15 δευτερόλεπτα - αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA
4. 60 °C για 1 λεπτό - σύνδεση εκκινητών και επιμήκυνση
5. Επανάληψη σταδίων 3 και 4 για 39 φορές
6. 60 °C-90 °C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης - αποδιάταξη των προϊόντων

### 3.9.1. Καμπύλη ενίσχυσης - Threshold - Τιμή Ct

Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει τη συσσώρευση του προϊόντος (amplicon) κατά τη διάρκεια της Real-Time PCR. Στον άξονα του  $x$  αντιστοιχεί ο αριθμός κύκλου της PCR και στον άξονα του  $y$  αντιστοιχεί το σήμα φθορισμού, που είναι ανάλογο της ποσότητας του προϊόντος. Στο διάγραμμα ενίσχυσης φαίνονται επιπλέον: η εκθετική φάση όπου ο στόχος ιδανικά διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, καθώς και η φάση του πλατώ, όπου η αντίδραση τελικά επιβραδύνεται, λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Ως threshold-κατώφλι ορίζεται το επίπεδο του σήματος που αντανάκλα μια στατιστικά σημαντική αύξηση πέραν του βασικού σήματος και στο οποίο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν.

Ως τιμή Ct ή Threshold cycle ορίζεται ο αριθμός του κύκλου κατά τον οποίο υπάρχει επαρκής ποσότητα προϊόντος, ώστε το σήμα φθορισμού να είναι ανιχνεύσιμο και να βρίσκεται στη γραμμική φάση της καμπύλης ενίσχυσης. Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης του mRNA. Τα επίπεδα Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα προς την ποσότητα της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα, και συγκεκριμένα όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αλληλουχίας στόχου τόσο πιο χαμηλή θα είναι η τιμή του Ct (Εικ.22).

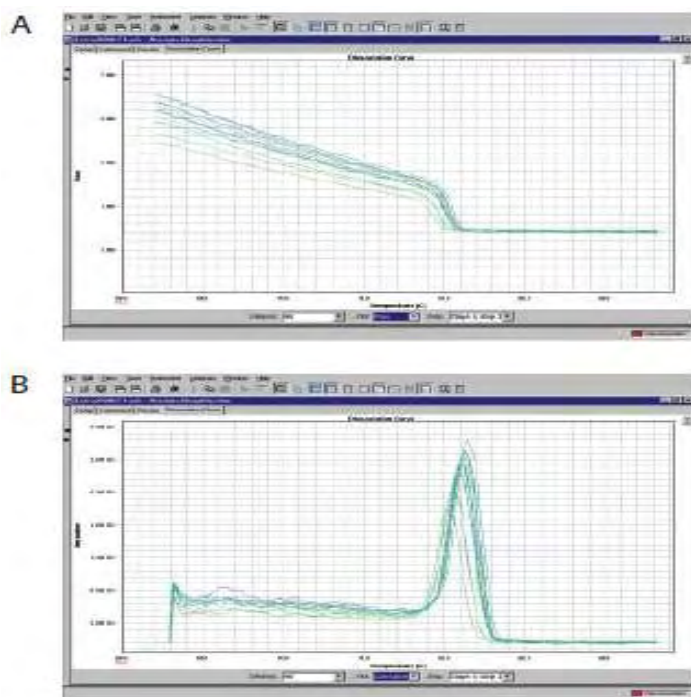


Εικ.22 Καμπύλες ενίσχυσης δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR (προσαρμογή από [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com))



### 3.9.2. Ανάλυση καμπύλης τήξης

Η ποιοτική ανάλυση του προϊόντος της Real-Time PCR μπορεί να γίνει με τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος. Μια καμπύλη τήξης απεικονίζει την αλλαγή στο φθορισμό που παρατηρείται όταν το δίκλωνο DNA με τα ενσωματωμένα μόρια της χρωστικής αποδιατάσσεται (τήκεται) σε μονόκλωνο DNA, καθώς η θερμοκρασία της αντίδρασης αυξάνεται. Κατά το σημείο τήξης (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί  $-T_m$ ) παρατηρείται μια απότομη μείωση του φθορισμού λόγω της αποδιάταξης των DNA αλυσίδων και της επικείμενης απελευθέρωσης της χρωστικής. Εφόσον η θερμοκρασία τήξης των αλληλουχιών επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενο τους σε γουανίνη και κυτοσίνη (G/C), το σημείο τήξης θα είναι χαρακτηριστικό για κάθε προϊόν. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης ελέγχει για την ύπαρξη διμερών εκκινητών, επιμόλυνσης με DNA, ώστε να διασφαλιστεί η ειδικότητα της αντίδρασης. Αναλυτικότερα, οι κορυφές που παρουσιάζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί και συγκεκριμένα σε μια κοινή τιμή  $T_m$ , ενώ στην περίπτωση ύπαρξης και μη ειδικών προϊόντων θα υπάρχει και κορυφή στην καμπύλη που θα αντιστοιχεί σε διαφορετική  $T_m$ . Στην καμπύλη τήξης εμφανίζεται ο φθορισμός σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (Εικ. 23A) και σε επόμενη φάση παρουσιάζεται η αλλαγή του φθορισμού προς την αλλαγή της θερμοκρασίας ( $-\Delta F/\Delta T$ ) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (Εικ. 23B).



Εικ.23 (A) Καμπύλη τήξης, (B)  $(-\Delta F/\Delta T)$  σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (www.invitrogen.com)

### 3.9.3. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

Η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων αναλύθηκε με τη μέθοδο  $\Delta\Delta Ct$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως σχετικές μονάδες σύμφωνα με τον τύπο  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  όπου:  
 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ γονιδίου στόχου} - Ct \text{ γονιδίου αναφοράς})_{\text{δείγματος}} - (Ct \text{ γονιδίου στόχου} - Ct \text{ γονιδίου αναφοράς})_{\text{δείγμα μάρτυρα}}$ .

Αναλυτικότερα, για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά Ct του γονιδίου-στόχου (π.χ. HIF-1α) και της β-ακτίνης ( $\Delta Ct$ ). Στη συνέχεια από το  $\Delta Ct$  κάθε δείγματος αφαιρείται το  $\Delta Ct$  του δείγματος μάρτυρα (το δείγμα που δεν έχει υποστεί κατεργασία-«control») κι έτσι προκύπτει το  $\Delta\Delta Ct$ . Τελικά, γίνεται ο υπολογισμός του λόγου έκφρασης  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Το αποτέλεσμα εκφράζει πόσες φορές αυξάνεται ή μειώνεται η έκφραση mRNA του γονιδίου στόχου στο υπό μελέτη δείγμα σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

### 3.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια ανίχνευση των πρωτεϊνών. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αναγνωριστούν λειτουργώντας ως αντιγόνα για αντίστοιχα αντισώματα. Τα αντισώματα μπορούν να αναγνωριστούν από δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με μια φθορίζουσα χρωστική. Όταν στα κύτταρα επιδρά φως κατάλληλου μήκους κύματος επιτυγχάνεται φθορισμός (Εικ.24)



Εικ.24 Εντοπισμός πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό (προσαρμογή από [www.microbiol.unimelb.edu](http://www.microbiol.unimelb.edu).)

Αναλυτικά, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τριβλία στα οποία είχαν τοποθετηθεί αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm. Τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις καλυπτρίδες και όταν καλυψαν το 60-70% της επιφάνειας επώαστηκαν στις κατάλληλες συνθήκες που προαναφέρονται. Στο τέλος της επίδρασης με τους παράγοντες το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και έγινε πλύση με 1x PBS. Στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση των

κυττάρων με διάλυμα 1xPBS-3.65% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι εσωτερικές δομές του κυττάρου, όπου βρίσκονται η υπό μελέτη πρωτεΐνες. Η πλύση με 1xPBS επαναλαμβάνεται 2 φορές για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεύδη. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 1xPBS-1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4 °C, ώστε οι κυτταρικές μεμβράνες να γίνουν διαπερατές για το αντίσωμα που θα προστεθεί. Ύστερα από 2 πλύσεις με 1xPBS, γίνεται επώαση σε διάλυμα κορεσμού 1xPBS- 0.1% Tween 20-3% BSA για 16-18 ώρες στους 4 °C, με σκοπό να κορεστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη μεταφορά των καλυπτρίδων σε πιάτο 24 θέσεων και την επώαση τους με το πρώτο αντίσωμα (anti-HIF-1 $\alpha$  rabbit, [1:1000]) σε διάλυμα 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% BSA για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα σε υγρό περιβάλλον. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% BSA. Αφού οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε άλλη θέση του πιάτου, προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα χρωστική (anti-IgG rabbit συζευγμένο με CY3, [1:500], Jackson Immunoresearch), σε διάλυμα 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι. Έγινε πάλι απομάκρυνση του αντισώματος με 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% BSA. Ακολούθως, η κάθε καλυπτρίδα εμβαπτίστηκε στιγμιαία σε H<sub>2</sub>O, στεγνώθηκε και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε 20μl διαλύματος επιστοιβαξης Vectashield (Vector Laboratories), οποίο περιέχει 49,6-diamidino-2-phenylindole-DAPI (20 μg/ml), για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Οι καλυπτρίδες σφραγίστηκαν περιμετρικά με βερνίκι και τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA με ενσωματωμένη ειδική ψηφιακή φωτογραφική κάμερα (Leica DFC 480, Leica cameras, Solms, Germany).

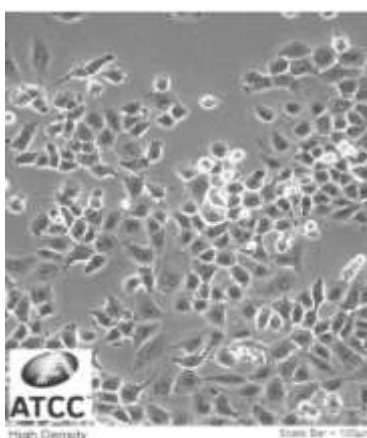
### 3.11 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Sigmaplot 12.0 (Systat). Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων δεδομένων υπολογίστηκαν με το στατιστικό κριτήριο t. Η τιμή  $P < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Η επίδραση του TNF $\alpha$ στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Στα πειράματα επίδρασης του TNF $\alpha$  σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H1299 (Εικ 25). Τα κύτταρα H1299 προέρχονται από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και έχουν την ιδιότητα να διαιρούνται επ' άπειρον λόγω απουσίας της έκφρασης της p53.



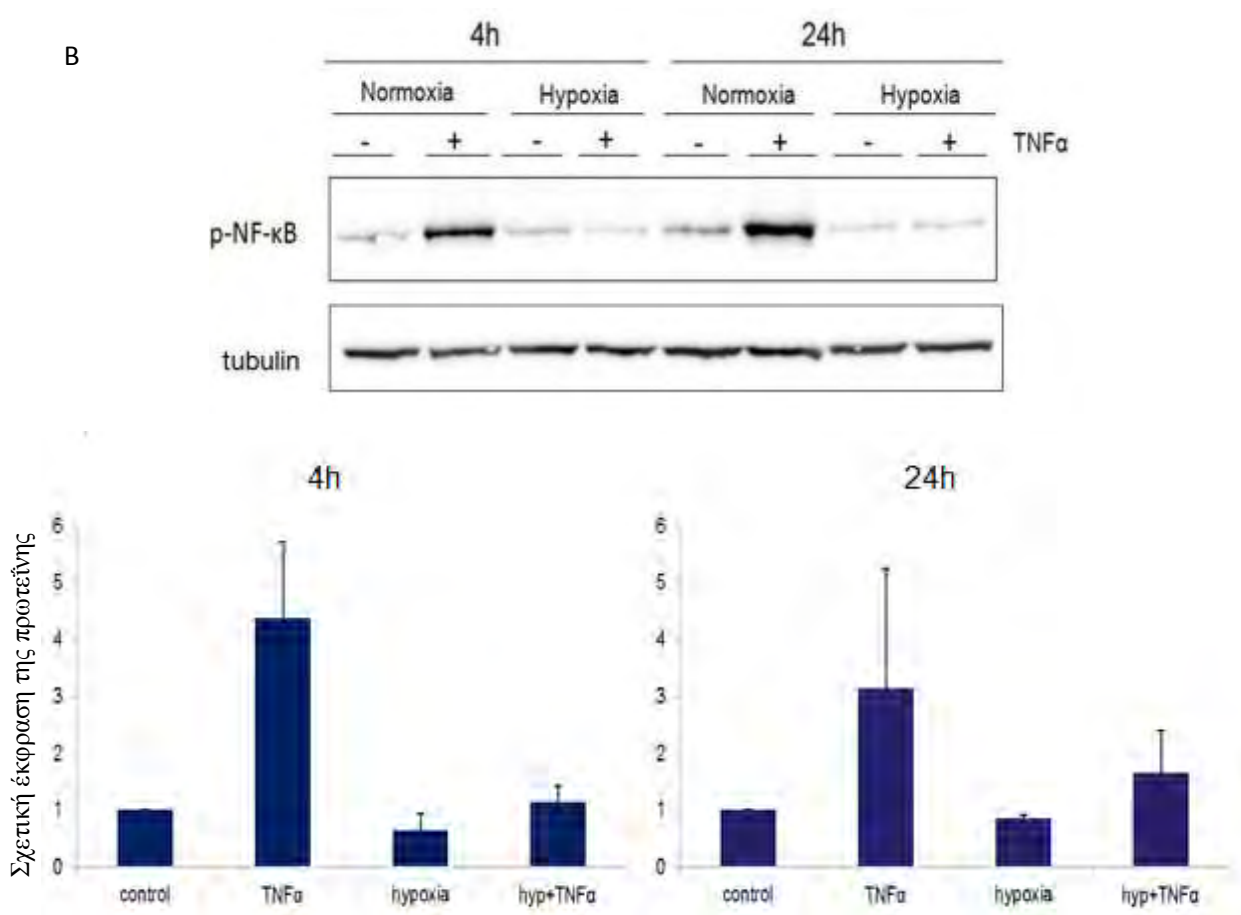
Εικ.25 Μορφολογία κυττάρων H1299 σε καλλιέργεια

Κύτταρα H1299 καλλιεργήθηκαν σε τριβλία μέχρι να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας καλλιέργειας. Ακολούθησε επώαση σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS για μία ημέρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS που περιείχε TNF $\alpha$  (10ng/ml) σε συνθήκες νορμοξίας (20% O $_2$ , ατμοσφαιρικός αέρας) ή/και σε υποξία (1% O $_2$ ). Τα κύτταρα που επώαστηκαν για όλη τη διάρκεια του πειράματος χωρίς FBS χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

#### 4.1.1. Ενεργοποίηση του NF-κB

Για να ελέγξουμε αν ο TNFα ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB, αναλύθηκε η φωσφορυλίωση της υπομονάδας του p65 στη Ser 536. Είναι γνωστό ότι κατά το μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB, η p65 μετατοπίζεται στον πυρήνα και επιπλέον η φωσφορυλίωση της p65 στη Ser 536 στην περιοχή trans ενεργοποίησης αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB (Perkins, 2006).

Με ανοσοαποτύπωση κατά Western, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB επάγεται από τον TNFα σε συνθήκες νορμοξίας. Ωστόσο, σε συνθήκες υποξίας δεν παρατηρείται ανιχνεύσιμη επαγωγή της φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB (Εικ.26 A,B).



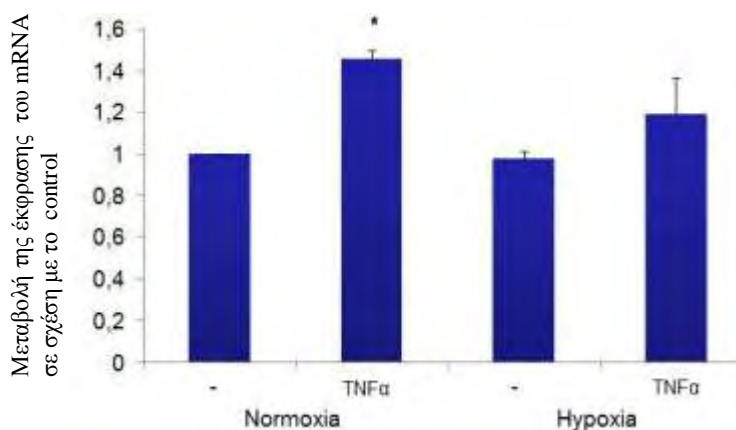
Εικ.26 Η επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στην επαγωγή της φωσφορυλίωσης της p65 NF-κB πρωτεΐνης σε κύτταρα H1299. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία (20% O<sub>2</sub>) ή σε υποξία (1% O<sub>2</sub>), απουσία ή παρουσία TNFα. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western της phospho-NF-κB

B. Ποσοτικοποίηση της phospho-NF-κB εκφρασμένης ως λόγος phospho-NF-κB /τουμπουλίνη

#### 4.1.2. Έκφραση των HIF-1α mRNA και RANTES mRNA

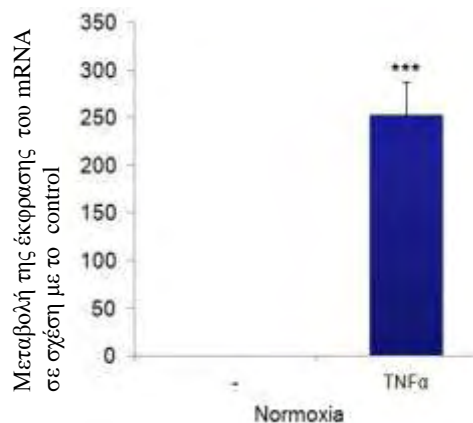
Ο NF-κB είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του HIF-1α mRNA σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (Rius et al., 2008). Επιπλέον, η επαγωγή του NF-κB από τον TNFα σε λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής του HIF-1α mRNA (Tsapournioti et al., 2013). Για να εξεταστεί αν η επαγωγή του NF-κB από τον TNFα οδηγεί στη μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α σε κύτταρα H1299, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του HIF-1α mRNA. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξία, παρουσία ή απουσία TNFα. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, ανάστροφη μεταγραφή και ανάλυση των επιπέδων του HIF-1α mRNA με ποσοτική Real-Time PCR με χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Η παρουσία του TNFα στη νορμοξία προκάλεσε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α (1.46 φορές ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNFα,  $P < 0.05$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή των επιπέδων mRNA του HIF-1α στην υποξία, απουσία και παρουσία TNFα (Εικ.27).



Εικ.27 Σχετική έκφραση mRNA του HIF-1α κυττάρων H1299 μετά από 4h επώαση σε νορμοξία απουσία ή παρουσία TNFα και σε υποξία απουσία ή παρουσία TNFα. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (-) σε νορμοξία και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 4 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της β-actin (\*:  $P < 0.05$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNFα]

Στις ίδιες συνθήκες ο TNFα προκαλεί μια αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων mRNA της κυτταροκίνης RANTES, η οποία είναι γνωστό ότι επάγεται από τον TNFα μέσω του NF-κΒ. Σε σύγκριση με τον HIF-1α, η επαγωγή του RANTES από τον TNFα είναι πολύ μεγαλύτερη (Εικ.28).

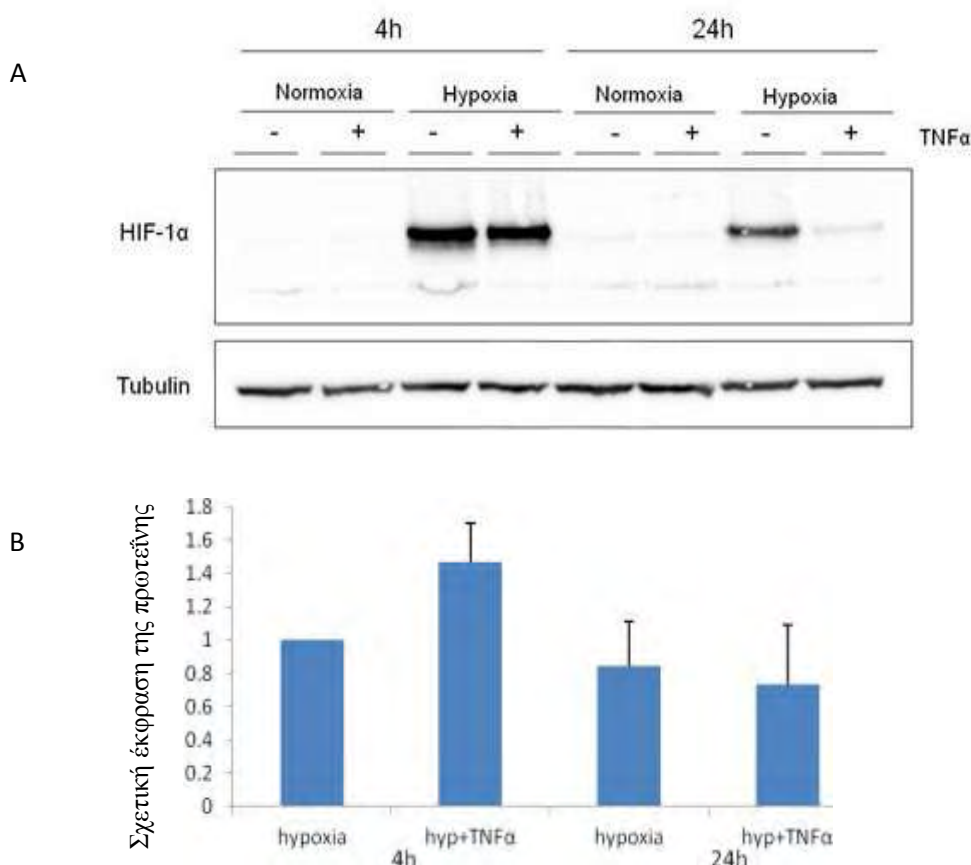


Εικ.28 Σχετική έκφραση mRNA του RANTES κυττάρων H1299 μετά από 4h επώαση σε νορμοξία με ή χωρίς TNFα. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (-) και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 4 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της  $\beta$ -actin (\*\*\*: $P<0,001$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNFα]

### 4.1.3. Έλεγχος των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης

Τα κύτταρα H1299 επωάστηκαν για 4 και 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, παρουσία ή απουσία TNFα. Παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν 40-50 µg πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Παρατηρήσαμε ότι η HIF-1α πρωτεΐνη επάγεται σε συνθήκες υποξίας απουσία ή παρουσία TNFα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης υπό την επίδραση του TNFα στη νορμοξία. Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε και πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των ζωνών της HIF-1α πρωτεΐνης σε σχέση με τις ζώνες της τουμπουλίνης. Σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση, η επώαση με TNFα για 4 ή 24 ώρες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (Εικ.29 Α,Β).



Εικ.29 Επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στην έκφραση της HIF-1α πρωτεΐνης σε κύτταρα H1299. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία (20% O<sub>2</sub>) ή σε υποξία (1% O<sub>2</sub>), απουσία ή παρουσία TNFα. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

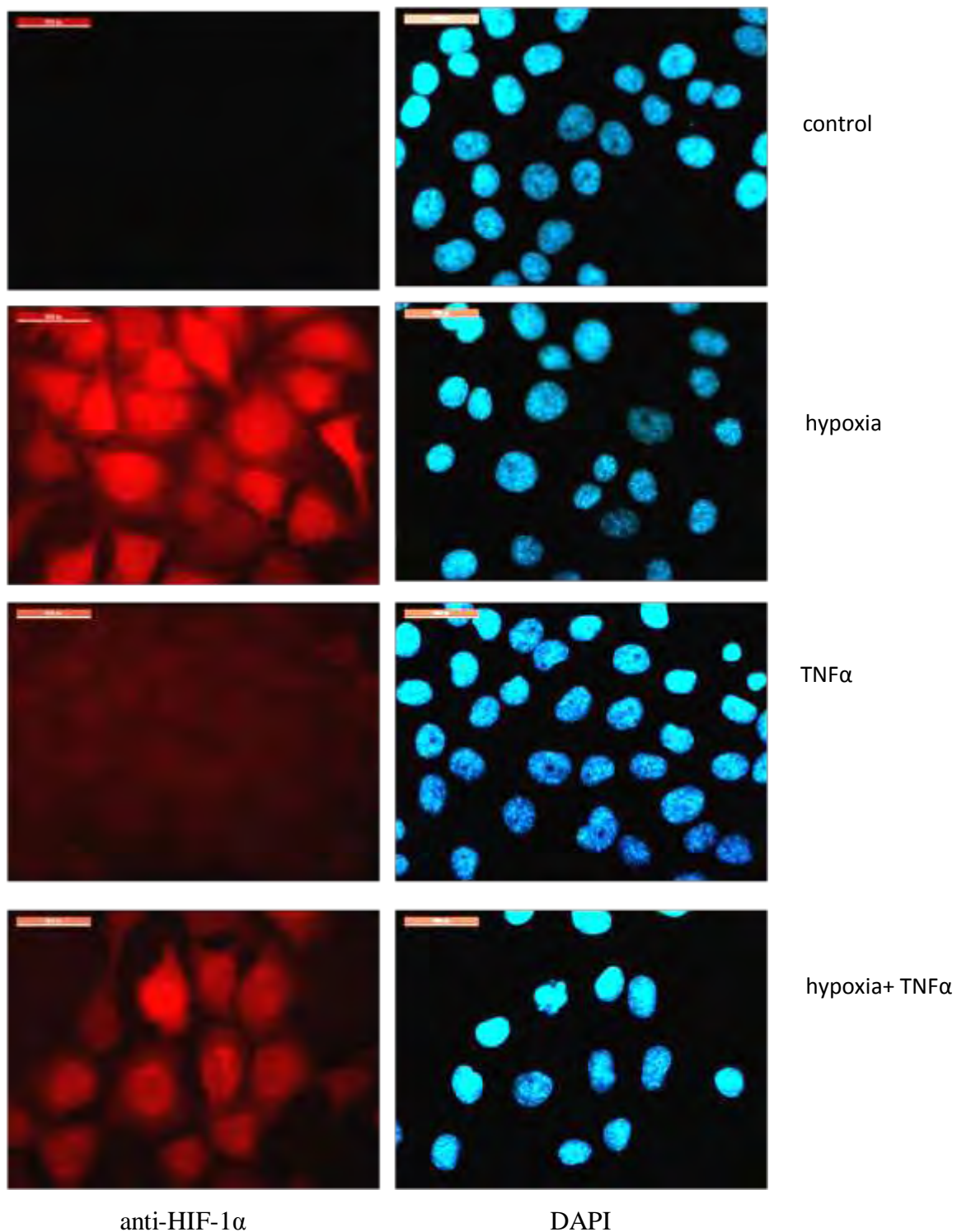
A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western του HIF-1α

B. Ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/τουμπουλίνη.



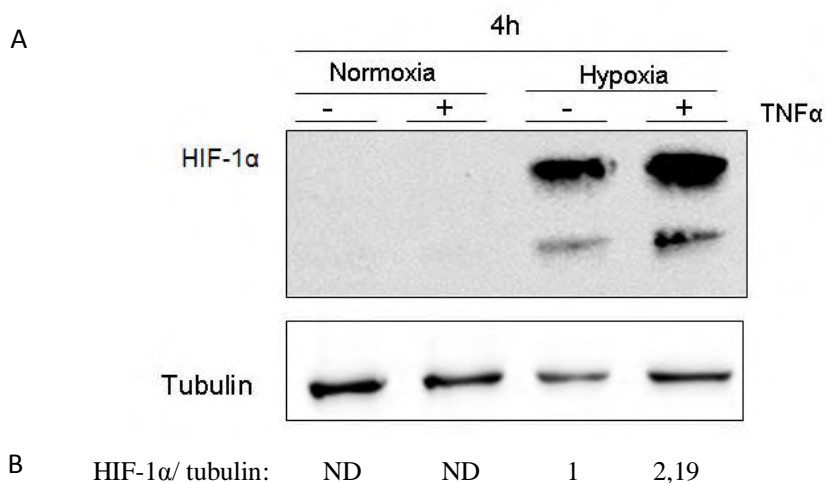
Για την υποκυτταρική ανίχνευση της HIF-1α πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Κύτταρα H1299 επώστηκαν για 4 ώρες παρουσία ή απουσία TNFα σε νορμοξία και σε υποξία. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, και αφού έγιναν διαπερατά επώστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι σε υποξία απουσία ή παρουσία TNFα HIF-1 επάγεται και εντοπίζεται στον πυρήνα. Στα κύτταρα που είχαν κατεργαστεί με TNFα σε νορμοξία δεν υπήρχε ουσιαστική διαφορά στην ένταση του σήματος σε σχέση με το control. Επιπλέον, δεν παρατηρείται διαφορά στην ένταση ή στον υποκυτταρικό εντοπισμό του σήματος του HIF-1α μεταξύ των κυττάρων που είχαν επωαστεί παρουσία ή απουσία TNFα σε συνθήκες υποξίας. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με το πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικ.30).



*Εικ.30 Μικροσκοπία έμμεσον ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι του HIF-1α σε H1299, μετά από επώαση 4h σε νορμοξία ή υποξία και με ή χωρίς TNFα σε νορμοξία και σε υποξία. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.*

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η καλλιέργεια των κυττάρων απουσία FBS επηρεάζει την επαγωγή του HIF-1α από τον TNFα, πραγματοποιήθηκε μελέτη και σε κύτταρα H1299, τα οποία επώαστηκαν για 4 ώρες με θρεπτικό διάλυμα παρουσία FBS με ή χωρίς TNFα σε νορμοξία και σε υποξία (Εικ.31). Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι η HIF-1α πρωτεΐνη επάγεται σε συνθήκες υποξίας απουσία και παρουσία του TNFα, όπως παρατηρείται και απουσία ορού. Και σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρείται έκφραση της HIF-1α πρωτεΐνης υπό τη επίδραση του TNFα σε νορμοξία. Προφανώς, η ύπαρξη ή όχι του ορού δεν επηρεάζει την επαγωγή του HIF-1α.



Εικ.31 Επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης σε H1299 που επώαστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό με FBS σε νορμοξία (20% O<sub>2</sub>) ή σε υποξία (1% O<sub>2</sub>), απουσία ή παρουσία TNFα. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

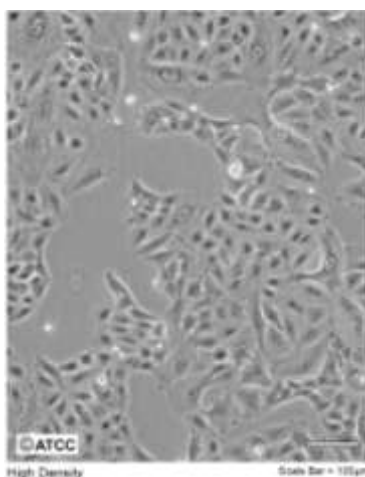
A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western του HIF-1α

B. Ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/τουμπουλίνη.

(ND =μη ανιχνεύσιμο)

## 4.2 Η επίδραση του TNF $\alpha$ στην κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού A549 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

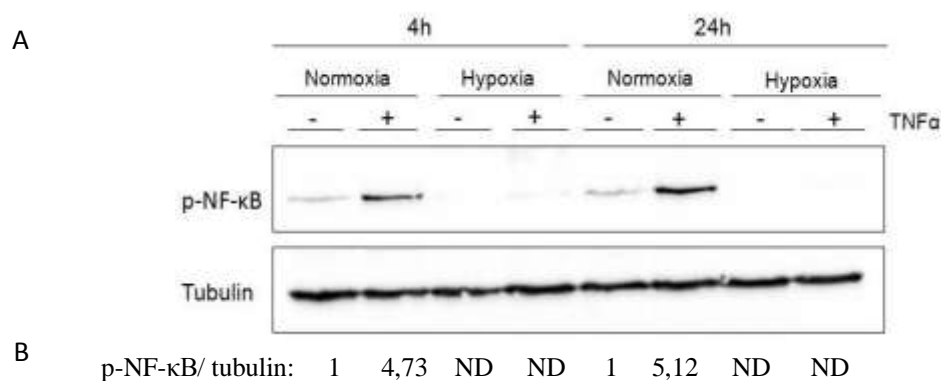
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το εύρημα ότι η κατεργασία με TNF $\alpha$  δεν επηρεάζει την επαγωγή του HIF-1 $\alpha$  στα κύτταρα H1299, τα αντίστοιχα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western επαναλήφθηκαν και στην κυτταρική σειρά A549 (Εικ.32). Τα A549 είναι κυψελιδικά κύτταρα, προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και το 24% των κυττάρων χαρακτηρίζεται από υποτριπλοειδία (66 χρωμοσώματα). Για το σκοπό αυτό A549 κύτταρα επωάστηκαν για 4 και 24 ώρες με θρεπτικό διάλυμα χωρίς FBS (control) σε νορμοξία και σε υποξία, με ή χωρίς προσθήκη TNF $\alpha$  (10ng/ml)..



Εικ.32 Μορφολογία κυττάρων A549 σε καλλιέργεια

#### 4.2.1. Ενεργοποίηση του NF-κB

Όπως στα κύτταρα H1299, ομοίως στα κύτταρα A549 παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της p65 της NF-κB πρωτεΐνης επάγεται από τον TNFα σε συνθήκες νορμοξίας. Ωστόσο σε συνθήκες υποξίας με ή χωρίς TNFα η φωσφορυλιωμένη p65 δεν ανιχνεύεται (Εικ.33)



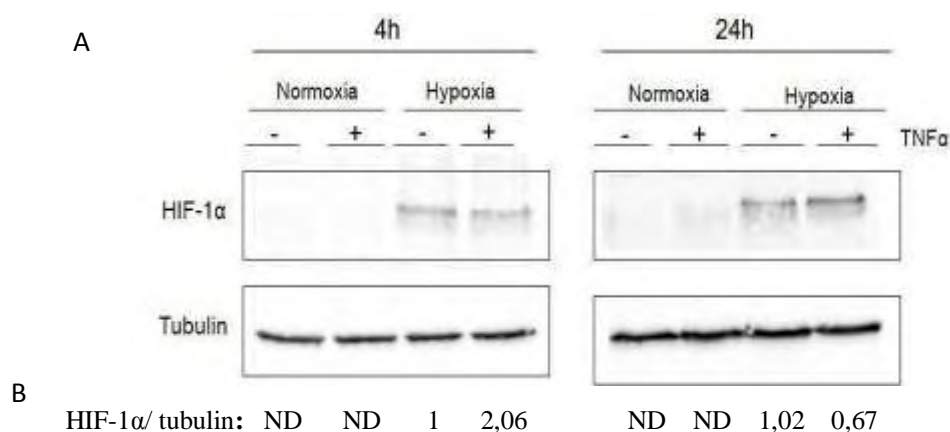
Εικ.33 Η επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στην επαγωγή της phospho-NF-κB πρωτεΐνης σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία (20% O<sub>2</sub>) ή σε υποξία (1% O<sub>2</sub>), απουσία ή παρουσία TNFα. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western του phospho-NF-κB

B. Ποσοτικοποίηση του phospho-NF-κB εκφρασμένου ως λόγος phospho-NF-κB/τουμπουλίνη (ND =μη ανιχνεύσιμο)

#### 4.2.2 Έλεγχος των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης

Ο έλεγχος των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης στις παραπάνω συνθήκες έδειξε ότι η HIF-1α πρωτεΐνη επάγεται σε συνθήκες υποξίας απουσία ή παρουσία TNFα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή των επιπέδων της πρωτεΐνης υπό την επίδραση του TNFα στη νορμοξία (Εικ.34). Τα αποτελέσματα των A549 συμφωνούν με τα αποτελέσματα των H1299.



Εικ.34 Η επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στα επίπεδα της HIF-1α πρωτεΐνης σε κύτταρα A549 που επωάστηκαν για 4 και 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία (20% O<sub>2</sub>) ή σε υποξία (1% O<sub>2</sub>), απουσία ή παρουσία TNFα. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

A. Μελέτη με ανοσοαποτύπωση κατά Western του HIF-1α

B. Ποσοτικοποίηση του HIF-1α εκφρασμένου ως λόγος HIF-1α/τουμπουλίνη (ND =μη ανιχνεύσιμο)

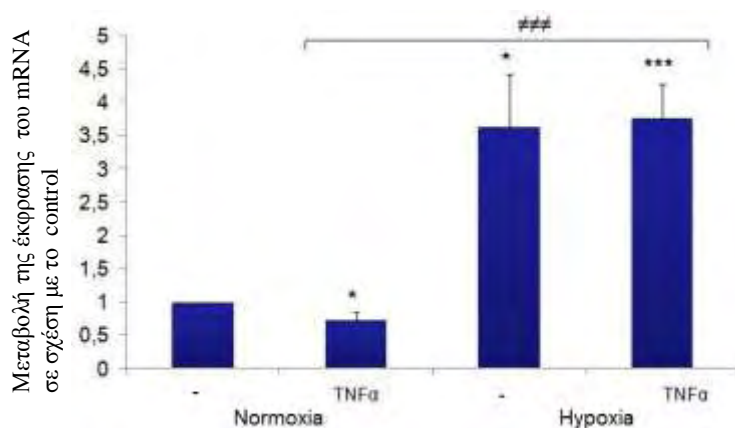
### 4.3. Η επίδραση του TNF $\alpha$ στη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Σε παθολογικές καταστάσεις τα ενεργοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες (Mills et al., 1999).

Προκειμένου να ελεγχθεί η μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων H1299 υπό την επίδραση του TNF $\alpha$  και της υποξίας εξετάστηκε η έκφραση του VEGF και παραγόντων της φλεγμονής, όπως των κυτταροκινών RANTES, IL-6 και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 ώρες με θρεπτικό διάλυμα χωρίς ορό (control) σε νορμοξία και σε υποξία, με ή χωρίς προσθήκη TNF $\alpha$  (10ng/ml). Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή και ανάλυση των επιπέδων του HIF-1 $\alpha$  mRNA με ποσοτική Real-Time PCR με χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -ακτίνη.

#### 4.3.1 Επαγωγή του VEGF

Η επώαση σε συνθήκες υποξίας απουσία ή παρουσία TNF $\alpha$  προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF (3.6 και 3.8 φορές αντίστοιχα ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNF $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). Ωστόσο ο TNF $\alpha$  σε νορμοξία προκάλεσε μικρή μείωση στα επίπεδα mRNA του VEGF, που είναι στατιστικά σημαντική (0.733 φορές ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNF $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ) (Εικ.35).



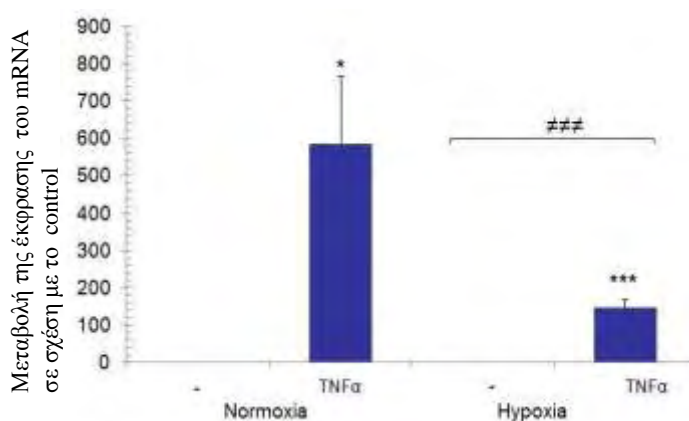
Εικ.35 Σχετική έκφραση mRNA του VEGF κυττάρων H1299 μετά από 20h επώαση σε νορμοξία ή σε υποξία, απουσία ή παρουσία TNF $\alpha$ . Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (control) και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 4 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της  $\beta$ -actin (\*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , ###:  $P < 0.001$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNF $\alpha$ ]

[#: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία παρουσία TNF $\alpha$ ]

### 4.3.2 Επαγωγή των παραγόντων της φλεγμονής RANTES, IL-6, I-CAM, V-CAM

Ο TNF $\alpha$  σε νορμοξία και σε υποξία προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα mRNA του RANTES (585 φορές  $P < 0.05$  και 145 φορές αντίστοιχα, ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNF $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). Αν και σε υποξία η διαμεσολαβούμενη από τον TNF $\alpha$  αύξηση του mRNA του RANTES είναι μικρότερη από ότι σε νορμοξία, ωστόσο αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η υποξία από μόνη της δεν επέφερε αλλαγή στα mRNA του RANTES (Εικ.36). Όσον αφορά τα επίπεδα mRNA της IL-6, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή σε καμία από τις πειραματικές συνθήκες που εξετάσαμε.



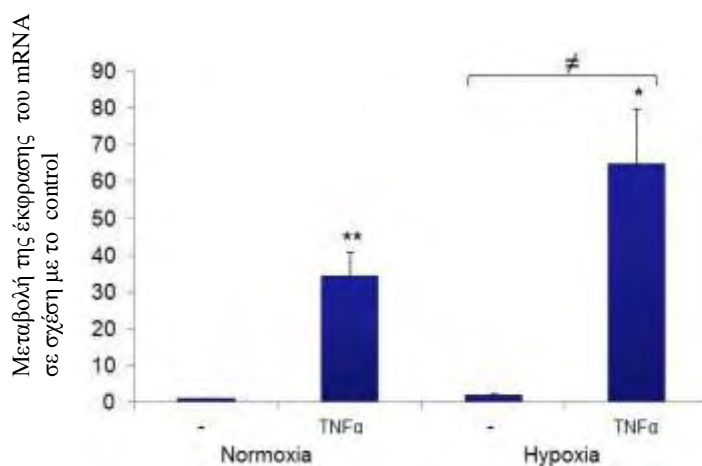
Εικ.36 Σχετική έκφραση mRNA του RANTES κυττάρων H1299 μετά από 20h επώαση σε νορμοξία ή σε υποξία, απουσία ή παρουσία TNF $\alpha$ . Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (-) και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της  $\beta$ -actin (\*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , ###:  $P < 0.001$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNF $\alpha$ ]

[#: σε σχέση με επώαση σε υποξία απουσία TNF $\alpha$ ]



Ο TNFα σε νορμοξία και σε υποξία επάγει τα επίπεδα mRNA του ICAM (34.6 και 64.9 φορές αντίστοιχα, ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNFα,  $P < 0.05$ ). Αν και σε υποξία η διαμεσολαβούμενη από τον TNFα αύξηση του mRNA του I-CAM είναι μεγαλύτερη από ότι σε νορμοξία, ωστόσο αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η υποξία από μόνη της δεν προκάλεσε αλλαγή στα mRNA του I-CAM (Εικ.37).

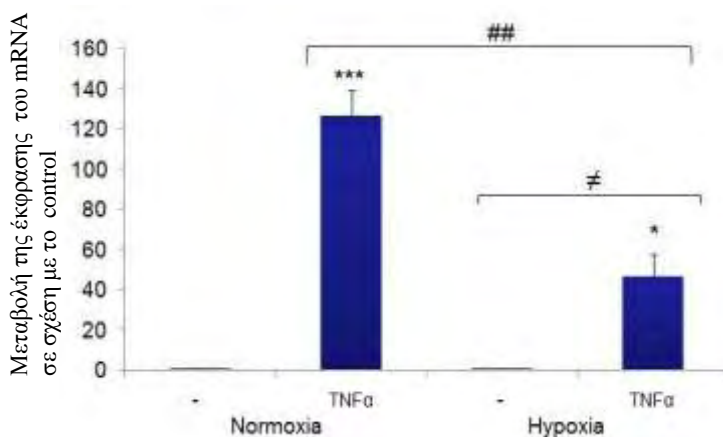


Εικ.37 Σχετική έκφραση mRNA του ICAM κυττάρων H1299 μετά από 20h επώαση σε νορμοξία ή σε υποξία, απουσία ή παρουσία TNFα. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (-) και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της β-actin (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , #:  $P < 0.05$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNFα]

[#: σε σχέση με επώαση σε υποξία απουσία TNFα]

Ο TNFα σε νορμοξία και σε υποξία επάγει τα επίπεδα mRNA του V-CAM (126.6 και 46.8 φορές αντίστοιχα, ως προς τα επίπεδα σε κύτταρα που επώαστηκαν σε νορμοξία απουσία TNFα,  $P < 0.05$ ). Ωστόσο, φαίνεται ότι η υποξία μειώνει στατιστικά σημαντικά τη διαμεσολαβούμενη από τον TNFα αύξηση του mRNA του V-CAM. Η υποξία από μόνη της δεν επέφερε αλλαγή στα mRNA του V-CAM (Εικ.38).



Εικ.38 Σχετική έκφραση mRNA του VCAM κυττάρων H1299 μετά από 20h επώαση σε νορμοξία απουσία ή παρουσία TNFα και σε υποξία απουσία ή παρουσία TNFα. Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (control) και αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων διπλών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα ομαλοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα mRNA της β-actin (\*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , ≠:  $P < 0.05$ , ##:  $P < 0.01$ )

[\*: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία απουσία TNFα]

[≠: σε σχέση με επώαση σε υποξία απουσία TNFα]

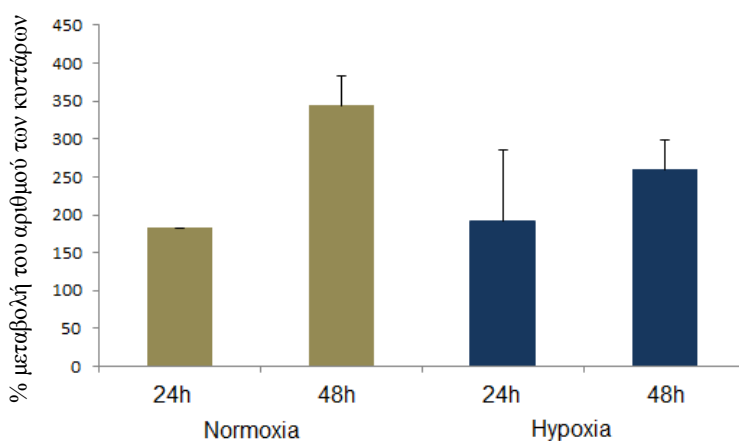
[#: σε σχέση με επώαση σε νορμοξία παρουσία TNFα]

#### 4.4 Επίδραση του TNFα στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

Καθώς η υποξία και η φλεγμονή μπορούν να επιδρούν στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, ένας ακόμη στόχος μας ήταν να ελέγξουμε αν τα κύτταρα H1299 επιβιώνουν ή και πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες επώασης με TNFα σε νορμοξία και σε υποξία. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο MTS.

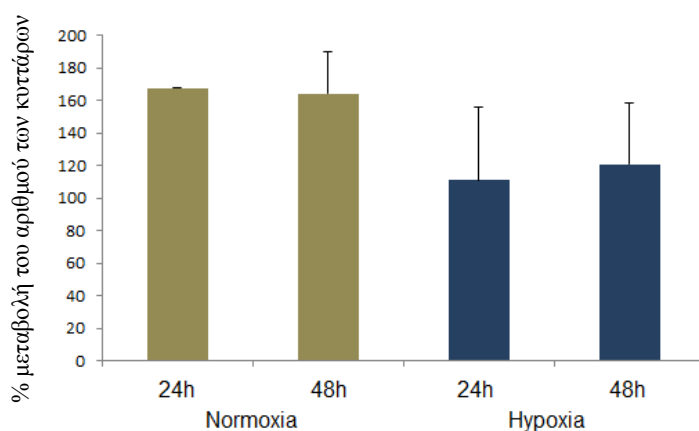
Σε προκαταρκτικά πειράματα με διαφορετικούς αριθμούς κυττάρων επιβεβαιώθηκε ότι οι μετρήσεις είναι ανάλογες με τον αριθμό των κυττάρων. Για τα επόμενα πειράματα, 5000 κύτταρα H1299 τοποθετήθηκαν σε τριβλία 96 θέσεων και κατεργάστηκαν όπως περιγράφεται σε κάθε πείραμα.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό με FBS σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 και 48 ώρες. Τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία παρατηρείται πολλαπλασιασμός των κυττάρων από τις 24 στις 48 ώρες, σε σχέση με τις 0 ώρες. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του πολλαπλασιασμού ανάμεσα σε νορμοξία και σε υποξία. Επομένως η υποξία δε φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299 (Εικ. 39).



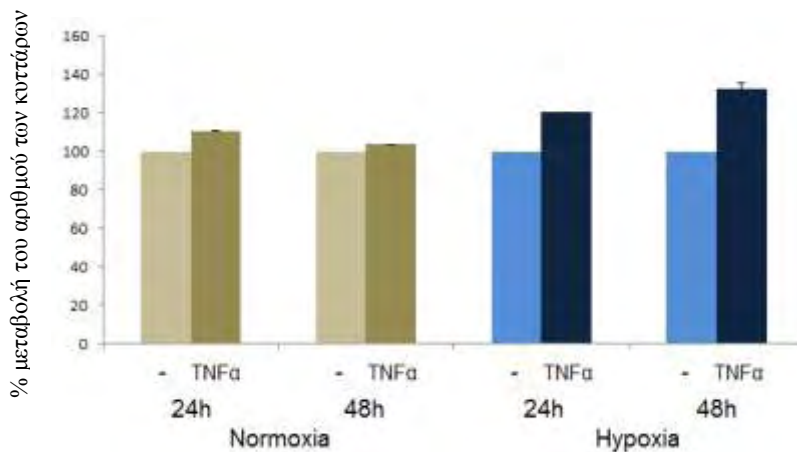
Εικ.39 Πολλαπλασιασμός των κυττάρων H1299 κάτω από συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, παρουσία FBS. Η % μεταβολή του αριθμού των κυττάρων παρουσιάζεται σε σχέση με τις 0 ώρες.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων H1299 σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε νορμοξία και σε υποξία. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24h σε νορμοξία στους 37°C προκειμένου να προσκολληθούν και την επόμενη μέρα έγινε μέτρηση (0 ώρες). Έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού (-FBS) και ακολούθησαν μετρήσεις ύστερα από το πέρας 24 και 48 ωρών επώασης σε κάθε συνθήκη. Όπως φαίνεται στην εικόνα η βιωσιμότητα των κυττάρων H1299 δεν επηρεάζεται από την επώαση τους σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS (Εικ.40).



*Εικ.40 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων H1299 κάτω από συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, για 4 και 24 ώρες, απουσία FBS. Η % αύξηση του αριθμού των κυττάρων παρουσιάζεται σε σχέση με τις 0 ώρες.*

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του TNF $\alpha$  στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα κύτταρα H1299 επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες σε νορμοξία ή σε υποξία, απουσία ή παρουσία TNF $\alpha$ . Σε συνθήκες επώασης με TNF $\alpha$  σε νορμοξία και σε υποξία δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων στις 24 και στις 48 ώρες, σε σχέση με το control (-FBS) της αντίστοιχης μέρας και συνθήκης (Εικ.41).



Εικ.41 Πολλαπλασιασμός των κυττάρων H1299 κάτω από συνθήκες TNF $\alpha$  σε νορμοξία και σε υποξία, για 4 και 24 ώρες. Η % μεταβολή του αριθμού των κυττάρων παρουσιάζεται σε σχέση με το control (-FBS) της αντίστοιχης μέρας και συνθήκης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού H1299 χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του TNF $\alpha$ , της υποξίας και του συνδυασμού τους στην έκφραση του HIF-1 $\alpha$  και στη μεταγραφική δραστηριότητα των H1299 μέσω της επαγωγής του VEGF και παραγόντων φλεγμονής, όπως RANTES, IL-6, I-CAM και VCAM. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του TNF $\alpha$  στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Είναι γνωστό ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συμμετέχουν στην παθογένεση χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ, όχι μόνο ως δομικά κύτταρα, αλλά έχοντας λειτουργικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής και κατά την αναδιαμόρφωση του ιστού που τη συνοδεύει. Το επιθήλιο του αναπνευστικού αποτελεί στόχο του TNF $\alpha$ , ο οποίος συμμετέχει στην παθοφυσιολογία παθήσεων των αεραγωγών, όπως το άσθμα, ρυθμίζοντας τη διαδικασία τη φλεγμονής, της ιστικής αναδιαμόρφωσης και της βρογχικής υπεραπαντητικότητας. Επιπλέον, η υποξία και η φλεγμονή συνυπάρχουν στο άσθμα και αλληλεπιδρούν μέσω μηχανισμών ενεργοποίησης παραγόντων, όπως ο HIF-1 $\alpha$  και ο NF- $\kappa$ B.

Έχει δειχθεί ότι σε νορμοξία κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και άλλοι παράγοντες της φλεγμονής μπορούν να επάγουν τον HIF-1 και σε αυτό μπορεί να συμβάλλει η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B (Dehne and Brune, 2009). Συγκεκριμένα για τον TNF $\alpha$ , η πρόσδεση του στον υποδοχέα του οδηγεί σε ενεργοποίηση της IKK $\beta$  και φωσφορυλίωση της I $\kappa$ B $\alpha$ , η οποία οδηγείται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Το σύμπλοκο του p65-p50 NF- $\kappa$ B μετατοπίζεται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Η ενεργοποίηση της IKK $\beta$  από τον TNF $\alpha$  προκαλεί, επίσης, φωσφορυλίωση της p65 και αυξάνεται περισσότερο η μεταγραφική ενεργότητα του NF- $\kappa$ B (Perkins, 2006). Δείχθηκε ότι στα H1299 η κατεργασία με TNF $\alpha$  σε νορμοξία επάγει την φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας και άρα τη μεταγραφική ενεργότητα του NF- $\kappa$ B. Αντίθετα με τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα ότι η υποξία ενεργοποιεί τον NF- $\kappa$ B (Taylor, 2008), στα κύτταρα H1299 βρίσκουμε ότι σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της p65 από τον TNF $\alpha$  μειώνεται.

Η επαγωγή του HIF-1 $\alpha$  σε νορμοξία από κυτταροκίνες πραγματοποιείται μέσω της αύξησης της σύνθεσης του, δηλαδή αύξηση της μεταγραφής του RNA του και της μετάφρασης (Frede et al., 2007). Συγκεκριμένα, ο NF- $\kappa$ B μεσολαβεί στη μεταγραφή του HIF-1 $\alpha$  mRNA (Rius et al., 2008; Van uden). Παρατηρήσαμε ότι σε κύτταρα H1299 ο TNF $\alpha$  σε νορμοξία αυξάνει τα επιπέδα του HIF-1 $\alpha$  mRNA, αλλά όχι της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μη ισχυρή επαγωγή της HIF-1 $\alpha$  πρωτεΐνης, η οποία δεν μπορεί να

ανιχνευτεί. Η πρωτεΐνη του HIF-1α επάγεται κατά την υποξία και η επαγωγή αυτή δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία TNFα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και με ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Σε υποξία η αύξηση των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης οφείλεται στη σταθεροποίηση της. Η αδυναμία επαγωγής του NF-κΒ και του HIF-1α mRNA από την υποξία συμφωνεί και με το γεγονός ότι σε λεία μυϊκά κύτταρα πνευμονικών αρτηριών η επαγωγή του NF-κΒ και του HIF-1α mRNA είναι ταχεία και παροδική (Belaïba et al., 2007). Σε λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων, η υποξία μειώνει την από τον TNFα αυξημένη επαγωγή του NF-κΒ και το HIF-1α mRNA (Tsapournioti et al., 2013).

Βέβαια, η επαγωγή του HIF-1α σε κατάσταση φλεγμονής έχει μελετηθεί καλύτερα σε κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ο ρόλος του HIF-1α σε κύτταρα του ανοσοποιητικού είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση και την επιβίωση των κυττάρων αυτών κατά τη φλεγμονώδη απόκριση (Imtiyaz and Simon, 2010). Σε πρωτογενή φλεγμονώδη κύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα) κατά την έναρξη της φλεγμονής ο TNFα αυξάνει το HIF-1α mRNA και τη συσσώρευση της HIF-1α πρωτεΐνης (Albina et al., 2001). Μέσω της επαγωγής του από φλεγμονώδεις μεσολαβητές σε νορμοξία, ο HIF-1α μπορεί να διαφεύγει από την αποικοδόμηση του, και έτσι να συσσωρεύεται, ώστε να βοηθά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να προσαρμοστούν στο υποξικό περιβάλλον της φλεγμονής (Dehne and Brune, 2009).

Η επανάληψη των πειραμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και σε κύτταρα A549 δεν έδειξε επαγωγή της HIF-1α πρωτεΐνης από τον TNFα. Ωστόσο, σε άλλη έρευνα με A549, η επίδραση με TNFα αύξησε σε μεγάλο βαθμό την έκφραση της HIF-1α πρωτεΐνης, χωρίς να επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα του HIF-1α mRNA (Jung et al 2003). Επίσης, σε άλλες μελέτες με πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού τα αποτελέσματα ποικίλουν. Σε κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, βρέθηκε ότι ο TNFα οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1 και μετατόπιση του στον πυρήνα (Haddad and Land, 2001). Σε βρογχικά κύτταρα βρέθηκε ότι ο TNFα σε συνδυασμό με την IL-4 σε υποξία αν και δεν προκαλούν συσσώρευση της HIF-1α πρωτεΐνης, ενεργοποιούν τον HIF-1α μέσω αύξησης της μεταγραφής και μετάφρασης (Jiang et al., 2010).

Κατά τη διαδικασία της φλεγμονής, τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού εκκρίνουν κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης και συμβάλλουν έτσι στην ενεργοποίηση των κυττάρων της φλεγμονής, στην ιστική αναδιαμόρφωση, και στην αλληλεπίδραση με τα υπόλοιπα δομικά κύτταρα (Mills et al., 1999). Η έκκριση του VEGF σε μηχανισμούς αναδιαμόρφωσης στον πνεύμονα προάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων με στόχο τη νεοαγγειογένεση (Voelkel et al., 2006). Στα επιθηλιακά κύτταρα η κατεργασία με TNFα δεν επηρεάζει ουσιαστικά τα επίπεδα του VEGF mRNA,

γονιδίου στόχου του HIF-1α. Αντίθετα, η έκφραση του VEGF mRNA αυξάνεται στην υποξία. Ο TNFα προκαλεί περαιτέρω επαγωγή και κυτταροκινών, όπως RANTES και μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM διευκολύνοντας έτσι τη συνέχιση της φλεγμονώδους απόκρισης (Wang et al., 1997). Παρατηρήθηκε ότι και στα κύτταρα H1299, ο TNFα προκαλεί επαγωγή της κυτταροκίνης RANTES και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM σε νορμοξία και σε υποξία. Η υποξία από μόνη της δε φαίνεται να προκαλεί επαγωγή των RANTES, ICAM και VCAM, αλλά φαίνεται ότι αναστέλλει την υποκινούμενη από τον TNFα αύξηση του VCAM. Η αναστολή της επαγόμενης από τον TNFα αύξησης του VCAM μέσω της υποξίας και μόρια μιμητών της υποξίας παρατηρήθηκε και σε αθανατοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων (Tsapournioti et al., 2013; Cartee et al., 2012). Αν και σε λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων η υποξία σε ένα μικρό βαθμό και ο TNFα σε νορμοξία και σε υποξία επέφεραν αύξηση της IL-6 (Tsapournioti et al., 2013), στην παρούσα μελέτη ούτε η υποξία ούτε ο TNFα είχαν επίδραση σε αυτή την κυτταροκίνη.

Η υποξία και η φλεγμονή μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση και των πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε πρωτογενή κυψελιδικά κύτταρα τύπου II και σε A549, η υποξία ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και αύξησε την απόπτωση με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο (Krick et al. 2005; Strassberg et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη η υποξία δεν επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων H1299. Πιθανόν εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί επίδρασης της υποξίας ανάλογα με τον τύπο των επιθηλιακών κυττάρων και της παθολογικής κατάστασης και οι οποίοι πιθανόν σχετίζονται με τη διαδικασία επούλωσης του επιθηλίου κατόπιν βλάβης.

Κατά τη χρόνια φλεγμονή παθήσεων του αναπνευστικού επικρατεί απώλεια της ακεραιότητας του επιθηλίου και σε αυτό συμβάλλει ο TNFα, ο οποίος σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα βρόγχων βρέθηκε ότι προκαλεί σημαντική απόπτωση (Kampf et al., 1999). Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, ο TNFα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας δε φαίνεται να επιδρά στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κΒ από τον TNFα, η οποία δείχθηκε και στην μελέτη μας, αναστέλλει την απόπτωση και έχει, έτσι, προστατευτικό ρόλο στα κύτταρα (Liu et al., 1996). Σε μια πρόσφατη μελέτη σε νευρονικά κύτταρα η κατεργασία με ο TNFα προάγει την κυτταρική επιβίωση με ενεργοποίηση του NF-κΒ και του μονοπατιού MAP/ERK (Marques-Fernandez et al., 2013). Διαφορετικά αποτελέσματα δείχνουν ότι ο TNFα, δεν προκαλεί απόπτωση, αλλά αντίθετα, σε λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων ανθρώπου, ο TNFα προκάλεσε πολλαπλασιασμό, γεγονός που σχετίζεται με τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών κατά το άσθμα και τη ΧΑΠ (Stamatiou et



al.,2012). Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων H1299 υπό την επίδραση του TNFα είναι αμελητέος.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο TNFα σε νορμοξία δεν επιδρά στην έκφραση της HIF-1α πρωτεΐνης σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, αλλά αντίθετα σε νορμοξία και σε υποξία επιφέρει σημαντική αύξηση της κυτταροκίνης RANTES και των μορίων προσκόλλησης ICAM και VCAM. Αντίθετα, η υποξία προκαλεί αύξηση των επιπέδων της HIF-1α πρωτεΐνης και του VEGF mRNA, αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση των περισσότερων δεικτών της φλεγμονής που εξετάσαμε. Επιπλέον, ούτε ο TNFα ούτε η υποξία επιδρούν στη επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων H1299. Γενικά, η υποξία και η από τον TNFα επαγόμενη φλεγμονή φαίνεται ότι επιδρούν ανεξάρτητα στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού.

Στους μελλοντικούς μας στόχους κατατάσσεται και η επίδραση του TNFα και της υποξίας στην έκφραση και άλλων παραγόντων της φλεγμονής, καθώς και ειδικών γονιδίων που εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού, όπως οι βλεννίνες. Επιπλέον, καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα μέσω εκκρινόμενων παραγόντων αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα δομικά κύτταρα του αναπνευστικού, κρίνεται σημαντική η μελέτη της επίδρασης των επιθηλιακών κυττάρων και στα λεία μυϊκά κύτταρα των βρόγχων σε συνθήκες φλεγμονής και υποξίας, με συγκαλλιέργεια.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albina, J. E., Mastrofrancesco, B., Vessella, J. A., Louis, C. A., Henry, W. L., Reichner, J. S., (2001). HIF-1 expression in healing wounds : HIF-1  $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF-  $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 281, 1971-1977.
- Baay-Guzman, G. J., Bebenek, I. G., Zeidler, M., Hernandez-Pando, R., Vega, M. I., Garcia-Zepeda, et al. (2012). HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Respiratory Research* 13(262), 60.
- Baek, K. J., Cho, J. Y., Rosenthal, P., Alexander, L. E. C., Nizet, V., & Broide, D. H. (2013). Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 $\alpha$ , chemokines, airway inflammation, TGF- $\beta$ 1, and airway remodeling in a mouse model. *Clinical Immunology* 147(1), 27–37.
- Bai, T. R., & Knight, D. a. (2005). Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clinical Science* 108(6), 463–77.
- Barnes, P., & Karin, M. (1997). Nuclear factor – kb- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine* 336(15), 1066-71
- Barnes, P. J. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *The Journal of Clinical Investigation* 118(11), 3546-3556.
- Barret, K., Brooks, H., Boitano, S., Barman, S. (2010). Ganong's review of medical physiology, 23<sup>rd</sup> edition.
- Borges, V. M., Vandivier, R. W., McPhillips, K., Kench, J., Morimoto, K., Groshong, S. D., Janssen, W. J. (2009). TNF $\alpha$  inhibits apoptotic cell clearance in the lung, exacerbating acute inflammation. *American journal of physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology* 297(4), 586–95.
- Brightling, C., Berry, M., and Amrani, Y. (2007) *Current Opinion in Pharmacology* ,7(3), 279-82.
- Carroll, V., & Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7, 1-16.
- Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J.M., Braliou, G.G., Gorlich, D., Simos, G. (2009). Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun* 390(2), 235-240.
- Chanez, P. (2005). Severe asthma is an epithelial disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 25(6), 945–6.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 Signaling : A Beautiful Pathway. *Science* 296, 1634–1635.
- Clerici, C., & Plane, C. (2009). Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, 267–274.

Cohn, L. (2006) Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. *J Clin Invest* 116, 306–8.

Cooper, D.N (2005). The molecular genetics of lung cancer. Springer, UK.

Coussens, L.M. & Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917),860-7.

Cummins, EP., Berra E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur J., Taylor, C.T. (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta giving insight into hypoxia-induced NF-kappaB activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18154–18159.

Curran, D. R., & Cohn, L. (2010). Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42(3), 268–75.

Darnay, B. G., & Aggarwal, B. B. (1997). Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *Journal of Leukocyte Biology* 61(5), 559–66.

Davies, D. E. (2009). The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society* 6(8), 678–82.

Dehre, N., and Brune, B.(2009). HIF-1 in the inflammatory environment. *Experimental Cell Research* 315(11), 1791-1797.

Eltzschig,H & Carmelite,P.(2011). Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 364, 656-665

Eltzschig, H. K., Thompson, L. F., Karhausen, J., Cotta, R. J., Ibla, J. C., Robson, S. C., & Colgan, S. P. (2004). Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*, 104(13), 3986–92.

Fitzpatrick, S. F., Tambuwala, M. M., Bruning, U., Schaible, B., Scholz, C. C., et al. (2011). An intact canonical NF- $\kappa$ B pathway is required for (2010). Inflammatory gene expression in response to hypoxia. *Journal of Immunology* 186(2), 1091–6.

Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J. (2007). Regulation of Hypoxia Inducible Factors during inflammation. *Methods in Enzymology* 435, 405-419.

Hackett, T.-L. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 12(1), 53–59.

Haddad, J. J., & Harb, H. L. (2005). Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *International Immunopharmacology* 5(3), 461–83.

Haddad, J. J., & Land, S. C. (2001). A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF $\alpha$  - dependent regulation of HIF-1 $\alpha$ , *FEBS Lett.* 505, 1–6.

Hart, M. L., Grenz, A., Gorzolla, I. C., Schittenhelm, J., Dalton, J. H., & Eltzschig, H. K. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor. *Journal of Immunology* 186(7), 4367–74.

- Heijink, I.H., Postma, D.S., Noordhoek, J.A., et al. (2010) House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42,69–79.
- Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W (1999). Interleukin-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1, *Blood* 94,1561–1567.
- Holgate, S. T. (2008). Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38(6), 872–897.
- Houghton, A. M., Quintero, P. A., Perkins, D. L., Kobayashi, D. K., Kelley, D. G., Marconcini, L. A., Mecham, R. P., et al. (2005). Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema, *The Journal of Clinical Investigation* 116, 1-7.
- Imtiyaz, H. & Simon, C. (2010) Hypoxia-inducible factors as essential regulators of Inflammation, *Curr Top Microbiol Immunol* 345,105–120.
- Jain, M., & Sznajder, J. I. (2005). Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(3), 202–5.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 59(4), 225-249.
- Jiang, H., Zhu, Y., Xu, H., Sun, Y., & Li, Q. (2010). Activation of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  via nuclear factor- $\kappa$  B in rats with chronic obstructive pulmonary disease, *Acta Biochim Biophys Sin* 42(7), 483–488.
- Jonckheere, N., & Van Seuning, I. (2010). The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* 92(1), 1–11.
- Jung, Yunjin, Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z., & Neckers, L. (2003). Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor  $\kappa$  B activation, *Biochem. J.* 370, 1011–1017.
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* 30(4), 393–402.
- Kampf, C., Relova, J., Sandler, S., & Roomans, G. M. (1999). Effects of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL- $\beta$  on normal human bronchial epithelial cells. *The European Respiratory Journal* 14(1), 84–91.
- Ke, Q., & Costa, M. (2006a). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacology* 70(5), 1469–1480.
- Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer* 12(1), 9–22.
- Koeppen, M., Eckle, T., Eltzschig, H. (2011) Hypoxia-Inflammation Link and Potential Drug Targets. *Curr Opin Anaesthesiol* 24(4), 363–369.

- Krick, S., Eul, B. G., Hänze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., & Rose, F. (2005). Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32(5), 395–403.
- Krüger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Schröppel, B. (2009). Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(9), 3390–5.
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2013). Death at the airway epithelium in asthma. *Cell Research* 23(5), 588–9.
- Liu, Y.J. (2006) Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 203, 269–73.
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87(3), 565–76.
- Luo, S. Y., & Lam, D. C. (2013). Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Translational Respiratory Medicine* 1(1), 6.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* 40(2), 294–309.
- Marques-Fernandez, F., Planells-Ferrer, L., Gozzelino, R., Galenkamp, K. M. O., Reix, S., Llecha-Cano, N., Comella, J. X. (2013). TNF $\alpha$  induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *Cell Death & Disease* 4(2), e493.
- McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D. E., & Dubois, C. M. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *The Journal of Biological Chemistry* 281(34), 24171–81.
- Mills, P. R., Davies, R. J., & Devalia, J. L. (1999). Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160, 38-43.
- Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., Yu, J. (2009). Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of Inflammation Research* 2, 1–11.
- Murdoch, C., Muthana, M., & Lewis, C. E. (2013). Hypoxia Regulates Macrophage Functions in inflammation. *Journal of Immunology* 175(10), 6257-6263.
- Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem* 283(41), 27620-27627.
- Na, N., Chandel, N. S., Litvan, J., & Ridge, K. M. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxia-induced degradation of keratin intermediate filaments.

FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 24(3), 799–809.

Peebles, K., Lee, J., Mao, J., Hazra S., Reckamp, K., et al. (2007). Inflammation and lung carcinogenesis: applying findings in prevention and treatment. *Expert Review of Anticancer Therapy* 7(10), 1405-1421.

Perkins, N D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25(51), 6717–30.

Perkins, Neil D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 8(1), 49–62.

Polosukhin, V. V., Cates, J. M., Lawson, W. E., Milstone, A. P., Matafonov, A. G., Massion, P. P., Lee, J. W., et al. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 signalling promotes goblet cell hyperplasia in airway epithelium. *The Journal of Pathology* 224(2), 203-211.

Puchelle, E., Zahm, J.-M., Tournier, J.-M., & Coraux, C. (2006). Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3(8), 726-733.

Rezvani, H.R., Ali, N, Nissen L.J., Harfouche, G., de Verneuil, H., Taïeb, A., Mazurier, F.J. (2011). HIF-1 $\alpha$  in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *Invest Dermatol* 131(9):1793-1805.

Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R., Haddad, G., Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453(7196), 807–11.

Rooney, C., & Sethi, T. (2011). The epithelial cell and lung cancer: the link between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 81(2), 89–104.

Rydell-Törmänen, K., Risse, P.A., Kanabar, V, Bagchi. R., Czubryt, M.P., Johnson, J.R. (2013) Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 26(1),13-23.

Safronova, O., & Morita, I. (2010). Transcriptome remodeling in hypoxic inflammation. *Journal of dental research* 89(5), 430–44.

Saini, Y., Greenwood, K. K., Merrill, C., Kim, K. Y., Patial, S., Parameswaran, N., LaPres, J. J. (2010). Acute cobalt-induced lung injury and the role of hypoxia-inducible factor 1alpha in modulating inflammation. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 116(2), 673–81.

Scharte, M., Han, X., Bertges, D. J., Fink, M. P., & Delude, R. L. (2003). Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 284(3), 373–84.

Schleimer, R. P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., & Avila, P. C. (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(6), 1279–84.

Scortegagna, M., Cataisson, C., Martin, R. J., Hicklin, D. J., Schreiber, R. D., Yuspa, S. H., & Arbeit, J. M. (2008). HIF-1 $\alpha$  regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF $\kappa$ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* 111(7), 3343–54.

Semenza, G. L. (2010). Oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems Biology and Medicine* 2(3), 336–61.

Stamatiou, R., Paraskeva, E., Gourgoulianis, K., Molyvdas, P.A., Hatziefthymiou, A.(2012) Cytokines and Growth Factors Promote Airway Smooth Muscle Cell Proliferation. *ISRN Inflammation*, 2012, Article ID 731472, 13 pages

Stockley, R. a, Mannino, D., & Barnes, P. J. (2009). Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 6(6), 524–6.

Strassberg S, Godi I, Pandya D, Dudhbbhai A, Parton L. (2004) Proinflammatory mediators amplify the apoptotic response of human lung cells during hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 797

Strieter, R., Kunkel, S., Keane, M., Standiford, T.(1999) Chemokines in Lung Injury. *Chest* 116, 103-110.

Takeda, N., O'Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J.W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A., Johnson, R.S.(2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Gene Dev* 24(5), 491-501.

Taylor, C. T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- $\kappa$ B in hypoxic inflammation. *The Journal of Physiology* 586(17), 4055–9.

Temann, U.-A., Laouar, Y., Eynon, E. E., Homer, R., & Flavell, R. a. (2007). IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *International Immunology* 19(1), 1–10.

Thomas, P. S. (2001). Tumour necrosis factor- $\alpha$ : the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunology and Cell Biology* 79(2), 132–40.

Thomas, P. S., & Heywood, G. (2002). Effects of inhaled tumour necrosis factor  $\alpha$  in subjects with mild asthma. *Thorax* 57(9), 774–8.

Tsapournioti, S., Mylonis, I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R,Koukoulis GK, Simis G, Molyvdas PA and Paraskeva E.(2013). TNF $\alpha$  induces HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein in Airway Smooth Muscle Cells via an NF- $\kappa$ B- dependent pathway but inhibits HIF-1 $\alpha$ /ARNT complex formation and HRE dependent transcriptional activity under hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*.

Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M. a, Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., & Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and

HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 279(15), 14871–8.

Van Uden, P., Kenneth, N. S., Webster, R., Müller, H. A., Mudie, S., & Rocha, S. (2011). Evolutionary conserved regulation of HIF-1 $\beta$  by NF- $\kappa$ B. *PLoS genetics* 7(1), e1001285.

Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. (2006) Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, 209-221.

Wang, J. H., J. L. Devalia, R. J. Sapsford, and R. J. Davies. (1997). Effect of corticosteroids on release of RANTES and sICAM-1 from cultured human bronchial epithelial cells, induced by TNFa. *Eur. Respir. J.* 10, 834–840.

Wetsel, R., Wang, D. and Calame, D.(2010). Therapeutic Potential of Lung Epithelial Progenitor Cells Derived from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Annual Review of Medicine* 62, 95-105.

Wistuba, I. I., Berry, J., & Behrens, C., (2000). Molecular Changes in the Bronchial Epithelium of Patients with Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 6, 2604-2610

Wu, Y., & Zhou, B. P. (2009). A driving force speeds cancer metastasis, *Cell Cycle* 8 (20), 3267–3273.

Yao, H., & Rahman, I. (2009). Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 9(4), 375–83.

Young, H. W. J., Williams, O. W., Chandra, D., Bellinghausen, L. K., Pérez, G., Suárez, A., Evans, C. M. (2007). Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37(3), 273–90.