



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της απόκρισης στην υποξία των Λείων Μυϊκών
Κυττάρωναεραγωγών: ο ρόλος του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα – 1
(HIF-1)

Καραμπότση Νίκη
Βιολόγος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παρασκευά Ευφροσύνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
- Μυλωνής Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φυσιολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Study of the Airway Smooth Muscle Cells hypoxic response:
The role of the Hypoxia Inducible Factor - 1 (HIF-1)**

By
KarampotsiNiki

Advisory Thesis Committee:

- Paraskeva Efrosyni, Associate Professor, thesis supervisor
- Mylonis Ilias, Assistant Professor
- Germenis Anastasios, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Physiology

Larissa, October 2015

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract	8
Συνοτομογραφίες	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1.Δομή και λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος	12
1.2.Ο ρόλος του αναπνευστικού συστήματος στην ανοσία και η φλεγμονή των αεραγωγών	13
1.2.1. Αναδιαμόρφωση των αεραγωγών	14
1.3.Χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού	15
1.3.1. Άσθμα	15
1.3.2. Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)	15
1.4.Χαρακτηριστικά των ΛΜΚ των αεραγωγών και ο ρόλος τους στην φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος	16
1.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των αεραγωγών	17
1.4.2. Ο ανοσορυθμιστικός ρόλος των ΛΜΚ αεραγωγών.....	18
1.5. Φλεγμονή στους αεραγωγούς.....	19
1.5.1. Παράγοντες που συμμετέχουν στη φλεγμονή των αεραγωγών.....	19
1.5.1.1. Κυτταροκίνες	19
1.5.1.2. Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNFα).....	20
1.5.1.3. Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης – CAMs	21
1.5.2. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	21
1.5.2.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κΒ	22
1.5.2.2. Η ρύθμιση του NF-κΒ.....	24
1.6.Υποξία και φλεγμονή στους αεραγωγούς.....	25
1.7.Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία	25
1.8.Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs	26
1.8.1. Η ρύθμιση του HIF-1α.....	27
1.8.1.1.Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο.....	27
1.8.1.2.Ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το οξυγόνο.....	28
1.8.1.3.Ρύθμιση της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα.....	29
1.8.1.4.Μετα - μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α.....	30
1.8.1.5.Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες.....	31
1.8.2. Ρύθμιση του HIF-1α κατά την φλεγμονή.....	32

1.9. Η επίδραση της υποξίας και ο ρόλος του HIF στο μεταβολισμό του κυττάρου.....	33
1.10. Λιπογένεση και ο ρόλος των TAG.....	34
1.10.1. De novo σύνθεση τριακυλογλυκεριδίων (TAG).....	35
1.10.2. Ρύθμιση σύνθεσης της σύνθεσης των TAG.....	36
Σκοπός της εργασίας.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1. Καλλιέργεια Λείων Μυικών Κυττάρων.....	39
2.2. Κατεργασία των κυττάρων.....	39
2.3. Έναρξη καλλιιεργειών και Πάγωμα κυττάρων.....	39
2.4. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΛΜΚ.....	40
2.4.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης.....	40
2.5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE.....	42
2.5.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	45
2.5.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	46
2.6. Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.....	48
2.7. Χρώση λιποσταγονιδίων με Nile-Red.....	49
2.8. Απομόνωση ολικού RNA.....	49
2.8.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA.....	50
2.9. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή.....	51
2.10. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time-PCR).....	52
2.10.1. Καμπύλη ενίσχυσης- Threshold- Τιμή Ct.....	53
2.10.2. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA.....	54
2.10.3. Ανάλυση καμπύλης τήξης.....	55
2.11. Έλεγχος των εκκινητών και της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.....	55
2.11.1. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	57
2.12. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
3.1. Επίδραση της υποξίας στη βιοσύνθεση λιπιδίων σε ΛΜΚ αεραγωγών:.....	58
Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Lipin1 και AGPAT 2 σε συνθήκες υποξίας.....	58
3.1.1. Επαγωγή του HIF-1α και συσώρευση λιποσταγονιδίων σε HBSMCs σε συνθήκες υποξίας.....	58
3.1.2. Επίδραση της υποξίας στα επίπεδα mRNA των Lipin1 και AGPAT 2 σε HBSMCs.....	58
3.1.3. Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της πρωτεΐνης Lipin1.....	62

3.2. Απόκριση των ΛΜΚ των αεραγωγών στην υποξία και στον προφλεγμονώδη παράγοντα TNFα: μελέτη της έκφρασης των γονιδίων μεσολαβητών της ίνωσης, δεικτών EMT & δεικτών ίνωσης	63
3.2.1. Επίδραση του TNFα και της υποξίας στην ενεργοποίηση του NF-κB σε ΛΜΚ των αεραγωγών.....	63
3.2.2. Επίδραση του TNFα και της υποξίας στην επαγωγή του HIF-1α.....	65
3.2.3. Η επίδραση του TNFα και της υποξίας στην έκφραση των mRNA γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μεσολαβητών ίνωσης, δεικτών EMT και δημιουργίας ίνωσης σε HBSMCs.....	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
Βιβλιογραφία.....	75

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κλινικές εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Σε αυτό το σημείο αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Πριν από όλους, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Παρασκευά Ευφροσύνη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και για την υπέροχη συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υποστήριξή της, την καθοδήγησή της και την ενθάρρυνσή της καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και για την υπομονή της στην διόρθωση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου: τον Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Βιοχημείας κ. Η. Μυλωνή, για την βοήθεια του και τις συμβουλές του στα πειράματα και τον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Α. Γερμενή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο Π.Μ.Σ. «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ».

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Ε-Α. Τριανταφύλλου για τη βοήθεια της στα πειράματα και την εκμάθηση των πειραματικών τεχνικών. Όλους τους διδάσκοντες καθηγητές των μαθημάτων Βιοφυσική Μεμβρανών (Εργαστήριο Φυσιολογίας) και Κυτταρική ομοιοστασία και γονιδιακή έκφραση (Εργαστήριο Βιοχημείας) για τις γνώσεις τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοχημείας για τη βοήθεια τους και την καλή συνεργασία όλη τη διάρκεια του χρόνου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μακαντάση για τη βοήθεια του σε τεχνικά θέματα αλλά και την κ. Νούτσου για την γραμματειακή υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Τάσο για την συμπαράσταση του και ιδιαίτερα τους γονείς μου και τα αδέρφια μου Βαγγέλη και Αριστείδη που με στηρίζουν πάντα.

Περίληψη

Στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, προκαλείται αναδιαμόρφωση των αεραγωγών. Τα Λεία Μυϊκά Κύτταρα (ΛΜΚ) των αεραγωγών συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση και ρυθμίζουν τη φλεγμονή εκκρίνοντας κυτταροκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Η φλεγμονή των αεραγωγών συνοδεύεται από υποξία, ενώ επιπρόσθετα οι χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολική δυσλειτουργία και εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου. Η προσαρμογή και επιβίωση των κυττάρων στην υποξία μεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1. Πρόσφατες μελέτες σε κύτταρα του ανοσοποιητικού και καρκινικά κύτταρα αναδεικνύουν την συμμετοχή του HIF-1 στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία ίνωσης και στην αυξημένη σύνθεση λιπιδίων, διαδικασίες που συνοδεύουν τις χρόνιες παθήσεις του αναπνευστικού.

Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε σε ΛΜΚ αεραγωγών α) την επίδραση της υποξίας στην έκφραση των γονιδίων *Lipin1* και *AGPAT 2*, τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση λιπιδίων και β) την αλληλεπίδραση υποξίας και φλεγμονής στην έκφραση γονιδίων μεσολαβητών ίνωσης (*TGF-β* και *PAI-1*), δεικτών EMT (*E-cadherin* και *FSP-1*) και δεικτών ίνωσης (*P4HA 1-1* και *P4HB*), με σκοπό την κατανόηση του ρόλου των ΛΜΚ στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.

Παρατηρήθηκε ότι, η υποξία (1% O₂ ή DMOG) προκάλεσε επαγωγή του HIF-1α, συσσώρευση λιποσταγονιδίων και αύξηση των επιπέδων mRNA της *Lipin1*, που συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης *Lipin1*. Αντίθετα, δεν είχε επίδραση στην έκφραση του mRNA της *AGPAT 2*.

Επίσης, επώαση των ΛΜΚ αεραγωγών σε συνθήκες υποξίας, προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων μεσολαβητών και δεικτών της ίνωσης, ενώ δεν επηρέασε την έκφραση του δείκτη EMT *FSP-1*. Παράλληλα, η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη TNFα δεν προκάλεσε επαγωγή, σε κανένα από τα γονίδια που μελετήθηκαν. Αντίθετα, μείωσε την έκφραση των γονιδίων *FSP-1* και *P4HB* στη νορμοξία και ανταγωνίστηκε την επαγωγή τους από την υποξία.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι, στα ΛΜΚ αεραγωγών η υποξία έχει διαφορετική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων *Lipin1* και *AGPAT 2* που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων. Επίσης, η υποξία και ο TNFα έχουν διαφορετική, ή ακόμη και ανταγωνιστική επίδραση στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση των ΛΜΚ αεραγωγών στη φλεγμονή και την ίνωση.

Λέξεις κλειδιά: Λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών, υποξία, HIF-1, φλεγμονή, σύνθεση λιπιδίων.

Abstract

Chronic inflammatory respiratory diseases cause airway remodeling. Airway smooth muscle cells (ASMCs) participate in this process as modulators of inflammation, by secreting cytokines, chemokines and growth factors. Airway inflammation coexists with hypoxia; in addition, chronic respiratory diseases may lead to metabolic dysfunction and development of metabolic syndrome. The adaptation and survival of the cells to hypoxia is mediated by the transcription factor HIF-1. Recent studies on immune and cancer cells, demonstrate the participation of HIF-1 in the regulation of genes that are involved in the formation of fibrosis as well as increased lipid synthesis, which accompany chronic respiratory diseases.

In this study, we investigated in ASMCs a) the effect of hypoxia on the expression of Lipin1 and AGPAT 2 genes, that participate in lipid synthesis, and b) the interaction between hypoxia and inflammation in the expression of genes encoding mediators of fibrosis (TGF- β and PAI-1), EMT (E-cadherin and FSP-1) and fibrosis (P4HA 1-1 P4HB) markers, in order to understand the role of ASMCs in the airway remodeling.

We observed that, treatment of ASMCs under hypoxic conditions (1% O₂ or DMOG) caused induction of HIF-1 α , accumulation of lipid droplets and increased the levels of Lipin1 mRNA; events accompanied by an increase in Lipin1 protein levels. In contrast, hypoxia had no effect on the expression of AGPAT 2 mRNA.

Moreover, incubation of ASMCs under hypoxia induced the expression of mediators and markers of fibrosis, while it did not affect the expression of the EMT marker FSP-1. On the other hand, the pro-inflammatory cytokine TNF α has not induced the expression of the genes studied. In contrast, incubation with TNF α decreased the expression of FSP-1 and P4HB mRNAs in normoxia, and antagonized their induction by hypoxia.

In summary, our results indicate that in ASMCs, hypoxia has different effects on the expression of the lipid biosynthesis pathway genes, Lipin1 and AGPAT 2. Furthermore, hypoxia and TNF α have different or even antagonistic effects on the expression of genes involved in the response of ASMCs to inflammation and fibrosis.

Keywords: Airway smooth muscle cells, hypoxia, HIF-1, inflammation, lipid synthesis.

Συντομογραφίες

ΛΜΚ: Λεία Μυϊκά Κύτταρα

ΧΑΠ: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

AGPAT: ακυλτρανσφεράση της 3-φωσφορικής ακυλγλυκερόλης

APS (ammonium persulfate): υπερθειϊκόαμμώνιο

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

α-SMA (smooth muscle α-actin): ακτίνη των ΛΜΚ

ASMCs (Airway smooth muscle cells): λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών

bFGF (basic fibroblast growth factor): βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

bHLH (basic helix loop helix): βασική περιοχή έλικα στροφής

BHR (bronchial hyperresponsiveness): βρογχική υπερανταποκρισιμότητα

BSA (bovine serum albumin): αλβουμίνη ορού βοός

CAMs (cell adhesion molecules): μόρια κυτταρικής προσκόλλησης

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

CK (casein kinase): κινάση καζεΐνης

CRM1: chromosomal maintenance 1

DAG (diacylglycerole): διακυλογλυκερόλη

DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole): 4', 6 διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο

DFO (desferrioxamine): δεσφεριοξαμίνη

DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12): θρεπτικούλικό για ΛΜΚ

DMOG (dimethylaloxalglycine): διμεθυλοξαλλο-γλυκίνη

DMSO (dimethylsulfoxide): διμεθυλοσουλφοξείδιο

DTT (dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

ECM (extracellular matrix): εξωκυττάρια μήτρα

EDTA (ethylenediamine): αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EMT (epithelial-mesenchymal transition):

μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά

EPO (erythropoietin): ερυθροποιητίνη

ERK (extracellular signal regulated kinases):

κινάσες που ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια ερεθίσματα

FAS (fatty acid synthase): σύνθεση των λιπαρών οξέων

FBS (fetal bovine serum): ορός εμβρύου βοός

FIH-1 (factor inhibiting HIF): παράγοντας αναστολής του HIF

FITC (fluorescein isothiocyanate): ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη

FSP-1 (fibroblast specific protein – 1): ειδική πρωτεΐνη ινοβλαστών – 1

GLUT1 (Glucose transporter 1): μεταφορέας της γλυκόζης 1

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

GPCR (G protein coupled receptors): υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες

GSK-3 (glycogen synthase Kinase-3): κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3

HIF (hypoxia inducible factor): επαγόμενος από την υποξία παράγοντας

HRE (hypoxia response element): στοιχείο απόκρισης στην υποξία

Hsp90 (heat shock protein 90): πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1): μόριο διακυττατικής προσκόλλησης-1

IL (interleukin): ιντερλευκίνη

INF-β (Interferon-β): ιντερφερόνη-β

IP3 (inositol trisphosphate): τριφωσφορική ινοσιτόλη

IPAS (inhibitory PAS-domain protein): ανασταλτική πρωτεΐνη PAS

LDH (lactate dehydrogenase): αφυδρογονάση του γαλακτικού

LPA: λυσοφωσφατιδικό οξύ

LPS (lipopolysaccharides): λιποπολυσακχαρίτης

MAPK (mitogen activated protein kinase): κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα

MMPs (matrix metalloproteinases): μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας

mTOR (mammalian target of rapamycin): στόχος της ραπαμυκίνης σε θηλαστικά

NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease): μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος

NES (nuclear export signal): σήμα πυρηνικής εξόδου

NF-κB (nuclear factor kappa B): πυρηνικός παράγοντας κάπα Β

NLS (nuclear localization signal): σήμα πυρηνικού εντοπισμού

NO (nitric oxide): μονοξείδιο του αζώτου

ODD (oxygen-dependent degradation domain): οξυγονο-εξαρτώμενη περιοχή αποικοδόμησης

PA: φωσφατιδικό οξύ

PAI-1 (plasminogen activator inhibitors-1): αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1

PAMP: (pathogen-associated molecular patterns): μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνο

PAP: φωσφατάση του φωσφατυδικού οξέος

PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: (phosphate buffered saline): διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PDGF (platelet derived growth factor): αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από τα αιμοπετάλια

PDH (pyruvate dehydrogenase): αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού

PDK (PDH kinase): κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού

PHDs (prolyl hydroxylase domain proteins): προλυλ-υδροξυλάσες

PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate): 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη

PKD1 (protein kinase D1): πρωτεϊνική κινάση D1

PMSF (phenylmethylsulfoxide): φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor): πολλαπλασιαστικός υποδοχέας των υπεροξυσωμάτων

PRRs (pattern recognition receptors): υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

pVHL: protein von Hippel-Lindau

PI3K:(phosphatidylinositol -3 kinase): κινάση της 3- φωσφατιδυλινοσιτόλης

RANTES: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RHD (Rel-homology domain): περιοχή ομόλογη των Rel

ROS (reactive oxygen species): ενεργές ριζοξυγόνου

SDS (sodium dodecyl sulfate): σουλφοξείδιο του νατρίου

sm-MHC (smooth muscle [sm] myosin heavy chain): μυοσίνη της βαριάς αλυσίδας των ΛΜΚ

SREBP-1: sterol regulatory–element binding protein

SUMO: small ubiquitin like modifier

TADs (trans activation domains): περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής

TAG (triacylglyceride): τριακυλογλυκερίδια

TEMED (tetramethylethylenediamine): τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

TNFR (TNF receptor): υποδοχέας TNF

TNF α (tumor necrosis factor α): παράγοντας νέκρωσης όγκων

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

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

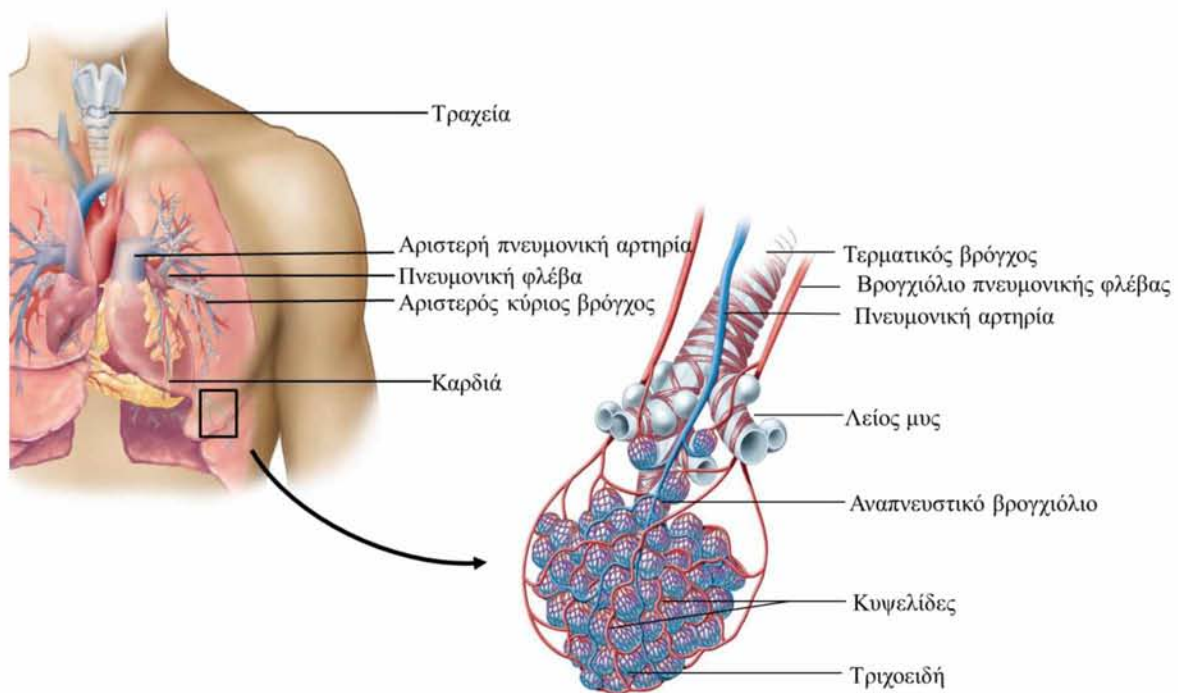
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Δομή και λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος

Η κύρια λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος είναι η μεταφορά O_2 προς τους ιστούς και η απομάκρυνση CO_2 από αυτούς. Επιπλέον το αναπνευστικό συμμετέχει στη ρύθμιση του pH του αίματος, στη δημιουργία ήχων ομιλίας και στην άμυνα έναντι των μικροβίων.

Το ανθρώπινο αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τους αεραγωγούς, δηλαδή τους σωλήνες μέσα από τους οποίους διακινείται ο αέρας, τους πνεύμονες που είναι το κύριο αναπνευστικό όργανο στο οποίο πραγματοποιείται η ανταλλαγή αερίων και τις δομές του θώρακα, οι οποίες βοηθούν στη μετακίνηση του αέρα κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Οι αεραγωγοί αποτελούν την τραχεία η οποία διακλαδίζεται σε δυο βρόγχους που ο καθένας εισέρχεται στον αντίστοιχο πνεύμονα. Οι βρόγχοι διακλαδίζονται περαιτέρω σε βρογχιόλια τα οποία με τη σειρά τους καταλήγουν στους κυψελιδικούς σάκους. Οι κυψελιδικοί σάκοι αποτελούν τη θέση ανταλλαγής των αερίων (εικόνα 1). Οι αεραγωγοί διακρίνονται σε δυο ζώνες: την ζώνη αγωγής που εκτείνεται από την τραχεία έως την αρχή των αναπνευστικών βρογχιολίων και την αναπνευστική ζώνη που ξεκινάει από τα αναπνευστικά βρογχιόλια και εκτείνεται μέχρι τους κυψελιδικούς σάκους. Στην αναπνευστική ζώνη πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων με το αίμα μέσω των τριχοειδών που υπάρχουν στα τοιχώματα των κυψελίδων (1).



Εικόνα 1. Η δομή του αναπνευστικού συστήματος (Ανατόπωση από: Barrett KE, Boitano S, Barman SM, Brooks HL. *Ganong's Review of Medical Physiology*. 23th ed 2010(1)).

1.2. Ο ρόλος του αναπνευστικού συστήματος στην ανοσία και η φλεγμονή των αεραγωγών

Η επιφάνεια του βλεννογόνου του αναπνευστικού βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, είναι κατά συνέπεια συνεχώς εκτεθειμένη σε παθογόνους μικροοργανισμούς, ατμοσφαιρικές τοξίνες και ρύπους. Αποτελεί λοιπόν, σημαντικό παράγοντα της έμφυτης ανοσίας αφού δρα ως φραγμός για τον αποκλεισμό και καταπολέμηση εισπνεόμενων σωματιδίων και μικροβίων (3).

Η βλέννα που παράγεται από το επιθήλιο των αεραγωγών συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην συγκράτηση των εισπνεόμενων μικροβίων και σωματιδίων και πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα δημιουργούν ένα αφιλόξενο περιβάλλον για τα μικρόβια. Αν τα μικρόβια και τα σωματίδια καταφέρουν να περάσουν την πρώτη γραμμή άμυνας τότε η εισβολή αντιμετωπίζεται μέσω της πολύπλοκης διαδικασίας της φλεγμονής(2, 3).

Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών φέρουν υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων συντηρημένων μικροβιακών δομών (pattern recognition receptors, PRRs), που ονομάζονται μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνο (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Όταν οι υποδοχείς αυτοί συνδεθούν με το πρόσδεμά τους, επάγουν τη διαδικασία της φλεγμονής. Τα ενεργοποιημένα κύτταρα στην περιοχή της φλεγμονής απελευθερώνουν προ – φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και χημειοκίνες. Η προκύπτουσα χημειοτακτική κλίση που δημιουργείται, κατευθύνει τη μετανάστευση στην περιοχή της φλεγμονής ουδετερόφιλων, τα οποία θα φαγοκυτταρώσουν τον εισβολέα. Επίσης τα ουδετερόφιλα παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου για την καταστροφή των μικροβίων και πρόσθετες χημειοκίνες. Οι χημειοκίνες με τη σειρά τους, θα ενεργοποιήσουν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να βοηθήσουν στην αποτελεσματική καταστροφή του παθογόνου ερεθίσματος. Η λήξη της φλεγμονής σηματοδοτείται από την καταστροφή του μικροβίου και την επαγωγή της απόπτωσης των ουδετερόφιλων, των οποίων η απομάκρυνση πραγματοποιείται από τα μακροφάγα. Η απομάκρυνση των ουδετερόφιλων οδηγεί στην παραγωγή πρόσθετων μεσολαβητών που αναστέλλουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν στην αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού(3, 4).

Η αποκατάσταση του τραυματισμένου ιστού πραγματοποιείται από ινοβλάστες οι οποίοι ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Οι ινοβλάστες μπορεί να προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα της περιοχής, από τον μυελό των οστών αλλά και από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία υφίστανται EMT (epithelial to mesenchymal transition, επιθήλιο – μεσεγχυματική μετάπτωση). Μόλις οι ινοβλάστες ενεργοποιηθούν μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες οι οποίοι εκκρίνουν συστατικά της

εξωκυττάριας μήτρας. Τελικά, η πληγή επουλώνεται μέσω του πολλαπλασιασμού και της συστολής των μυοϊνοβλαστών(5).

Για την ομοιοστασία του αναπνευστικού, απαιτείται η ρύθμιση της φλεγμονής δηλαδή μία ισορροπία μεταξύ προ – φλεγμονωδών παραγόντων και αντι- φλεγμονωδών παραγόντων. Η ελλιπής φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να οδηγήσει σε λοίμωξη, ενώ η επίμονη φλεγμονώδης απόκριση σε χρόνια φλεγμονή και την ανάπτυξη χρόνιων παθήσεων του αναπνευστικού, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ.(2).

Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από ιστική βλάβη. Τα κύτταρα που κυριαρχούν είναι τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα. Η συσσώρευση και ενεργοποίηση των μακροφάγων συνοδεύεται από την έκκριση κυτταροκινών που διεγείρουν συνεχώς τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή κολλαγόνου με τελικό αποτέλεσμα την ίνωση (5). Φλεγμονώδεις μεσολαβητές (κυτταροκίνες, χημειοκίνες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης) εκκρίνονται τόσο από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και από μη φλεγμονώδη κύτταρα. Οι μεσολαβητές αυτοί παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μετακίνησης των κυττάρων και στην αγγειογένεση (5).

1.2.1. Αναδιαμόρφωση των αεραγωγών

Μια από τις σημαντικές συνέπειες της χρόνιας φλεγμονής είναι η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών(6). Ως αναδιαμόρφωση χαρακτηρίζονται οι δομικές αλλαγές στα τοιχώματα των αεραγωγών που προκαλούνται από επαναλαμβανόμενους κύκλους βλάβης και επιδιόρθωσης του ιστού (7). Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν πάχυνση του επιθηλίου, υπερτροφία των βλεννωδών αδένων, μεταβολές στα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, ίνωση, αγγειογένεση και σημαντική αύξηση της μάζας των λείων μυών των αεραγωγών (8). Η αύξηση των ΛΜΚ των αεραγωγών επηρεάζει την απόκριση των αεραγωγών και προκαλεί στένωση με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη ροή αέρα στις χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις.

Ο μηχανισμός που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πιθανόν, η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων οδηγεί στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων προκειμένου το επιθήλιο να επανακτήσει την ακεραιότητά του, οι οποίοι συμβάλλουν στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης και στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών. Οι αυξητικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ απελευθερώνονται και από τα κύτταρα της φλεγμονής (ηωσινόφιλα, μακροφάγα) συμβάλλοντας επιπρόσθετα στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ. Εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες και άλλοι παράγοντες (κυτταροκίνες, χημειοκίνες) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση. Επίσης τα ΛΜΚ των αεραγωγών εκκρίνουν και

τα ίδια κυτταροκίνες με αποτέλεσμα τη διαιώνιση της φλεγμονής των αεραγωγών που τελικά οδηγεί σε αναδιαμόρφωση(9).

1.3. Χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού

Οι χρόνιας φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως. Τα κλινικά τους συμπτώματα είναι κοινά και συνήθως περιλαμβάνουν δύσπνοια, συριγμό, βήχα και παραγωγή πτυέλων. Το κύριο χαρακτηριστικό τους άσθματος και της ΧΑΠ είναι η χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών που συμβάλλει στην στένωση τους με τελικό αποτέλεσμα την περιορισμένη ροή του αέρα. Ωστόσο, το προφίλ των κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονή διαφέρει στις δυο αυτές παθήσεις(7).

1.3.1. Άσθμα

Το άσθμα είναι χρόνια πάθηση των μεγάλων αεραγωγών που χαρακτηρίζεται από αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, υπερανταποκρισιμότητα (hyperresponsiveness) και χρόνια φλεγμονή. Η βρογχική υπερανταποκρισιμότητα είναι η υπερβολική βρογχοσυσταλτική απόκριση των αεραγωγών ως απόκριση σε χημικά, φυσικά και φαρμακευτικά ερεθίσματα(11).

Στη χρόνια φλεγμονή στο άσθμα παρατηρείται διήθηση ηωσινόφιλων, ενεργοποιημένων μακροφάγων και Th2 κυττάρων. Κατά κύριο λόγο η παθογένεση του άσθματος οφείλεται στην ανισορροπία Th1/Th2 κυττάρων, ωστόσο υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η υπερανταποκρισιμότητα επιμένει και απουσία φλεγμονής υπονοώντας ότι τα δομικά κύτταρα, όπως τα ΛΜΚ ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο (12).

Η δομική αναδιαμόρφωση των αεραγωγών που παρατηρείται στο άσθμα περιλαμβάνει επιθηλιακή αποκόλληση, υποεπιθηλιακή ίνωση, υπερπλασία βλεννοδών αδένων και καλυκοειδών κυττάρων, αγγειογένεση και αύξηση μάζας (υπερπλασία ή /και υπερτροφία) των λείων μυών των αεραγωγών, με τελικό αποτέλεσμα την στένωση των αεραγωγών (6).

1.3.2. Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια χαρακτηρίζεται από την προοδευτική και μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών που οδηγεί σε μειωμένη εισροή του αέρα και προκαλείται από τη χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος. Τα κύρια στοιχεία της πάθησης είναι η χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα (13).

Η έκθεση σε επιβλαβή σωματίδια ή αέρια και κυρίως η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου αποτελούν τους κύριους παράγοντες πρόκλησης της ΧΑΠ. Η έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες

μπορεί να ενεργοποιήσει καταρράκτη φλεγμονωδών αποκρίσεων. Στη ΧΑΠ, τα κύρια κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή είναι τα Th1 κύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Επίσης παρατηρείται ίνωση στους μικρούς αεραγωγούς που πιθανόν συμβάλλει στην μη – αναστρέψιμη στένωση των αεραγωγών (4).

1.4. Χαρακτηριστικά των ΛΜΚ των αεραγωγών και ο ρόλος τους στην φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος

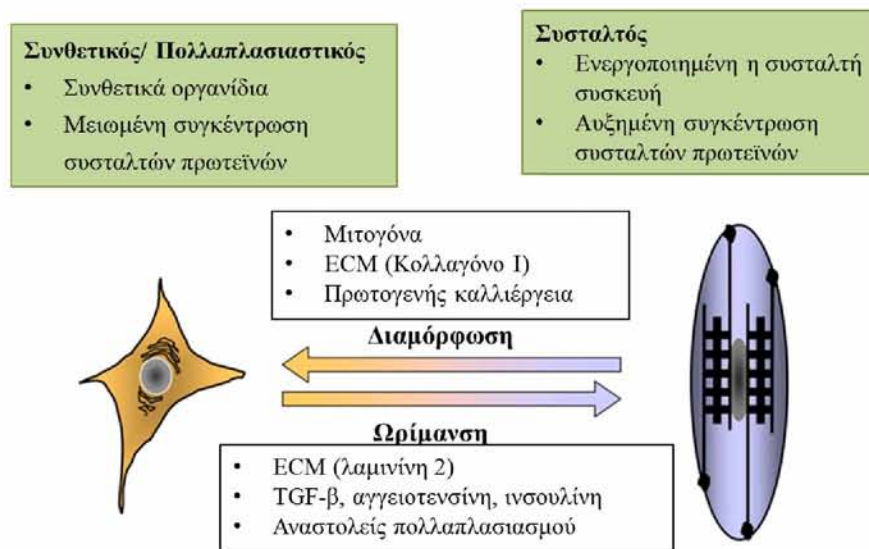
Τα ΛΜΚ επενδύουν τους αεραγωγούς και ελέγχουν τη διάμετρο αυτών, ρυθμίζοντας την ροή του αέρα στον οργανισμό μέσω της συστολή τους. Επιπλέον, είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του βρογχοκινητικού τόνου των αεραγωγών που επιτυγχάνεται από τη φαινοτυπική πλαστικότητα που διαθέτουν.

Στο συσταλό φαινότυπο, τα κύτταρα έχουν επίμηκες σχήμα και έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη συστολή, όπως η ακτίνη των ΛΜΚ (smooth muscle α -actin, α -SMA) και η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης των ΛΜΚ (smooth muscle [sm] myosin heavy chain, sm-MHC) (14). Οι σύσπαση των αεραγωγών προκαλείται από βρογχοσυσπαστικές ουσίες (ισταμίνη, θρομβίνη, ενδοθηλίνη, σερετονίνη και λευκοτριένια), οι οποίες συνδέονται σε υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (G-proteincoupledreceptor, GPCR) και προκαλούν την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C. Η ενεργοποιημένη φωσφολιπάση C διασπά τη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol trisphosphate, IP₃) και διακυλογλυκερόλη (diacyloglycerole, DAG). Η IP₃ με τη σειρά της οδηγεί σε απελευθέρωση Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο προσδένεται στην καλμοδουλίνη. Το σύμπλοκο καλμοδουλίνης-Ca²⁺ ενεργοποιεί τη κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης με τελικό αποτέλεσμα τη σύσπαση (15).

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών δεν είναι τελικά διαφοροποιημένα αλλά μεταπίπτουν στον συνθετικό ή πολλαπλασιαστικό φαινότυπο, που χαρακτηρίζεται από αφθονία οργανιδίων για τη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων, πολυάριθμα μιτοχόνδρια, χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη συστολή, αυξημένη ευαισθησία σε βρογχοσυσταλτικά ερεθίσματα και αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και έκκρισης μεσολαβητών (15).

Η πορεία της εναλλαγής από το συσταλό φαινότυπο στο συνθετικό ονομάζεται αναδιαμόρφωση (εικόνα 2). Ενώ η αναστρέψιμη πορεία από το συνθετικό φαινότυπο στο συσταλό ονομάζεται ωρίμανση και επιτυγχάνεται *in vitro* με παρατεταμένη στέρηση ορού (17) ή / και με αναστολή του πολλαπλασιασμού εξ' επαφής (18).

Η φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ, δηλαδή ικανότητα εναλλαγής του φαινοτύπου που τους επιτρέπει να ασκούν τόσο συσταλτικές όσο και πολλαπλασιαστικές λειτουργίες ενδέχεται να συμβάλλει στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και στην παθοφυσιολογία των παθήσεων του αναπνευστικού (18).

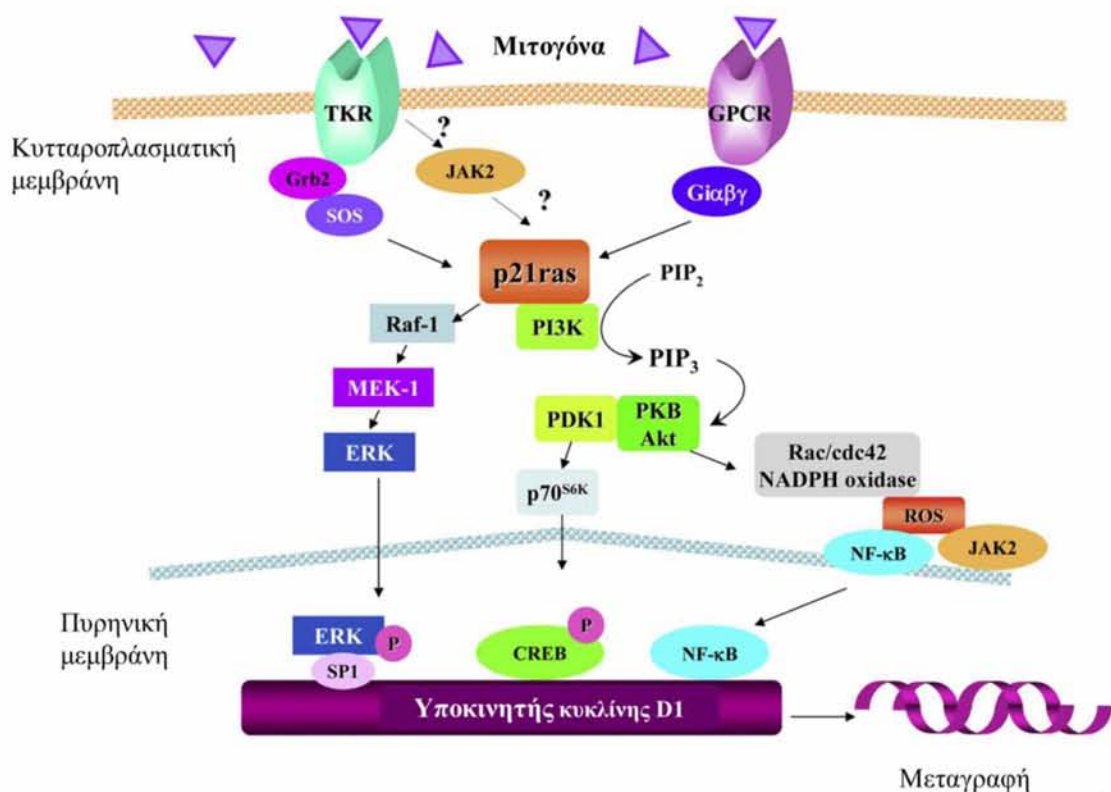


Εικόνα 2. Φαινοτυπική πλαστικότητα των ΛΜΚ των αεραγωγών (Ανατύπωση από: Halayko AJ et al., Proceedings of the American Thoracic Society, 2008; 5(1):80-8(19)).

1.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των αεραγωγών

Η αύξηση μάζας των ΛΜΚ των αεραγωγών που παρατηρείται στην αναδιαμόρφωση οφείλεται τόσο σε αύξηση του μεγέθους τους (υπερτροφία) όσο και σε αύξηση του αριθμού τους λόγω αυξημένου πολλαπλασιασμού (υπερπλασία). Ως μιτογόνα δρουν αυξητικοί παράγοντες, αγωνιστές συστολής προ – φλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθώς και ορμόνες, όπως η ινσουλίνη. Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τα μιτογόνα και μεσολαβούν στον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ είναι αυτά των MAP κινασών και της PI3K (εικόνα 3)(20).

Συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα ΛΜΚ των αεραγωγών έχει βρεθεί ότι η ινσουλίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω του PI3K μονοπατιού (21). Οι αυξητικοί παράγοντες όπως, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor, PDGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και ο TGF-β (transforming growth factor-β) που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής από τα φλεγμονώδη κύτταρα (ηωσινόφιλα και μακροφάγα) επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ τόσο μέσω των MAP κινασών όσο και μέσω του PI3K μονοπατιού (9). Τέλος, ο TNFα ως προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη επάγει επίσης τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ μέσω μόνο του μονοπατιού των MAP κινασών (9).



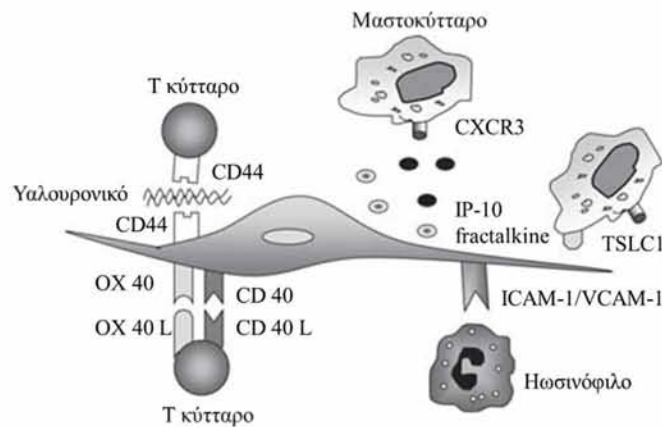
Εικόνα3. ΜεταγωγήσηματοςστονπολλαπλασιασμότωνΛΜΚτωναεραγωγών (Ανατύπωσηαπό:PelaiaGetal., *Respiratorymedicine*, 2008;102(8):1173-81(15)).

1.4.2. Ο ανοσορυθμιστικός ρόλος των ΛΜΚ αεραγωγών

Στις παθήσεις του αναπνευστικού, τα ΛΜΚ των αεραγωγών συμμετέχουν και ως μεσολαβητές της φλεγμονής, αφού παράγουν και εκκρίνουν φλεγμονώδεις παράγοντες, και συμβάλλουν ενεργά στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης (22).

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς κυτταροκινών και χημειοκινών και υποδοχείς τύπου – Toll αποδεικνύοντας ότι συμμετέχουν στη φλεγμονή μέσω αυτοκρινούς και παρακρινούς σηματοδότησης (23). Διεγείρονται από προ – φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως TNFα, INF-γ και IL-1β και συνθέτουν χημειοκίνες και μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως RANTES, ηωτοξίνη, IL-1β, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-13, MCP-1, MCP-2, MCP-3, GM-CSF, INF-β, ανασταλτικό παράγοντα λευχαιμίας και προστανοειδή (όπως προσταγλανδίνη E2) (24).

Επιπλέον, τα ΛΜΚ αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και T- κύτταρα) μέσω μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 που εκφράζουν στην επιφάνειά τους (εικόνα 4). Ακόμη, τα ΛΜΚ αλληλεπιδρούν με τα T-κύτταρα μέσω CD44 και CD40 υποδοχέων. Η αλληλεπίδραση με τα T-κύτταρα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, την απελευθέρωση IL-6, και την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ συμβάλλοντας στην συστολή τους (16).



Εικόνα 3. Οι αλληλεπιδράσεις των ΑΜΚ των αεραγωγών με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Ανατύπωση από: Oliver BG, Black JL, *AllergyInternational*, 2006;55(3):215-23(16)).

1.5. Φλεγμονή στους αεραγωγούς

1.5.1. Παράγοντες που συμμετέχουν στη φλεγμονή των αεραγωγών

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής πολλά μονοπάτια μεταγωγή σήματος συγκλίνουν στον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ. Η ενεργοποίηση του NF-κΒ στο άσθμα και στη ΧΑΠ προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από την απόκριση σε προ-φλεγμονώδεις παραγόντες IL-1 και TNFα ή από την ενεργοποίηση των υποδοχέων TLRs κατά τη διάρκεια βακτηριακής ή ιογενούς μόλυνσης. Ο NF-κΒ ρυθμίζει την έκφραση των κυτταροκινών, των χημειοκινών και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs), που επηρεάζουν τα φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία διηθούν στους αεραγωγούς στις χρόνιες φλεγμονώδεις αναπνευστικές παθήσεις (10).

1.5.1.1. Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι διαλυτά πολυπεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος που κυμαίνονται από 8 μέχρι και 30 kDa. Παράγονται κατά το πλείστον από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή της φλεγμονής. (25). Οι κυτταροκίνες στις παθήσεις των αεραγωγών διακρίνονται σε:

- προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η δράση των οποίων ενισχύει τη φλεγμονώδη απόκριση και στις οποίες συγκαταλέγονται οι IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, και ο TNFα.
- αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η δράση των οποίων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόκρισης στην φλεγμονή και στις οποίες ανήκουν IL-4, IL-10, IL-13, και TGF-β.
- χημειοκίνες, οι οποίες είναι χημειοτακτικές κυτταροκίνες που οδηγούν τα κύτταρα τελεστές στη θέση της φλεγμονής και συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα να αποτελούν τον συνδετικό κρίκο μεταξύ της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας (πχ. RANTES).

- λεμφοκίνες, που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα και κυρίως τα CD4⁺. Διαχωρίζονται σε δυο λειτουργικά υποσύνολα, Th1 (IL-2, IFN, TNFα) και Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), ανάλογα από τον τύπο των βοηθητικών T-κυττάρων που τις εκκρίνουν(25), και
- αυξητικοί παράγοντες με σημαντικότερους τους PDGF, EGF και TGF-β, οι οποίοι επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και των ΛΜΚ και συμμετέχουν στους μηχανισμούς επισκευής και αναδιαμόρφωσης (25).

1.5.1.2. Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNFα)

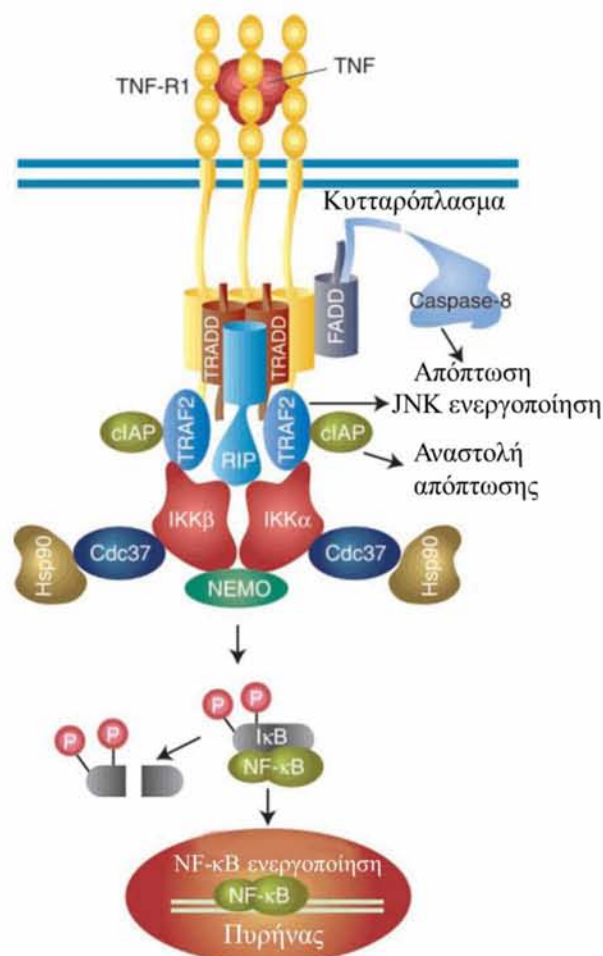
Ο TNFα είναι μία πλειοτροπική προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη που μεσολαβεί στην οξεία και συστηματική φλεγμονώδη απόκριση, στην απόπτωση, στη νέκρωση και στη λύση των καρκινικών κυττάρων. Υπάρχει σε δύο μορφές: τη διαλυτή (sTNF-α) και τη δεσμευμένη στην μεμβράνη (mTNF-α). Η μετατροπή της mTNF-α σε sTNF-α πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου TACE (Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme), (26).

Τα κύτταρα των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένων και των ΛΜΚ, έχουν την ικανότητα να παράγουν TNFα. Ο TNFα λειτουργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα κοκκιοκύτταρα και ρυθμίζει την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion molecules, CAMs), όπως E-σελεκτίνη, VCAM-1, ICAM-1 και CD45. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι ο TNFα προκαλεί αύξηση των ICAM-1 και VCAM-1 στα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της προσκόλλησης των ηωσινόφιλων κυττάρων, αύξηση του πολλαπλασιασμού των μυοϊνοβλαστών, συμβάλλοντας στη στένωση των αεραγωγών, ενεργοποιεί τους μυοϊνοβλάστες και τους ινοβλάστες οδηγώντας σε υπο-επιθηλιακή ίνωση, διεγείρει την έκκριση βλέννας και προκαλεί απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών από τα ηωσινόφιλα, συμβάλλοντας στην αναδιαμόρφωση (27).

Τα ΛΜΚ εκφράζουν τους υποδοχείς του TNF-α, TNFR-1 και TNFR-2. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης TNFα ξεκινά με την πρόσδεση του στους υποδοχείς και των τριμερισμό αυτών. Ακολουθεί η ενεργοποίηση της κινάσης TAK-1 η οποία ενεργοποιεί τόσο τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω της ενεργοποίησης του συμπλόκου IKK όσο και τον AP-1 παράγοντα μεταγραφής μέσω της ενεργοποίησης των JNK και p38. Ο NF-κΒ και ο AP-1 με τη σειρά τους ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες (εικόνα 5), (28).

Στα ΛΜΚ των αεραγωγών ο TNFα προκαλεί βρογχική υπερανταποκρισιμότητα που οφείλεται είτε στην άμεση επιδράση του στα ΛΜΚ είτε στην απελευθέρωση ισταμίνης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού κατά τη φλεγμονώδη απόκριση. Επιπλέον, στην υπερανταποκρισιμότητα συμβάλλει προκαλώντας και αλλαγές στα επίπεδα Ca²⁺. Επίσης

διευκολύνει την μετανάστευση των ΛΜΚ αυξάνοντας την έκφραση των ICAM-1 και VCAM-1 και την προσκόλληση των Τ-κυττάρων στα ΛΜΚ (26).



Εικόνα 4. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TNF-α (Ανατύπωση από: Chen G, Goeddel DV, Science, 2002;296(5573):1634-5(29).

1.5.1.3. Μόριακυτταρικήςπροσκόλλησης – CAMs

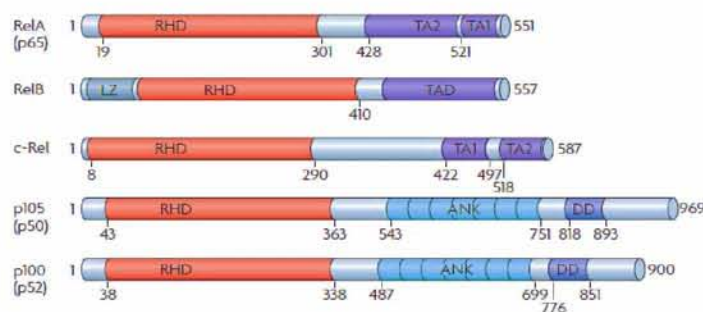
Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion molecules, CAMs) μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, με χαρακτηριστικότερη την πρόσδεση των λευκοκυττάρων πάνω στο ενδοθήλιο των αγγείων και τελικό αποτέλεσμα τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής. Στα ΛΜΚ των αεραγωγών εκφράζονται τα VCMA-1 και ICAM-1, που συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση των φλεγμονωδών κυττάρων με τα ΛΜΚ. Η έκφραση των VCMA-1 και ICAM-1 επάγεται από ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένου και του TNFα (22).

1.5.2. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ

Το όνομα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Nuclear Factor-κΒ) προέκυψε από την ανακάλυψη ότι ο παράγοντας αυτός προσδένεται σε στοιχεία ενισχυτών του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας κάπα των ανοσοσφαιρινών σε ενεργοποιημένα Β – κύτταρα. Μέσα σε

σύντομο χρονικό διάστημα βρέθηκε ότι τα στοιχεία στα οποία προσδένεται ο NF-κB βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων με αποτέλεσμα να είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων. Τα γονίδια στόχοι του NF-κB ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση, την προσκόλληση των κυττάρων, την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία, τη φλεγμονή, την απόκριση στο κυτταρικό στρες και την αναδιαμόρφωση του ιστού. Τα στοιχεία στα οποία προσδένεται ο NF-κB ονομάζονται κB στοιχεία και είναι συντηρημένες αλληλουχίες DNA στους υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων στόχων.

Η οικογένεια του NF-κB αποτελείται από πέντε πρωτεΐνες: Rel-A(p65), Rel-B, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) και p52/p100(NF-κB2) οι οποίες σχηματίζουν ομοδιμερή ήτεροδιμερή (εικόνα 6), αν και παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες έχουν διακριτές και μη επικαλυπτόμενες ιδιότητες. Και οι πέντε πρωτεΐνες έχουν μια αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από περίπου 300 αμινοξέα, ονομάζεται Rel – ομόλογη περιοχή (Rel homology domain, RHD) και είναι υπεύθυνη για το διμερισμό των πρωτεϊνών και τη δέσμευση με το DNA. Επίσης, οι πρωτεΐνες Rel-A, Rel-B και c-Rel έχουν στο καρβοξυτελικό άκρο την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (transcriptional activation domain, TAD). Οι πρωτεΐνες p50 και p52 συντίθενται ως πρόδρομες πρωτεΐνες p105 και p100 αντίστοιχα, και στο καρβοξυτελικό άκρο έχουν μία περιοχή που περιέχει επαναλήψεις αγκυρίνης (ankyrin-repeat motifs, ANK) οι οποίες αποκόπτονται κατά την ωρίμανση των πρωτεϊνών. Τα ομοδιμερή των πρωτεϊνών p50 και p52, επειδή δεν περιέχουν TAD περιοχή όταν δεσμευτούν στα κB στοιχεία λειτουργούν ως καταστολείς, αν όμως ετεροδιμεριστούν με τα άλλα μέλη, που περιέχουν TAD λειτουργούν ως ενεργοποιητές (30).



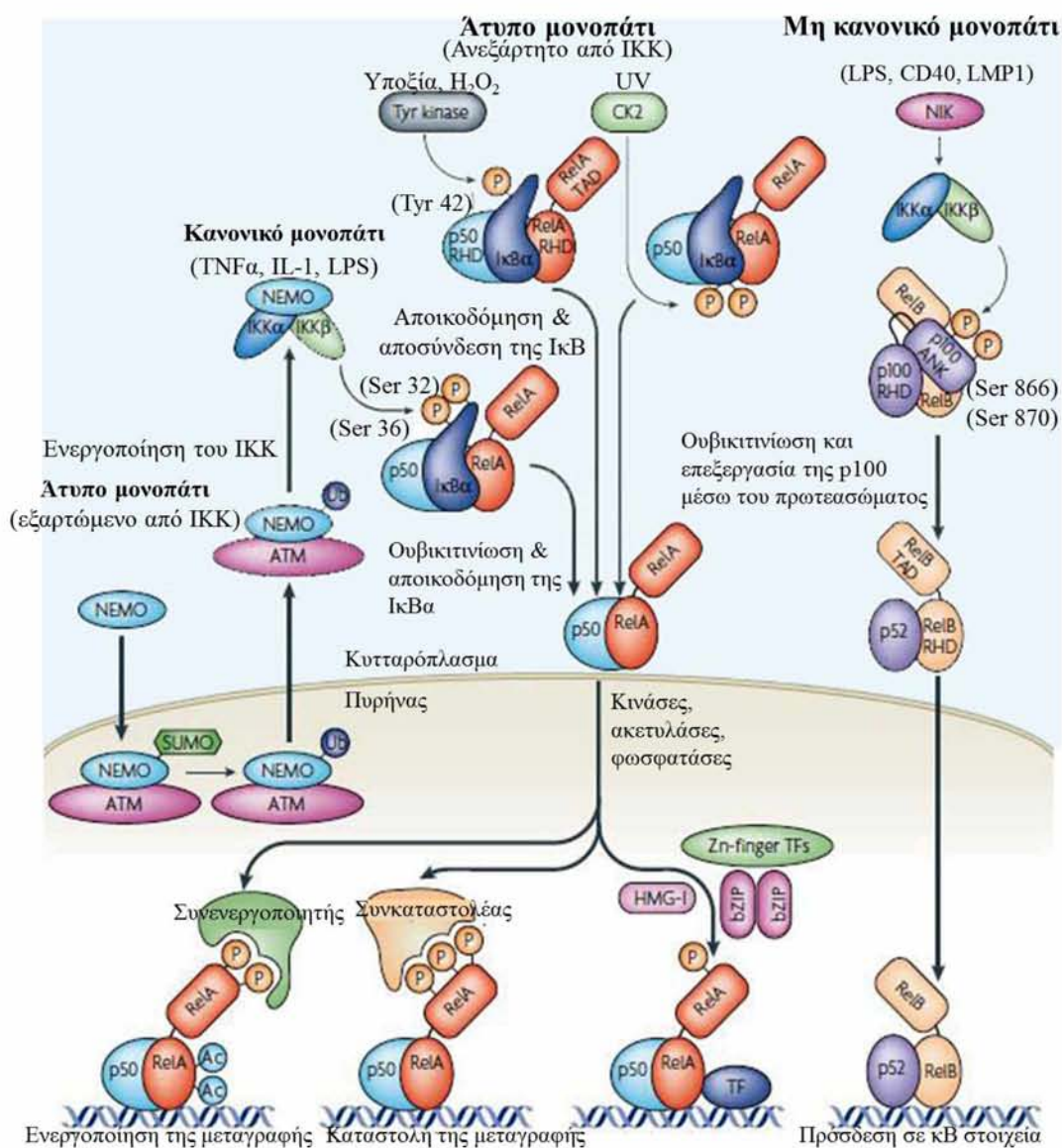
Εικόνα 5. Τα μέλη της οικογένειας του NF-κB (Ανατύπωση από: Perkins ND, *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007;8(1):49-62(30).

1.5.2.1. Τασηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κB

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες Rel-A, Rel-B και c-Rel συνδέονται στο κυτταρόπλασμα με τα μέλη της οικογένειας των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB (inhibitors of NF-κB), οι οποίες φέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο επαναλήψεις αγκυρίνης. Οι IκBs αναστέλλουν τη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα μέσω της απόκρυψης του NLS του NF-κB που

βρίσκεται την RHD περιοχή (30). Ο NF-κB ενεργοποιείται από πολλά ερεθίσματα μέσω διαφορετικών μονοπατιών, από τα οποία τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είναι το κανονικό και το μη- κανονικό μονοπάτι (εικόνα 7).

Το κανονικό μονοπάτι του NF-κB ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα όπως προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τον TNFα και την IL-1 και τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Η σύνδεση του TNFα με τον υποδοχέα του ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK (κινάση IκB), το οποίο αποτελείται από τρεις υπομονάδες, τις IKKα και IKKβ οι οποίες έχουν δραστηριότητα κινάσης σερίνης/ θρεονίνης και τη ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ ή NEMO. Η υπομονάδα IKKβ του ενεργοποιημένου συμπλόκου IKK φωσφορυλιώνει την IκBa στις σερίνες 32 και 36, με αποτέλεσμα αυτή να ουβικιτινωθεί και να αποικοδομηθεί στο πρωτεάσωμα 26S. Πλέον το ετεροδιμερές p50/Rel-A, που συμμετέχει στο κανονικό μονοπάτι, είναι ελεύθερο να εισέλθει στον πυρήνα (30).



Εικόνα 6. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον NF-κB (Ανατύπωση από: Perkins ND, *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007;8(1):49-62(30).

Το μη κανονικό μονοπάτι του NF-κB, το οποίο ενεργοποιείται από τη διέγερση του CD40, του υποδοχέα της λεμφοτοξίνης – β, το LPS και την LMP1 πρωτεΐνη του ιού Epstein- Barr περιλαμβάνει τις υπομονάδες Rel-B και p52. Σε αυτό το μονοπάτι η IKKα ενεργοποιείται από την κινάση NIK (NF-κB-inducing kinase). Η ενεργή IKKα φωσφορυλιώνει την p100, η οποία ουβικιτινιώνεται και υπόκειται σε μερική αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της λειτουργικής υπομονάδας p52 και τη μετατόπιση του ετεροδιμερούς p52/Rel-B, στον πυρήνα (30).

Ο ενεργοποιημένος NF-κB όταν μετατοπιστεί τον πυρήνα προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του και ρυθμίζει τη μεταγραφή τους (30).

1.5.2.2. Η ρύθμιση του NF-κB

Μετά –μεταφραστικές τροποποιήσεις του NF-κB

Η μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης της Rel-A (p65) υπομονάδας. Η Rel-A φωσφορυλιώνεται από διαφορετικές κινάσες σε απόκριση σε διαφορετικά φλεγμονώδη ερεθίσματα με διαφορετική επίδραση στην ενεργότητα της.

Συγκεκριμένα, οι φωσφορυλίωσεις στα κατάλοιπα σερίνης 276,281,311,468,529,536 και θρεονίνης 254 προκαλούν αύξηση τις μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB, ενώ οι φωσφορυλίωσεις στα κατάλοιπα θρεονίνης 435 και 505 προκαλούν αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του. Μερικές από τις κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον NF-κB είναι PKAc,MSK1, PKC, GSK3β και CK2 (31).

Ιδιαίτερα, η σερίνη 536 που βρίσκεται εντός της περιοχής TAD της Rel-A υπομονάδας του NF-κB, είναι ένας σημαντικός στόχος φωσφορυλίωσης από πολλές κινάσες με πολλαπλές επιδράσεις. Η φωσφορυλίωση της, από την IKKβ αποτελεί μέρος του μηχανισμού ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB, και οδηγεί στην μετατόπιση της Rel-A στον πυρήνα και τη μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κB (31).

Επίσης, η Rel-A υπομονάδα ακετυλιώνεται σε πολλά κατάλοιπα λυσίνης είτε ενισχύοντας τη δέσμευση στο DNA και αναστέλλοντας την πρόσδεση της Rel-A από τις νεοσυντιθέμενες IκBa, είτε επιδρώντας αρνητικά στην ρύθμιση του NF-κB (31).

Ρύθμιση του NF-κB από τα miRNAs

Ο NF-κB επάγει τη μεταγραφή αρκετών miRNAs μερικά εκ των οποίων είναι τα miR-9, miR-21, miR-143, miR-146 και miR-224. Αυτά τα miRNAs εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανάδρασης στοχεύοντας ανοδικά μόρια του NF-κB με τελικό αποτέλεσμα να συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του NF-κB.

Επίσης σε μια πρόσφατη εργασία βρέθηκε ότι κατά τη διαφοροποίηση των μακροφάγων τα miR-15a, miR-16 και miR-223 επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης IKKα αλλά όχι την IKKβ ή την NEMO υπομονάδα, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να είναι ρυθμιστές του μη κανονικού μονοπατιού (32).

1.6. Υποξία και φλεγμονή στους αεραγωγούς

Η υποξία και η φλεγμονή είναι δυο διαδικασίες αλληλοεξαρτώμενες. Η υποξία μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή αλλά και η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία υποξίας. Για παράδειγμα η παραμονή σε υψηλό υψόμετρο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών μεσολαβητών. Επίσης, ποντίκια που εκτέθηκαν σε οξεία υποξία βρέθηκαν να έχουν αυξημένα επίπεδα κυτταροκίνων και συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στους πνεύμονες και σε διάφορα άλλα όργανα. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικές κλινικές περιπτώσεις που η υποξία συνοδεύεται από φλεγμονή είναι το πνευμονικό οίδημα και ο καρκίνος (33).

Από την άλλη μεριά, η φλεγμονή δημιουργεί υποξία στους τραυματισμένους ιστούς. Η υποξία προκύπτει λόγω της αύξησης των μεταβολικών απαιτήσεων των κυττάρων της φλεγμονής και από τον ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό των παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι καταναλώνουν O_2 και ενέργεια και της ταυτόχρονης μείωσης παροχής του O_2 από την αγγειακή βλάβη στον τραυματισμένο ιστό (33).

1.7. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία

Στους ανώτερους οργανισμούς το O_2 είναι απαραίτητο για την παραγωγή ενέργειας γιατί χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, μέσω της οποίας παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Κατά συνέπεια, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής που τους βοηθούν να ανταπεξέλθουν στις χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 , κατάσταση που καλείται υποξία (34).

Η υποξία παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όπως κατά την εμβρυική ανάπτυξη ή στην ανάβαση σε υψηλό υψόμετρο, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η πνευμονοπάθειες και ο καρκίνος. Η υποξία μπορεί να είναι συνεχής ή διακοπτόμενη και μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια (35).

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαχειρίζεται την υποξία μέσω της αύξησης του πνευμονικού αερισμού και της αποτελεσματικότερης αιμάτωσης των ιστών. Συγκεκριμένα, όταν ένα άτομο αναβαίνει σε υψόμετρο ή υποφέρει από αιμοραγία όλα τα κύτταρα του σώματος υποβάλλονται σε υποξία. Η καρωτίδα το όργανο που μετρά της αρτηριακή PO_2 ενεργοποιεί το συμπαθητικό νευρικό σύστημα για να ρυθμίσει την καρδιακή παροχή και τον αερισμό. Τα αγγεία στην

πνευμονική κυκλοφορία συστέλλονται για να ωθήσουν το οξυγονωμένο αίμα μακριά από τον πνεύμονα, ενώ τα αγγεία της συστηματικής κυκλοφορίας διαστέλλονται ώστε να δεχτούν περισσότερο αίμα. Ταυτόχρονα αυξάνεται η ερυθροποίηση ώστε να αυξηθεί το O₂ που θα μεταφέρει το αίμα. Οι ιστοί ανταποκρίνονται στην υποξία μέσω της αγγειογένεσης. Επίσης, γίνεται επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού μεταβαίνοντας από την οξειδωτική φωσφορύλιωση σε γλυκολυτικό μεταβολισμό (36).

Οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που μεσολαβούν στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIFs ελέγχουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν τόσο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στο μεταβολισμό του σιδήρου, στην αγγειογένεση όσο και στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των κυττάρων (35).

1.8. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIFs

Οι παράγοντες HIFs είναι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες και ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών bHLH – PAS (basic Helix-Loop-Helix – Per-ARNT-Sim). Τα ετεροδιμερή αποτελούνται από μία α υπομονάδα, η έκφραση και δράση της οποίας ρυθμίζεται από τα επίπεδα οξυγόνου και μία β υπομονάδα, η οποία εκφράζεται συνεχώς (εικόνα 8). Οι υπομονάδες του HIF μεταφέρονται στον πυρήνα όπου συνδέονται σε συντηρημένες αλληλουχίες DNA (RCGTG), στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE (hypoxia response elements) που βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές και σε υποκινητές γονιδίων, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από την υποξία (37).

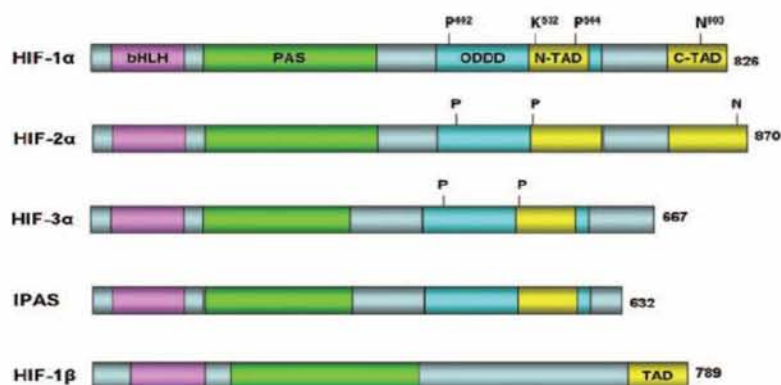
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της α υπομονάδας: οι HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α. Ο HIF-1α εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και είναι ο κύριος ρυθμιστής της υποξίας. Αποτελείται από 826 αμινοξέα. Στον αμινοτελικό άκρο φέρει τις περιοχές bHLH και PAS, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (transactivation domains, TAD). Η περιοχή N-TAD βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 531–575 και η περιοχή C-TAD μεταξύ των καταλοίπων 813–826. Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-1 και τη δέσμευση του με συνεργοποιητές, όπως τους p300/CBP και Ref-1. Επίσης ο HIF-1α φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο και την περιοχή ODD (oxygen-dependent degradation domain) μεταξύ των καταλοίπων 401-603 που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (38).

Ο HIF-2α έχει παρόμοια αλληλουχία με τον HIF-1α με 48% ομοιότητα στα αμινοξικά κατάλοιπα. Ετεροδιμερίζεται και αυτός με τον ARNT και μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση γονιδίων που φέρουν HRE. Υπάρχουν αρκετά γονίδια που ενεργοποιούνται μόνο από HIF-2,

κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν δείκτες αρχέγονων κυττάρων (NANOG, OCT4/POU5F1) σε ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (38).

Ο ρόλος του HIF-3α είναι λιγότερο κατανοητός, αλλά φαίνεται να αλληλεπιδρά και αυτός με τον ARNT και να δεσμεύεται σε HRE στοιχεία (39). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το εναλλακτικό μάτισμα του HIF-3α, από το οποίο προκύπτει η ανασταλτική πρωτεΐνη IPAS, η οποία αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στο αμινοτελικό άκρο, αποτρέποντας τη δέσμευση του σε DNA και λειτουργώντας ως βρόγχος αρνητικής ανάδρασης (38).

Η υπομονάδα HIF-1β αποτελείται από 789 αμινοξέα και είναι γνωστή και ως ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) που διμερίζεται και με τον υποδοχέα AHR (arylhydrocarbonreceptor) ώστε να σχηματιστεί ο λειτουργικός υποδοχέας της διοξίνης. Η υπομονάδα αυτή εκφράζεται συνεχώς και δεν υπόκειται σε ρύθμιση από τη συγκέντρωση του O₂, αν και υπάρχουν πρόσφατα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση του ARNT ρυθμίζεται τόσο από την υποξία όσο και από μιμητικά-υποξικά ερεθίσματα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (40).



Εικόνα 7. Η δομή των υπομονάδων του HIF (Ανατύπωση από: Ke Q, Costa M., *Mol Pharmacol*, 2006;70:1469–80(41)).

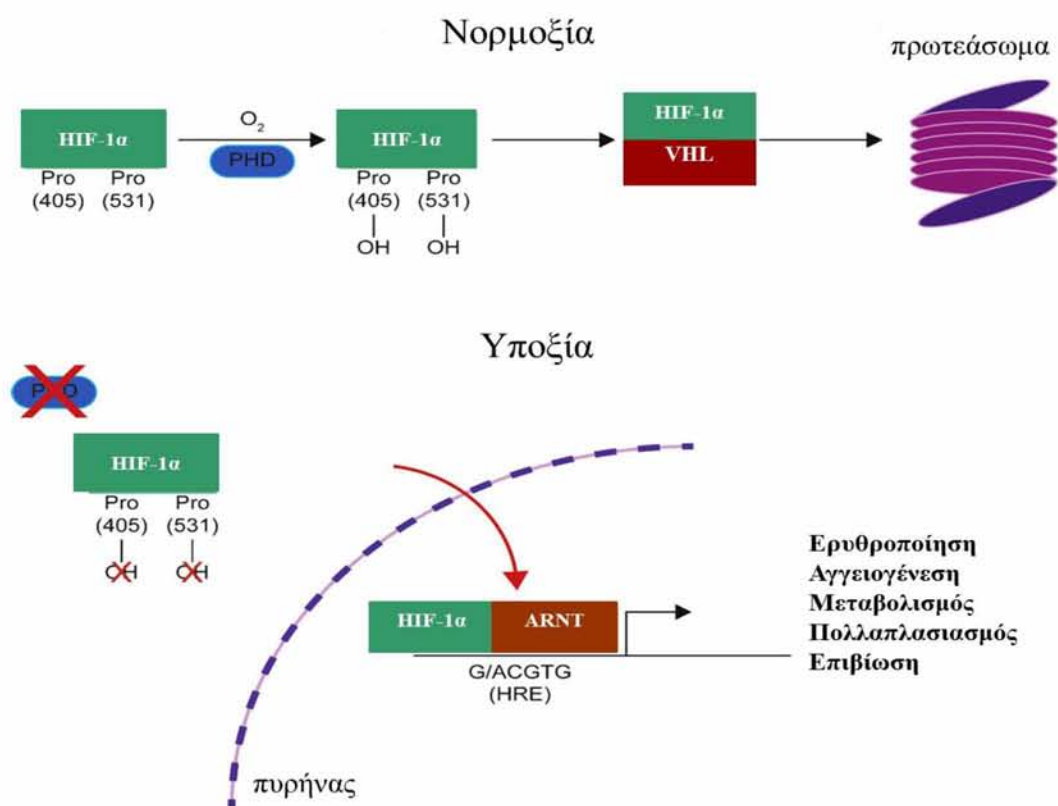
1.8.1. Η ρύθμιση του HIF-1α

1.8.1.1. Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο

Σε φυσιολογική συγκέντρωση O₂ (21%), ο HIF-1α έχει μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 5 λεπτά). Αν και μεταγράφεται και μεταφράζεται συνεχώς, η πρωτεΐνη HIF-1α δεν είναι ανιχνεύσιμη λόγω της ταχείας αποικοδόμησης της στο πρωτεάσωμα. Συγκεκριμένα, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης Pro402 και Pro564, που βρίσκονται εντός της ODDD περιοχής, από ειδικές προλυλ-υδροξυλάσες (prolyl-4-hydroxylase domain proteins, PHDs), οι οποίες λειτουργούν ως αισθητήρες O₂ του κυττάρου. Οι PHDs είναι μέλη της υπερ-οικογένειας των διοξυγενασών και στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές PHD1, PHD2 και PHD3. Οι

PHDs απαιτούν O_2 ως υπόστρωμα για την υδροξυλίωση της προλίνης σε υδροξυπρολίνη και τους συμπαράγοντες ασκορβικό οξύ και σίδηρο. Παρουσία O_2 , οι PHDs υδροξυλιώνουν τον HIF-1α, με συνέπεια να αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL). Πρόσδεση της pVHL στο HIF-1α σηματοδοτεί την ουβικιτινίωση του από το σύμπλοκο E3 λιγάσης και την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα 26S (εικόνα 9),(42).

Επιπλέον, σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn803) που βρίσκεται εντός της C- TAD περιοχής από την ανασταλτική πρωτεΐνη FIH-1 (factor inhibiting HIF-1). Η υδροξυλίωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους συνεργοποιητές CBP/p300. Η πρωτεΐνη FIH-1 ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών όπως και οι PHDs και απαιτεί ως συμπαράγοντες ασκορβικό οξύ και σίδηρο (43).



Εικόνα9. Ρύθμιση του HIF-1 από το οξυγόνο (Ανατύπωση από: Shay JE, Celeste Simon, *Seminars in cell & developmental biology*, 2012;23(4):389-94 (44)).

1.8.1.2. Ρύθμιση του HIF-1α ανεξάρτητη από το οξυγόνο

Εκτός από την ρύθμιση σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα του HIF-1α ρυθμίζονται σε φυσιολογική συγκέντρωση O_2 από διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-1α, τη μεταγραφή και τη μετάφραση του HIF-1α mRNA. Σε συνθήκες νορμοξίας αναστολείς των προλυλ-υδροξυλασών, όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο προκαλούν τη σταθεροποίηση της HIF-1α πρωτεΐνης. Αυτά τα μέταλλα μετάπτωσης αντικαθιστούν το Fe^{2+} με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ενζυμική ενεργότητα των PHDs. Στους άμεσους αναστολείς των προλυλ-

υδροξυλασών ανήκει και η δεσφερριοξαμίνη (DFO) η οποία συμπλοκοποιεί το Fe^{2+} και το ανάλογο του 2- οξογλουταρικού η διμέθυλο οξαλική γλυκίνη (DMOG).

Σε φυσιολογικές συνθήκες O_2 , η επαγωγή του HIF-1α εξαρτάται από την αύξηση της HIF-1α πρωτεΐνης. Με τη σειρά της, η αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης εξαρτάται από την αύξηση της μεταγραφής και από την αύξηση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α(36).

Ο HIF-1α επάγεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις O_2 από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες όπως αγγειοτενσίνη II και θρομβίνη, αλλά και οι ικές πρωτεΐνες (45).

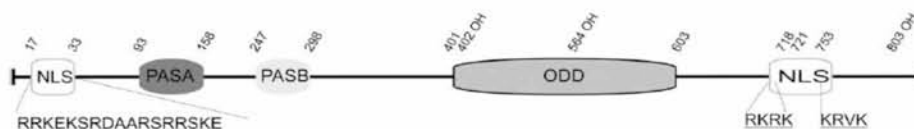
Η αύξηση της μεταγραφής του HIF-1α εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB οποίος ενεργοποιείται από τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως οι κυτταροκίνες (46). Συγκεκριμένα, ο HIF-1α διαθέτει στοιχεία κB στην αλληλουχία του υποκινητή του (-197/-188), μέσω των οποίων ο NF-κB ενισχύει τη μετάγραφή του mRNA του (47). Η επίδραση αυτή έχει βρεθεί και σε ΛΜΚ των αεραγωγών (48).

Η διέγερση των μακροφάγων με αγγειοτενσίνη II, θρομβίνη, λιποπολυσακχαρίτη (LPS), με ενδοθηλίνη στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και κοβάλτιο στα ΛΜΚ των αεραγωγών προκαλεί αύξηση των επιπέδων του HIF-1α που οφείλεται σε αύξηση της μετάφρασης μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K(49).

Η PI3K ενεργοποιεί την Akt η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την mTOR (mammalian target of rapamycin). Η ενεργοποιημένη mTOR φωσφορυλιώνει δυο βασικούς ρυθμιστές της μετάφρασης, την p70S6K (p70 S6 kinase) και 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1). Η ενεργοποιημένη p70S6K φωσφορυλιώνει με τη σειρά της την ροβοσωμική πρωτεΐνη S6 ενώ η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 από την mTOR τον αναστέλλει με αποτέλεσμα ο παράγοντας eIF-4E είναι ελεύθερος να ξεκινήσει τη μετάφραση (35).

1.8.1.3. Ρύθμιση της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα

Η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα είναι απαραίτητο βήμα για το σχηματισμό του λειτουργικού διμερούς HIF-1α/ARNT και τη αλληλεπίδραση με τα HRE στοιχεία. Η μετατόπιση του HIF-1α στον πυρήνα γίνεται μέσω των πυρηνικών πόρων και ρυθμίζεται από τους υποδοχείς πυρηνικής μεταφοράς που ανήκουν στην οικογένεια των ιμπορτίνων – β.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού του HIF-1α. (Ανατύπωση από: Deppring Ret al., *Biochimica et biophysica acta*, 2008; 1783 394–404(50).

Έχουν εντοπιστεί δύο αλληλουχίες του HIF-1α που έχουν ομολογία με σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLS, μία στο αμινοτελικό άκρο, το οποίο δεν είναι λειτουργικό και μια

καρβοξυτελικό άκρο που αποτελείται από δυο αλληλουχίες βασικών αμινοξέων (bipartite NLS) (εικόνα 10), (51).

Το NLS στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α αλληλεπιδρά με την ιμφορτίνη α και ειδικότερα με τις ισομορφές α1, α3, α5 και α7. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προωθούν την είσοδο του στον πυρήνα μέσω του συμπλόκου α/β ιμφορτίνων (50). ΟHIF-1α αλληλεπιδρά επιπλέον με τις ιμφορτίνες 4 και 7 μέσω της αμινοτελικής bHLH-PAS περιοχή του, η οποία είναι υπεύθυνη για το ετεροδιμερισμό με τον ARNT και τη δέσμευση στο DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή συνεπάγεται ότση είσοδος στον πυρήνα και η απελευθέρωση του HIF-1α θα ολοκληρωθεί, όταν ο HIF-1α θα συναντήσει τον ARNT ή θα προσδεθεί στα HREs(52).

1.8.1.4. Μετα - μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α

Εκτός από την υδροξυλίωση στις προλίνες 402 και 564 από τις PHDs, που ρυθμίζει την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα, και στην ασπαραγίνη 803 από την FIH, που ρυθμίζει την πρόσδεση του παράγοντα CBP/p300 και έχουν συζητηθεί παραπάνω, Ο HIF-1α υπόκειται σε μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Μεταξύ των οποίων ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση και S-νιτροζιλίωση, οι οποίες ρυθμίζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη δράση του. συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι:

Ο HIF-1α ακετυλιώνεται από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (ArrestDefective-1 protein) σε λυσίνη που εντοπίζεται στη θέση 532. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί την αλληλεπίδραση με την pVHL με επακόλουθο την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για το αν η ARD1 υπόκειται σε ρύθμιση από το O₂, καθώς έχει αναφερθεί μείωση της ακετυλίωσης του HIF-1α στην υποξία λόγω μείωσης των επιπέδων mRNA της ARD1 .

Ο HIF-1α είναι στόχος φωσφορυλίωσης τόσο σε συνθήκες υποξίας όσο και σε συνθήκες νορμοξίας. Οι κινάσες ERK1/2 φωσφορυλίωvουν τον HIF-1α στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643. Η φωσφορυλίωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την εξπορτίνη CRM1 και την εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας (54). Επίσης ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τη CK1δ στη σερίνη 247, στην αμινοτελική περιοχή σύνδεσης με τον ARNT. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του διμερούς HIF-1α/ ARNT μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1(55). Μια ακόμη σημαντική φωσφορυλίωση του HIF-1α είναι από την GSK-3 στην N-TAD περιοχή στα κατάλοιπα σερίνης 551, τυροσίνης 555 και σερίνης 589 του HIF-1α, που φαίνεται να οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη VHL (56).

Ο HIF-1α συνδέεται ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες SUMO (smallubiquitinlikemodifier). Οι SUMO αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν τις πρωτεΐνες- στόχους

από ουβικιτινίωση. Ο HIF-1α διαθέτει 2 θέσεις σουμυλίωσης στις λυσίνες 391 και 477 μέσω των οποίων συνδέεται η πρωτεΐνη SUMO 1. Φαίνεται ότι η σουμυλίωση πραγματοποιείται από την RanBP2 E3 λιγάση που βρίσκεται από την κυτταροπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου. Η τροποποίηση αυτή δεν έχει διευκρινιστεί αν συντελεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α ή αν επιφέρει αρνητική ρύθμιση (57).

Μια τελευταία τροποποίηση που πραγματοποιείται στο HIF-1α είναι η S-νιτροζιλίωση. Στην S-νιτροζιλίωση πραγματοποιείται ομοιοπολική σύνδεση μια ομάδας μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης, συμβάλλοντας στην μετα-μεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών. Ο HIF-1α νιτροζιλιώνεται στα κατάλοιπα κυστεΐνης 533 και 800, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του (58). Συγκεκριμένα, η νιτροζιλίωση στο κατάλοιπο κυστεΐνης 533, που βρίσκεται εντός της περιοχής ODD, οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω της αναστολής της πρόσδεσης της pVHL(59), ενώ η νιτροζιλίωση στο κατάλοιπο 800, που βρίσκεται στην περιοχή C-TAD, διευκολύνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συνεργοποιητή p300/CREB(60).

1.8.1.5. Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

Η ενεργότητα του HIF-1α επηρεάζεται και από την αλληλεπίδραση του με άλλες πρωτεΐνες. Παρακάτω παρατίθενται οι κυριότερες από αυτές:

p300: Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον συνεργοποιητή p300 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητάς του. Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p300 μέσω της C-TAD περιοχής σε συνθήκες υποξίας. Η αλληλεπίδραση με την p300 ενισχύεται περαιτέρω από αναστολείς της υδροξυλίωσης και s-νιτροζιλίωσης του HIF-1α. Επίσης οι μεταγραφικοί ρυθμιστές CITED2/CITED4, που συνδέονται στον συνεργοποιητή p300 αναστέλλουν την αλληλεπίδραση HIF-1α/p300 και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Επιπλέον, η έκφραση της CITED2 επάγεται από την υποξία και ίσως λειτουργεί ως ρυθμιστής της ενεργότητας του HIF-1α (61). Σε συνθήκες νορμοξία, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την p300 αναστέλλεται εξαιτίας της υδροξυλίωσης της ασπαραγίνης στη θέση 803 (62).

IPAS: Η πρωτεΐνη IPAS εκφράζεται ιστοειδικά και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα της υπομονάδας HIF-3α και δεν έχει περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η συνέκφραση της με τον HIF-1α μειώνει σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Από πειράματα ανοσο-κατακρήμνισης βρέθηκε ότι προσδέεται πάνω στον HIF-1α εμποδίζοντάς τον να δεσμευτεί σε DNA(63, 64).

p53: Το υποξικό στρες προκαλεί συσσώρευση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η οποία μπορεί να δεσμευτεί στον HIF-1α και να προκαλέσει μείωση της μεταγραφικής ενεργότητάς του. Τόσο ο HIF-1α όσο και η p53 αλληλεπιδρούν με τον συνεργοποιητή p300,

οποίος αυξάνει τη μεταγραφική τους ενεργότητα. Ωστόσο η έκφραση της p300 δεν μπορεί να αντιστρέψει την αναστολή του HIF-1α που μεσολαβείται από την p53, ενώ είναι απαραίτητη η πρόσδεση της p53 στον p300 για να την αναστολή του HIF-1α (62).

Hsp90 (heatshockprotein): Η Hsp90 είναι μοριακή συνοδός, που βοηθούν κατά κύριο λόγο τις πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν σωστά. Η Hsp90 προσδέεται στο HIF-1α μέσω της PAS περιοχής σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας. Η αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε μειωμένη συσσώρευση του HIF-1α και παρεμπόδιση της σύνδεσης του στο DNA υπό συνθήκες υποξίας. Η Hsp90 προστατεύει τον HIF-1α από μη ειδική αποικοδόμηση ανεξάρτητα από την pVHL. Αφού αναστολείς της Hsp90 προκαλούν ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α ακόμη και όταν η pVHL απουσιάζει από τα κύτταρα. Η Hsp90 ανταγωνίζεται τον ARNT για τις θέσεις σύνδεσης στον HIF-1α. Στον πυρήνα, οι υψηλές συγκεντρώσεις του ARNT εκτοπίζουν την Hsp90 από την PAS περιοχή με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του HIF-1 (62).

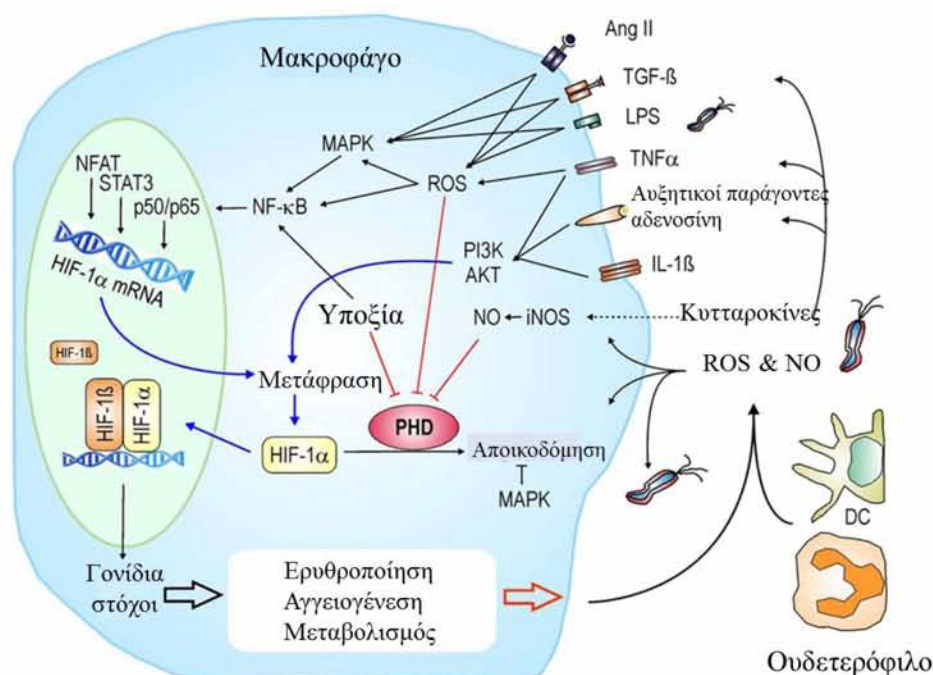
Myc/SP1: Η πρωτεΐνη Myc είναι μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου σχηματίζοντας ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη MAX. Σε φυσιολογικές συνθήκες η Mycαλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα SP1επάγοντας την έκφραση του γονιδίου κυκλίνης D(65). Σε συνθήκες υποξίας, η έκφραση του HIF-1α αυξάνεται με αποτέλεσμα ο HIF-1α να ανταγωνίζεται την Myc για την αλληλεπίδραση με τον SP1. Ο πρόσδεση του HIF-1α με τον SP-1οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού. Ωστόσο σε καρκινικά κύτταρα η Myc υπερεκφράζεται. Η υπερέκφραση της Myc οδηγεί σε συνεργασία με τον HIF-1α, τον συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε μειωμένα επίπεδα O₂(66, 67).

1.8.2. Ρύθμιση του HIF-1α κατά την φλεγμονή

Οι περισσότερες μελέτες που, αφορούν στη ρύθμιση του HIF-1α κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ο HIF-1α ρυθμίζεται από τους φλεγμονώδους μεσολαβητές και η ρύθμιση του μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά επίπεδα (εικόνα 11).

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι, η διαφοροποίηση των μονοκύτταρων σε μακροφάγα κατά τη φλεγμονή οδηγεί σε μείωση των επιπέδων Fe²⁺, με αποτέλεσμα την αναστολή των PHDs και την ενεργοποίηση του HIF-1. Επίσης, τα δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα και συντελούν στην νέκρωση των παθογόνων οργανισμών, ρυθμίζουν επίσης την ενεργοποίηση του HIF. Τα ROS ενεργοποιούν τον NF-κB, ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφή του HIF-1α. Τα ROS είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν τον HIF-1α και μέσω της οξείδωσης του Fe²⁺ στο ενεργό κέντρο των PHDs προκαλώντας την αναστολή των PHDs και τη σταθεροποίηση του HIF-1α(68).

Οι κυτταροκίνες, όπως ο TNFα και η IL-1β αυξάνουν τη μεταγραφή ή την μετάφραση του HIF-1α mRNA(69). Είναι ενδιαφέρον ότι στα ΛΜΚ των αεραγωγών ο TNFα αυξάνει τη μεταγραφή του HIF-1α mRNA μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB αλλά παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT μειώνοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-1(48).



Εικόνα11. Ηρύθμιση του HIF-1 σε συνθήκες φλεγμονής στα μακροφάγα (Ανατύπωση από: Dehne N, Brune B., *Experimental cell research*, 2009; 315(11):1791-7(68).

1.9. Η επίδραση της υποξίας και ο ρόλος του HIF στο μεταβολισμό του κυττάρου

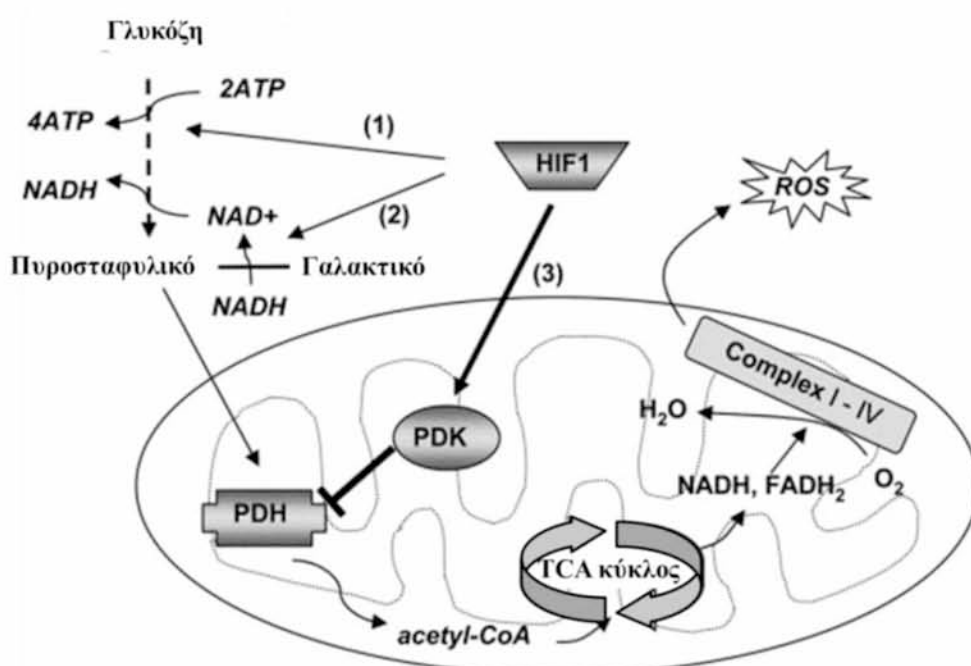
Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην υποξία μέσω επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού, ώστε να παράγουν ATP ανεξάρτητα από το O₂, μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης και να μειώσουν την κατανάλωση O₂ από τα μιτοχόνδρια. (70).

Η παραγωγή ATP σε συνθήκες υποξίας περιλαμβάνει την παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκόλυσης. Ο HIF-1 είναι υπεύθυνος για την επαγωγή ενζύμων της γλυκολυτικής οδού σε συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα, ο HIF-1 επάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς της γλυκόζης (GLUT-1 και GLUT-3) και γλυκολυτικά ένζυμα, όπως οι εξοκινάσες (HK1 και HK2) και η κινάση του φωσφογλυκερικού 1 (PGK1), (42, 70).

Η μείωση της κατανάλωσης O₂ από τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας. Στα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται ο κύκλος του Krebs και η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία αποτελεί την κυριότερη πηγή ενέργειας για το κύτταρο σε συνθήκες νορμοξίας. Μέσου του κύκλου του Krebs παράγεται NADH το οποίο λειτουργεί ως φορέας ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη O₂ για την παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παρατηρείται παραγωγή

ROS, που οφείλεται στην διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα και τα οποία μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση.

Το ένζυμο που είναι απαραίτητο για την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-CoA είναι η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase, PDH) η οποία αναστέλλεται από την κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDH kinase, PDK). Η μεταγραφική ρύθμιση της PDK ρυθμίζεται από τον HIF-1 που αποτελεί γονίδιο στόχο του. Η επαγωγή της PDK1 από τον HIF-1 και η ενεργοποίηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase, LDH) οδηγούν στην μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ αποτρέποντας την εισροή του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο TCA (37).



Εικόνα 9. Η ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού από τον HIF-1 (Ανατύπωση από: Kim J *et al.*, *Cell metabolism*, 2006;3:177-85(71)).

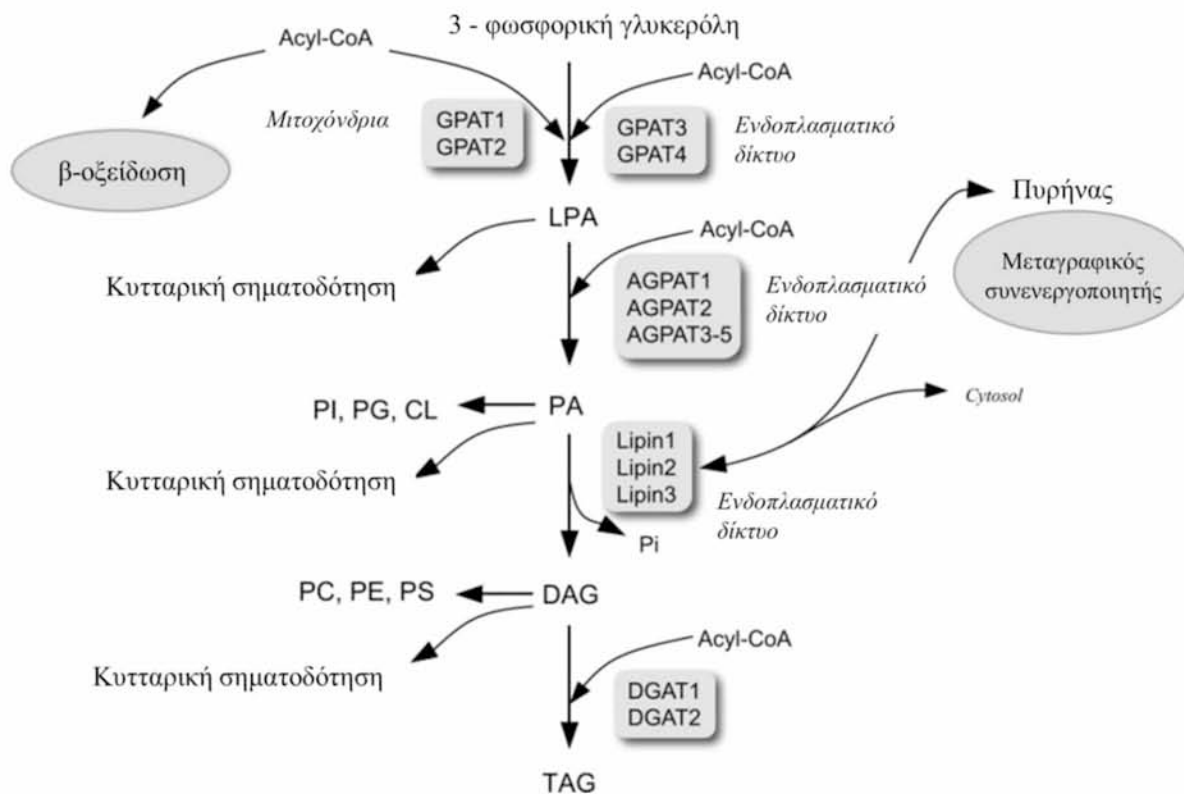
1.10. Λιπογένεση και ο ρόλος των TAG

Η λιπογένεση περιλαμβάνει τις διαδικασίες της σύνθεσης λιπαρών οξέων και της επακόλουθης σύνθεσης των τριακυλογλυκεριδίων (TAG),(72). Τα TAG σε φυσιολογικές συνθήκες χρησιμοποιούνται σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες, όπως για την αποθήκευση ενέργειας ως λιποσταγονίδια και ως αποθήκες λιπαρών οξέων και ακετυλ-CoA για να προστατεύσουν το κύτταρο από τη λιποτοξικότητα. Ωστόσο, η υπερβολική συσσώρευση TAG στο λιπώδη ιστό και σε μη- λιπώδεις ιστούς σχετίζεται με αρκετές παθήσεις, όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2, η στεφανιαία νόσος, η υπερτριγλυκεριδαμία και NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease,μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος)(73).

1.10.1. De novo σύνθεση τριακυλογλυκεριδίων (TAG)

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η σύνθεση TAG πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο μέσω της οδού της φωσφορικής γλυκερόλης. Για να ξεκινήσει η σύνθεση TAG απαιτούνται ελεύθερα λιπαρά οξέα και 3-φωσφορική γλυκερόλη. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση TAG περιλαμβάνει την ακυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης από την οικογένεια ενζύμων GPAT (ακετυλτρανσφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης) και τη δημιουργία LPA (λυσωφωσφατυδικού οξέος). Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τη μεταφορά λιπαρού οξέος στο LPA και τη δημιουργία PA (φωσφατυδικού φωσφατιδικού οξέος). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οικογένεια των πρωτεϊνών AGPAT (ακυλτρανσφεράση της 3-φωσφορικής ακυλογλυκερόλης). Η οικογένεια αυτή αποτελείται από 10 μέλη με την AGPAT 2 να είναι η πιο δραστική (73). Η AGPAT 2 έχει μοριακό βάρος 31kDa και εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Συνδέεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού μέσω των τεσσάρων υδροφοβικών περιοχών που διαθέτει. Είναι το μόνο μέλος της οικογένειας που συνδέεται άμεσα με τη συγγενή γενικευμένη λιποδυστροφία. Συγκεκριμένα η ανεπάρκεια AGPAT 2 οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση TAG στο λευκό λιπώδη ιστό (75). Επίσης υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η AGPAT 2 συμβάλει στη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras / Raf / Erk και PI3K / Akt και του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ (76, 77). Επίσης, κλινικά δεδομένα δείχνουν ότι η AGPAT 2 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινους καρκίνους και συνδέεται με την αυξημένη επιθετικότητα και την κακή πρόγνωση (78).

Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των λιπιδίων, ακολουθεί η μετατροπή του PA σε DAG (διακυλογλυκερόλη) με τη βοήθεια των λιπινών (Lipins). Τα ένζυμα της οικογένειας των λιπινών (Lipins) ή αλλιώς φωσφατάσων του φωσφατιδικού οξέος (PAP), λειτουργούν κυρίως ως φωσφατάσες. Παράλληλα, δεδομένα δείχνουν ότι λειτουργούν και ως μεταγραφικοί ρυθμιστές στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Στα σπονδυλωτά, η οικογένεια αποτελείται από τα τρία μέλη τη Lipin1, τη Lipin2 και τη Lipin3 τα οποία εμφανίζουν διακριτά ιστο-ειδικά πρότυπα έκφρασης. Η Lipin-1 εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη εγγενή δραστικότητα σε σχέση με τα άλλα δυο μέλη (74, 75). Η δράση της Lipin-1 ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής του mRNA της Lipin-1 (76), του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA, της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης (77) και του κυτταρικού της εντοπισμού (74). Η Lipin1 επάγεται από ερεθίσματα όπως η νηστεία, οι δίαιτες υψηλές σε περιεκτικότητα λιπαρών οξέων, η σηματοδότηση μέσω cAMP, οι στατίνες και η χρόνια έκθεση στο αλκοόλ. Όλα αυτά τα ερεθίσματα επηρεάζουν τη δράση διάφορων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προσδένονται στον υποκινητή της Lipin1 και επάγουν την έκφραση της. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργότητα της Lipin-1 είναι NOR-1, C/EBP (78), SREBP-1(79) και CREB (80), (75, 81).



Εικόνα 13. Ηβιοσυνθετική οδός των TAG (Ανατύπωση από : Takeuchi K, Reue K., *Amer J Physiol Endocrinol Metab.*, 2009; 296: E1195–E209 (82)).

Και το τελευταίο βήμα για το σχηματισμό λιπιδίων καταλύεται από τα ένζυμα DGAT (ακετυλτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης) που μετατρέπει τη DAG σε TAG (εικόνα 13), (73, 82).

1.10.2. Ρύθμιση σύνθεσης και σύνθεσης των TAG

Στη ρύθμιση της λιπογένεσης και της σύνθεσης των TAG συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες που ανταποκρίνονται σε ορμόνες και μεταβολίτες που προέρχονται από την τροφή. Συγκεκριμένα, διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξάνει τη λιπογένεση στο ήπαρ και τη σύνθεση TAG, ενώ αντίστροφα η νηστεία προκαλεί τη μείωση τους. Αυτές οι επιδράσεις μεσολαβούνται από τις ορμόνες ινσουλίνη και γλυκαγόνη και από το μεταγραφικό παράγοντα SREBR-1 (Sterol regulatory element-binding protein). Με πειράματα knockout σε ποντίκια, φάνηκε ότι ο SREBR-1 δεν είναι απαραίτητος για την έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στη λιπογένεση, αλλά για τις αλλαγές που προκαλούνται από τη διατροφή. Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) ρυθμίζει θετικά την έκφραση των ενζύμων της λιπογένεσης και τη σύνθεση TAG. Ένα

χαρακτηριστικό παράδειγμα της ρύθμισης του PPAR γ είναι η υπερέκφραση του σε ποντίκια, που οδήγησε σε αύξηση του ενζύμου DGAT1 και ηπατοστεάτωση (83, 84).

Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η υποξία επηρεάζει τη λιπογένεση. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιείται αναστολή της β - οξειδωσης των λιπαρών οξέων, λόγω της αναστολής της έκφρασης των αφυδρογονασών του ακετυλ - CoA, MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase) και LCAD (long-chain acyl-CoA dehydrogenases), από τον HIF-1 (73). Επίσης, η υποξία προκαλεί συσσώρευση λιπιδίων μέσω της επαγωγής της συνθάσης των λιπαρών οξέων (fatty acid synthase, FAS) σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1 ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1 (sterol regulatory-element binding protein) ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφή της FAS (74).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η υποξία επηρεάζει και τη βιοσύνθεση των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1 προκαλεί την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της Lipin1. Τα αυξημένα επίπεδα της Lipin1 οδηγούν σε συσσώρευση λιποσταγονιδίων και συμβάλλουν τελικά στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (75)(85). Επίσης, από πρόσφατα αδημοσίευτα δεδομένα της E-A Τριανταφύλλου και των συνεργατών της έχει βρεθεί ότι ακόμη ένα ένζυμο του μονοπατιού της σύνθεσης λιπιδίων επηρεάζεται από την υποξία και είναι η AGPAT 2, το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του LPA σε PA. Συγκεκριμένα, η υποξία προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA της AGPAT 2 σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7).

Σκοπός της εργασίας

Στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού, όπως το άσθμα και η ΧΑΠ, τα ΛΜΚ συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών τόσο δομικά μέσω της αυξημένης μάζας τους όσο και ως ανοσορυθμιστές της φλεγμονώδους απόκρισης εκκρίνοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως κυτταροκίνες και χημειοκίνες.

Η υποξία είναι παρούσα στη φλεγμονή των αεραγωγών λόγω της αγγειακής βλάβης και των αυξημένων απαιτήσεων για ενέργεια. Η έλλειψη O_2 οδηγεί στην επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, συντελώντας στην προσαρμογή και επιβίωση του κυττάρου. Επίσης, ο HIF-1 επάγεται και σε φυσιολογικές συνθήκες O_2 από φλεγμονώδεις μεσολαβητές.

Επίπλεον, από μελέτες σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών, προκύπτει ότι η υποξία μέσω της επαγωγής του HIF-1 επηρεάζει τη λιπογένεση, και συγκεκριμένα την βιοσύνθεση λιπιδίων, επάγοντας γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική οδό, με αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης τριγλυκεριδίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν σε πρωτογενή ΛΜΚ των αεραγωγών η επίδραση της υποξίας στην σύνθεση των λιπιδίων, και παράλληλα η αλληλεπίδραση υποξίας και φλεγμονής στην έκφραση παραγόντων που μεσολαβούν τη δημιουργία ίνωσης.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε α. η έκφραση του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και των ενζύμων βιοσύνθεσης λιπιδίων, Lipin1 και AGPAT2 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας και β. η επίδραση του φλεγμονώδους παράγοντα TNFα και/ή της υποξίας στην επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και NF-κB, και στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην απόκριση των ΛΜΚ των αεραγωγών στη φλεγμονή και στην αποκατάσταση της ιστικής βλάβης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργεια Λείων Μυϊκών Κυττάρων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων (HumanBronchialSmoothMuscleCells, HBSMC, cc2576, Clonetics-LonzaGroupLtd, Basel, Switzerland). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες επιφάνειας 75cm² χρησιμοποιώντας θρεπτικό μέσο DMEM-F12 το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100mg/ml στρεπτομυκίνη. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε υγρανόμενο κλίβανο επώασης σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂. Κάθε 48-72 ώρες γινόταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80-100% της επιφάνειας της φλάσκας γινόταν ανακαλλιέργεια. Συγκεκριμένα, γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και μια πλύση της καλλιέργειας με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (1XPBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄). Ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος 0,25% τρυψίνης – 0,53mMEDTA, επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας, προσθήκη θρεπτικού μέσου, που περιείχε FBS, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη και επαναϊώρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα μοιραζόντουσαν σε φλάσκες ή σε πιάτα καλλιέργειας και γινόταν προσθήκη θρεπτικού μέσου. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, σε άσηπτες συνθήκες.

2.2. Κατεργασία των κυττάρων

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm. Στις καλλιέργειες στις οποίες έγινε η κατεργασία με TNF α , προηγήθηκε ολονύκτια επώαση σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας απουσία FBS. Περίπου 1 ώρα πριν την διεξαγωγή του πειράματος, έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

Στις καλλιέργειες προστέθηκαν οι παράγοντες: TNF α 10 ng/ml (Sigma), ελαιικό οξύ 0.4mM (Sigma) ή DMOG 1mM (AlexisBiochemicals), για 8 ή 24 ώρες.

Για την υποβολή των κυττάρων σε υποξία, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε ειδικό θάλαμο υποξίας (INVIVO2 200 hypoxiaworkstation, RuskinnLifeSciences) σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 1% O₂, 94% N₂ και 5% CO₂.

2.3. Έναρξη καλλιεργείων και Πάγωμα κυττάρων

Για την έναρξη της καλλιέργειας, φυαλίδια (cryovial), που περιείχαν τα κύτταρα, μεταφέρθηκαν από τους -80°C ή από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο των 37°C ώστε να ξεπαγώσουν υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης τύπου falcon και έγινε προσθήκη με αργό ρυθμό προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου. Ακολούθησε, φυγοκέντρωση (1.000rpm για 3 λεπτά), ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από τα κύτταρα. Τα

κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν σε φλάσκες, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε υγρανόμενο κλίβανο επώασης με θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂ για την ανάπτυξη των κυττάρων. Μετά από 24 ώρες έγινε παρατήρηση της καλλιέργειας στο μικροσκόπιο και αλλαγή θρεπτικού μέσου, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά και τα μη προσκολληθέντα κύτταρα από την καλλιέργεια.

Για το πάγωμα της καλλιέργειας, αρχικά έγινε αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από τις καλλιέργειες και δυο πλύσεις με διάλυμα 1X PBS. Προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από τις φλάσκες, έγινε προσθήκη 2ml διαλύματος 0,25% τρυψίνης – 0,53mM EDTA και επώαση για 3 περίπου λεπτά στους 37 °C. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού μέσου, μεταφορά σε σωλήνες τύπου falcon και φυγοκέντρηση στις 1.000rpm για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% FBS και 10% DMSO και μεταφέρθηκε σε κατάλληλα φυαλίδια (cyonival) και αποθηκεύτηκαν αρχικά στους -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο.

2.4. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα ΛΜΚ

Για την παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με διάλυμα 1X PBS που περιείχε τον αναστολέα πρωτεασών φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο(phenylmethysulfonyl fluoride – PMSF, 100μg/ml) και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) (πίνακας 1). Τα κυτταρικά λύματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf, αναδεύτηκαν με την βοήθεια πιπέτας και επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C), και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες. Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν 5μl και στο υπόλοιπο δείγμα έγινε προσθήκη διαλύματος φόρτωσης Laemmli 4X (πίνακας 2) σε αναλογία 1:3, προκειμένου, να αναλυθούν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανάλυση κατά Western. Τέλος, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 3 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

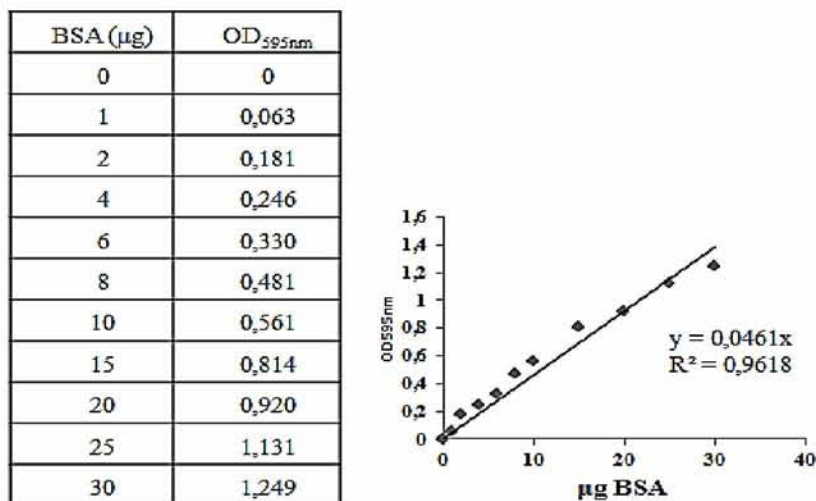
2.4.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να προσδένεται στις πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595nm.

Κατά την πειραματική διαδικασία, αναμείχθηκαν 5μl δείγματος από κάθε υπερκείμενο με 795μl dH₂O, προστέθηκαν 200μl αντιδραστηρίου Bradford (BioRad), και ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων και μέτρηση της απορρόφησης τους σε φωτόμετρο στα 595nm. Για τον

μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλό-δείγμα το οποίο περιείχε 800μl dH₂O και 200μl αντιδραστήριο Bradford.

Τέλος, η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς αλβουμίνης (BSA) (εικόνα 14).



Εικόνα 10. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αλβουμίνης (BSA).

Διάλυμα λύσης (Lysis buffer)	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris – HCl pH 7.5	25mM
NaCl	150mM
MgCl ₂	1mM
Triton X-100	1%
DTT	0.5mM
PMSF	0.2mM
Na ₃ VO ₄	1mM

Πίνακα1: Σύσταση διαλύματος λύσης.

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

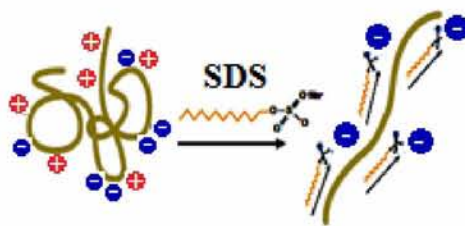
Πίνακας 2. Σύσταση διαλύματος Laemmli.

2.5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτες πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου, οι οποίοι λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου και N-N μεθυλενο – δις – ακρυλαμιδίου (MBA). Γενικά, πήκτη με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχει μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Η ταχύτητα μετατόπισης των πρωτεϊνών στην πήκτη είναι ανάλογη του μοριακού βάρους και του φορτίου τους.

Η πήκτη πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια (MBA). Για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του MBA απαιτείται υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED). Το TEMED επιταχύνει το ρυθμό σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου από το APS, και αυτές με τη σειρά τους καταλύουν τον πολυμερισμό.

Στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS – PolyAcrylamideGelElectrophoresis, SDS-PAGE), το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) αποδιάτασσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό βάρος τους (εικόνα 15). Οι μικρές πρωτεΐνες κινούνται πιο εύκολα μέσα στη πήκτη και προηγούνται των πιο μεγάλων πρωτεϊνών που κινούνται με πιο αργό ρυθμό.



Εικόνα15. Αποδιάταξη πρωτεϊνών από το SDS. (Προσαρμογή από: *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*, Biorad)

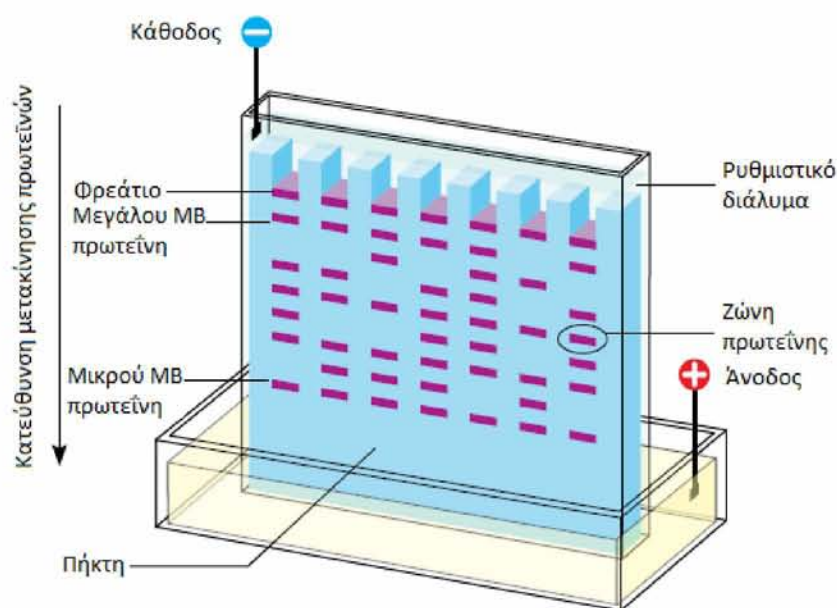
Η SDS-PAGE είναι ασυνεχής ηλεκτροφόρηση και επιτυγχάνεται με τη παρασκευή δύο διαφορετικών πηκτωμάτων: του πηκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel) και του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel), τα οποία έχουν διαφορετικά μεγέθη πόρων, ιοντική ισχύ και pH (πίνακας 3,4).

Στο πηκτώμα επιστοίβαξης συμπυκνώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα και στο πηκτώμα διαχωρισμού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος.

Επίσης στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών σημαντικό ρόλο παίζει και το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχει μεγάλη συγκέντρωση γλυκίνης και η κατάσταση ιονισμού της γλυκίνης είναι σημαντική για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Σε ουδέτερο pH, η γλυκίνη διαθέτει μια αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα και μια θετικά φορτισμένη αμινομάδα. Το pKa της αμινομάδας είναι 9.6, πολύ υψηλότερο από το pH του πηκτώματος επιστοιβάξης που το pH είναι 6.8. Οπότε η γλυκίνη δεν ιονίζεται στο πηκτώμα επιστοιβάξης, αλλά όταν εισέλθει στο πηκτώμα διαχωρισμού που έχει pH 8.8 ιονίζεται.

Συγκεκριμένα, όταν εφαρμοστεί τάση τα ιόντα Cl^- από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης κινούνται με μεγάλη ταχύτητα προς το θετικό πόλο παρασύροντας το πρωτεϊνικό δείγμα. Τα μόρια γλυκίνης κινούνται με μικρότερη ταχύτητα στο πηκτώμα επιστοιβάξης. Αυτή η διαφορά στη κινητικότητα των μορίων Cl^- και γλυκίνης και ταυτόχρονα οι μεγάλοι πόροι στο πηκτώμα επιστοιβάξης (που συνεισφέρουν μικρή αντίσταση στο πρωτεϊνικό δείγμα) οδηγούν στην παγίδευση του πρωτεϊνικού δείγματος σε μια πολύ λεπτή ζώνη.

Όταν το πρωτεϊνικό δείγμα εισέλθει στο πηκτώμα διαχωρισμού η γλυκίνη αποκτά αρνητικό φορτίο διότι το pH του πηκτώματος διαχωρισμού είναι 8.8, πολύ κοντά με το pKa της γλυκίνης. Οπότε τα μόρια γλυκίνης και Cl^- κινούνται με την ίδια ταχύτητα εξαλείφοντας τη διαφορά της τάσης, η οποία έλεγχε την κινητικότητα στο πηκτώμα επιστοιβάξης. Οι πόροι στο πηκτώμα επιστοιβάξης είναι πολύ μικροί οπότε αναπτύσσεται αντίσταση και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου. (Προσαρμογή από: *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*, Biorad)

Σε ειδική διάταξη τοποθετείται αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού και μετά τα πήκτωμα επιστοιβαξης. Στο πήκτωμα επιστοιβαξης τοποθετείται μια ειδική χτένα, ώστε να δημιουργηθούν τα φρεάτια μέσα στα οποία θα τοποθετηθεί το μίγμα πρωτεϊνών που θα αναλυθεί. Το πήκτωμα στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης (εικόνα 16) και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Running buffer) (πίνακας 5). Πριν φορτωθούν τα δείγματα στο πήκτωμα, θερμαίνονται στους 95 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται με τη βοήθεια της σύρριγγας Hamilton μέσα στα φρεάτια του πηκτώματος. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέεται με το τροφοδοτικό και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V, 350mA, για 1 ώρα περίπου, μέχρι το μέτωπο της χρωστικής που περιέχεται στο loading buffer να φτάσει στο άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.

Πήκτωμα διαχωρισμού	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο/ Bis Ακρυλαμίδιο (50:1)	8% - 12%
Tris – HCl (pH 8.8)	0.375M
EDTA	2mM
SDS	0.1%
APS	1.76mM
TEMED	13mM

Πίνακας 3. Σύσταση διαλύματος διαχωρισμού.

Πήκτωμα επιστοιβαξης	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο/ Bis Ακρυλαμίδιο (50:1)	4,5%
Tris – HCl (pH 8.8)	0.5M
EDTA	8mM
SDS	0.4%
APS	2.76mM
TEMED	21mM

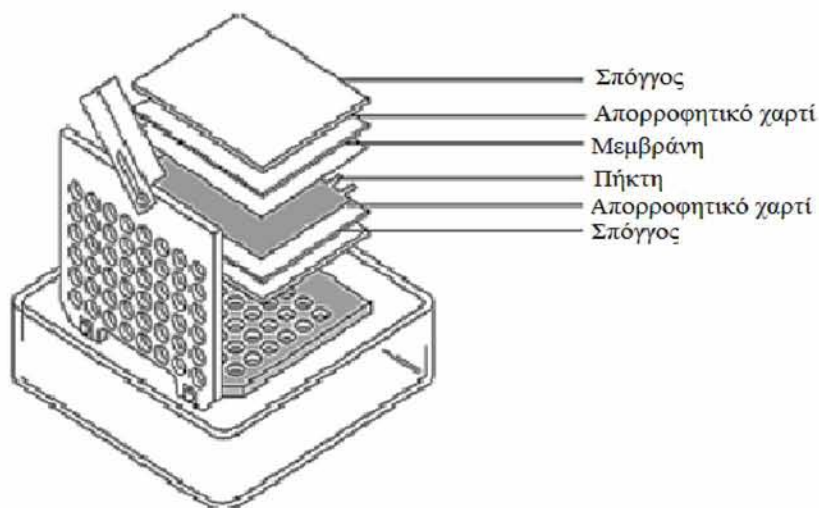
Πίνακας 4. Σύσταση διαλύματος επιστοιβαξης.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris – HCl (pH 8.3)	50mM
Γλυκίνη	0.38M
SDS	0.1%
EDTA	2mM

Πίνακας 5. Σύσταση διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

2.5.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος σε υγρό περιβάλλον. Σε ειδική διάταξη (cassete) τοποθετήθηκαν με τη σειρά ένας σπόγγος, ένα διηθητικό χαρτί, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα διηθητικό χαρτί και ένας σπόγγος (εικόνα 17). Όλα τα υλικά είχαν εμποτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transferbuffer) (πίνακας 6). Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έγινε εφαρμόζοντας τάση 100V και ένταση 350 mA για 1 ώρα.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Προσαρμογή από: *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Instruction Manual, Biorad*)

Διάλυμα μεταφοράς	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris – HCl (pH 8.3)	48mM
Γλυκίνη	39mM
SDS	0.037%
Μεθανόλη	20%

Πίνακας 6. Σύσταση διαλύματος μεταφοράς.

Ο έλεγχος της μεταφοράς των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau S. Επίσης, επισημάνθηκαν οι θέσεις των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (proteinmarker).

2.5.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και προσδέονται ειδικά σε αυτές. Η πρόσδεση πρωτεΐνης – αντισώματος ανιχνεύεται με τη χρήση αντισωμάτων κατά του πρώτου αντισώματος και τα οποία είναι συζευγμένα με ένζυμο δείκτη. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

1 ^ο Αντίσωμα	Κλωνικότητα	Προέλευση	Αραίωση
Anti-HIF-1α (Lyberopoulou et al., 2007)	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	1:1000
Anti-phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling)	Μονοκλωνικό	Κουνέλι	1:1000
Anti-NF-κB p65 (Cell Signaling)	Μονοκλωνικό	Κουνέλι	1:1000
Anti-Lipin-1 (Grimsey et. al., 2008)	Πολυκλωνικό	Κουνέλι	1:2000
Anti-b-actin (Millipore, Billerica, MA, USA)	Μονοκλωνικό	Ποντίκι	1:5000

Πίνακας 7. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.

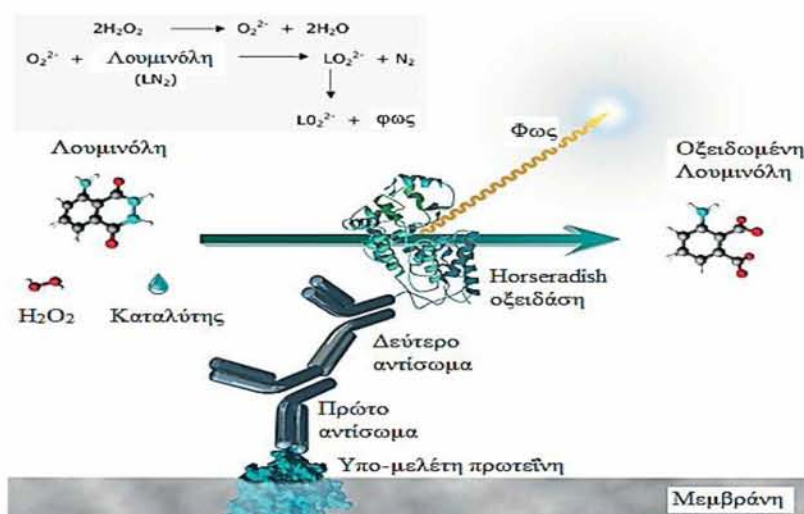
Ως ένζυμο δείκτης χρησιμοποιήθηκε η υπεροξειδάση και ως υπόστρωμα η λουμινόλη. Κατά τη αντίδραση η υπεροξειδάση παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (και με τη βοήθεια καταλύτη) οξειδώνει τη λουμινόλη και εκλύεται φως.

Κατά την πειραματική διαδικασία η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού (1 X PBS/0,1% Tween-20 με 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση με αντίσωμα που είναι ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη στους 4°C και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα 1 X PBS/0,1% Tween-20. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα 1 X PBS/0,1% Tween-20.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemoluminescence, ECL) (εικόνα 18). Για το σκοπό αυτό, έγινε επώαση της μεμβράνης για 1 λεπτό με διάλυμα λουμινόλης (πίνακας 8). Η οξείδωση της λουμινόλης από της υπεροξειδάση (το ενζυμο που είναι συζευγμένο στο δεύτερο αντίσωμα) προκάλεσε έκλυση φωτός το οποίο ανιχνεύτηκε, στην παρούσα εργασία, σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (Imager chemoluminescence).

Διάλυμα Λουμινόλης	
Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Tris – HCl (pH 8.6)	0.1M
Λουμινόλη	1.4mM
p –κουμαρικό οξύ (σε DMSO)	0.007mM
H ₂ O ₂	30%

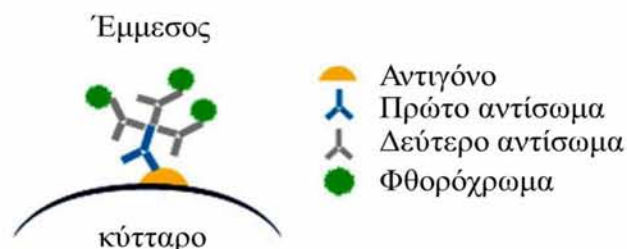
Πίνακας 8. Σύσταση διαλύματος λουμινόλης.



Εικόνα13. Αρχή της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. (Προσαρμογή από: www.covalab.com)

2.6. Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Στην τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιούνται συζευγμένα αντισώματα με φθορίζοντα χρώματα, όπως η ισοθειακυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), τα οποία προσδένονται ειδικά στην υπό – μελέτη πρωτεΐνη και μας επιτρέπουν τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση των τεχνικών φθορισμού. Κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό το δεύτερο αντίσωμα κατά του πρώτου αντισώματος είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική (εικόνα 19).



Εικόνα 14. Αρχή της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού. (Ανατύπωση από: www.abcam.com)

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον κυτταρικό εντοπισμό των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και HIF-1α με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (πίνακας 9)

Κατά την πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, που περιείχαν αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες. Μετά την κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και δυο πλύσεις με διάλυμα 1XPBS. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 3,65% φορμαλδεΐδης/1XPBS για 15 λεπτά στους 4°C και δυο πλύσεις με 1X PBS. Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε την επώαση των κυττάρων με διάλυμα 1% Triton X-100/1X PBS για 15 λεπτά στους 4°C, προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή στα αντισώματα. Ακολούθησαν και πάλι 2 πλύσεις με διάλυμα 1XPBS και επώαση των κυττάρων με διάλυμα κορεσμού 1XPBS/ 0.1% Tween 20/ 3% BSA για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε ολνύκτια επώαση στους 4°C με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1XPBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1XPBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική σε διάλυμα 1XPBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Μετά το τέλος της επώασης, αφαιρέθηκε το δεύτερο αντίσωμα και έγιναν μια πλύση των 5 λεπτών με διάλυμα 1XPBS/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA και δυο πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1XPBS/ 0.1% Tween 20. Τέλος, οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν σε H₂O, στέγνωσαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες πάνω σε 2μl Mowiol- DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, UK.), ώστε να γίνει και η χρώση του DNA των κυττάρων. Ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

1^ο Αντίσωμα	Αραίωση
Anti-HIF-1α (Lyberopoulouetal., 2007)	1:500
Anti-NF-κBp65 (Ser536) (CellSignaling)	1:400
2^ο Αντίσωμα	
Anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd., Suffolk,UK)	1:500
Anti-rabbit CY-3(Jackson ImmunoResearch Europe, Ltd., Suffolk,UK)	1:500

Πίνακας 9. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό.

2.7. Χρώση λιποσταγονιδίων με Nile-Red

Για την παρατήρηση των λιποσταγονιδίων πραγματοποιήθηκε χρώση με τη λιπόφιλη χρωστική NileRed. Τα κύτταρα προσκολλήθηκαν σε καλυπτρίδες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου μετά την κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων και ακολούθησαν δύο πλύσεις με διάλυμα 1X PBS. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 3,65% φορμαλδεΐδης/1X PBS για 15 λεπτά στους 4°C, δυο πλύσεις με 1X PBS, επώαση με την χρωστική NileRed (0.1μg/ml σε 1XPBS/0.1% Tween 20), (Sigma) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι, και 3 πλύσεις με διάλυμα με 1XPBS/ 0.1% Tween 20. Τέλος, οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν σε H₂O, και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες πάνω σε 2μl Mowoil- DAPI, ώστε να γίνει και η χρώση του DNA των κυττάρων.

2.8. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol (Invitrogen), το οποίο είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης.

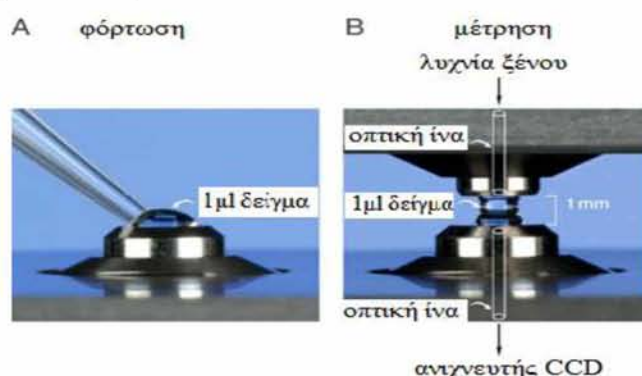
Από τις καλλιέργειες αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου TRIzol. Με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf, όπου ομογενοποιήθηκαν. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 5 λεπτά στους 8°C, ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν είχαν λυθεί. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες, προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο, έγινε γρήγορη ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός του δείγματος σε τρεις φάσεις: την υπερκείμενη υδατική φάση, στην οποία βρίσκεται το RNA, την ενδιάμεση, στην οποία βρίσκεται το DNA και την οργανική που περιέχει τις πρωτεΐνες. Με προσοχή συλλέχθηκε η υδατική φάση, η οποία μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες, έγινε προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τα

δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα πλύθηκε με 1ml αιθανόλης 75% και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα RNA επαναιωρήθηκε σε 25-50μl αποστειρωμένο ddH₂O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Όλοι οι χειρισμοί έγιναν με αποστειρωμένα υλικά, ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις με RNAάσες.

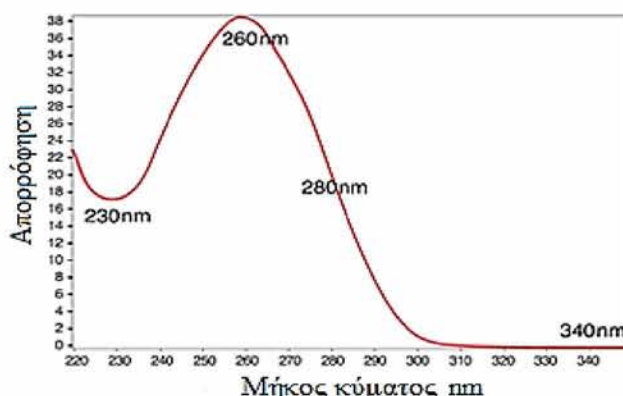
2.8.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000. Το σύστημα χρησιμοποιεί τεχνολογία οπτικών ινών και την εγγενή επιφανειακή τάση του υγρού – δείγματος που δημιουργείται μεταξύ των δυο επιφανειών του οργάνου κατά τη διάρκεια της μέτρησης (εικόνα 20).



Εικόνα 15. Μέτρηση στο Nanodrop. (Ανατύπωση από: www.nanodrop.com)

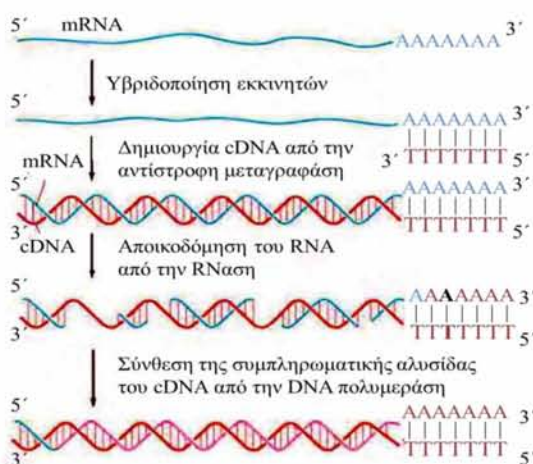
Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε δείγμα όγκου 1μl, και από το φάσμα απορρόφησης με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού υπολογίστηκε η συγκέντρωση RNA και οι λόγοι A₂₆₀/A₂₈₀ και A₂₆₀/A₂₃₀, οι οποίοι αποτελούν δείκτες της καθαρότητας του δείγματος όσον αφορά μολύνσεις από άλλα μακρομόρια και οργανικούς διαλύτες που δεν απομακρύνθηκαν κατά τη διαδικασία αντίστοιχα (εικόνα 21).



Εικόνα 16. Τυπικό φάσμα νουκλεϊκού οξέος. (Ανατύπωση από: www.nanodrop.com)

2.9. Σύνθεση cDNA από RNA με αντίστροφη μεταγραφή

Η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA στηρίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA. Η διαδικασία αρχίζει με τη δράση των εκκινητών, οι οποίοι προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στο RNA. Στη συνέχεια η αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας dNTPs συνθέτει το cDNA και σχηματίζονται σύμπλοκα RNA/cDNA. Τα σύμπλοκα αυτά υδρολύονται από RNάση. Η DNA πολυμεράση συνθέτει στη συνέχεια τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA και η διαδικασία της σύνθεσης του cDNA τερματίζει με το σχηματισμού φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των νεοσυντιθέμενων τμημάτων DNA, μέσω της δράσης του ενζύμου λιγάση, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία δίκλωνου cDNA (εικόνα 22).



Εικόνα22. ΣύνθεσηcDNA. (Τροποποίησηαπό:BruceAlbertset. al.,MolecularBiologyofThecell 5th, GarlandScienceTaylor&FrancisGroup, UnitedStatesofAmerica 2008)

Γιατησύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA καιτοαντιδραστήριο High – Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), σύμφωναμετιςοδηγίεςτουκατασκευαστή. Για κάθε αντίδραση όγκου 20μl χρησιμοποιήθηκαν 10μl δείγματος RNA, το οποίο περιείχε 1μgRNA και 10μl του μείγματος της αντίδρασης (2XRTMastermix) το οποίο περιείχε:

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)/ αντίδραση
10X RT buffer	2.0
25X dNTPs mix	0.8
10X random primers	2.0
MultiScribe reverse transcriptase	1.0
dH ₂ O - απαλλαγμένο από RNάσες	4.2
Τελικός όγκος	10.0

Επίσης παρασκευάστηκε και ένα αρνητικό δείγμα, στο οποίο η αντίδραση πραγματοποιήθηκε απουσία της αντίστροφης μεταγραφής.

Το πρόγραμμα το θερμοκυκλοποιητή, όπου τα δείγματα επωάστηκαν ήταν το εξής:

- 25 °C για 10 λεπτά
- 37 °C για 120 λεπτά
- 85 °C για 5 δευτερόλεπτα
- 4 °C - ∞

Τέλος τα δείγματα cDNA φυγοκεντήθηκαν, προστέθηκαν 80μl αποστειρωμένου dH₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C, μέχρις ότου να χρησιμοποιηθούν.

2.10. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time-PCR)

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ποσοτικήςPCR πραγματικού χρόνου (Real-TimePCR). Η Real-TimePCR συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας –στόχου με την ταυτόχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων χρησιμοποιώντας ανιχνευτές που φθορίζουν και την ποσοτικοποίηση τους.

Η ανίχνευση των προϊόντων συνήθως γίνεται με τη χρήση της μη ειδικής φθορίζουσας χρωστικής SYBRGreen I. Η χρωστική αυτή ενσωματώνεται στη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπει στα 520nm. Η ένταση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του DNA υπάρχει στην αντίδραση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων VEGF, IL-6, TGF-β, PAI-1, FSP-1, P4HA 1-1, LIPIN-1, AGPAT-2 και ACTIN-β χρησιμοποιώντας τους ανάλογους εκκινητές. Η ποσοτική Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα MiniOpticon RT-PCR (Biorad) και χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο SYBR Green PCR Master mix (Kapa Biosystems).

Σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου σε 5μl δείγματος cDNA προστέθηκαν 15μl διάλυματος της αντίδρασης που αποτελούνταν από 10μl SYBR Green mix, 1μl πρόσθιο εκκινητή (Forward Primer 0.5 pMol/μl), 1μl ανάστροφο εκκινητή (Reverse Primer 0.5 Mol/μl) και 3μl αποστειρωμένο dH₂O. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν εις διπλούν και χρησιμοποιήθηκαν δυο δείγματα ελέγχου. Στο ένα δείγμα ελέγχου NRTπροστέθηκε δείγμα που κατά τη αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης δεν είχε προστεθεί το ένζυμο και στο άλλο δείγμα ελέγχου NTC προστέθηκε νερό αντί για cDNA.

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής (εικόνα 23):

1. 50 °C για 2 λεπτά → ενεργοποίηση του Sybr Green και της Taq πολυμεράσης.
2. 95 °C για 10 λεπτά → αρχική αποδιάταξη.
3. 95 °C για 15 δευτερόλεπτα → αποδιάταξη.
4. 60 °C για 1 λεπτό → πρόσδεση εκκινητών και επέκταση.

5. Επανάληψη των σταδίων 3 – 4 για 39 φορές.
6. 60 °C – 90 °C → αποδιάταξη των προϊόντων



Εικόνα 17. Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR. (Λογισμικό πρόγραμμα της RT-PCR)

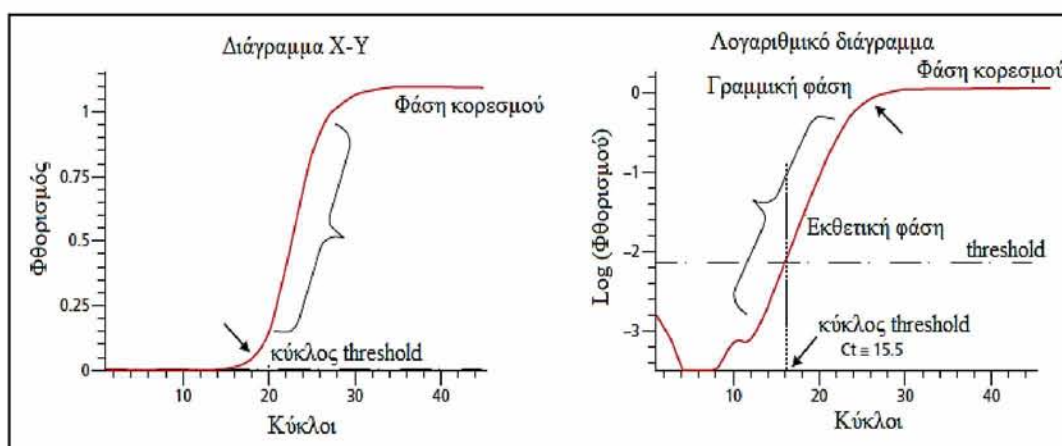
2.10.1. Καμπύλη ενίσχυσης- Threshold- Τιμή Ct

Η καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) προκύπτει από τη μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (εικόνα 24). Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που πολλαπλασιάζεται και σχετίζεται άμεσα με την αρχική συγκέντρωση του δείγματος.

Στην καμπύλη ενίσχυσης ο άξονας του x αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων της PCR και ο άξονας του y αντιστοιχεί στο σήμα φθορισμού. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

- ✓ την εκθετική φάση, όπου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ο ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος
- ✓ τη γραμμική φάση, στην οποία κάποια αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται και παράλληλα να συσσωρεύονται αναστολείς, και
- τη φάση κορεσμού, όπου η αντίδραση σταματάει λόγω πλήρης εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Από την καμπύλη ενίσχυσης της RT-PCR υπολογίζεται η τιμή Ct (threshold cycle). Η τιμή Ct εντοπίζεται πάνω στην εκθετική φάση και είναι ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτείται ώστε το παρατηρούμενο σήμα φθορισμού να προσεγγίζει το threshold, δηλαδή το κατώτερο επίπεδο στο οποίο παρατηρείται σήμα φθορισμού και αυτό το σήμα δεν αποτελεί background, δηλαδή υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του φθορισμού. Επίσης, η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας της αλληλουχίας –στόχου, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η τιμή του Ct τόσο υψηλότερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας – στόχου. Η τιμή Ct αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο για την ποσοτικοποίηση της μεθόδου.



Εικόνα 18 Καμπύλη ενίσχυσης (Τροποποίηση από: qPCRTechnicalGuide, Sigma)

2.10.2. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA

Η ποσοτικοποίηση του αρχικού γενετικού υλικού μπορεί να γίνει με απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό ή με σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό. Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, στον οποίο χρησιμοποιούνται γονίδια αναφοράς που είναι γνωστό ότι η έκφραση τους παραμένει σταθερή στις πειραματικές συνθήκες και δεν επηρεάζεται από την πειραματική διαδικασία. Στην συγκεκριμένη εργασία, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των γονιδίων κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου β-ακτίνης που είναι γνωστό ότι η έκφραση του δεν μεταβάλλεται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν.

Οι τιμές κανονικοποιούνται τόσο ως προς τον εσωτερικό μάρτυρα που είναι το γονίδιο αναφοράς όσο και προς το βαθμονομητή. Ως βαθμονομητής ορίζεται μια συνθήκη αναφοράς. Οι τιμές που προκύπτουν είναι αυθαίρετες μονάδες έκφρασης και συνήθως εκφράζουν πόσες φορές αυξάνεται ή μειώνεται η έκφραση mRNA του γονιδίου – στόχου στο υπό μελέτη δείγμα σε σχέση με το δείγμα βαθμονομητή.

Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου – στόχου προσδιορίζονται σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου αναφοράς χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $\Delta\Delta CT$. Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

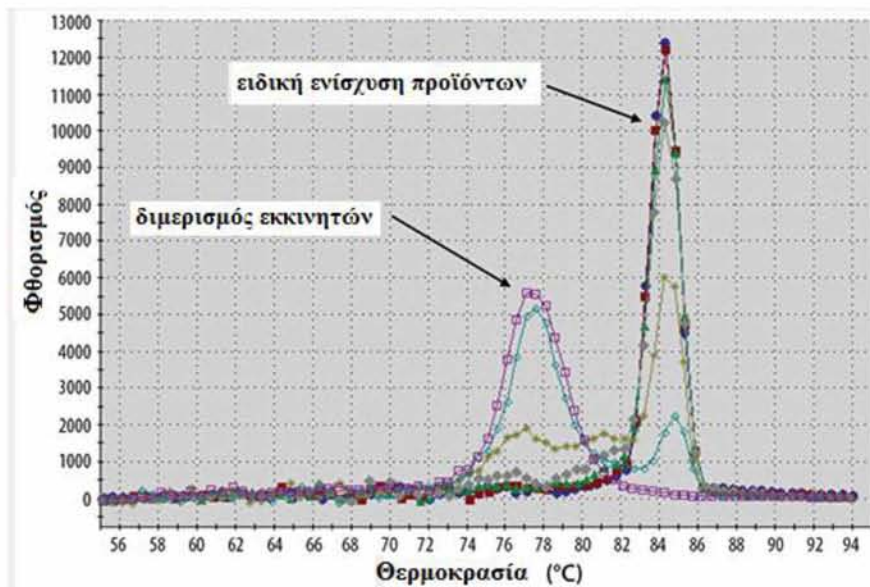
Όπου: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος - ΔCt βαθμονομητή

ΔCt δείγματος = Ct δείγματος, γονιδίου στόχου - Ct δείγματος, γονιδίου αναφοράς

ΔCt βαθμονομητή = Ct βαθμονομητή, γονιδίου στόχου - Ct βαθμονομητή, γονιδίου αναφοράς.

2.10.3. Ανάλυση καμπύλης τήξης

Το τελευταίο στάδιο της RT-PCR περιλαμβάνει την αποδιάταξη όλων των προϊόντων αυξάνοντας τη θερμοκρασία διαδοχικά (2 °C σε κάθε βήμα) ξεκινώντας από τους 60 °C και φτάνοντας έως και τους 90°C, ενώ ταυτόχρονα γίνεται μέτρηση του φθορισμού στην καμπύλη τήξης (melting curve) (εικόνα 25).



Εικόνα 19. Καμπύλη τήξης. (Προσαρμογή από: www.sigmaldrich.com/technical-documents)

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis) δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του σήματος φθορισμού που οφείλεται στην ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου από το σήμα φθορισμού που μπορεί να οφείλεται στο διμερισμό των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα. Η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από το σημείο τήξης (T_m) του προϊόντος. Το σημείο τήξης (T_m) είναι χαρακτηριστικό για κάθε προϊόν, αφού εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Έτσι, είναι δυνατή η διάκριση του σήματος φθορισμού του προϊόντος το οποίο θα δώσει μια συγκεκριμένη οξεία κορυφή που θα αντιστοιχεί στο T_m του, σε σχέση με τα μη ειδικά προϊόντα που θα δώσουν πολλές κορυφές σε διαφορετικές T_m .

2.11. Έλεγχος των εκκινητών και της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

Η καταλληλότητα των εκκινητών (πίνακας 10) και η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων στα ΛΜΚ αεραγωγών ελέγχθηκε σε αντιδράσεις RT – PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε cDNA, το οποίο προήλθε από την αντίστροφη μεταγραφή μείγματος RNA ΛΜΚ αεραγωγών που υπέστησαν κατεργασία των κυττάρων σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Ως αρνητικοί μάρτυρες παραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις στις οποίες παραλείφθηκε η προσθήκη cDNA ή ο ένας εκκινητής.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Μέγεθος προϊόντος PCR (nt)
Hs Actin F	CCAACCGCGAGAAGATGA	97
Hs Actin R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	
Hs VEGF sense EX3 F	CCCCTGAGGAGTCCAACATC	58
Hs VEGFE sense EX4R	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC	
Hs IL-6 F	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	202
Hs IL-6 R	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	
Hs IL-1 β F	GGCTGCTCTGGATTCTCTT	238
Hs IL-1 β R	AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG	
Hs TGF- β F	GAGCCCTGGACACCAACTAT	130
Hs TGF- β R	AAGTTGGCATGGTAGCCCTT	
Hs P4HA 1-1 F	AGGGGTTGCTGTGGATTACC	274
Hs P4HA 1-1 R	GTCATGTA CTGTAGCTCGGC	
Hs P4HB F	AGCTCGACAAAGATGGGGTT	196
Hs P4HB R	GGCAAGAACAGCAGGATGTG	
Hs PAI-1 F	GAAAGGCAACATGACCAGGC	256 & 1317
Hs PAI-1 R	CATGCGGGCTGAGACTATGA	
Hs E – cadherin F	TCATGAGTGTCCCCCGGTAT	240
Hs E – cadherin R	TCTTGAAGCGATTGCCCCAT	
Hs FSP-1 F	CTCCTCAGCGCTTCTTCTTTCTT	207 & 256
Hs FSP-1 R	AAGCAGCTTCATCTGTCCTTTT	
hLPIN1+141	TTTCCACGTCCGCTTTGGG	174
hLPIN1+314	GTGGCCAGGTGCATAGGG	
Hs AGPAT-2 F	TGTGGATCTATCCCGAGGGT	118
Hs AGPAT-2 R	GAAGAGTACACCACGGGGAC	

Πίνακας 10. Αλληλουχίες εκκινητών.

Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο SYBR Green mix (Kapa Biosystems), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας (αναλύεται παρακάτω). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

1. 50 °C για 2 λεπτά → ενεργοποίηση του Sybr Green και της Taq πολυμεράσης.
2. 95 °C για 10 λεπτά → αρχική αποδιάταξη.
3. 95 °C για 15 δευτερόλεπτα → αποδιάταξη.
4. 60 °C για 1 λεπτό → πρόσδεση εκκινητών και επέκταση.

Τα στάδια 3 και 4 επαναλήφθηκαν 39 φορές.

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.11.1. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% TAE (0.04 M Tris – acetate, 0.001MEDTApH 8.0). Για την χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο GelRed (Biotium), το οποίο δεσμεύεται σε DNA μέσω παρεμβολής και εκπέμπει φως στα 595nm. Αναλύθηκαν 15μl από κάθε δείγμα της αντίδρασης αφού πρώτα αναμείχθηκαν με 3μl διαλύματος φόρτωσης (0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% xylenecyanol, 30% γλυκερόλη σε νερό). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% TAE, στα 100Volts, 350mA.

2.12. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος STATISTICA. Χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική δοκιμασία t- test. Ως στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε το $p\text{-value} < 0.05$.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση της υποξίας στη βιοσύνθεση λιπιδίων σε ΛΜΚ αεραγωγών:

Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Lipin1 και AGPAT 2 σε συνθήκες υποξίας

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα (85, 86) έδειξαν ότι η υποξία και ειδικότερα ο HIF-1 επάγουν το ένζυμο Lipin1, που μετατρέπει το φωσφατιδικό οξύ σε διακυλογλυκερόλη, προκαλώντας συσσώρευση λιποσταγονιδίων. Επιπλέον, πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, η υποξία προκαλεί επαγωγή της έκφρασης της AGPAT2, μιας ακόμη πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην σύνθεση των τριγλυκεριδίων (Τριανταφύλλου και συνεργάτες, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων βρόγχων (HBSMCs) για να ελέγξουμε αν η υποξία επηρεάζει τα επίπεδα mRNA των Lipin1 και AGPAT 2 και σε πρωτογενή ΛΜΚ αεραγωγών.

3.1.1. Επαγωγή του HIF-1α και συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε HBSMCs σε συνθήκες υποξίας

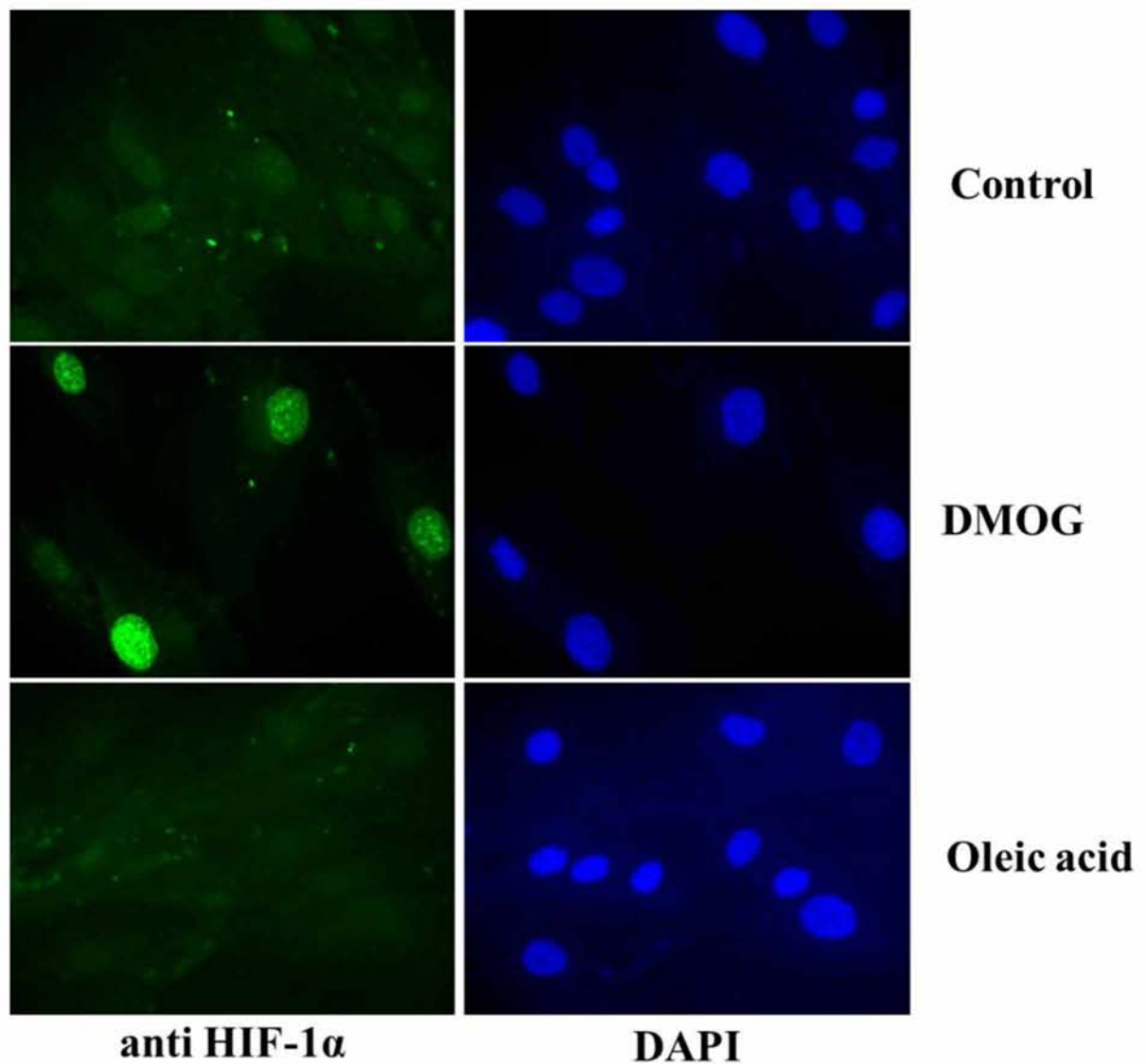
Αρχικά επιβεβαιώσαμε την επαγωγή του HIF-1α και τη συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε HBSMCs σε συνθήκες υποξίας.

Για το σκοπό αυτό, HBSMCs επιστρώθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία ή απουσία του αναστολέα των προλυδροξυλασών DMOG (1mM), ή ελαϊκού οξέος (0.4mM), ως θετικού μάρτυρα της συσσώρευσης λιποσταγονιδίων. Η μελέτη της επαγωγής του HIF-1α πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού και κατάλληλο αντίσωμα, ενώ η συσσώρευση λιποσταγονιδίων με χρώση NileRed.

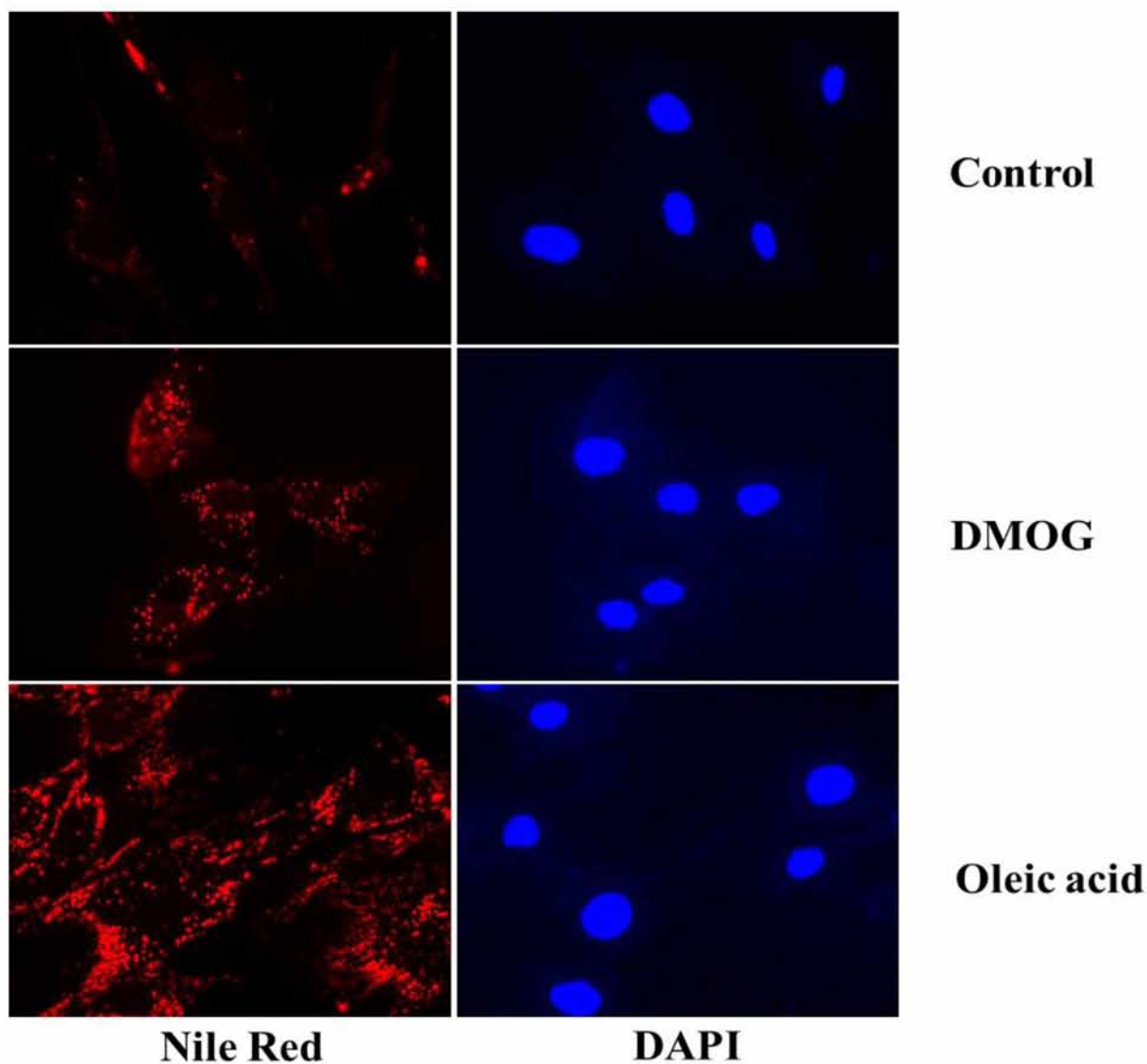
Παρατηρήσαμε ότι η επώαση των κυττάρων για 24 ώρες παρουσία DMOG προκάλεσε την αύξηση των επιπέδων του HIF-1α στον πυρήνα των ΛΜΚ, ενώ η επώαση με ελαϊκό οξύ δεν επηρέασε την έκφραση του (εικόνα 26). Στις καλυπτρίδες που έγινε χρώση με NileRed παρατηρήθηκε αύξηση της συσσώρευσης λιποσταγονιδίων μετά από 24 ώρες επώαση τόσο με DMOG, όσο και με ελαϊκό οξύ (εικόνα 27).

3.1.2. Επίδραση της υποξίας στα επίπεδα mRNA των Lipin1 και AGPAT2 σε HBSMCs

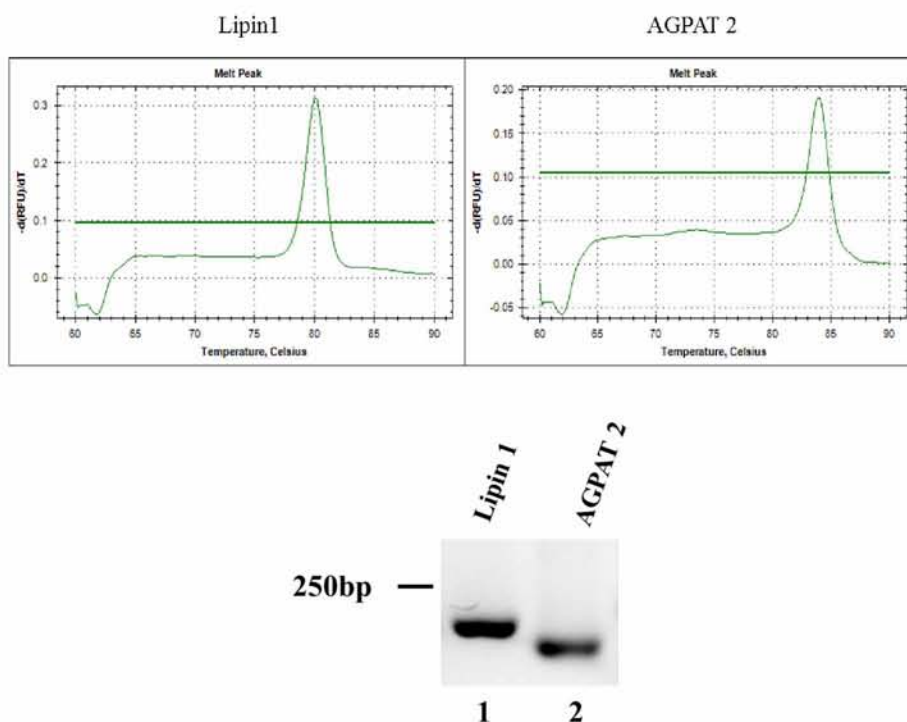
Η μελέτη της ρύθμισης των επιπέδων mRNA των Lipin1 και AGPAT2 σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Αρχικά έγινε έλεγχος των εκκινήτων και της έκφρασης των υπο-μελέτη γονιδίων στα HBSMCs (εικόνα 28).



Εικόνα 20. Ανάλυση της επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α σε HBSMCs μετά από 24 ώρες επώαση με DMOG, με μικροσκοπία έμμεσον ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά του HIF-1α και η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 40X.

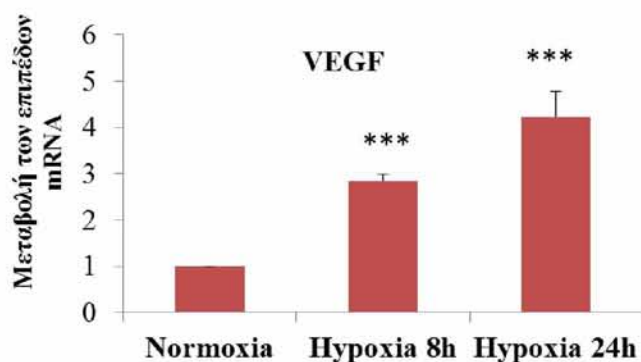


Εικόνα 21. Παρατήρηση λιποσταγονιδίων με χρώση NileRed σε HBSMCs μετά από 24 ώρες επώαση με DMOG. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 40X



Εικόνα 22. Έλεγχος των εκκινήτων και της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων με RT-PCR. Α.Καμπύλες τήξεως από τη RT-PCR. Β. Ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγορόζης.

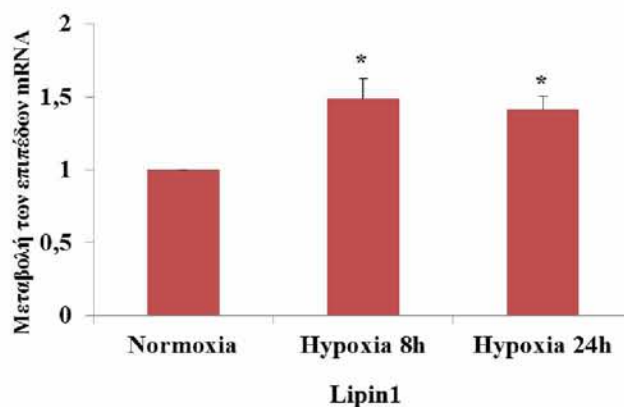
Ο προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της Lipin1 και της AGPAT2 πραγματοποιήθηκε σε δείγματα που προέρχονταν από HBSMCs τα οποία είχαν υποβληθεί σε 8 ή 24 ώρες υποξία. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη, ενώ ως δείκτης της υποξίας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο του VEGF το οποίο αποτελεί γονίδιο στόχος του HIF-1.



Εικόνα 23. Σχετική έκφραση του VEGF mRNA σε HBSMCs μετά από επώαση για 8 ή 24 ώρες σε υποξία με ποσοτική RT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 3 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη. (***: $P < 0.001$)

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF περίπου κατά 3 και 4 φορές, αντίστοιχα (εικόνα 29) ύστερα από 8 και 24 ώρες επώασης των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας, επιβεβαιώνοντας την ενεργοποίηση του HIF-1.

Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της Lipin1 τόσο στις 8 ώρες όσο και στις 24 ώρες επώασης σε συνθήκες υποξίας (εικόνα 30).



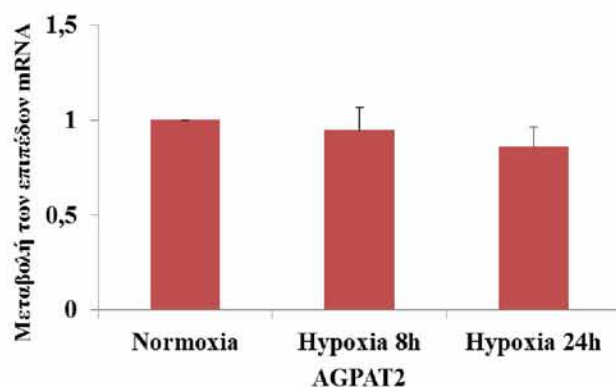
Εικόνα 24. Σχετική έκφραση του Lipin1 mRNA σε HBSMCs μετά από επώαση για 8 ή 24 ώρες σε υποξία με ποσοτική RT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 4 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη (*: $P < 0.05$).

Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA της AGPAT2 δεν παρουσίασαν μεταβολή στις παραπάνω συνθήκες (εικόνα 31)

3.1.3. Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της πρωτεΐνης Lipin1

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν η αύξηση των επιπέδων mRNA της Lipin-1 υπό την επίδραση υποξίας συνοδεύεται και από αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης Lipin-1. Για το σκοπό αυτό καλλιέργειες HBSMCs επώαστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) ή σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και ακολούθησε λύση των κυττάρων, παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και ανάλυση κατά Western. Επίσης ανάλυση κατά Western πραγματοποιήθηκε και για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α ως δείκτη της υποξίας.

Τα επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν ύστερα από επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας για 24 ώρες υποξία (Εικόνα 32, διαδρομές 2,3). Παράλληλα παρατηρήθηκε και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Lipin1 (εικόνα 32, διαδρομές 2,3).



Εικόνα 25. Σχετική έκφραση του AGPAT-2 mRNA σε HBSMCs μετά από επώαση για 8 ή 24 ώρες σε υποξία με ποσοτική RT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 4 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη.

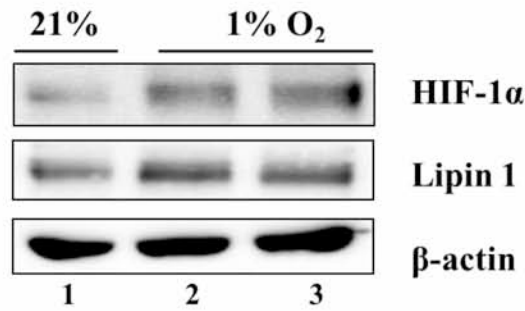
3.2. Απόκριση των ΛΜΚ των αεραγωγών στην υποξία και στον προφλεγμονώδη παράγοντα TNFα: μελέτη της έκφρασης των γονιδίων μεσολαβητών της ίνωσης, δεικτών EMT & δεικτών ίνωσης

Σε καρκινικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η υποξία προωθεί την ίνωση μέσω της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση των ινοβλαστών, στην EMT αλλά και γονιδίων που συντελούν στην αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου.

Προκειμένου να μελετηθεί η απόκριση των ΛΜΚ των αεραγωγών στην επίδραση του TNFα και/ή της υποξίας στην έκφραση μεσολαβητών της ίνωσης, δεικτών EMT και δεικτών ίνωσης, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες HBSMCs, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ολονύκτια επώαση με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας απουσία ορού. Τα κύτταρα στη συνέχεια, επώαστηκαν παρουσία ή απουσία TNFα (10ng/ml) για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα σε συνθήκες νορμοξίας (20% O₂) ή υποξίας (1% O₂).

3.2.1. Επίδραση του TNFα και της υποξίας στην ενεργοποίηση του NF-κB σε ΛΜΚ των αεραγωγών

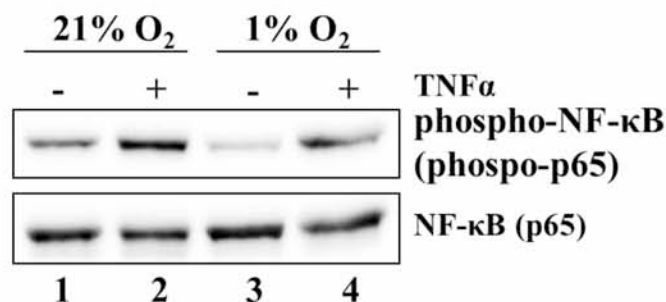
Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB. Η ενεργοποίηση του NF-κB από την προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη TNFα, προκαλεί τη μετατόπιση του συμπλόκου p65/p50 στον πυρήνα. Επίσης, η p65 υπομονάδα του NF-κB φωσφορυλιώνεται στην Ser 536, η οποία βρίσκεται στην περιοχή TAD (περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης), με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του (66).



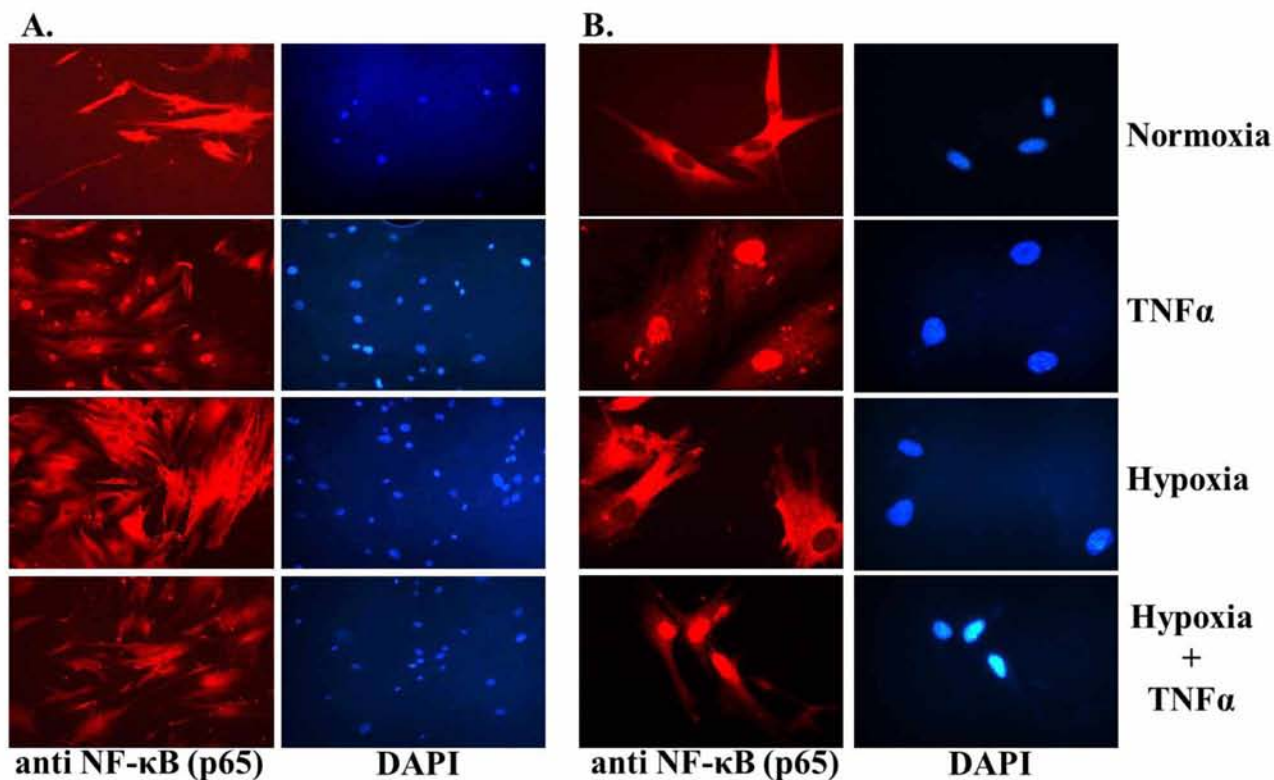
Εικόνα 26. Ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνών Lipin1 και HIF-1α. Η Lipin1 και ο HIF-1α επάγεται μετά από 24 ώρες υποξία. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της β-ακτίνης.

Καλλιέργειες HBSMCs υπβλήθηκαν σε στέρηση ορού, στη συνέχεια επώαστηκαν παρουσία ή απουσία TNFα (10ng/ml) για 4 ή 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας ή νορμοξίας και εξετάστηκε η φωσφορυλίωση στη Ser536 της p65 υπομονάδας του NF-κB, με ανάλυση κατά Western, και η μετατόπισή της στον πυρήνα με έμμεσο ανοσφθορισμό.

Επώαση με τον TNFα σε συνθήκες νορμοξίας προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB (εικόνα 33, διαδρομή 2) και της μετατόπισης της στον πυρήνα των κυττάρων (εικόνα 34 A&B). Σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της p65 (εικόνα 33, διαδρομή 4) και η μετατόπιση της στον πυρήνα (εικόνα 34 A&B) παρουσία TNFα, ήταν μικρότερη ένταση σε σχέση με τις αντίστοιχες συνθήκες νορμοξίας. Τέλος, σε συνθήκες υποξίας, παρατηρήθηκε μείωση των βασικών επιπέδων φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας (εικόνα 33, διαδρομή 3).



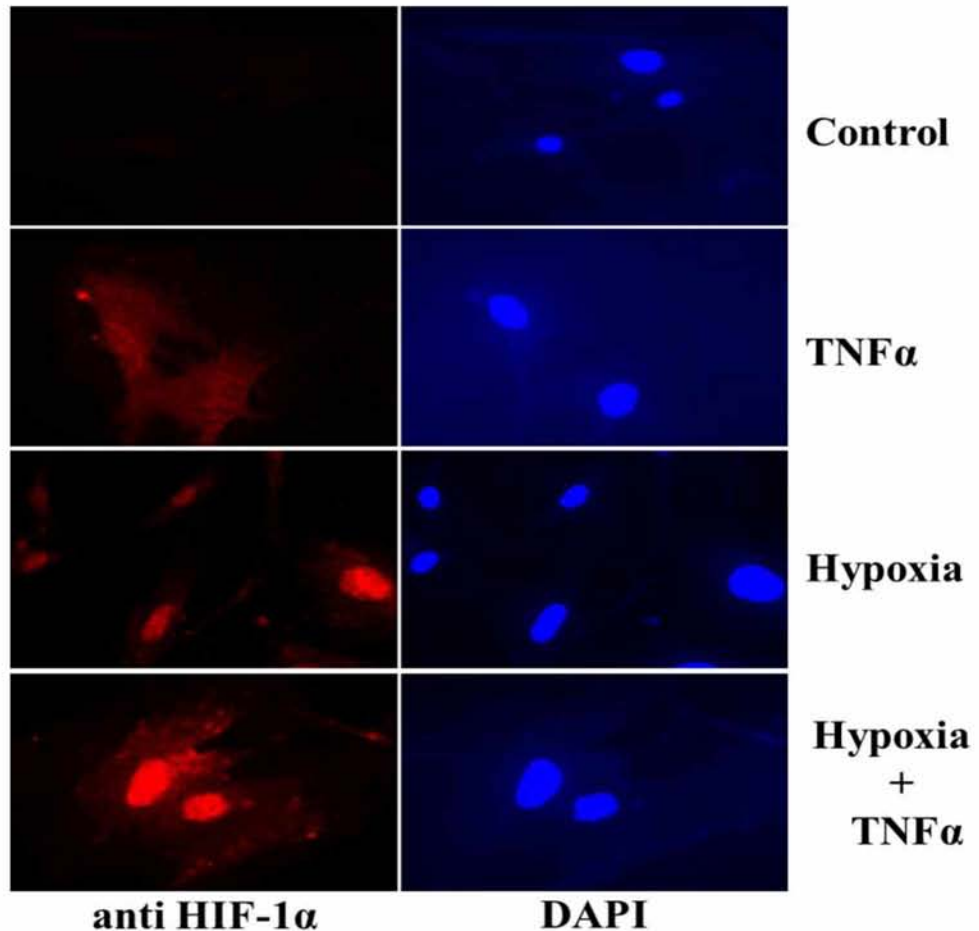
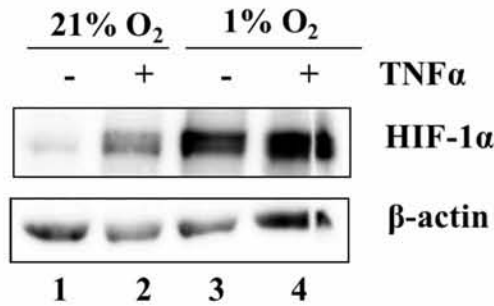
Εικόνα 27. Επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στη φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα κατά της phospho-p65 (Ser 536). Ο TNFα και ο συνδυασμός TNFα και υποξίας επάγουν τη φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB μετά από 24 ώρες επώαση. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της p65.



Εικόνα 28. Μετατόπιση της p65 υπομονάδας του NF-κB στον πυρήνα σε HBSMCs ύστερα από 4 ώρες επώαση με TNF α σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας. Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα κατά της p65 υπομονάδας NF-κB. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. A) Μεγέθυνση 10X, B) Μεγέθυνση 40X.

3.2.2. Επίδραση του TNF α και της υποξίας στην επαγωγή του HIF-1 α

Στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και κατεργασίας των HBSMCs μελετήθηκε και η επαγωγή του HIF-1 α , με ανάλυση κατά Western και έμμεσο ανοσοφθορισμό. Σε συνθήκες υποξίας παρατηρήθηκε απουσία ή παρουσία TNF α αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1 α (εικόνα 35A, διαδρομές 2 και 3) και παράλληλα αύξηση του σήματος στον πυρήνα των κυττάρων (εικόνα 35B). Επίσης, παρατηρήθηκε μικρή επαγωγή του HIF-1 α υπό την επίδραση του TNF α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (εικόνα 35A, διαδρομές 2 & 4).



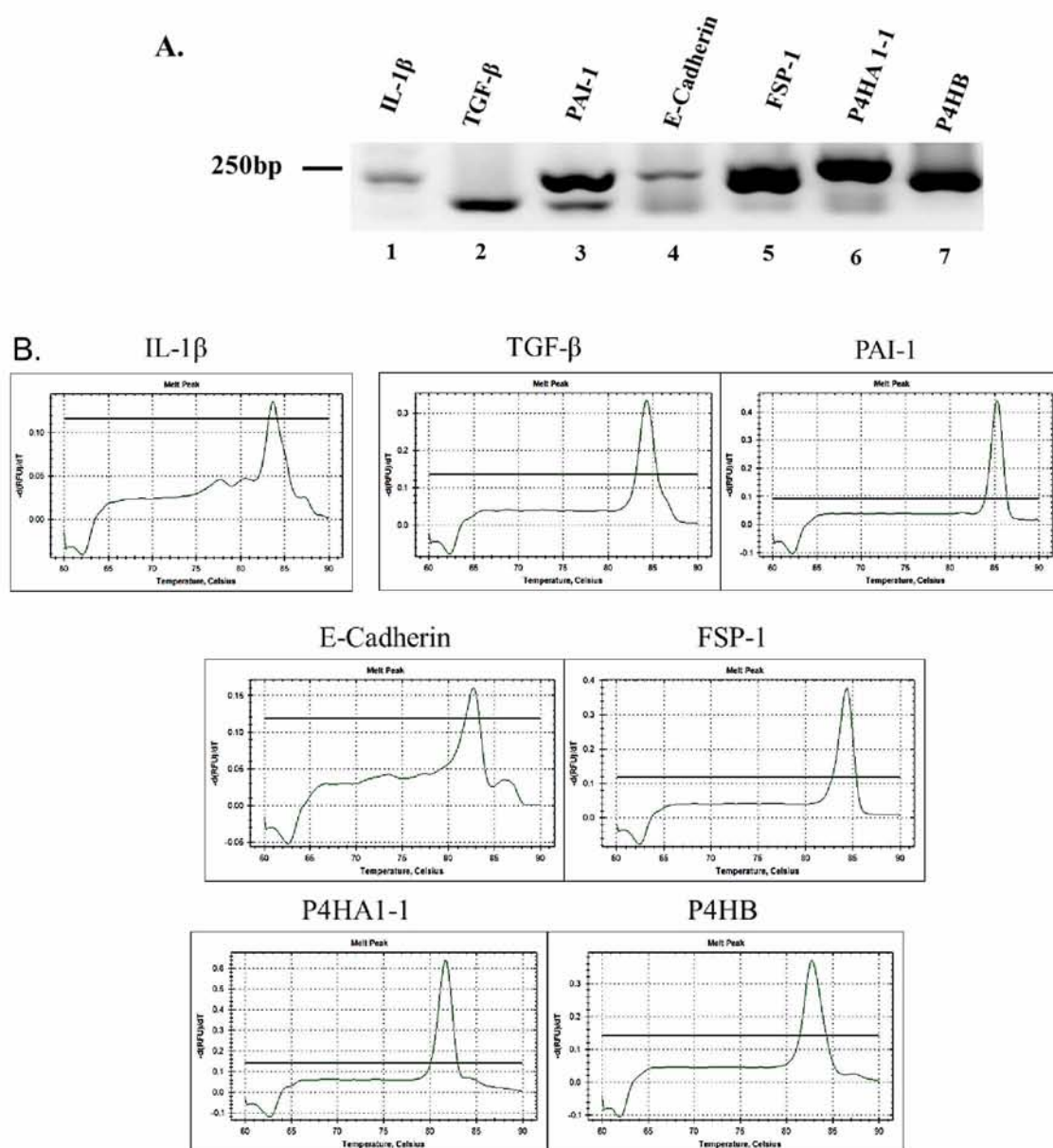
Εικόνα 29. Επίδραση του TNFα, της υποξίας και του συνδυασμού τους στην επαγωγή του HIF-1α. Ο TNFα και η υποξία σε μικρότερο βαθμό επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης HIF-1α.

A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του HIF-1α μετά από 24 ώρες επώαση σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας παρουσία ή απουσία TNFα. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της β-ακτίνης.

B. Η κυτταρική εντόπιση του HIF-1α σε HBSMCs με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού, μετά από 4 ώρες επώαση σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρουσία ή απουσία TNFα. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά του HIF-1α και η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI. Μεγέθυνση 40X.

3.2.3. Η επίδραση του TNF α και της υποξίας στην έκφραση των mRNA γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μεσολαβητών ίωσης, δεικτών EMT και δημιουργίας ίωσης σε HBSMCs

Για τον έλεγχο της μεταγραφής των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στη φλεγμονή και την ίωση χρησιμοποιήθηκε RNA από HBSMCs που είχαν υποστεί *in vitro* διαφοροποίηση (48). Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ITS (5 μ g/ml ινσουλίνη, 5 μ g/ml τρανσφερίνη και 5 μ g/ml σελήνιο), απουσία ορού για 3 ημέρες. Στη συνέχεια, στα κύτταρα έγινε προσθήκη TNF α , επώαστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας ή νορμοξίας. Από τα κύτταρα απομονώθηκε ολικό RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση cDNA.



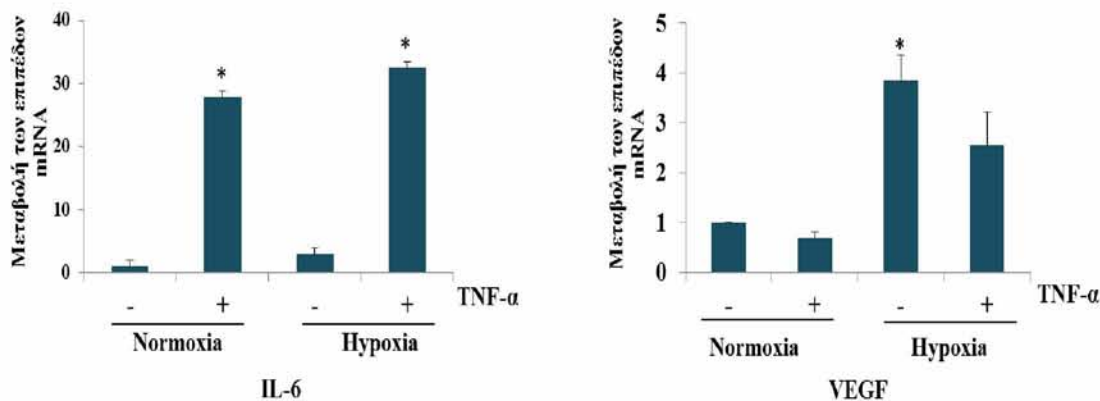
Εικόνα 30. Α. Έλεγχος των εκκινήτων και της έκφρασης των υπο μελέτη γονιδίων μεσολαβητών της φλεγμονώδους απόκρισης σε HBSMCs με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Β. Καμπύλες τήξεως από την RT-PCR.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των εκκινητών και της έκφραση των γονιδίων IL-1β (κυτταροκίνη), TGF-β και PAI-1 (μεσολαβητές της ίνωσης), E- Cadherin και FSP-1 (δείκτης EMT), PAHA1-1 και PAHB (δείκτες ίνωσης) στα HBSMCs σε αντιδράσεις RT-PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 36).

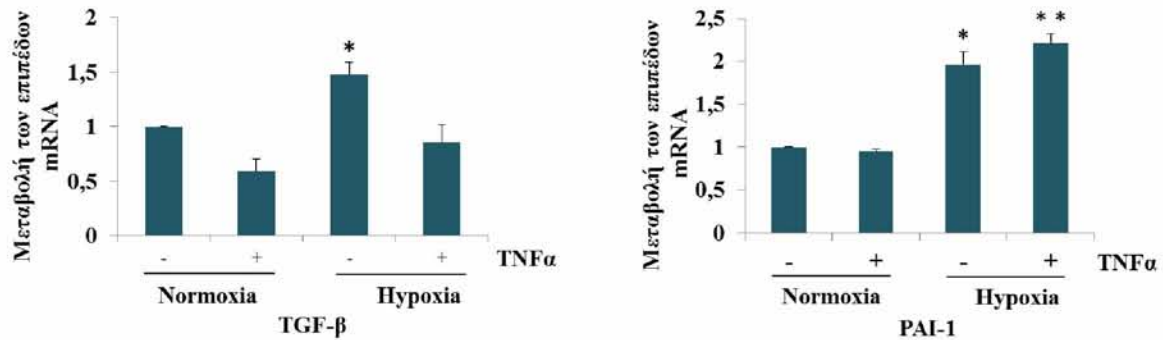
Από τον έλεγχο των εκκινητών διαπιστώσαμε ότι τα γονίδια TGF-β, PAI-1, FSP-1, PAHA1-1 και PAHB εκφράζονται σε ΛΜΚ των αεραγωγών και δίνουν ζώνες στα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων (πίνακας 10). Αντίθετα τα γονίδια IL-1β και E- Cadherin έχουν χαμηλή έκφραση και γι' αυτό δεν έγινε περαιτέρω έλεγχος τους.

Ως θετικούς μάρτυρες της απόκρισης των HBSMCs στον TNFα και στην υποξία αντίστοιχα, μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA της κυτταροκίνης IL-6, η οποία αποτελεί δείκτη της φλεγμονής, και του VEGF, ο οποίος αποτελεί γονίδιο στόχο του HIF-1α (Tsapourniotiet. al., 2013). Παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της IL-6 από την επίδραση του TNFα σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας (περίπου 28 και 35 φορές αντίστοιχα) καθώς και των επιπέδων mRNA του VEGF σε συνθήκες υποξίας (εικόνα 37).

Στα επίπεδα mRNA των μεσολαβητών της ίνωσης TGF-β και PAI-1 παρατηρήσαμε ότι αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας, αλλά όχι ύστερα από επώαση των κυττάρων παρουσία TNFα (εικόνα 38). Αντίθετα, ο TNFα προκάλεσε μείωση, (αν και όχι στατιστικά σημαντική) της έκφρασης του TGF-β σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

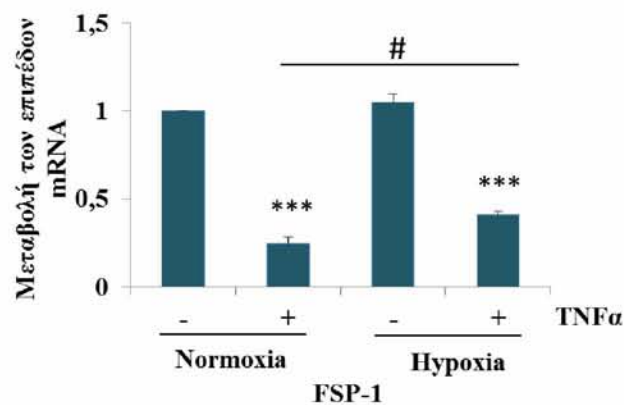


Εικόνα 31. Προσδιορισμός με ποσοτική RT-PCR των επιπέδων mRNA των IL-6 και VEGF σε HBSMCs, μετά από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρουσία ή απουσία TNFα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 3 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. (*: $P < 0.05$)



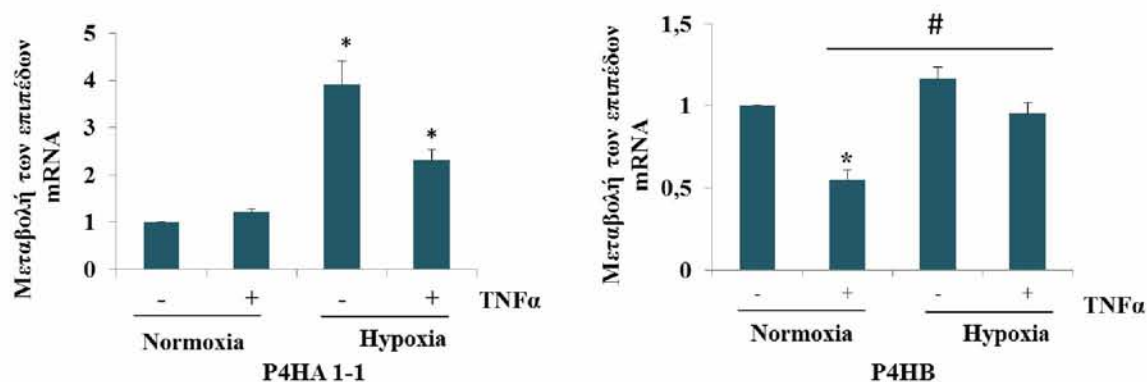
Εικόνα 32. Προσδιορισμός με ποσοτική RT-PCR των επιπέδων mRNA των TGF-β και PAI-1 σε HBSMCs, μετά από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρουσία ή απουσία TNFα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 2 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

Τα επίπεδα mRNA του δείκτη EMT FSP-1 δεν μεταβλήθηκαν όταν τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (εικόνα 39). Αντίθετα, ο TNFα προκάλεσε σημαντική μείωση της μεταγραφής του FSP-1, τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας.



Εικόνα 33. Προσδιορισμός με ποσοτική RT-PCR των επιπέδων mRNA του FSP-1 σε HBSMCs, μετά από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρουσία ή απουσία TNFα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 2 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ σε σχέση με τη συνθήκη normoxia, #: $P < 0.05$ σε σχέση με τη συνθήκη TNFα)

Τέλος μελετήθηκαν και τα επίπεδα mRNA των προλυλυδροξυλάσεων του κολλαγόνου P4HA 1-1 και P4HB. Στα επίπεδα mRNA του P4HA 1-1 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων τους σε συνθήκες υποξίας παρουσία ή απουσία TNF α , αντίθετα στα επίπεδα mRNA του P4HB παρατηρήθηκε μόνο μια τάση αύξησης σε συνθήκες υποξίας (εικόνα 40). Ο TNF α δεν επηρέασε τα επίπεδα mRNA του P4HA 1-1, ενώ αντίθετα, μείωσε τα επίπεδα mRNA του P4HB σε συνθήκες νορμοξίας (εικόνα 40).



Εικόνα 34. Προσδιορισμός με ποσοτική RT-PCR των επιπέδων mRNA των P4HA 1-1 και P4HB σε HBSMCs, μετά από επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρουσία ή απουσία TNF α . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (Normoxia) και είναι ο μέσος όρος 2 ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία αναλύθηκαν εις διπλούν. Η β -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. (*: $P < 0.05$, σε σχέση με τη συνθήκη normoxia, #: $P < 0.05$ σε σχέση με τη συνθήκη TNF α)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΛΜΚ των αεραγωγών παίζουν σημαντικό ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του αναπνευστικού συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση και στην φλεγμονή. Η χρόνια φλεγμονή συνοδεύεται από υποξία, προκαλώντας ίνωση και ιστική βλάβη. Ταυτόχρονα, η υποξία επάγει και τη σύνθεση λιπιδίων. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον ότι η υποξία και η φλεγμονή είναι παρούσες στα μεταβολικά σύνδρομα, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη σύνθεση λιπιδίων.

Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε σε ΛΜΚ αεραγωγών α) την επίδραση της υποξίας στην έκφραση των γονιδίων *Lipin 1* και *AGPAT 2*, τα οποία συμμετέχουν στην σύνθεση λιπιδίων, και β) την αλληλεπίδραση υποξίας και φλεγμονής στην έκφραση γονιδίων μεσολαβητών ίνωσης, δεικτών *EMT* και δεικτών ίνωσης, με σκοπό την κατανόηση του ρόλου τους στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.

Παρατηρήσαμε ότι, η επώαση των ΛΜΚ αεραγωγών σε συνθήκες υποξίας (1% O₂ ή επώαση με τον αναστολέα των προλυλ – υδροξυλασών, *DMOG*) προκάλεσε την επαγωγή του *HIF-1α*, που συνοδεύτηκε από συσσώρευση λιποσταγονοδίων (εικόνες 26,27). Επίσης, προκλήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA της *Lipin 1* και αύξηση των επιπέδων της *HIF-1α* και *Lipin 1* πρωτεΐνης (εικόνες 30,32). Αντίθετα, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, η υποξία δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα mRNA της *AGPAT 2* (εικόνα 31).

Σε δημοσιευμένες εργασίες έχει δείξει ότι, η υποξία προκαλεί την επαγωγή της πρωτεΐνης *Lipin 1*, που συνοδεύεται από συσσώρευση λιποσταγονοδίων σε καρκινικά κύτταρα *Huh7* και *HeLa*, αλλά και σε πρωτογενή *HBSMCs* (86), όπως παρατηρήσαμε και στην παρούσα εργασία. Η επαγωγή αυτή στα καρκινικά κύτταρα, μεσολαβείται από τον *HIF-1* και την αύξηση της μεταγραφής του mRNA της *Lipin 1* (86). Είναι πιθανόν ότι ο *HIF-1* είναι υπεύθυνος για την αύξηση της μεταγραφής του mRNA της *Lipin 1* και στα *HBSMCs* (εικόνα 30), αφού πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης δείχνουν ότι ο *HIF-1α* συνδέεται στον υποκινητή του γονιδίου της *Lipin 1* στα κύτταρα αυτά (48).

Εκτός από τη *Lipin 1*, ακόμη ένα ένζυμο του μονοπατιού βιοσύνθεσης λιπιδίων, η *AGPAT 2*, επάγεται από την υποξία σε κύτταρα *Huh7* (Τριανταφύλλου και συν., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλο ενδιαφέρον επειδή η *AGPAT 2*, το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του *PLA* σε *PA*, έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στον καρκίνο και η ανεπάρκεια του γονιδίου συνδέεται με την εμφάνιση λιπιδιστροφιών (87). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ευρήματα στα κύτταρα *Huh7*, η υποξία δεν προκάλεσε καμία επίδραση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου σε *HBSMCs*, υποδεικνύοντας ότι ίσως υπάρχουν διαφορές στη ρύθμιση της έκφρασης της *AGPAT 2* μεταξύ καρκινικών και πρωτογενών-φυσιολογικών κυττάρων.

Σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή του HIF-1, προκαλεί επαγωγή της FAS (88) και αναστολή της β - οξειδωσης (89), με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης λιπαρών οξέων στο κυτταρόπλασμα, σε επίπεδα που μπορεί να είναι τοξικά για τα κύτταρα. Ταυτόχρονα όμως, η επαγωγή της Lipin1 από τον HIF-1, προστατεύει το κύτταρο από την λιποτοξικότητα, μέσω της αποθήκευσης των λιπαρών οξέων σε λιποσταγονίδια (86). Επιπλέον έχειδειχθεί ότι σε κύτταρα HeLaM, η επαγωγή της Lipin1 και η συσσώρευση των λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας, οδηγούν σε αύξηση του πολλαπλασιασμού (85). Είναι λοιπόν πιθανόν, ότι η Lipin 1 και τα λιποσταγονίδια έχουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία, προστατεύοντας το κύτταρο από την απόπτωση, που μπορεί να προκληθεί από τη λιποτοξικότητα.

Όσον αφορά τη μελέτη της απόκρισης των ΛΜΚ των αεραγωγών σε συνθήκες φλεγμονής και υποξίας, ελέγχθηκε η έκφραση των γονιδίων μεσολαβητών φλεγμονής (IL-6 και IL-1 β), μεσολαβητών ίνωσης (TGF- β και PAI-1), δεικτών EMT (E - cadherin και FSP-1) και δεικτών ίνωσης (P4HA1-1 και P4HB).

Οι IL-6 και IL-1 β , είναι προ - φλεγμονώδεις κυτταροκίνες της έμφυτης ανοσία, εκφράζονται σε ΛΜΚ αεραγωγών (23), τα επίπεδα τους αυξάνονται σε ασθματικούς ασθενείς και η έκφραση τους επάγεται από τον TNF α (25). Η έκφραση της IL-6 επάγεται από τον TNF α σε HBSMCs, ενώ η υποξία δεν προκαλεί επίδραση στο mRNA της IL-6 (48). Αντίθετα, στα αρχικά πειράματα έλεγχου διαπιστώσαμε ότι δεν υπήρξε ικανοποιητική ενίσχυση του mRNA της IL-1 β (εικόνα 36), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ακαταλληλότητα των εκκινητές, αφού παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και ύστερα από τη χρήση τους σε δείγματα από κύτταρα Huh7.

Οι μεσολαβητές της ίνωσης αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης- β (transforming growth factor beta, TGF- β) και αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (plasminogen activator inhibitors - 1, PAI-1), συμβάλουν με διαφορετικό τρόπο στην παραγωγή συστατικών ECM. Ο TGF- β συμβάλλει στην διέγερση των ινοβλαστών και την παραγωγή συστατικών ECM προάγοντας την ίνωση, παράγεται και από κύτταρα των αεραγωγών. Επίσης, ο TGF- β αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ΛΜΚ των αεραγωγών και η έκφραση του σχετίζεται με το βαθμό της υπό - επιθηλιακής ίνωσης (90). Ο PAI-1 παράγεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως ενδοθηλικά κύτταρα αγγείων, λιποκύτταρα και ινοβλάστες. Είναι αναστολέας του ινωδολυτικού συστήματος και συγκεκριμένα αναστέλλει τον ιστικό ενεργοποιό παράγοντα (tPA - tissue plasminogen activator) και την ουροκινάση (uPA - urokinase type plasminogen activator), ένζυμα που μετατρέπουν το πλασμινογόνο σε πλασμίνη, προστατεύοντας από έκτοπη ινοδύλωση, με αποτέλεσμα η υπερέκφραση του PAI-1 να οδηγεί σε συσσώρευση κολλαγόνου, συμβάλλοντας στην ίνωση (91).

Παρατηρήσαμε ότι ο TGF- β αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας, ενώ ο TNF α προκαλεί μη στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφής του. Ομοίως, τα επίπεδα mRNA του PAI-1, που αποτελεί γνωστό γονίδιο – στόχο του HIF-1 α (92), αυξάνονται σε συνθήκες υποξίας(εικόνα 38). Αντίθετα ο TNF α δεν προκαλεί καμία επίδραση στο γονίδιο.

Η ειδική πρωτεΐνη των ινοβλαστών-1 (fibroblast specific protein – 1, FSP-1 ή S100A4) και η E-καντχερίνη (E – cadherin) χρησιμοποιείται ως δείκτης της EMT. Η FSP-1 είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που δεσμεύεται με το Ca²⁺, ρυθμίζει την αγγειογένεση, την επιβίωση και η λειτουργία της συνδέεται με την αυξημένη κυτταρική κινητικότητα προωθώντας άμεσα την έκφραση των MMPs, συμβάλλοντας στην ίνωση(93). Η E – cadherin χρησιμοποιείται ως δείκτης επιθηλιακού φαινοτύπου, εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα και συμβάλει στην σύνδεση των επιθηλιακών κυττάρων σφραγίζοντας τον βασηοπλευρικό μεσοκυττάριο χώρο. Όταν τα κύτταρα υπόκεινται σε EMT μειώνεται η έκφραση της E-cadherin και αυξάνεται η έκφραση του FSP-1.

Από τον έλεγχο των εκκινήτων, διαπιστώσαμε ότι η E-cadherin δεν έδωσε ικανοποιητικά επίπεδα ενίσχυσης σε αντιδράσεις RT-PCR (εικόνα 36). Οι συγκεκριμένοι εκκινήτες του γονιδίου έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε κύτταρα (Τριανταφύλλου & συν.). Είναι πιθανόν ότι ο επιθηλιακός δείκτης E – cadherin δεν εκφράζεται σε HBSMCs, τα οποία είναι κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης. Αντίθετα, η FSP-1 που είναι δείκτης μεσεγχυματικού φαινοτύπου, εκφράζεται στα ΛΜΚ των αεραγωγών. Παρατηρήσαμε ότι, η υποξία δεν προκαλεί καμία επίδραση στα επίπεδα mRNA του και ο TNF α μειώνει την μεταγραφή του (εικόνα 39). Άρα η έκφραση των δεικτών EMT δεν επηρεάζεται στα ΛΜΚ των αεραγωγών σε συνθήκες υποξίας, ενώ η επίδραση του TNF α ίσως να συνδέεται με την μείωση της έκφρασης γονιδίων που χαρακτηρίζουν το μεσεγχυματικό φαινότυπο των κυττάρων.

Οι προλυλ- υδροξυλάσες του προκολλαγόνου (C-P4Hs) είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με την απόθεση κολλαγόνου και την ίνωση. Είναι τετραμερή ένζυμα που αποτελούνται από δύο β υπομονάδες, που κωδικοποιούνται από το γονίδιο P4HB, και δύο α καταλυτικές υπομονάδες, που κωδικοποιούνται από το γονίδιο P4HA, το οποίο έχει τρεις ισομορφές (P4HA1, P4HA2 και P4HA3). Η υδροξυλίωση των προλινών του προκολλαγόνου είναι απαραίτητη για την σταθερότητα της τριπλής έλικας του κολλαγόνου (94). Από τη μελέτη των δεικτών της ίνωσης παρατηρήσαμε ότι η υποξία επάγει το P4HA 1-1, ενώ, ο TNF α δεν προκαλεί καμία επίδραση (εικόνα 40). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο P4HA 1-1 αποτελεί στόχο του HIF-1 α (92), ενώ από μελέτες σε κύτταρα του καρκίνου του μαστού έχει αποδειχθεί η επαγωγή του γονιδίου σε συνθήκες υποξίας, συνοδεύεται από αυξημένη εναπόθεση του κολλαγόνου. Επίσης, σε πρωτογενή ΛΜΚ αορτής επώαση 8ωρών παρουσία TNF α προκάλεσε μείωση των επιπέδων mRNA του P4HA-1 (95). Επίσης, η υποξία προκαλεί

αύξηση του mRNA του P4HB, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική, αντίθετα ο TNFα προκαλεί μείωση των επιπέδων mRNA του και ανταγωνίζεται την επίδραση της υποξίας (εικόνα 40).

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι, στα ΛΜΚ αεραγωγών η υποξία έχει διαφορετική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων (Lipin1 και AGPAT 2). Επίσης παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση του γονιδίου AGPAT2 μεταξύ των ΛΜΚ αεραγωγών και των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επίσης η υποξία αυξάνει την έκφραση των γονιδίων μεσολαβητών και δεικτών της ίνωσης που εξετάστηκαν, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση του δείκτη EMT FSP-1. Ο προφλεγμονώδης παράγοντας TNFα δεν προκάλεσε επαγωγή κανενός από τα γονίδια που εξετάστηκαν. Αντίθετα, μείωσε την έκφραση των γονιδίων FSP-1 και P4HB στη νορμοξία και ανταγωνίστηκε την επαγωγή τους από την υποξία. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι στα ΛΜΚ αεραγωγών η υποξία και ο TNFα έχουν διαφορετική, ή ακόμη και ανταγωνιστική επίδραση στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στη φλεγμονή και την ίνωση.

Βιβλιογραφία

1. Barrett KE, Boitano S, Barman SM, Brooks HL. Ganongs Review of Medical Physiology. 23th ed2010.
2. Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, Kuchmiy A, Lamkanfi M. Inflammasomes in respiratory disease: from bench to bedside. *Chest*. 2014;145(5):1121-33.
3. Hallstrand TS, Hackett TL, Altemeier WA, Matute-Bello G, Hansbroc PM, Knight DA. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clinical Immunology*. 2014;151:1-15.
4. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):183-92.
5. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7):1339-50.
6. Halayko AJ, Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2003;137(2-3):209-22.
7. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of Airway Remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026 – 32.
8. Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305:L912–L33.
9. Stamatiou R, Paraskeva E, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A. Cytokines and Growth Factors Promote Airway SmoothMuscle Cell Proliferation. *ISRN Inflammation*. 2012;2012:1-13.
10. Schuliga M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules*. 2015;5(3):1266-83.
11. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:1-16.
12. Damera G, Panettieri RA. Does airway smooth muscle express an inflammatory phenotype in asthma? 2011;163(1):68–80.
13. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *The European respiratory journal*. 2007;30(5):993-1013.
14. Amrani Y, Panettieri RA. Airway smooth muscle: contraction and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003;35:272–6.
15. Pelaia G, Renda T, Gallelli L, Vatrella A, Busceti MT, Agati S, et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. *Respiratory medicine*. 2008;102(8):1173-81.
16. Oliver BG, Black JL. Airway Smooth Muscle and Asthma. *Allergology International*. 2006;55(3):215-23.
17. Camoretti-Mercado B, Liu HW, Halayko AJ, Forsythe SM, Kyle JW, Li B, et al. Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(39):30387-93.
18. Hirota JA, Nguyen TTB, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: Phenotype plasticity and function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutic*. 2009;22:370–8.
19. Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(1):80-8.
20. Lazaar AL, Panettieri RA, Jr. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(3):488-95; quiz 96.
21. Papagianni M, Hatziefthimiou A, Chachami G, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA, Paraskeva E. Insulin causes a Transient Induction of Proliferation via Activation of the PI3K-

- Kinase Pathway in Airway Smooth Muscle Cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2007;115:118-23.
22. Damera G, Tliba O, Panettieri RA. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2009;22(5):353-9.
 23. Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri RA, Johnson M. Synthetic responses in airway smooth muscle. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(2 Suppl):S32-50.
 24. Oliver BG, Black JL. Airway Smooth Muscle and Asthma. *Allergology International*. 2006;55:215-23.
 25. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3546-56.
 26. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respiratory research*. 2006;7:125.
 27. Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(3):279-82.
 28. Amrani Y, Lazaar AL, Hoffman R, Amin K, Ousmer S, Panettieri RA. Activation of p55 Tumor Necrosis Factor- α Receptor-1 Coupled to Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 Stimulates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression by Modulating a Thapsigargin-Sensitive Pathway in Human Tracheal Smooth Muscle Cells. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;58:237-45.
 29. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296(5573):1634-5.
 30. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):49-62.
 31. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25(51):6717-30.
 32. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*. 2013;12:86.
 33. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. *The new england journal of medicine*. 2012;364:656-65.
 34. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *The Journal of Experimental Biology*. 2000;203:1253-63.
 35. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009;24:97-106.
 36. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010;2(3):336-61.
 37. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*. 2010;40(2):294-309.
 38. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews*. 2012;92(3):967-1003.
 39. Augstein A, Poitz DM, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH, Schmeisser A. Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3 α : inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(15):2627-42.
 40. Wolffa M, Jelkmanna W, Dunstb J, Deppinga R. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 β) is Influenced by Hypoxia and Hypoxia-Mimetics. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32:32:849-58.
 41. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70:1469-80.
 42. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.

43. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*. 2002;16(12):1466-71.
44. Shay JE, Celeste Simon M. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012;23(4):389-94.
45. Kuschel A, Simon P, Tug S. Functional regulation of HIF-1alpha under normoxia is there more than post-translational regulation? *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):514-24.
46. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008;453(7196):807-11.
47. Gorlach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *The Biochemical journal*. 2008;412(3):e17-9.
48. Tsapournioti S, Mylonis I, Hatziefthimiou A, Ioannou MG, Stamatiou R, Koukoulis GK, et al. TNFalpha induces expression of HIF-1alpha mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(8):1745-53.
49. Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2004;31(5):544-51.
50. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783:394-404.
51. Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1a, 2a and 3a). *Oncogene*. 2001;20:1435-44.
52. Chachami G, Paraskeva E, Mingot J-M, Braliou GG, Görlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1a into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;390:235-40.
53. Jeong J-W, Bae M-K, Ahn M-Y, Kim S-H, Sohn T-K, Bae M-H, et al. Regulation and Destabilization of HIF-1 α by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell*. 2002;111:709-20.
54. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent Nuclear Export Signal Mediates Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α by MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(41):27620-7.
55. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of cell science*. 2010;123:2976-86.
56. Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylates Hypoxia-Inducible Factor 1 and Mediates Its Destabilization in a VHL-Independent Manner. *Molecular and Cellular, Biology*. 2007;27(9):3253-65.
57. Baea SH, Jeonga JW, Parka JA, Kima SH, Baec MK, Choid SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1a stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324:394-400.
58. Sha Y, Marshall HE. S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820:701-11.
59. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, et al. Regulation of HIF-1 α Stability through S-nitrosylation. *Molecular Cell*. 2007;26(1):63-74.
60. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1K protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS letters*. 2003;549:105-9.
61. Yoon H, Lim JH, Cho CH, Huang LE, Park JW. CITED2 controls the hypoxic signaling by snatching p300 from the two distinct activation domains of HIF-1alpha. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(12):2008-16.

62. Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1755(2):107-20.
63. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(36):32405-8.
64. Jang MS, Park JE, Lee JA, Park SG, Myung PK, Lee DH, et al. Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(1):209-15.
65. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell cycle*. 2010;9(9):1722-8.
66. Doe MR, Ascano JM, Kaur M, Cole MD. Myc posttranscriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells. *Cancer research*. 2012;72(4):949-57.
67. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(1):9-22.
68. Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental cell research*. 2009;315(11):1791-7.
69. Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of Hypoxia-Inducible Factors During Inflammation. 2007;435:403-19.
70. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *International journal of hematology*. 2012;95(5):457-63.
71. Kim J-w, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3:177-85.
72. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801:209-14.
73. Liu Q, Siloto RM, Lehner R, Stone SJ, Weselake RJ. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Progress in lipid research*. 2012;51(4):350-77.
74. Harris TE, et al. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(1):277-86.
75. Harris TE, Finck BN. Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(6):226-33.
76. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell metabolism*. 2006;4(3):199-210.
77. Gomez-MuRoz A. Effects of akadaic acid on the activities of two distinct phosphatidate phosphohydrolases in rat hepatocytes. 1992.
78. Koh YK, Lee MY, Kim JW, Kim M, Moon JS, Lee YJ, et al. Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(50):34896-906.
79. Ishimoto K. Sterol-mediated Regulation of Human Lipin 1 Gene Expression in Hepatoblastoma Cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(33):22195-205.
80. Ryu D, Oh KJ, Jo HY, Hedrick S, Kim YN, Hwang YJ, et al. TORC2 regulates hepatic insulin signaling via a mammalian phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1. *Cell metabolism*. 2009;9(3):240-51.
81. Reue K, Zhang P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS letters*. 2008;582(1):90-6.
82. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E1195-E209.

83. Coleman R. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research*. 2004;43(2):134-76.
84. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*. 2001;2:282-6.
85. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniouoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cellular signalling*. 2015;27(6):1129-40.
86. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniouoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 14):3485-93.
87. Agarwal AK, Garg A. Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2003;14(5):214-21.
88. Huang D, Li T, Li X, Zhang L, Sun L, He X, et al. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell reports*. 2014;8(6):1930-42.
89. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer research*. 2008;68(4):1003-11.
90. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Current opinion in immunology*. 2007;19(6):676-80.
91. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):493-507.
92. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(10):721-32.
93. Boye K, Maelandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology*. 2010;176(2):528-35.
94. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(15):10819-29.
95. Zhang C, Zhang M-X, Shen YH, Burks JK, Zhang Y, Wang J, et al. TNF- α Suppresses Prolyl-4-Hydroxylase α 1 Expression via the ASK1-JNK-NonO Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1760-7.

