



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**«Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ
ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ: Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NPM1»**

υπό

ΚΡΕΟΝΤΑ ΚΟΥΚΟΥΛΑ

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2022

© 2022 ΚΡΕΩΝ ΚΟΥΚΟΥΛΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (9^η/16-03-2022 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** **Γεώργιος Σίμος**
Καθηγητής Βιοχημείας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Ηλίας Μυλωνής**
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Ευφροσύνη Παρασκευά**
Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** **Ελένη Γεωργιάτσου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** **Παναγιώτης Λιάκος**
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** **Γεωργία Χαχάμη**
Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **Αντώνιος Γιακουντής**
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με Επιβλέποντα τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο. Αισθάνομαι υποχρεωμένος απέναντι σε πολλούς ανθρώπους, που είχα την τύχη να με βοηθήσουν στην προσπάθεια μου να ολοκληρώσω αυτήν τη διατριβή, και χαίρομαι που μου δίνεται η ευκαιρία να τους ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα μου, και Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή κ. Γεώργιο Σίμο. Η αγάπη του για την έρευνα, η μεθοδικότητα και η εργατικότητα του αποτελούν έμπνευση για όλους τους επιστήμονες που τον γνωρίζουν. Ως υποψήφιος διδάκτορας εκτίμησα ιδιαίτερα τον αγώνα του για την δική μου πρόοδο και προσωπική ευημερία και για αυτό θα του είμαι πάντα υπόχρεος.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή, ο οποίος συνεπίβλεψε την παρούσα διατριβή, συνεισφέροντας στην οργάνωση, την διεξαγωγή και την παρουσίαση όλων των πειραμάτων. Η μεθοδικότητα, το ερευνητικό ένστικτο, η υπομονή και η αισιοδοξία του αποτέλεσαν την συνταγή της επιτυχίας για αυτήν την διατριβή.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας κα. Ευφροσύνη Παρασκευά που συμμετείχε στην τριμελή επιτροπή και είχε πάντα την προθυμία να συνεισφέρει στην ερευνητική μου μελέτη. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας, τα οποία μου έδωσαν απλόχερα τις συμβουλές και τις ιδέες τους και βοήθησαν στην εξέλιξη της έρευνας μου και την επαγγελματική μου πρόοδο. Παράλληλα, ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, αφιέρωσαν πολύτιμο χρόνο στην διόρθωση του κειμένου και της προφορικής παρουσίασης της διατριβής.

Στην πρόοδο της επιστημονικής μου μελέτης συνεισέφεραν ιδιαίτερα και εξωτερικοί συνεργάτες της ερευνητικής μας ομάδας και θα ήθελα να τους εκφράσω την εκτίμησή μου. Ο Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αντώνης Γιακουντής προσέφερε με θέρμη την επιστημονική του εμπειρία και εξειδίκευση για την βελτίωση της ερευνητικής μου εργασίας, ενώ δέχτηκε να συμμετάσχει στην επταμελή εξεταστική επιτροπή και τον ευχαριστώ ιδιαίτερος για την προσφορά του. Ακόμη, ευχαριστώ για την ερευνητική τους συνεισφορά τους επί σειρά ετών εξωτερικούς συνεργάτες του εργαστηρίου Βιοχημείας και ερευνητές του Αλέξανδρος Φλέμινγκ, κα. Μαρτίνα Σαμιωτάκη και κ. Γεώργιο Παναγιώτου.

Για όλες τις ωραίες ή δύσκολες στιγμές της καθημερινής ζωής που επιφυλάσσει η έρευνα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους με τους οποίους μοιράστηκα όλα αυτά τα χρόνια την ίδια αγωνία, την ίδια απογοήτευση, την ίδια χαρά. Ευχαριστώ λοιπόν, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδακτορικούς ερευνητές του εργαστηρίου Βιοχημείας και τους εύχομαι ότι καλύτερο στην επαγγελματική και προσωπική τους ζωή. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την δόκτορα Αγγελική Καραγιώτα, για την πρακτική προσφορά της στην εξέλιξη της παρούσας μελέτης, για την φιλία της, αλλά και επειδή αποτέλεσε για μένα ένα καθημερινό παράδειγμα-πρότυπο νέου ερευνητή.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω όλη την οικογένειά μου. Τους φίλους μου που μου στέκονται σαν αδέρφια και τον αδερφό μου που είναι ο καλύτερος φίλος μου. Την οικογένειά της συζύγου μου που με στηρίζουν καθημερινά και πλέον είναι δικοί μου άνθρωποι. Πάνω από όλα ευχαριστώ τους γονείς μου, Ιωάννη και Ζωή, για την ακλόνητη πίστη τους στις δικές μου δυνατότητες, την αμέριστη υποστήριξη και την απίστευτη αγάπη τους. Η οικογένειά αποτελεί την βάση για την ευτυχία κάθε ανθρώπου κι εγώ πετάω στα σύννεφα. Για αυτό, κορίτσι μου γλυκό σε ευχαριστώ, αυτό το αφιερώνω με όλη μου την αγάπη σε εσένα και στο αγόρι μας.

Κουκουλάς Κρέων

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Κρέων Κουκουλάς
Τηλέφωνο: +306977191832
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: kkoukoulas@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

11/2016 - σήμερα Διδακτορικό Δίπλωμα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Βιοχημείας
Τίτλος: «Η μελέτη της συνεισφοράς της υποξίας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, κάτω από τις συνθήκες στρες του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος: Ο ρόλος της πρωτεΐνης NPM1»

09/2015-10/2016 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Βιοχημείας
Τίτλος: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Βαθμός: 9,87 ΑΡΙΣΤΑ

09/2005-03/2014 Πτυχίο Βιολογίας

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Τμήμα Βιολογίας
Βαθμός: 6,58 Λίαν καλώς

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

01/2019-03/2022 Βιολόγος

ΕΛΚΕ, έργο 5821, ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
Τίτλος Έργου: Η ηπατιδίνη, κεντρικός ρυθμιστής της ομοιοστασίας του σιδήρου, ως βιοδείκτης διάγνωσης και μέσο εξατομικευμένης θεραπείας (BIOIRON)

10/2017-12/2017 Πωλητής Τηλεπικοινωνιών

MYRMIDONES, Τηλεπικοινωνίες

08/2009-12/2009 Τεχνική Υποστήριξη Τηλεπικοινωνιών

Οργανισμός Τηλεπικοινωνιών Ελλάδος

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Koukoulas K., Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, Mylonis I. ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Mol Oncol.* 2021 Dec;15(12):3468-3489. doi: 10.1002/1878-0261.13080.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Kreon Koukoulas, Antonis Giakountis, George Simos¹, Ilias Mylonis
2018, 69ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ο33

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

K. Koukoulas, G. Simos, I. Mylonis, A. Giakountis, M. Samiotaki, G. Panayotou
2019, 44ο Διεθνές συνέδριο FEBS (Federation of European Biochemistry Societies), P-35-024

K. Koukoulas, M. Samiotaki, G. Panagiotou, G. Simos, I. Mylonis
2016, 67ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, P32, p128

ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ

05/2014-02/2015

Ειδικότητα βοηθού μικροβιολογικού και βιοχημικού εργαστηρίου/ Εκπαίδευση νοσοκόμου τραυματιοφορέα.

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Πτυχίο Αγγλικής Γλώσσας:

University of Michigan, *Certificate of Proficiency in English*, 03/2004

Δίπλωμα Φλάουτου:

Κρατικό Ωδείο Θεσσαλονίκης, Βαθμός 9,75 Άριστα 07/2011.

Πιστοποιητικό επάρκειας γνώσης υπολογιστών

ECDL Progress Certificate, Syllabus Version: 4.0

**«Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ
ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ: Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NPM1»**

ΚΡΕΩΝ ΚΟΥΚΟΥΛΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Γεώργιος Σίμος** Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(Επιβλέπων)
2. **Ηλίας Μυλωνής** Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
3. **Ευφροσύνη Παρασκευά** Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η υποξία είναι μία χαρακτηριστική ιδιότητα των συμπαγών όγκων. Η απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από τα μέλη της οικογένειας μεταγραφικών ενεργοποιητών που είναι γνωστοί ως μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factors, HIFs). Οι HIFs δεσμεύονται σε περιοχές υποκινητών γονιδίων, πάνω σε στοιχεία γνωστά ως HREs (Hypoxia Response Elements) και ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων τα οποία συνεισφέρουν στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Ο HIF-1, το ευρύτερα μελετημένο μέλος της οικογένειας, είναι ετεροδιμερές της υπομονάδας HIF-1α που υπόκειται σε ρύθμιση από το οξυγόνο με αποτέλεσμα να αποικοδομείται σε φυσιολογικές συνθήκες (νορμοξία) και της υπομονάδας HIF-1β, γνωστής και ως ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), η οποία παρουσιάζει συνεχή έκφραση. Εκτός από την οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση, έχει δείχθει ότι η α υπομονάδα ρυθμίζεται και ανεξάρτητα από το οξυγόνο μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η παρούσα διατριβή εμβαθύνει στην ρύθμιση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2. Σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες του εργαστηρίου αποδείχθηκε πειραματικά ότι οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις σερίνες Ser 641/643 εντός μιας επικράτειας που ονομάστηκε ETD (ERK Targeted Domain) με αποτέλεσμα να αποκρύπτουν ένα παρακείμενο σήμα πυρηνικής εξαγωγής και να προωθούν την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Προκαταρκτικά πειράματα, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας του ΥΔ, έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πολυλειτουργική πρωτεΐνη NPM1 (νουκλεοφοσμίνη).

Στην παρούσα διατριβή δείχθηκε ότι οι HIF-1α και NPM1 αλληλεπιδρούν εντός των κυττάρων όταν οι ERK1/2 είναι ενεργές ή όταν η ETD φέρει την φωσφομιμητική μετάλλαξη SE (σερίνη 641 σε γλουταμινικό οξύ). Αποδείχθηκε πειραματικά ότι η σύνδεση των δυο πρωτεϊνών είναι

άμεση και ειδική για τον HIF-1α, χωρίς να παρατηρείται αντίστοιχη αλληλεπίδραση της NPM1 με τον HIF-2α, ενώ επιπρόσθετα αποκαλύφθηκε ότι η NPM1 δεσμεύεται ισχυρότερα με τον HIF-1α όταν είναι μέρος του ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT.

Επιπλέον, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξαν ότι η παρουσία της NPM1 σε περιοχές της χρωματίνης που γειτνιάζουν με λειτουργικά HREs είναι αναγκαία για την εξαρτώμενη από την φωσφορυλίωση σύνδεση του HIF-1 σε αυτά τα στοιχεία. Ακολούθως δείχθηκε ότι αυτός ο μηχανισμός έχει σημαντική επίδραση στην ενεργότητα του HIF-1. Αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 στην υποξία είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργοποίησης ενός τεχνητού υποκινητή που εξαρτάται από τον HIF-1, την μείωση της μεταγραφής γνωστών γονιδίων στόχων του HIF-1 και την μείωση της σύνδεσης του HIF-1 με στοιχεία της ενεργής χρωματίνης. Επιπρόσθετα σε αποτελέσματα αλληλούχισης RNA η αποσιώπηση σε συνθήκες υποξίας είτε της έκφρασης της NPM1 είτε εκείνης του HIF-1α είχε παρόμοιο αποτέλεσμα στην μεταγραφή σημαντικού αριθμού γονιδίων που ρυθμίζονται από την υποξία. Για το σύνολο των γονιδίων των οποίων η επαγωγή στην υποξία βασίζεται στην παρουσία και των 2 πρωτεϊνών δείχθηκε ότι σε ορισμένους καρκινικούς τύπους η έκφραση τους συσχετίζεται αφενός θετικά με την έκφραση των γονιδίων *NPM1*, *HIF1A* και γονιδίων που χαρακτηρίζουν την υποξία και αφετέρου αρνητικά με την επιβίωση των ασθενών. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα αποδείχθηκε πειραματικά ότι σε συνθήκες υποξίας η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 είχε ως αποτέλεσμα αφενός την μείωση του διαμεσολαβούμενου από τον HIF-1 επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου την αύξηση του κυτταρικού θανάτου λόγω απόπτωσης. Τα αποτελέσματα της διατριβής αποκαλύπτουν ένα νέο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης του HIF-1, η στόχευση του οποίου από την αντικαρκινική θεραπεία μπορεί να δώσει αξιόλογα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των συμπαγών όγκων.

Abstract

It is well-established that hypoxia is a distinguished feature of solid tumors. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) are a family of transcription factors that mediate the cellular response to hypoxic stress. HIF-1, the most studied member of HIFs, forms a functional heterodimer consisting of an oxygen-labile HIF-1 α subunit and a HIF-1 β subunit also known as ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), which exhibits stable expression. Despite the well-described oxygen-dependent regulation of HIF-1 α , there is evidence of its oxygen-independent control by various post-translational modifications. The present dissertation aims to further elucidate the regulation of HIF-1 α by ERK1/2 kinases. Previously published research established that ERK1/2 phosphorylate HIF-1 α at serines 641/643, in an area designated as ETD (ERK Targeted Domain), thus masking an adjacent nuclear export signal, and promoting the accumulation of HIF-1 α in the nucleus and the transcriptional activity of HIF-1 (Mylonis, 2008, JBC). Preliminary results from the Doctoral Candidate's Master thesis indicated that ERK-mediated phosphorylation regulates the interaction between HIF-1 α and the multifunctional protein NPM1 (nucleophosmin).

During this thesis it was shown that HIF-1 α and NPM1 associate within cancer cells when ERK1/2 are active or when the ETD carries the phosphomimetic SE mutation (serine 641 to glutamate). Furthermore, experiments showed that this interaction is both direct and specific for HIF-1 α , as no association between NPM1 and HIF-2 α was observed, while it was demonstrated that NPM1 favors interaction with HIF-1 α that is part of the HIF-1 α /ARNT heterodimer.

Moreover, chromatin immunoprecipitation experiments revealed that NPM1 is required for phosphorylation-dependent recruitment of HIF-1 to hypoxia response DNA elements. In concert, silencing of NPM1 expression diminished HIF-1 mediated transcription of hypoxia target genes and the activation of HIF-1 dependent synthetic promoter, while it also had a

negative impact on HIF-1 α association with elements of open chromatin. Transcriptome analysis revealed a significant number of hypoxia-related genes commonly regulated by NPM1 and HIF-1. Data mining at publicly available cancer patient databases revealed that this set of genes is enriched in cancer types along with NPM1 and HIF-1 α , and their expression exhibited significant negative correlation with patients' survival. Supporting these data, silencing of NPM1 expression under hypoxia inhibited HIF-1 mediated metabolic adaptation of cancer cells and triggered apoptosis and cell death. The described mechanism of ERK-mediated optimal activation of HIF-1 α its interaction with NPM1, which is essential for cancer cell survival under low oxygen, could provide a promising target for anticancer drug development.

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1	Εισαγωγή.....	15
1.1	Οι παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία των καρκινικών κυττάρων σε περιβάλλον συμπαγών όγκων.....	15
1.2	Υποξία και επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες.....	18
1.2.1	Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	20
1.2.2	Οι λειτουργικές επικράτειες των HIF.....	22
1.2.3	Λειτουργία των HIF.....	25
1.2.4	ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α.....	34
1.2.5	Η ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HIF-1 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....	55
1.3	Η Νουκλεοφοσμίνη (NPM1).....	62
1.3.1	Οι λειτουργικές επικράτειες της NPM1.....	63
1.3.2	Κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκεται η NPM1.....	68
1.3.3	Νουκλεοφοσμίνη και καρκίνος.....	77
Κεφάλαιο 2	Σκοπός.....	80
Κεφάλαιο 3	Υλικά και Μέθοδοι.....	81
3.1	Υλικά.....	81
3.1.1	Βακτηριακά στελέχη.....	81
3.1.2	Πλασμιδιακοί Φορείς.....	81
3.1.3	Ευκαρυωτικές καρκινικές σειρές.....	85
3.1.4	Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας.....	85
3.1.5	Εταιρείες προμήθειας χημικών αντιδραστηρίων και ενζύμων.....	86
3.1.6	Υλικά χρωματογραφίας.....	86
3.1.7	Ολιγονουκλεοτιδικό Εκκινητές.....	87
3.1.8	Αλληλουχίες μικρών παρεμβατικών μορίων RNA.....	88
3.1.9	Αντισώματα.....	89
3.2	Μέθοδοι.....	90
3.2.1	Επεξεργασία βακτηριακών στελεχών ώστε να καταστούν δεκτικά για μετασχηματισμό....	90
3.2.2	Μετασχηματισμός στελεχών <i>E.Coli</i> με εξωγενές πλασμίδιο.....	91
3.2.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation).....	92
3.2.4	Φασματοφωτομετρικός υπολογισμός συγκέντρωσης μακρομορίων.....	93
3.2.5	Ποιοτικός έλεγχος του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	95
3.2.6	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	95
3.2.7	Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα.....	96
3.2.8	Λύση βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος.....	97
3.2.9	Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας.....	98
3.2.10	Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.....	99
3.2.11	Κρυοσυντήρηση και απόψυξη καρκινικών σειρών.....	100
3.2.12	Συνθήκες σταθεροποίησης των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων HIF.....	101
3.2.13	Εκχύλιση πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα.....	101
3.2.14	Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE.....	102
3.2.15	Μονιμοποίηση και χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδιου.....	104
3.2.16	Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	104
3.2.17	Δοκιμή in vitro συγκατακρήμνισης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (In vitro pull-down assay).....	106
3.2.18	Δοκιμές in vitro αλληλεπίδρασης καθαρών πρωτεϊνών.....	107
3.2.19	Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με φορείς έκφρασης (DNA transfection) και μικρά παρεμβατικά RNA (siRNA transfection).....	109

3.2.20	Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1	112
3.2.21	Η μέθοδος της Ανοσοκατακρήμνισης	113
3.2.22	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για ενίσχυση τμημάτων γονιδιακών υποκινητών	118
3.2.23	Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα	119
3.2.24	Ανάστροφη μεταγραφή, RT-PCR	120
3.2.25	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qPCR).....	121
3.2.26	Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και ποσοτικός προσδιορισμός του συνεντοπισμού τους.....	123
3.2.27	Υποκυτταρικός εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός του σχηματισμού λιποσταγονιδίων	126
3.2.28	Χρωματομετρικός προσδιορισμός κυτταρικού θανάτου.....	127
3.2.29	Εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός διατάραξης της ασυμμετρίας της κυτταρικής μεμβράνης.....	128
3.2.30	Εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός θραύσεων της χρωματίνης	129
3.2.31	Ανάλυση Βάσεων δεδομένων γονιδιακής έκφρασης σε όγκους και κλινικής εικόνας καρκινοπαθών.....	130
Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα.....		131
4.1	Μελέτη και χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α	131
4.1.1	Υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών τμημάτων σε βακτηριακά κύτταρα <i>E. Coli</i> BL21 RIL	131
4.1.2	Μελέτη της <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πλήρους μεγέθους NPM1 B23.1, B23.2 με κυτταρικό HIF-1α	133
4.1.3	Μελέτη και χαρτογράφηση της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ ανασυνδυασμένων μορφών NPM1 και HIF-1α.....	134
4.2	Η αλληλεπίδραση NPM1/HIF-1α εντός των κυττάρων και ο ρόλος των ERK1/2 στην ρύθμιση της αλληλεπίδρασης.	139
4.2.1	Εντοπισμός των NPM1/HIF-1α εντός κυττάρων HeLa και επιβεβαίωση της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης τους σε συνθήκες που επιτρέπουν την ενεργοποίηση των ERK1/2.	139
4.3	Διερεύνηση της επίδρασης της NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα και τον μηχανισμό δράσης του HIF-1.	142
4.3.1	Μελέτη της συμβολής της NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1	142
4.3.2	Ο ρόλος της NPM1 στον μηχανισμό δράσης του HIF-1.....	145
4.3.3	Ο ρόλος της NPM1 στην μεταγραφική απόκριση σε συνθήκες υποξίας	153
4.4	Ο ρόλος του συμπλόκου HIF-1α/NPM1 στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας	158
4.4.1	Ο ρόλος της NPM1 στην μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.....	158
4.4.2	Ο ρόλος της NPM1 στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.....	159
4.4.3	Ο ρόλος της NPM1 και των γονιδίων που επάγει στην υποξία μαζί με τον HIF-1α, αναλύθηκε σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους.....	164
Κεφάλαιο 5 Συζήτηση.....		168
Κεφάλαιο 6 Σύνοψη		177
Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία		179

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1 Οι παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία των καρκινικών κυττάρων σε περιβάλλον συμπαγών όγκων

Η δημιουργία και η εξέλιξη των καρκινικών όγκων συνδέεται άρρηκτα και δυναμικά με το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται. Οι συνθήκες με τις οποίες έρχονται αντιμέτωπα τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται σημαντικά από οργανισμό σε οργανισμό, από τον τύπο και τη θέση του καρκίνου, αλλά και από το στάδιο της καρκινογένεσης. Ωστόσο ορισμένες από αυτές τις συνθήκες χαρακτηρίζουν τους περισσότερους καρκινικούς όγκους και καθορίζουν τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αγγειογένεση, την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση, την διήθηση και την μετάσταση, τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την διαφυγή από το ανοσοποιητικό και την αποφυγή της απόπτωσης (1):

➤ Γενωμική αστάθεια

Η συσσώρευση μεταλλάξεων αποτελεί κινητήριο μοχλό της καρκινογένεσης. Μπορεί να προέλθει από κληρονομικότητα, λάθη του μηχανισμού της αντιγραφής και του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, από την δράση ενδογενών μεταβολιτών, καθώς και από ένα ευρύ φάσμα ογκογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων, ενώ συνήθως ανατροφοδοτείται και εντείνεται μετά την εγκαθίδρυση των συμπαγών όγκων (2). Αν και δεν έχουν όλες οι μεταλλάξεις ογκογόνο δράση, σε όλους τους συμπαγείς όγκους παρατηρούνται μεταλλάξεις σε γονίδια κομβικά για την κυτταρική αύξηση και επιβίωση που μετά την απορρύθμιση τους χαρακτηρίζονται ως ογκογονίδια καθώς μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη των όγκων, μεταξύ των οποίων βρίσκονται τα *c-Ras*, *c-myc*, *EGFR* (3). Αντίστοιχα αποτελέσματα επιφέρουν και μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία φυσιολογικά προωθούν την παύση του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική απόπτωση όπως

αυτά που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb), την p53 και την PTEN (4). Παράλληλα, πολύ σημαντική παράμετρος είναι και η παρατηρούμενη απορρυθμισμό γονιδίων που ενώ δεν μπορούν να προκαλέσουν *de novo* καρκινογένεση, διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των καρκίνων (5). Τα τελευταία χρόνια φαίνεται ολοένα και περισσότερο ότι εκτός από την απορρυθμισμό γονιδίων μέσω μεταλλάξεων ένας καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των όγκων είναι και η επιγενετική τροποποίηση της χρωματίνης ώστε να επιτευχθεί επαγωγή ή αποσιώπηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (6).

➤ Επίδραση των κυττάρων του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος

Στο νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον τα καρκινικά κύτταρα γειτνιάζουν με υγιή κύτταρα που μπορεί να είναι ίδιας προέλευσης με τα γειτονικά νεοπλασματικά κύτταρα ή να ανήκουν σε άλλες κατηγορίες. Έτσι παρατηρούνται μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα στρώματος (MSCs), ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs), διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως T- και B- λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς (NK-cells), τα σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα (Tumor Associated Macrophages, TAMs), καθώς και αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα, ενώ, ταυτόχρονα παρεμβάλλονται κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων (4, 7). Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν σηματοδοτικά μόρια όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες που επηρεάζουν διάφορα στάδια της καρκινογένεσης (8-11). Επιπλέον, σε συνεργασία με σήματα προερχόμενα από τα καρκινικά κύτταρα επάγουν την τροποποίηση της μορφολογίας και της σύστασης της εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular Matrix, ECM) που προωθεί την ανάπτυξη, την εισβολή και την μετάσταση των καρκινικών όγκων (12-15).

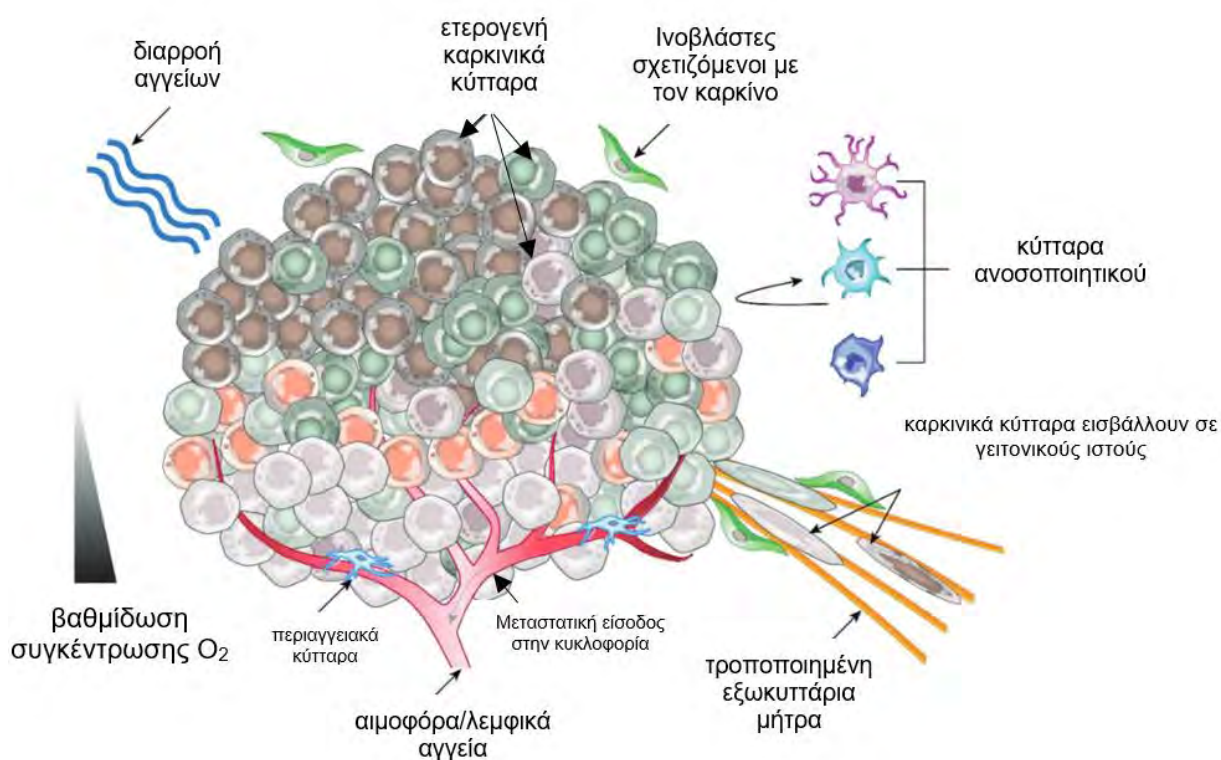
➤ Ελλιπής αγγείωση και νεοαγγειογένεση

Η θρέψη και οξυγόνωση κάθε ιστού βασίζεται στο κυκλοφορικό σύστημα. Στους καρκινικούς ιστούς ωστόσο, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα με αυξημένους μεταβολικούς

ρυθμούς, δημιουργώντας ένα έλλειμα σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Σε συνδυασμό με την απορρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων, οι παραπάνω συνθήκες πυροδοτούν την αγγειογένεση (16). Ωστόσο, η μορφολογία και κατανομή των νέων αγγείων σε συνδυασμό με την μηχανική πίεση από τον αυξανόμενο όγκο οδηγούν σε αναποτελεσματική δικτύωση και διάρρηξη των αγγείων (14). Έτσι, σε υποπεριοχές των συμπαγών όγκων δημιουργούνται και συντηρούνται βαθμίδωσεις οξυγόνου και θρεπτικών. Συγκεκριμένα η βαθμίδωση του οξυγόνου μπορεί να διαχωριστεί σε μια ζώνη επαρκούς οξυγόνωσης η οποία βρίσκεται κοντά στα αγγεία, η οποία ακολουθείται από μια περιοχή που χαρακτηρίζεται από υποξία δηλαδή έχει μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου και είναι πιθανό σε συμπαγείς όγκους να καταλήγει σε μια νεκρωτική ζώνη όπου παρατηρείται παντελής έλλειψη οξυγόνου, συνθήκη που χαρακτηρίζεται ως ανοξία. Η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον στρες για το κύτταρο. Ως πρώιμο στρες, λόγω της δυσλειτουργίας της αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, ενώ σε επόμενο στάδιο λόγω του καταβολισμού των προϊόντων της αυξημένης σε συνθήκες υποξίας γλυκόλυσης παρατηρείται απελευθέρωση πρωτονίων H^+ και οξίνιση του εξωκυττάριου pH (17). Ο παράγοντας υποξία, όπως ορίζεται η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου, είναι κομβικής σημασίας για την πορεία της ογκογένεσης καθώς τα στρες που υφίστανται τα κύτταρα εύλογα αναμένεται να οδηγούν σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και σε κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο έχειδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων με στόχο την αγγειογένεση, την προσαρμογή του μεταβολισμού και την αρνητική ρύθμιση της απόπτωσης. Μάλιστα σε επόμενο στάδιο προωθείται ολόκληρη η πορεία της ογκογένεσης και η μετάσταση, με αποτέλεσμα η παγίωση αυτών των συνθηκών στους καρκινικούς όγκους να σχετίζεται με κακή πρόβλεψη και αυξημένη ανθεκτικότητα σε θεραπείες (18, 19).

Η απόκριση των καρκινικών κυττάρων στον μεταβαλλόμενο συνδυασμό των περιβαλλοντικών παραγόντων καθορίζει την πορεία της καρκινογένεσης και για τον λόγο αυτό ένα μεγάλο μέρος της αντικαρκινικής έρευνας εστιάζει στην αποσαφήνιση τόσο των συνθηκών στρες όσο και των μηχανισμών που επιστρατεύουν τα καρκινικά κύτταρα για να προσαρμοστούν σε αυτά (20).

Στη παρούσα διατριβή διερευνήθηκε ο παράγοντας της υποξίας, η απόκριση μέσω της δράσης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 και η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 1 Διάφοροι παράγοντες καθορίζουν το μικροπεριβάλλον των συμπαγών όγκων και επιδρούν στην ανάπτυξη του όγκου, την μετάσταση, την διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα και την αντοχή σε θεραπευτικές μεθόδους. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ετερογένεια και επηρεάζονται από την συσσώρευση μεταλλάξεων, την ελλιπή αγγείωση, την αλληλεπίδραση με τα γειτονικά υγιή κύτταρα και την εξωκυττάρια μήτρα. Προσαρμογή από (20, 21).

1.2 Υποξία και επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες

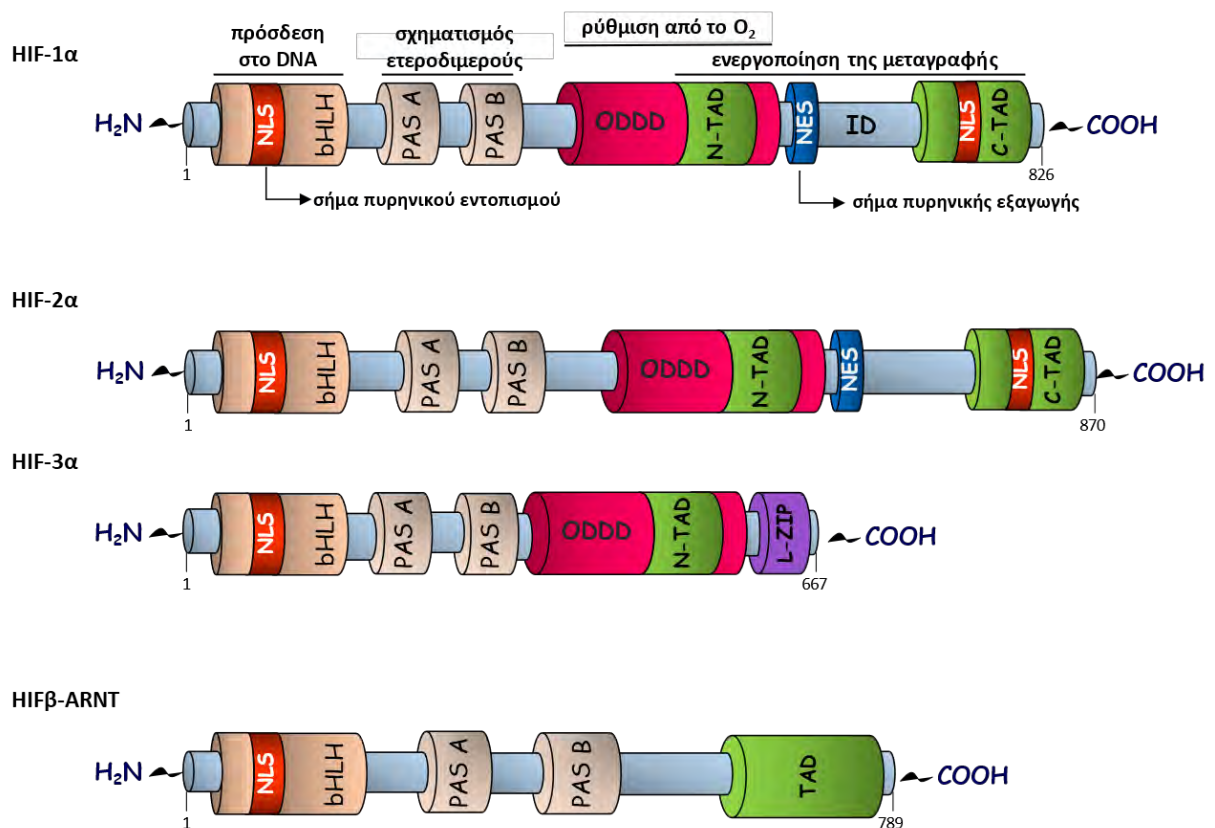
Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου σε επίπεδο οργανισμού, ιστού ή κυττάρου ορίζεται ως υποξία. Φυσιολογικά προκύπτει κατά την έντονη μυϊκή άσκηση και την διαβίωση σε μεγάλο

υπόμετρο, ενώ αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ερυθροποίηση, την εμβρυογένεση και την διατήρηση του δυναμικού των βλαστικών κυττάρων (22). Στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος οι απαιτήσεις σε οξυγόνο ποικίλουν και ανάλογα μεταβάλλεται η μερική πίεση οξυγόνου που επιτρέπει την φυσιολογική οξυγόνωση του κάθε ιστού (νορμοξία) και αντίστοιχα η οριακή συγκέντρωση οξυγόνου που τα διάφορα κύτταρα αναγνωρίζουν ως υποξική συνθήκη (23). Ωστόσο στο σύνολο των ιστών απαντώνται συντηρημένοι μηχανισμοί απόκρισης που αντιλαμβάνονται την μεταβολή των επιπέδων του διαθέσιμου οξυγόνου και δρουν ώστε να ανατρέψουν την νέα συνθήκη αλλά και να προσαρμόσουν σε αυτήν τις κυτταρικές λειτουργίες. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να αποτελούν άμεση απόκριση στο ερέθισμα της υποξίας, όπως είναι ορισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, η ενεργοποίηση ενζύμων και η απελευθέρωση ROS, ή να εξαρτώνται από την μεταγραφή και την μετάφραση (24, 25). Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors, HIFs) είναι οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Οι HIFs είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές. Σε συνθήκες υποξίας, σχηματίζουν λειτουργικά ετεροδιμερή εντός του πυρήνα τα οποία αλληλεπιδρούν με στοιχεία υποκινητών γνωστά ως HRE (Hypoxia Response Elements) ώστε να επάγουν την μεταγραφή ενός σημαντικού πλήθους γονιδίων από την RNA πολυμεράση II. Η δράση τους εμπλέκεται στην αγγειογένεση, την ερυθροποίηση και την προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

Η υποξία και οι HIF εκτός από τον σημαντικό τους ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι οι πνευμολογικές παθήσεις, η ισχαιμία, η φλεγμονή και ο καρκίνος (22). Ο ρόλος της υποξίας των συμπαγών όγκων στην αντίσταση των κυττάρων στις μεθόδους καρκινοθεραπείας δείχθηκε αρχικά για την ραδιοθεραπεία (26), (27) και στη συνέχεια την χημειοθεραπεία (28) καθώς τόσο η ιονίζουσα ακτινοβολία όσο και ορισμένα φάρμακα χρειάζονται το μοριακό οξυγόνο για να

έχουν κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Την τελευταία εικοσαετία η ανακάλυψη των HIF-1α (29, 30) και HIF-2α (31-34) και του ρόλου τους στην κυτταρική προσαρμογή αποτέλεσε συνδετικό κρίκο και πυροδότησε την εξέλιξη των αντικαρκινικών ερευνών (35). Οι HIF έχει αποδειχτεί ότι ενέχονται στην ανάπτυξη των υποξικών όγκων ρυθμίζοντας την αποφυγή της απόπτωσης, την προσαρμογή του μεταβολισμού, την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, την μετάσταση και την αντίσταση στην αντικαρκινική θεραπεία (22, 36). Η σπουδαιότητα των μηχανισμών κυτταρικής απόκρισης και προσαρμογής στην υποξία αποτυπώνεται με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής που απονεμήθηκε το 2019 στους πρωτοπόρους σε αυτό το πεδίο επιστήμονες William Kaelin Jr., Peter J. Ratcliffe και Gregg L. Semenza.

1.2.1 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF



Εικόνα 2 Οι δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF. Οι υπομονάδες των HIF μοιράζονται επικράτειες αλληλεπίδρασης με το DNA (bHLH), ετεροδιμερισμού (PAS) και μεταγραφικής ενεργοποίησης (TAD), ενώ φέρουν σήματα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS). Οι α υπομονάδες χαρακτηρίζονται από την επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODDD) ενώ οι HIF-1α και HIF-2α φέρουν δύο επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης (N-TAD/C-TAD) που χωρίζονται από μια ρυθμιστική επικράτεια (ID), εντός της οποίας έχει εντοπιστεί ένα σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES)

Οι HIF ανήκουν στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων bHLH/PAS η οποία χαρακτηρίζεται από μια βασική επικράτεια έλικας-στροφής-έλικας (basic Helix Loop Helix, bHLH) που χρησιμοποιείται για την πρόσδεση στο DNA και μια επικράτεια Per-ARNT-Sim (PAS) για τον σχηματισμό ετεροδιμερούς (Εικόνα 2). Το ετεροδιμερές του λειτουργικού HIF συνίσταται από μια HIF-α υπομονάδα που σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και μια HIF-β υπομονάδα που εκφράζεται συνεχώς. Στα κύτταρα των περισσότερων θηλαστικών απαντώνται τρεις διαφορετικές μορφές HIF-α υπομονάδας οι HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α καθεμία από τις οποίες έχει την ιδιότητα σχηματισμού ετεροδιμερούς με την ίδια HIF-β υπομονάδα που είναι γνωστή ως HIF-1β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator). Το γονίδιο *HIF1A* εκφράζει 3 ώριμα mRNA ως παράγωγα εναλλακτικού ματίσματος με την ισομορφή 1 να είναι η επικρατέστερη και να ορίζεται ως η κανονική μορφή HIF-1α (37). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς και έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την δομή, την λειτουργία και την ρύθμιση της καθώς συμμετέχει στην πλειονότητα των κυτταρικών διεργασιών που μεταβάλλονται σε συνθήκες υποξίας (38). Ο HIF-2α ή EPAS1 (Endothelial PAS domain protein 1) έχει μέγεθος 870 αμινοξέων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *EPAS1*. Η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει ιστοειδικότητα με υψηλότερη έκφραση στους ιστούς των πνευμόνων, του ήπατος, των νεφρών, της καρδιάς και του εγκεφάλου (32, 34). Ο HIF-3α ανιχνεύεται σε πολλές ισομορφές καθώς το mRNA του γονιδίου *HIF3A* αποτελεί αντικείμενο πολύπλοκου εναλλακτικού ματίσματος. Οι ισομορφές HIF-3α που προκύπτουν ποικίλουν σημαντικά σε δομή και λειτουργία ενώ παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση με τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α mRNA να έχουν ανιχνευθεί κυρίως στην καρδιά τους σκελετικούς μύες και τον πλακούντα και λιγότερο στους νεφρούς, το ήπαρ και τους πνεύμονες (39, 40). Ο HIF-β ή ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) είναι μια ευρέως εκφραζόμενη πρωτεΐνη αρχικά γνωστή για την αλληλεπίδραση του εντός του πυρήνα με τον υποδοχέα των αρυλο-

υδρογονανθράκων (AHR) (41), ωστόσο σύντομα αναγνωρίστηκε και ως η β υπομονάδα για τους HIF (30). Ο AHR είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που σχετίζεται με περιβαλλοντικούς ρύπους, ο οποίος μετά την δέσμευση του προσδέτη στο κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στον πυρήνα όπου χρειάζεται τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT ώστε να δεσμευτεί αποδοτικά σε υποκινητές γονιδίων και να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την απόκριση στους περιβαλλοντικούς ρύπους (42). Ανάλογα, όλες οι HIF-α πρωτεΐνες μετά την σταθεροποίηση τους σε συνθήκες υποξίας εισέρχονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με τον ARNT για να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση στην υποξία.

1.2.2 Οι λειτουργικές επικράτειες των HIF

➤ bHLH/PAS

Η δομή των μελών της οικογένειας των HIF χαρακτηρίζεται από υψηλή ομολογία ως προς την κατανομή και την σύσταση των διαφόρων λειτουργικών επικρατειών (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα, όλοι οι HIF-α και HIF-β ως μέλη της οικογένειας bHLH/PAS φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο επικράτειες βασικών αμινοξέων με βασική δομή έλικα-στροφή-έλικα (bHLH) για δέσμευση στο DNA αλλά και PER-ARNT-SIM (PAS) επικράτειες που ευθύνονται για την συγκρότηση του ετεροδιμερούς. Η δομή έλικα-στροφή-έλικα είναι η μια δομή που επιτελεί την πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA από τα βακτήρια έως τα θηλαστικά. Εξαιρετικά συντηρημένες σε όλους τους οργανισμούς είναι και οι επικράτειες PAS που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα σηματοδότησης ενώ στην περίπτωση που συνορεύουν με τις επικράτειες bHLH προσδίδουν την ιδιότητα ετεροδιμερισμού μεταξύ των διαφορετικών bHLH/PAS πρωτεϊνών. Αναμενόμενα, η αμινοξική αλληλουχία των bHLH/PAS επικρατειών είναι σημαντικά ομόλογη μεταξύ των διάφορων HIF-α ισομορφών του ανθρώπου. Συγκεκριμένα οι bHLH επικράτειες των HIF-1α και HIF-2α εμφανίζουν 85% ομολογία ενώ η αντίστοιχη επικράτεια του HIF-3α εμφανίζει 74% ομολογία με τις 2 πρώτες ισομορφές. Οι PAS

επικράτειες χωρίζονται σε δύο υποεπικράτειες PAS-A και PAS-B παρουσιάζουν συνολικά 70% ομολογία μεταξύ HIF-1α και HIF-2α, με τις αντίστοιχες επικράτειες του HIF-3α να είναι 57% ομόλογες με τον HIF-1α και 53% με τον HIF-2α (43, 44).

➤ ODDD

Καρβοξυτελικά των PAS επικρατειών στις HIF-α υπομονάδες εντοπίζεται η επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (Oxygen Dependent Degradation Domain, ODDD). Σε συνθήκες επαρκούς συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου συγκεκριμένα αμινοξέα προλίνης εντός της επικράτειας ODDD υδροξυλιώνονται από μια συντηρημένη οικογένεια προλυλο-υδροξυλασών (Prolyl-Hydroxylases, PHDs) και αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την αποικοδόμηση των HIF-α υπομονάδων (45). Στον HIF-1α η επικράτεια ODDD εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 401 και 603 με τις θέσεις υδροξυλίωσης να είναι οι Pro402 και Pro564. Στον HIF-2α η επικράτεια ODDD εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 401 και 565 και οι θέσεις υδροξυλίωσης βρίσκονται στην Pro405 και Pro531. Τα αμινοξέα που περιβάλλουν κάθε μια από τις θέσεις υδροξυλίωσης (30 αμινοξέα) είναι εξαιρετικά συντηρημένα σε HIF-1α και HIF-2α καθώς παρατηρείται 70% ομοιότητα (46). Η ισομορφή 1 του HIF-3α έχει μόνο μια θέση υδροξυλίωσης από τις PHDs στην Pro492 ενώ η ODDD απουσιάζει εντελώς από άλλες ισομορφές του HIF-3α οι οποίες δεν υπόκεινται σε ρύθμιση από το μοριακό οξυγόνο (47).

➤ TADs

Η ιδιότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής οφείλεται στις επικράτειες TADs (Transactivation Domains) που χωρίζονται στην αμινοτελική N-TAD (αμινοξέα 532–585 στον HIF-1α), η οποία εμφανίζεται αποκλειστικά στους HIF-α, όπου επικαλύπτεται με την ODDD, και την καρβοξυτελική C-TAD (αμινοξέα 776–826 στον HIF-1α) η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο των HIF-1/2α και HIF-β, ενώ απουσιάζει από τον HIF-3α στην ισομορφή 1 του οποίου εντοπίζεται καρβοξυτελικά ένα μοτίβο φερμουάρ λευκίνης. Ρυθμιστικό ρόλο για

την ενεργοποίηση της μεταγραφής παίζει η εγγενώς μη δομημένη επικράτεια που εκτείνεται μεταξύ των δύο TAD στους HIF-1/2α και είναι γνωστή ως Inhibitory Domain (ID) (48, 49). Μεταξύ HIF-1α και HIF-2α παρατηρείται 67% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία της C-TAD και αυτή η ομοιότητα επεκτείνεται και στον τρόπο λειτουργίας αυτών των επικρατειών καθώς αλληλεπιδρούν με τους ίδιους συμπαράγοντες της μεταγραφής ενώ ρυθμίζονται κατά παρόμοιο τρόπο από το οξυγόνο. Από την άλλη η αμινοτελική επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης N-TAD δρα ως επί το πλείστον συνεργατικά στην δραστηριότητα της C-TAD, ωστόσο ένα υποσύνολο ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-1 ή του HIF-2 βασίζονται στην N-TAD για την ενεργοποίηση της μεταγραφής τους. Επιπλέον φαίνεται ότι η N-TAD προσδίδει στους HIF-α την ειδίκευση ως προς τα διαφορετικά γονίδια στόχους καθώς έχει δειχθεί ότι αντικατάσταση της N-TAD του HIF-2α με εκείνη του HIF-1α είναι ικανή να προσδώσει στον HIF-2α την ιδιότητα ενεργοποίησης γονιδίων στόχων του HIF-1α, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν συμβαίνει με την αντικατάσταση των C-TAD (46).

➤ Σήματα Υποκυτταρικού Εντοπισμού

Για να εκδηλώσουν οι HIF την δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες, χρειάζεται οι HIF-α και HIF-β υπομονάδες να εισέλθουν στον πυρήνα. Ωστόσο, οποιαδήποτε πρωτεΐνη με μοριακό βάρος άνω των 40 kDa δεν μπορεί να διαχυθεί εντός και εκτός του πυρήνα καθώς η διέλευση της ελέγχεται από του πόρους του πυρηνικού φακέλου. Έτσι η μεταφορά συντελείται από μια ειδική οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται ιμπορτίνες οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) επάνω στις πρωτεΐνες-φορτία και τις μεταφέρουν μέσω των πυρηνικών πόρων καταναλώνοντας ενέργεια που προέρχεται από την υδρόλυση GTP. Ο HIF-1β εντοπίζεται διαρκώς στον πυρήνα καθώς ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο αμινοτελικό του άκρο αναγνωρίζεται από τις ιμπορτίνες α/β (50). Ένα διμερές καρβοξυτελικό σήμα πυρηνικού εντοπισμού, που αναγνωρίζεται από τις ιμπορτίνες α/β είναι συντηρημένο σε όλους τους HIF-α και έχει

χαρακτηριστεί ως λειτουργικό για τους HIF-1/2α του ανθρώπου (51, 52). Ωστόσο, για τον HIF-1α έχει δειχθεί ότι ένα νέο μη χαρακτηρισμένο σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης μπορεί να αλληλεπιδρά με τις ιμφορτίνες 4/7 παρέχοντας έτσι μια εναλλακτική οδό εισαγωγής του HIF-1α στον πυρήνα (53).

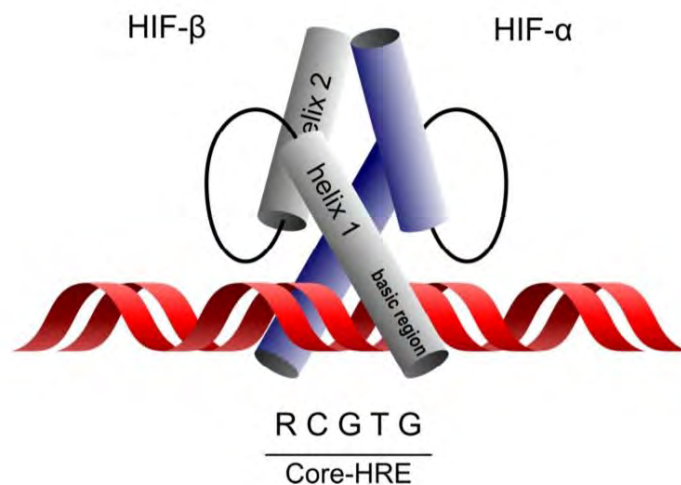
Σημαντική για την ρύθμιση της λειτουργίας των HIF είναι και η εξαγωγή της HIF-α υπομονάδας από τον πυρήνα. Η ενεργητική εξαγωγή των πρωτεϊνών από τον πυρήνα προϋποθέτει την δημιουργία ενός τριμερούς συμπλόκου που αποτελείται από την πρωτεΐνη-φορτίο, την Ran-GTP και μια εξαπορτίνη. Η κύρια εξαπορτίνη στα κύτταρα των θηλαστικών είναι η εξαπορτίνη 1, γνωστή και ως CRM1 (Chromosomal Maintenance 1). Σε δημοσιευμένες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν χαρακτηριστεί, εντός της επικράτειας ID των HIF-1α και HIF-2α, δύο διαφορετικής αλληλουχίας σήματα εξαγωγής από τον πυρήνα NES (Nuclear Export Signal). Αποδείχθηκε ότι τα σήματα αυτά αναγνωρίζονται από την εξαπορτίνη CRM1, καθώς επίδραση με τον αναστολέα της CRM1 λεπτομυκίνη B είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των HIF-1α και HIF-2α στον πυρήνα. Μάλιστα, όπως θα εξηγηθεί αναλυτικότερα στην συνέχεια, δείχθηκε και για τις δύο ισομορφές HIF-α ότι η αλληλεπίδραση με την CRM1 ρυθμίζεται αρνητικά από την φωσφορυλίωση των HIF-α από τις κινάσες ERK1/2, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απόκρυψη αυτών των NES και την συσσώρευση των HIF-α στον πυρήνα (54-56). Επιπλέον, βρέθηκε για τον HIF-1α ότι κατάργηση των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 προωθεί την εξαγωγή του από τον πυρήνα, μέσω της CRM1, και την αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη mortalín στα μιτοχόνδρια (57).

1.2.3 Λειτουργία των HIF

1.2.3.1 Η βάση της μεταγραφικής δράσης των HIF

Η κύρια λειτουργία των HIF είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που προωθούν

την κυτταρική απόκριση σε συνθήκες ελλιπούς συγκέντρωσης μοριακού οξυγόνου. Όπως περιγράφηκε, τα πρωταρχικά βήματα για την λειτουργία των HIF είναι η σταθεροποίηση της ρυθμιζόμενης από το οξυγόνο HIF-α υπομονάδας και η είσοδος της στον πυρήνα για τον ετεροδιμερισμό της με τον ARNT. Αφού δημιουργηθεί το ετεροδιμερές προσδένεται μέσω της βασικής δομής έλικας-στροφής-έλικας (bHLH) επάνω σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων όπου αναγνωρίζει αλληλουχίες που είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements, HRE) και έχουν στον πυρήνα τους συντηρημένη την νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'-RCGTG-3' όπου μια πουρίνη (R, αδενίνη ή γουανίνη) ακολουθείται από κυτοσίνη (C)-γουανίνη (G)-θυμίνη (T)-γουανίνη (G) (Εικόνα 3) (58). Τα HRE εντοπίζονται τόσο πάνω στους υποκινητές των γονιδίων κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής όσο και σε απόμακρες περιοχές ενισχυτών ανοδικά (προ του 5' άκρου) και καθοδικά (μετά το 3' άκρο) του γονιδίου.



Εικόνα 3 Η δομή έλικας-στροφής-έλικας (bHLH) των HIF με την οποία δεσμεύουν το DNA αναγνωρίζοντας το μοτίβο RCGTG στον πυρήνα των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (core-HRE) (58).

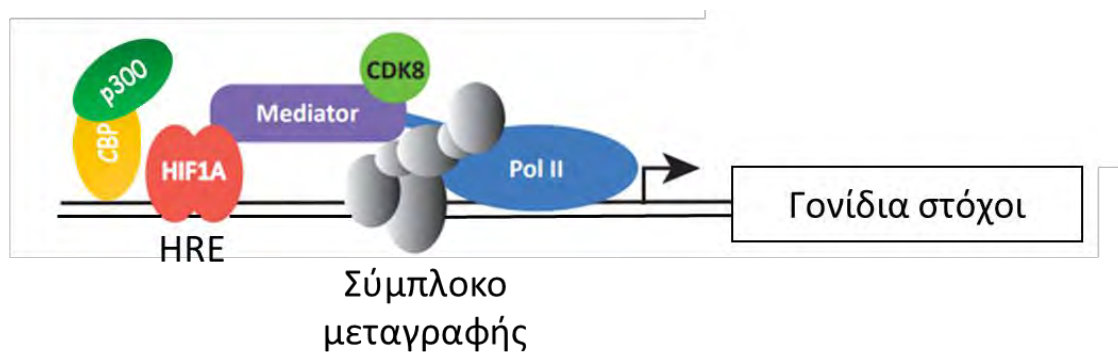
Στο γονιδίωμα των θηλαστικών η αλληλουχία του πυρήνα των HRE συναντάται πολύ πιο συχνά από τα πραγματικά λειτουργικά στοιχεία που δεσμεύονται από τους HIF. Οι παράγοντες που καθορίζουν την λειτουργικότητα ενός HRE δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο

είναι πιθανό να παίζουν ρόλο οι πλευρικές αλληλουχίες του HRE, η μετα-μεταφραστική τροποποίηση του πυρήνα των HRE, η ταυτόχρονη παρουσία παρακείμενων περιοχών δέσμευσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων αλλά και ο κυτταρικός τύπος. Εκατέρωθεν του συντηρημένου πυρήνα των HRE συναντώνται πλευρικές αλληλουχίες DNA η παρατηρούμενη ποικιλότητα των οποίων δεν είναι απαραίτητα τυχαία και μπορεί να συνδράμει στην ειδικότητα και την λειτουργικότητα του HRE (59). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η μεθυλίωση του πυρήνα του HRE στο δινοκλεοτίδιο -CG- από DNA μεθυλοτρανσφεράσες μπορεί να ακυρώσει την λειτουργικότητα του (60, 61). Αν και ο πυρήνας (core) HRE είναι η ελάχιστη αλληλουχία DNA που απαιτείται για την δέσμευση του HIF, δεν είναι από μόνο του αρκετό για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Συνήθως απαιτούνται και παρακείμενες αλληλουχίες όπου δεσμεύονται γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες που συνδράμουν έμμεσα ή άμεσα στην δράση του HIF, όπως έχειδειχθεί για τους CREB (cyclic AMP Response Element Binding protein) και ATF-1 (Activating Transcription Factor 1) (62, 63).

Ο βασικός μηχανισμός ενεργοποίησης της μεταγραφής από τους HIF περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής CBP (CREB Binding Protein) και p300 μέσω της C-TAD (64). Πρόκειται για δύο παράλογα με δράση ακετυλοτρανσφεράσας, που τροποποιώντας τις ιστόνες συνεισφέρουν στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης που είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής. Επιπρόσθετα, για την βέλτιστη λειτουργία των CBP/p300 είναι σημαντική η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση τους με πολλούς προσδεμένους στο DNA μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτό έχειδειχθεί για τους υποκινητές των γονιδίων των LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) και EPO (ερυθροποιητίνη) και την ενεργοποίησή τους από τους HIF, ATF-1 και CREB-1, αναδεικνύοντας τους CBP/p300 ως τον συνδετικό κρίκο που ευθύνεται για την συνέργεια των τριών αυτών μεταγραφικών παραγόντων (64).

Επιπλέον την τελευταία δεκαετία πλήθος ερευνητικών μελετών συνδέουν την ρυθμιζόμενη από τους HIF απόκριση του μεταγραφώματος στην υποξία με περιοχές χρωματίνης που είναι

«ανοιχτές» για μεταγραφή, δηλαδή χωρίς μεγάλη συσπείρωση του DNA στα νουκλεοσώματα (65), ενώ έχει προταθεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες ότι φέρουν προεγκατεστημένη την RNA πολυμεράση II που βρίσκεται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής ενεργή αλλά σε παύση. Μάλιστα έχει αποδειχθεί η ανάγκη για δέσμευση του συμπλόκου Mediator/CDK8 που αφενός διαμεσολαβεί για την αλληλεπίδραση των στοιχείων υποκινητή με στοιχεία ενισχυτών και αφετέρου μέσω της ενεργότητας της κινάσης CDK8 πυροδοτεί την αποδέσμευση της RNA πολυμεράσης II και την έναρξη της φάσης επιμήκυνσης της μεταγραφής, ενώ η πρόσδεση του HIF-1 έχει προταθεί ότι προωθεί την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση της CDK8 με την RNApolIII (66-69).



Εικόνα 4 Μοντέλο δράσης του HIF-1. Ο HIF-1 αλληλεπιδρά με τις ακετυλάσες CBP/p300 και προσδένεται σε HRE που βρίσκονται σε ανοιχτές περιοχές της χρωματίνης με προεγκατεστημένη RNApol2. Η πρωτεΐνη MEDIATOR συνεισφέρει στην αναδίπλωση της χρωματίνης και μετά την αλληλεπίδραση με τον HIF-1 επιτρέπει την αποδέσμευση της RNApol2 και την έναρξη της φάσης επιμήκυνσης της μεταγραφής. Προσαρμογή εικόνας από (70).

1.2.3.2 Διαφοροποίηση στην έκφραση και δράση των HIF-1 και HIF-2

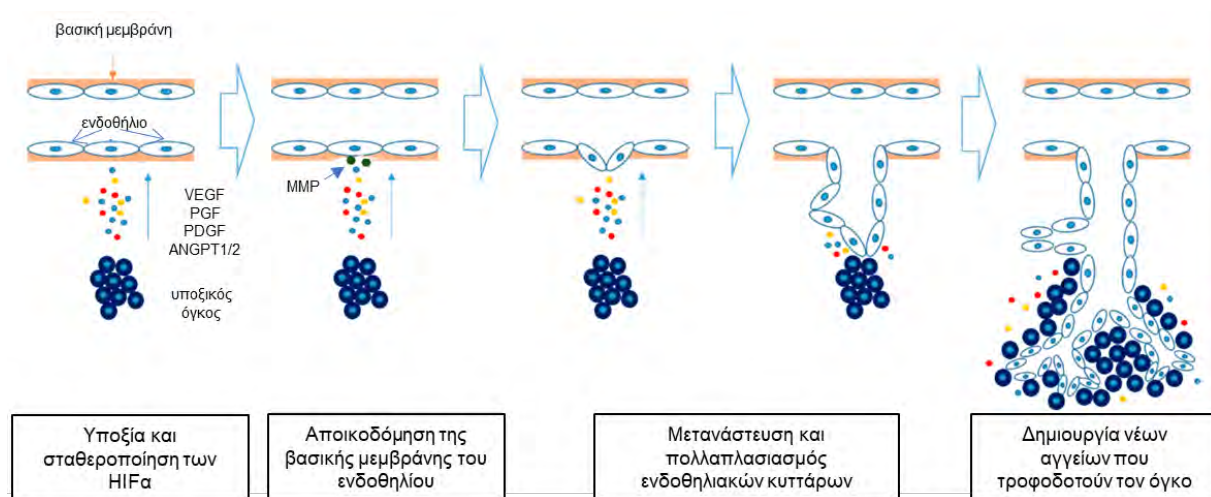
Παρά τις ομοιότητες στην δομή της HIF-α υπομονάδας και στον τρόπο λειτουργίας τους οι HIF-1 και HIF-2 μπορούν να επιτελούν διακριτούς ρόλους στην διαδικασία της προσαρμογής στην υποξία. Σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση μεταξύ HIF-1 και HIF-2 παίζει ο ιστός και ο κυτταρικός τύπος όπου έχει επιτευχθεί σταθεροποίηση της έκφρασης των HIF-α. *In situ* μελέτες έδειξαν ότι το mRNA του HIF-1α εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς (71). Από την άλλη η HIF-2α υπομονάδα παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση και το mRNA της σε φυσιολογικούς ιστούς εντοπίστηκε αρχικά στο ενδοθήλιο των πνευμόνων, το ήπατος, των

νεφρών και του εγκεφάλου. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίστηκε ως EPAS-1 (Endothelial PAS domain protein-1) και θεωρήθηκε ως παράγοντας που συμμετέχει στην προσαρμογή των ιστών του συστήματος αγγείων στην υποξία (31, 34). Ωστόσο, έχει δειχθεί με μελέτες έκφρασης mRNA και ανοσοϊστοχημείας ότι στα πλαίσια του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος μπορεί να εκφράζεται και σε άλλους ιστούς που δεν σχετίζονται με το σύστημα αγγείων ή και γενικότερα του ενδοθηλίου όπως τα παρεγχυματικά ή μη κύτταρα του ήπατος, ο εγκεφαλικός γαγγλιακός ιστός, αλλά και σε μακροφάγα που σχετίζονται με τους όγκους (Tumor Associated Macrophages) (72-74). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος που έδειξαν ότι αποσιώπηση της έκφρασης είτε του HIF-1α είτε του HIF-2α έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της άλλης μορφής. Μάλιστα η παρατηρούμενη υπερέκφραση της κάθε μορφής HIF-α είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων είτε μέσω αποφυγής της απόπτωσης, είτε μέσω επαγωγής της αυτοφαγίας αντίστοιχα (75).

Ο HIF-1 ανακαλύφθηκε αρχικά το 1991 ως μεταγραφικός παράγοντας που, σε συνθήκες υποξίας, προσδένεται σε περιοχές του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) (76). Πρόκειται για μια ορμόνη που, εκκρινόμενη κυρίως από τους νεφρούς και δευτερευόντως από το ήπαρ, επάγει την ερυθροποίηση από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού, ενώ δρα ως κυτταροπροστατευτικό σηματοδοτικό μόριο και σε άλλους ιστούς των θηλαστικών σε εμβρυική και ώριμη ηλικία (77). Μελέτες σε πειραματόζωα με γονιδιακές μεταλλάξεις που επάγουν ή καταστέλλουν την έκφραση είτε του HIF-1 είτε του HIF-2 έδειξαν ότι η ερυθροποίηση *in vivo* και ειδικότερα η EPO ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο ή και αποκλειστικά από τον HIF-2 και όχι από τον HIF-1 (78, 79), αν και συγχρόνως άλλη μελέτη πρότεινε ότι σε ήπια υποξία (12% O₂) στους νεφρούς η έκφραση της EPO στην υποξία ρυθμίζεται και από τους δύο HIF ενώ στον εγκέφαλο ρυθμίζεται κυρίως από τον HIF-2 (80). Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι

δύο αυτές ισομορφές HIF έχουν πλήθος κοινών αλλά και αποκλειστικών γονιδίων στόχων που κατηγοριοποιούνται οντολογικά σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες.

Ο HIF-1 και περισσότερο ο HIF-2 εμπλέκονται σημαντικά εκτός από την ερυθροποίηση και στην αγγειογένεση με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την επαγωγή του γονιδίου του παράγοντα αύξησης του ενδοθηλίου των αγγείων (Vascular Endothelium Growth Factor, VEGF) (81, 82). Η οικογένεια των VEGF στον άνθρωπο αποτελείται από 5 μέλη τους VEGF-A/B και PGF (Placental Growth Factor), που με κυριότερο τον VEGFA επάγουν την δημιουργία αιμοφόρων αγγείων και τους VEGF-C/D που επάγουν τον σχηματισμό των λεμφαγγείων (83). Σημαντικά γονίδια που επάγονται από τους HIFs και ρυθμίζουν την αγγειογένεση κωδικοποιούν για τον προερχόμενο από αιμοπετάλια παράγοντα αύξησης (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) και την αγγειοποιητίνη 1/2 (ANGPT1/2), καθώς και για πρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας (MMPs) που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου (Εικόνα 5) (84-88).

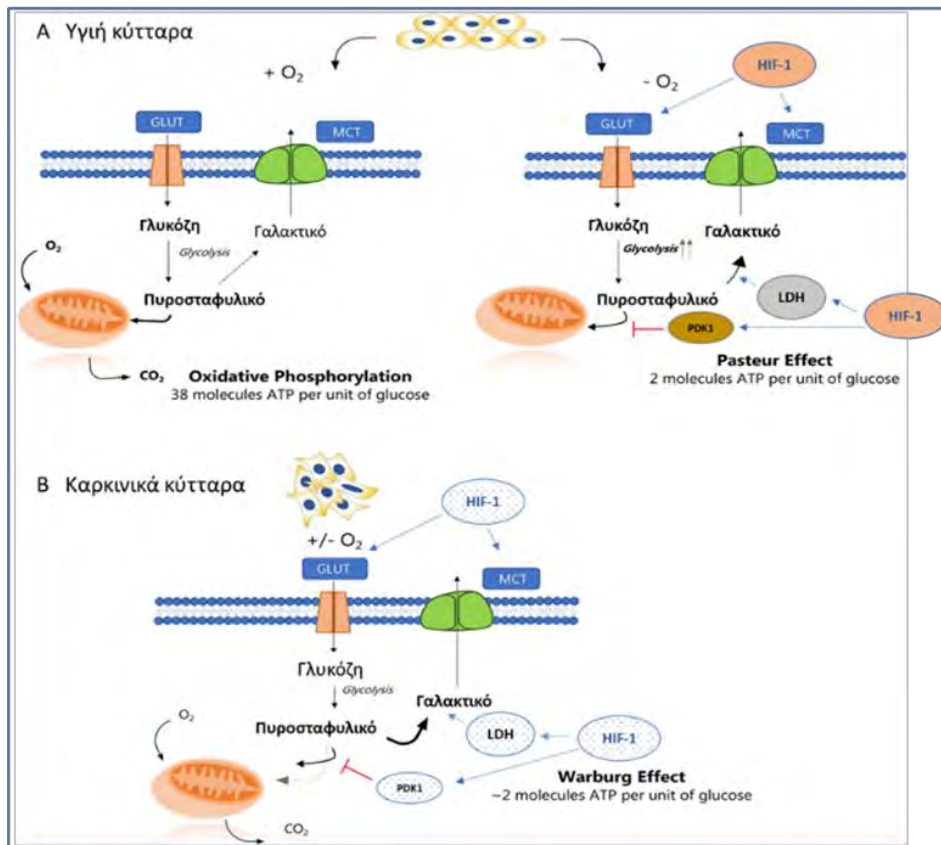
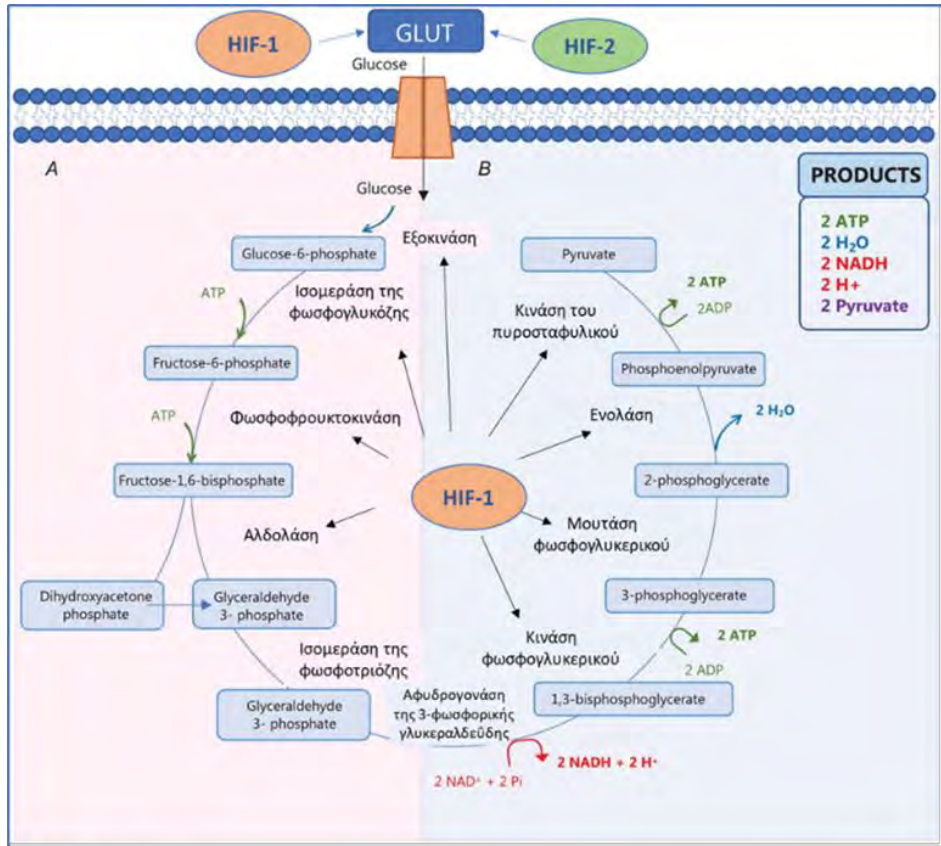


Εικόνα 5 Η σταθεροποίηση των HIF-α υπομονάδων σε συνθήκες υποξίας που χαρακτηρίζουν τους συμπαγείς όγκους οδηγεί στην συνεχή παραγωγή αγγειογεννητικών παραγόντων (VEGF, PGF, PDGF κ.α.) και μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (MMP), με αποτέλεσμα την προώθηση της αγγειογένεσης. Προσαρμογή εικόνας από (88).

Από την άλλη σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου είναι ζωτικής σημασίας για κάθε κύτταρο η προσαρμογή του μεταβολισμού, που περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο τη

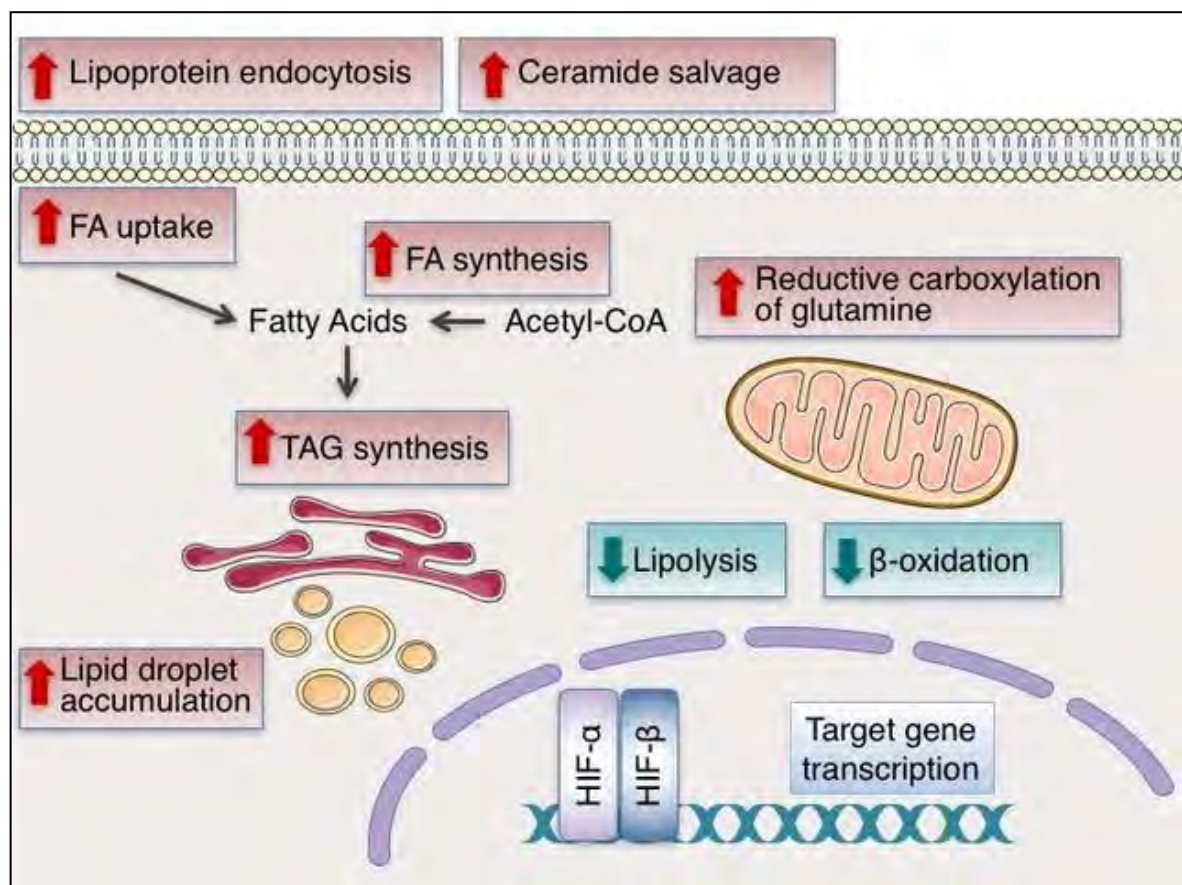
μετατόπιση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς την αναερόβια γλυκόλυση, ενώ ταυτόχρονα σταματάει η αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων μέσω β-οξείδωσης και επάγεται η συσσώρευση τους σε λιποσταγονίδια. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου τα κύτταρα εξασφαλίζουν την απαιτούμενη για την λειτουργία τους ενέργεια κυρίως μέσα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ωστόσο σε συνθήκες υποξίας ευνοείται το μονοπάτι της γλυκόλυσης. Αυτή η μετάβαση παρατηρήθηκε αρχικά στους αναερόβιους μικροοργανισμούς από τον Luis Pasteur, ωστόσο αργότερα αποδείχθηκε ότι σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να ευνοείται η γλυκόλυση ανεξάρτητα από τα διαθέσιμα επίπεδα οξυγόνου λόγω των ενδιάμεσων προϊόντων που χρειάζονται για την κυτταρική αύξηση και το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως Warburg effect, από το όνομα του επιστήμονα που το ανακάλυψε (89) (Εικόνα 6, κάτω).

Ο HIF-1 ευνοεί την γλυκόλυση επάγοντας την έκφραση του μονομεταφορέα γλυκόζης GLUT1, ο οποίος αυξάνει σημαντικά την πρόσληψη της γλυκόζης από την κυκλοφορία. Επιπλέον δεσμεύεται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων και επάγει την έκφραση των ενζύμων που δρουν σε κάθε στάδιο της γλυκόλυσης (εξωκινάση HK-2, φωσφοφρουκτοκινάση PFK1, αλδολάση ALDO(A,C), κινάση του φωσφογλυκερινικού PGK, μούτάση του φωσφογλυκερινικού PGM, ενολάση ENO1, κινάση του πυροσταφυλικού PKM2) (90, 91) (Εικόνα 6, επάνω). Ταυτόχρονα, επάγοντας την έκφραση της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDK1), ο HIF-1 αναστέλλει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-συνένζυμο A (acetyl-coA) που τροφοδοτεί τον κύκλο του Krebs (92). Αντίθετα επάγει την έκφραση αφενός της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), η οποία καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ, και αφετέρου του μεταφορέα μονοκαρβοξυλικών οξέων (MCT4), ο οποίος εξάγει μέρος του γαλακτικού οξέος από το κύτταρο. (Εικόνα 6, κάτω) (93).



Εικόνα 6 Πάνω: Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός της γλυκόζης στα υποξικά κύτταρα επάγονται από την μεταγραφική δράση του HIF-1. Κάτω: Σε υγιή κύτταρα (A) και συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (Pasteur Effect) και σε καρκινικά κύτταρα (B) ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Warburg Effect), προωθείται η γλυκόλυση και η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό. Προσαρμογή εικόνας από (91).

Η εμπλοκή του HIF-1 στην προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού σε συνθήκες υποξίας αφορά σε μεγάλο βαθμό και τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, ενώ έχει δειχθεί ότι και οι δύο HIF- α ισομορφές συντελούν στην συσσώρευση λίπους σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα HEPG2 μέσω αναστολής της β -οξειδωσης (94), πλήθος μελετών δείχνουν ότι γονίδια στόχοι του HIF-1 κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και ένζυμα που αναστέλλουν την λιπόλυση (95), επάγουν την πρόσληψη (96), (97) και την *de novo* σύνθεση των λιπαρών οξέων (98), την ενζυμική μετατροπή τους σε τριακυλογλυκερόλες (AGPAT2, Lipin-1) (99), (100) και την σύνθεση των μεμβρανών των λιποσταγονιδίων (101, 102), όπου γίνεται η τελική αποθήκευση. Έτσι το κύτταρο αποφεύγει τον κίνδυνο λιποτοξικότητας από την συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων και αποθηκεύει σημαντικά ενεργειακά αποθέματα έως ότου καταστεί ξανά δυνατή η ενεργειακή τους αξιοποίηση μέσω της β -οξειδωσης (103) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 Η δράση των HIF σε συνθήκες υποξίας προωθεί την λιπογένεση επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ενδοκύτωση λιποπρωτεϊνών και την πρόσληψη λιπαρών οξέων, την σύνθεση των τριακυλογλυκερολών

και τον σχηματισμό λιποσταγονιδίων, τον αναγωγικό μεταβολισμό της γλουταμίνης και την συντήρηση της *de novo* σύνθεσης λιπαρών οξέων. (103).

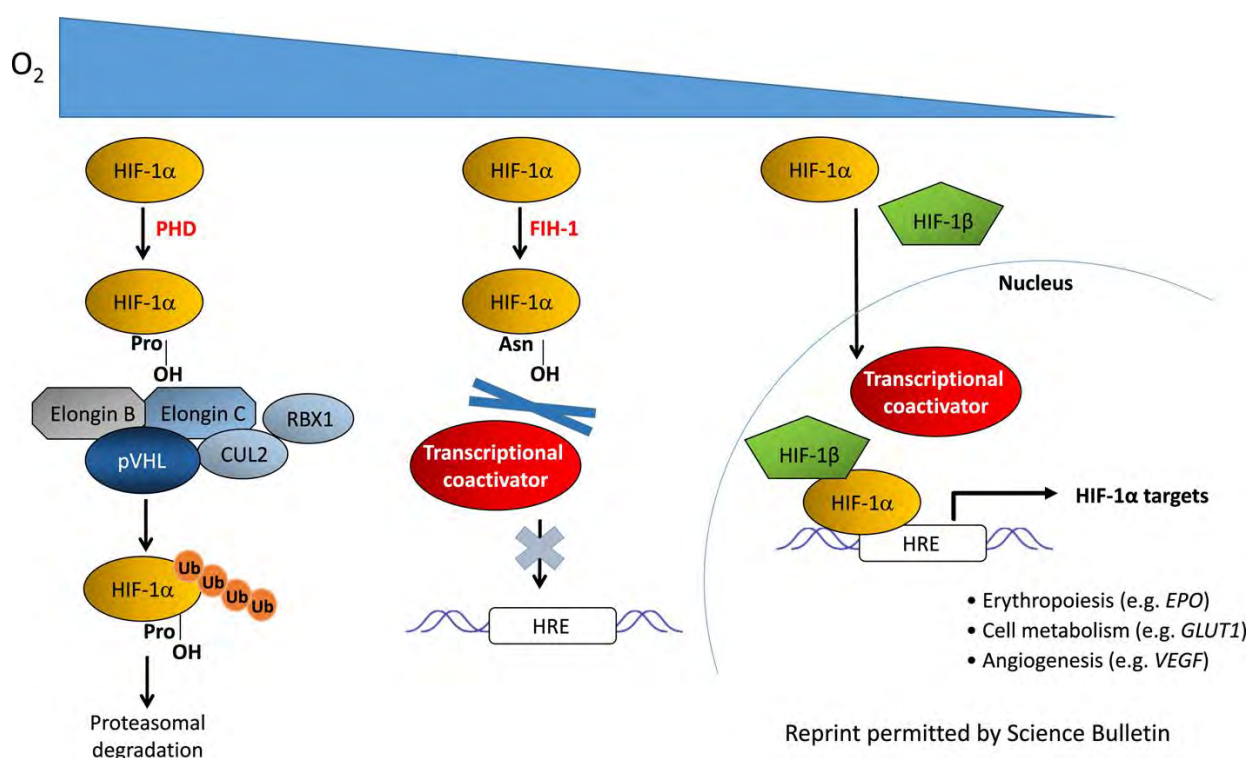
Επιπλέον και οι δύο ισομορφές HIF-α είναι απαραίτητες για την διατήρηση της βλαστικότητας και την φυσιολογική εμβρυογένεση που λαμβάνει χώρα σε ένα φυσιολογικά υποξικό περιβάλλον. Γονίδια που ελέγχουν την διατήρηση της βλαστικότητας των εμβρυικών βλαστοκυττάρων όπως τα *NANOG*, *SOX2* και *OCT4* βρέθηκε ότι σε συνθήκες 6% O₂ ελέγχονται κατά κύριο λόγο από τον HIF-2, ενώ η έκφραση του HIF-1α ήταν παροδική (104). Ωστόσο, μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι απώλεια της έκφρασης του HIF-1α οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο είτε, λόγω καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών (105) είτε λόγω μειωμένης γλυκολυτικής ικανότητας (106), ενώ απώλεια του HIF-2α έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο του 50% των εμβρύων λόγω δυσλειτουργίας των πνευμόνων και αυξημένη θνησιμότητα νεογνών (107, 108).

1.2.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

Η ρύθμιση της HIFα υπομονάδας είναι συνεχής και πολυδιάστατη σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών γεγονός που φανερώνει την σημαντική συνεισφορά του HIF-1 στην κυτταρική ομοιοστασία. Διακριτοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την μεταγραφή και την μετάφραση του *HIF1A* γονιδίου, ενώ μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ελέγχουν την σταθερότητα τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT και την μεταγραφική δραστηριότητα της HIFα υπομονάδας. Η διαθεσιμότητα του οξυγόνου παίζει τον πρωταγωνιστικό ρόλο στους μηχανισμούς ρύθμισης, ωστόσο πλήθος αυτών δρουν ανεξάρτητα από την συγκεκριμένη παράμετρο. Επιπλέον, παρόλο που η έκφραση του HIF-1α είναι σχεδόν καθολική για τους διάφορους ιστούς κάποιοι από τους μηχανισμούς ρύθμισης χαρακτηρίζονται από ειδικότητα ως προς τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο.

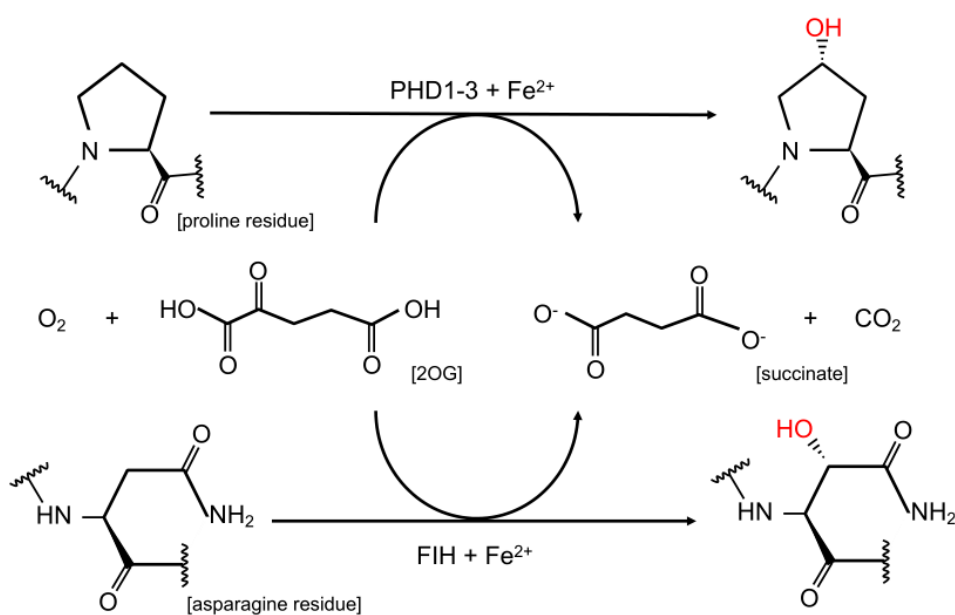
1.2.4.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της α υπομονάδας των HIF

Η κυριότερη ρύθμιση των HIF-α λαμβάνει χώρα σε συνθήκες επαρκούς συγκέντρωσης οξυγόνου και οδηγεί αφενός στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση του και αφετέρου στην μείωση της δραστηριότητας του. Το εναρκτήριο βήμα για την αποικοδόμηση των HIF-α υπομονάδων αποτελεί η υδροξυλίωση τους από τις υδροξυλάσες προλίνης PHD1-3 (Prolyl Hydroxylase Domain proteins 1-3) σε προλίνες που βρίσκονται εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (P402 και P564 στον HIF-1α/ P405 και P531 στον HIF-2α). Στην συνέχεια οι υδροξυλιωμένοι HIF-α αναγνωρίζονται και δεσμεύεται από το σύμπλοκο pVHL (Von Hippel Lindau) που έχει ιδιότητα E3 λιγάσης ουβικιτίνης και πολυουβικιτινώνει τους HIF-α οδηγώντας τους προς αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα. Εκτός από την pVHL μέλη του συμπλόκου είναι οι παράγοντες Elongin B και Elongin C, η πρωτεΐνη ικριώματος cullin 2, και η RBX1 (Ring Box Protein 1) (109) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Η οξυγονοεξαρτώμενη υδροξυλίωση των HIF-α από τις PHD και τον FIH ρυθμίζει την σταθερότητα και την δραστηριότητα της HIF-α υπομονάδας (109).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των HIF-α παρουσία οξυγόνου βασίζεται στην δράση μιας ακόμα υδροξυλάσης που όπως και οι PHDs χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο ως συν-υπόστρωμα. Ο παράγοντας που αναστέλλει τον HIF (FIH, Factor Inhibiting HIF) μεταφέρει ένα υδροξύλιο στην ασπαραγίνη του καρβοξυτελικού άκρου των HIF-α, εντός της επικράτειας C-TAD (Asn 803 στον HIF-1α ή Asn 851 στον HIF-2α) και αποτρέπει κατ' αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής CBP/p300 που είναι καθοριστικής σημασίας για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τους HIF (βλ. παρ. [1.2.3.1](#)) (Εικόνα 8).

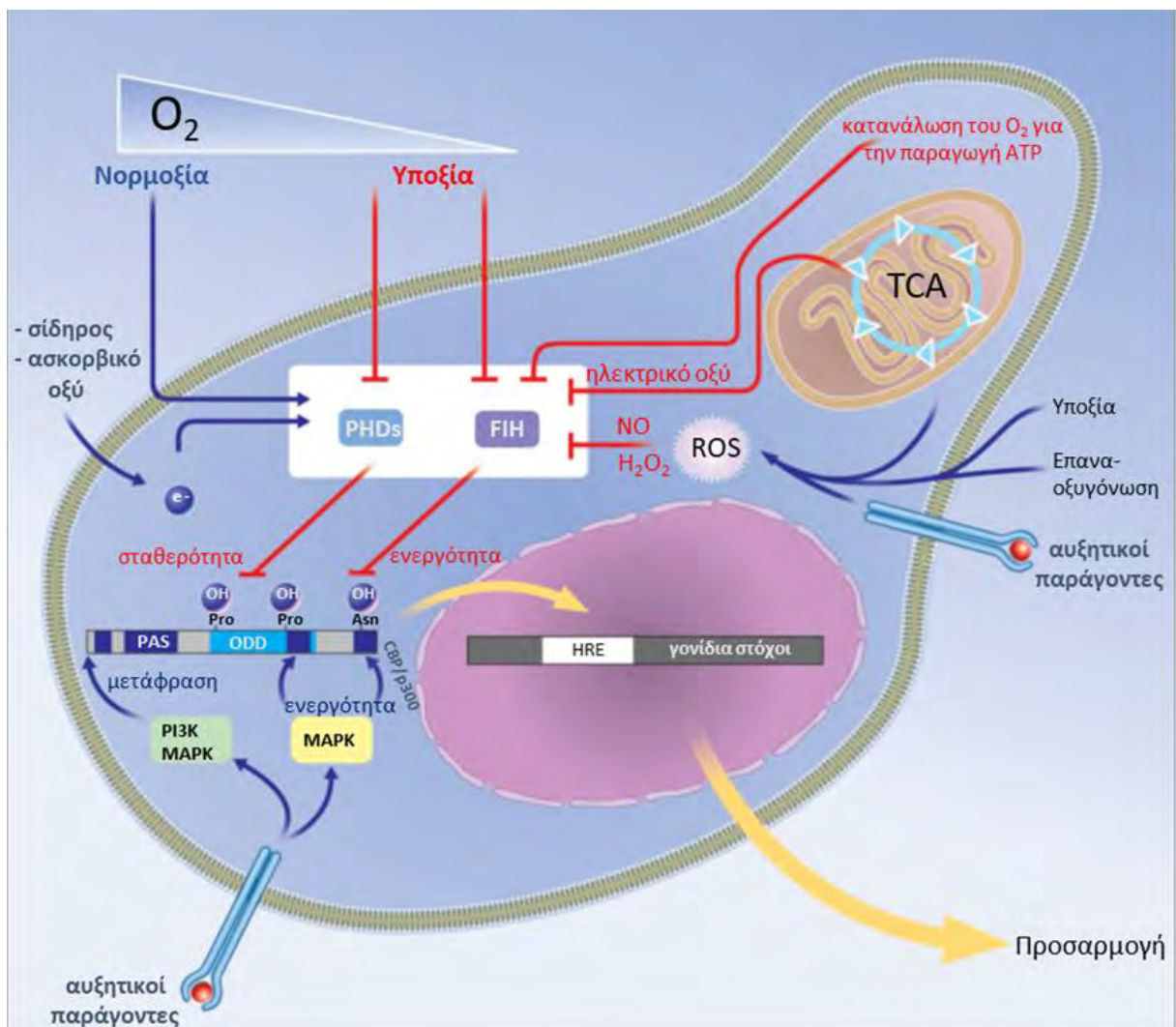


Εικόνα 9 Οι PHDs και FIH χρησιμοποιούν ως συνυπόστρωμα το οξυγόνο και το 2-κετογλουταρικό και ως συμπαράγοντα τον δισθενή σίδηρο για να υδροξυλιώσουν το υπόστρωμα προλίνης και ασπαραγίνης αντίστοιχα, ενώ από την αντίδραση παράγεται ηλεκτρικό οξύ και ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα (110).

Οι PHDs και FIH χρησιμοποιούν ως συν-υπόστρωμα εκτός από το οξυγόνο και το 2-κετογλουταρικό οξύ (2-OG), ένα ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του Krebs το οποίο κατά την αντίδραση αποκαρβοξυλιώνεται προς παραγωγή ηλεκτρικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα. Σημαντικοί συμπαράγοντες, που λειτουργούν ως διαδοχικοί δότες ηλεκτρονίων, στην αντίδραση υδροξυλίωσης είναι ο δισθενής σίδηρος (Fe²⁺), που οξειδώνεται σε τρισθενή (Fe³⁺),

και το ασκορβικό οξύ το οποίο οξειδώνεται στη μορφή ημιυδροασκορβικού οξέος ανάγοντας έτσι το σίδηρο στην Fe^{2+} μορφή (110) (Εικόνα 9).

Η εξάρτηση των συγκεκριμένων υδροξυλασών από οξυγόνο και κετογλουταρικό οξύ είναι εκείνη που ρυθμίζει κατά κύριο λόγο την λειτουργικότητα τους στην υποξία. Πρωταρχική αιτία της ρύθμισης των υδροξυλασών είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου στην υποξία. Επιπρόσθετα κατά την υποξία μεταβάλλεται ο κύκλος του Krebs που πλέον ευνοεί την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από α-κετογλουταρικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Το ηλεκτρικό οξύ αφενός συσσωρεύεται εις βάρος του κετογλουταρικού και αφετέρου το ανταγωνίζεται για την θέση σύνδεσης πάνω στις PHDs και έτσι αναστέλλει περαιτέρω την λειτουργία των υδροξυλασών (111) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Η ενεργότητα των υδροξυλασών που ρυθμίζουν τους HIF-α, προωθείται από την διαθεσιμότητα του O₂ και των συμπαραγόντων Fe³⁺ και ασκορβικού οξέος και ρυθμίζεται από υποπροϊόντα του κύκλου του Krebs και από την συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Προσαρμογή εικόνας από (59).

Επιπλέον, η δυσλειτουργία της αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια έχει ως συνέπεια δημιουργία ROS ενώ έχειδειχθεί ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου επάγεται και από αυξητικούς παράγοντες όπως ο EGF (Epidermal Growth Factor) (112) και οδηγούν έμμεσα στην προώθηση της δράσης του HIF-1 (113). Επιπρόσθετα, εφόσον εγκαθιδρυθεί η υποξία και λόγω της δράσης του HIF-1 επάγεται η μεταγραφή του γονιδίου της επαγωγίσιμης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (inducible Nitric Oxide Synthase, *iNOS*). Τα αυξημένα επίπεδα ROS και NO μπορούν να αναστείλουν την δράση των υδροξυλασών των HIF-α (59). Έτσι, σε συνθήκες υποξίας οι PHDs και ο FIH εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των HIF-α και την ρύθμιση της μεταγραφής από τους HIF (Εικόνα 10).

1.2.4.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

1.2.4.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Το mRNA του HIF-1α εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς ωστόσο τα επίπεδα μεταγραφής ποικίλουν σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους όπου μπορούν να επηρεάζονται σε συνθήκες φλεγμονής και υποξίας, από την δράση μεταγραφικών παραγόντων, σηματοδοτικών μορίων και ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS). Η επίδραση της υποξίας στα επίπεδα μεταγραφής του *HIF1A* γονιδίου έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά από κυτταρικούς τύπους όπως ηπατικά και νεφρικά καρκινικά κύτταρα, ινοβλάστες και νευρικά βλαστοκύτταρα, όπου μετά από έκθεση σε ήπια υποξία παρατηρήθηκε μια παροδική αύξηση των επιπέδων mRNA του HIF-1α που μετά τις 2 ώρες άρχισε να μειώνεται στα βασικά επίπεδα μεταγραφής (114). Επιπλέον μια μελέτη σε λευκοκύτταρα εθελοντών επιβεβαίωσε την παροδική αύξηση του mRNA του HIF-

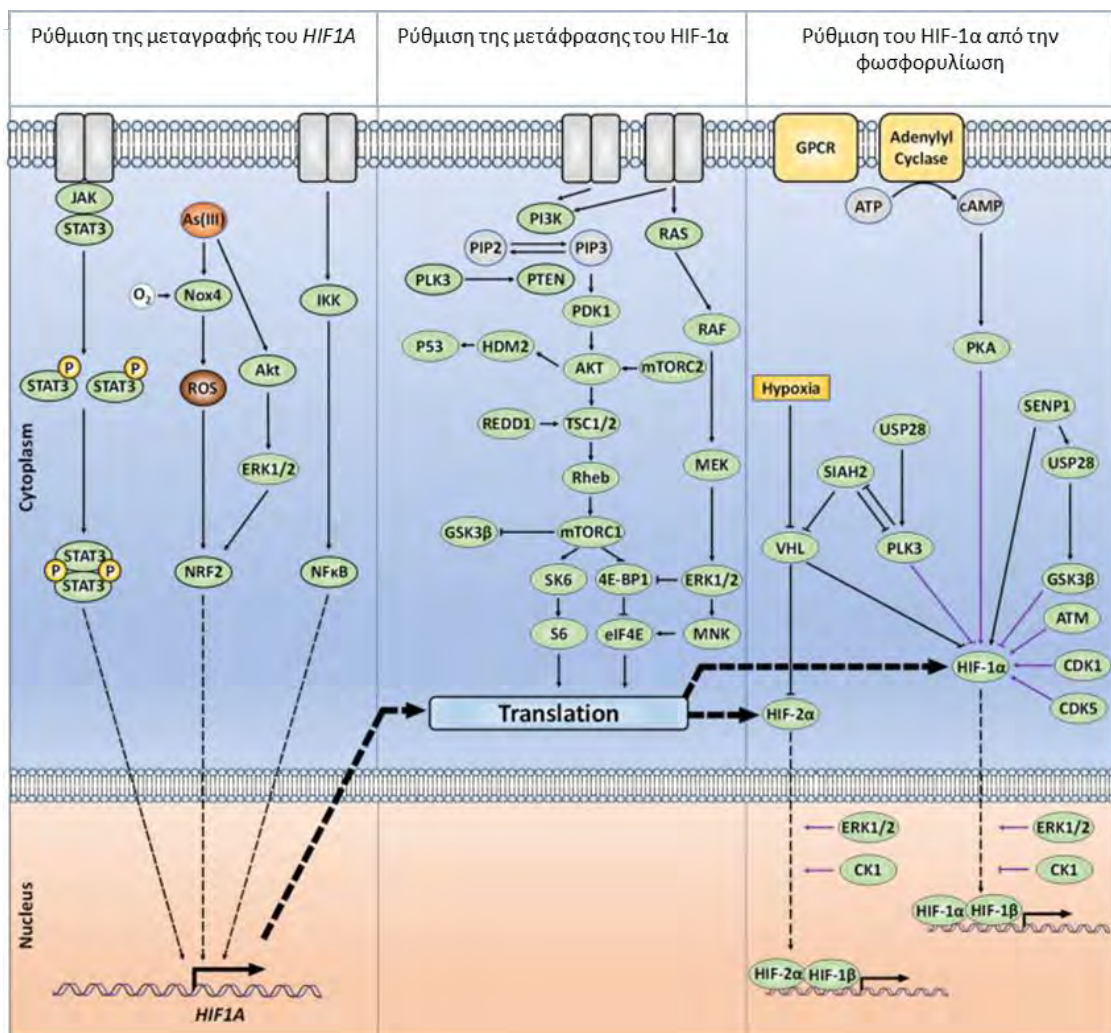
1a in vivo και έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση με την ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων ROS που εκλύονται λόγω δυσλειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας (115).

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου εκτός από την επίδραση τους στην δραστικότητα των PHDs (Εικόνα 10), εμπλέκονται και σε ένα μονοπάτι ρύθμισης της μεταγραφής του HIF-1α. Ένας μηχανισμός άμυνας των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες και τα ROS είναι η παραγωγή αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Nuclear Factor - erythroid 2 - related factor 2). Η συσχέτιση Nrf2 και HIF-1α δεν είναι ξεκάθαρη, όμως φαίνεται ότι όταν ενεργοποιείται από τα ROS ο Nrf2 συμβάλλει στην μεταγραφή του HIF-1α και την διατήρηση βασικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου. Έχει δειχθεί σε νεφρικά καρκινικά κύτταρα, όπου έχει απαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τον Nrf2, ότι τα επίπεδα mRNA του HIF-1α είναι μειωμένα σε σύγκριση με αγρίου τύπου κύτταρα ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου (116) (Εικόνα 11). Από την άλλη έχει δειχθεί σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου ότι στην υποξία αποσιώπηση της έκφρασης του Nrf2 έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ενεργοποίηση του HIF-1α καθώς γίνεται αναδιανομή του διαθέσιμου οξυγόνου και διατήρηση της ενεργότητας των προλυλοϋδροξυλασών (117).

Σε συνθήκες φλεγμονής, σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,). Ο NF-κB συντίθεται ως έτερο- ή όμο- διμερές από διαφορετικό συνδυασμό των υπομονάδων p65, RelB, cRel, p50 και p52, ενώ καταστέλλεται από πρωτεΐνες της οικογένειας IκB που με την σειρά τους αναστέλλονται από την δράση των κινασών IKKs (Inhibitory kappa B Kinases) κατά την εκκίνηση του σηματοδοτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κB (118). Έχει δειχθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα πνεύμονα και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ότι πρωτεϊνικές υπομονάδες του NF-κB προσδέονται σε στοιχεία του υποκινητή του *HIF1A* και συμβάλλουν στην διατήρηση των βασικών επιπέδων mRNA του HIF-1α, ενώ η ενεργοποίηση

του NF-κB από την δράση της κυτοκίνης TNF-α (Tumor Necrosis Factor) σε συνέργεια με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και σηματοδοτικά μόρια όπως η θρομβίνη επάγει την μεταγραφή του HIF-1α και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του τελευταίου σε συνθήκες φυσιολογικής διαθεσιμότητας οξυγόνου (119-121) (Εικόνα 11).

Επιπλέον, ο πολυλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3), βρέθηκε ότι όταν υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, προσδένεται στον υποκινητή και επάγει την μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A*, ενώ η έμμεση αναστολή του Stat3 από την δράση της κινάσης PKR (Protein Kinase R) αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει αρνητικά την μεταγραφή του *HIF1A* γονιδίου (122, 123) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 Ανεξάρτητα από το οξυγόνο, ο HIF-1α ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης, ενώ η φωσφορυλίωση παίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταγραφικής του ενεργότητας. Προσαρμογή εικόνας από (124)

1.2.4.2.2 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης

Η μετάφραση του mRNA του HIF-1α ρυθμίζεται από δύο βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται φυσιολογικά από εξωγενή σηματοδοτικά μόρια όπως οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες. Η εξάρτηση από το εξωκυττάριο περιβάλλον υποδηλώνει ιστοειδικότητα στον βαθμό ενεργοποίησης των μονοπατιών. Από την άλλη σε συνθήκες καρκινικού μικροπεριβάλλοντος και λόγω της δράσης μεταλλαγμένων και απορυθμισμένων γονιδίων τα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να βρίσκονται διαρκώς ενεργά.

Η κύρια οδός ρύθμισης της μετάφρασης του HIF-1α περνά μέσα από την ενεργοποίηση του mTORc1 (mammalian target of rapamycin complex 1,) που ενεργοποιείται καθοδικά του μονοπατιού PI3K/PKB-AKT (phosphatidylinositol 3-kinase / Protein Kinase B-AKT). Πρόκειται για ένα εξαιρετικά συντηρημένο σηματοδοτικό καταρράκτη ενεργοποιητικών φωσφορυλιώσεων που αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την ρύθμιση μεγάλου αριθμού κυτταρικών διεργασιών όπως η μεταγραφή και η μετάφραση, ο μεταβολισμός, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η απόπτωση. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αναστέλλεται αφενός από τις φωσφατάσες PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) και PP2A (Protein Phosphatase 2A), οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν την PIP3 [Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate], και αφετέρου από το ογκοκατασταλτικό σύμπλοκο TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex), το οποίο έχοντας δράση GTPασης (GAP, GTPase activating protein) καταστέλλει την ενεργοποίηση του mTORc1 (125) (Εικόνα 11). Μάλιστα, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος έχει δειχθεί ότι η μείωση της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT μετά από συνεχή υποξία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) η οποία φωσφορυλιώνει τον HIF-1α και τον οδηγεί σε αποικοδόμηση ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου (126, 127). Επιπρόσθετα, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος δείχθηκε ότι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D - καλσιτριόλη (calcitriol) παρεμβαίνει στο μονοπάτι PI3K/AKT και οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των HIF-α (128, 129).

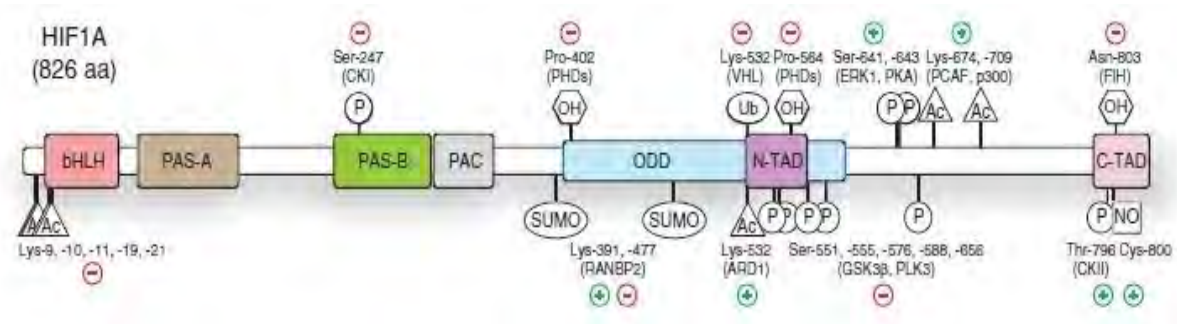
Η δεύτερη οδός ρύθμισης της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α εξαρτάται από το μονοπάτι των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). Το μονοπάτι αυτό ξεκινά από σήματα που προσδένονται στους υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTK, Receptor Tyrosine Kinase) και μετά από 3 στάδια φωσφορυλιώσεων καταλήγει στην ενεργοποίηση των κινασών που ERK (Extracellular signal Regulated Kinases) και σε επόμενο βήμα των κινασών MNK (MAPK interacting protein kinases). Όπως και στην περίπτωση της PKB-AKT οι ERK ρυθμίζουν πλήθος λειτουργιών που σχετίζονται κυρίως με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αποφυγή της απόπτωσης (130). Επιπρόσθετα, οι ERK επάγουν την δράση του mTOR καθώς συνδράμουν μέσω φωσφορυλίωσης στην αναστολή του ρυθμιστικού συμπλόκου TSC1/TSC2 (131) (Εικόνα 11).

Τόσο το μονοπάτι που ενεργοποιεί το mTOR όσο και αυτό των MAPK δρουν κατά βάση με τον ίδιο τρόπο, καθώς καταλήγουν στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης 4E-BP (eIF4E-Binding Protein 1), με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του παράγοντα eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) και την προώθηση της σύνδεσης των πολυριβωσωμάτων στα mRNA που φέρουν καλύπτρα στο 5' άκρο τους (132). Αυτό αφορά την πλειοψηφία των ώριμων mRNA μεταξύ των οποίων και του HIF-1α. Μάλιστα σε υποξικά κύτταρα προερχόμενα από καρκίνο του μαστού βρέθηκε ότι ο ίδιος ο HIF-1 επάγει την μεταγραφή του γονιδίου του eIF4E προωθώντας έμμεσα την μετάφραση των mRNA που φέρουν καλύπτρα και ανατροφοδοτώντας έτσι την δική του σύνθεση (133). Επιπρόσθετα, οι ενεργοποιημένες από τις ERK κινάσες MNK φωσφορυλιώνουν τον eIF4E και ενισχύουν την δραστικότητα του προωθώντας την έναρξη της μετάφρασης των mRNA με 5' καλύπτρα (134), ενώ το mTOR ευνοεί περαιτέρω την μετάφραση ενεργοποιώντας την κινάση S6K (ribosomal protein S6 kinase). Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 είναι μέλος της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας, ενώ από την δράση της S6K ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες και γονίδια που ενισχύουν περαιτέρω την λειτουργία του μηχανισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Εικόνα 11) (135). Ακόμη, το mTOR προωθεί την

μετάφραση του mRNA του YB-1 (Y-Box Binding Protein 1), ενός παράγοντα που προωθεί την καρκινογένεση προωθώντας την μεταγραφή και την μετάφραση πολλών γονιδίων (136). Έχει δειχθεί ότι ο YB-1 ενισχύει την μετάφραση του mRNA του HIF-1α δεσμευόμενος στην 5'-UTR του υπό μετάφραση mRNA προωθώντας την μετάσταση σε καρκινικά κύτταρα σαρκώματος (137).

1.2.4.2.3 Ρύθμιση του HIF-1α από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Οι μεταγραφικοί παράγοντες στο σύνολο τους ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τόσο για την φυσιολογική τους λειτουργία όσο και για την συνεχή ενεργοποίηση ή και καταστολή τους σε συνθήκες καρκινικού μικροπεριβάλλοντος. Οι τροποποιήσεις αυτές, που γίνονται από ειδικά ένζυμα, συνίστανται μεταξύ άλλων από τις φωσφορυλίωση, υδροξυλίωση, ουβικιτινίωση, ακετυλίωση, νιτροζυλίωση, μεθυλίωση, γλυκοζυλίωση και σουμοϋλίωση. Μάλιστα η έκρυθμη δράση πολλών μεταγραφικών παραγόντων στους καρκινικούς όγκους επιτάσσει την αποκωδικοποίηση των μηχανισμών ρύθμισης τους από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (138). Ο HIF-1α ρυθμίζεται συνεχώς σε νορμοξία και υποξία από σημαντικό πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν την σταθερότητα, την δραστικότητα, τον υποκυτταρικό του εντοπισμό, τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT, αλλά και την αλληλεπίδραση του με πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα 12 Εικονική αναπαράσταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πάνω στην πρωτεΐνη του HIF-1α και το πρόσημο της επίπτωσης που έχει η τροποποίηση από τα αναφερόμενα ένζυμα στην ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα (47).

1.2.4.2.3.1 Ακετυλίωση

Πολλαπλά κατάλοιπα λυσίνης εντός της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-1α υπόκεινται τροποποίηση από την αντίρροπη δράση των ενζύμων KAT (K acetyl-transferases) και KDAC (K De-Acetylases). Ο μηχανισμός ακετυλίωσης-αποακετυλίωσης λυσινών έχει ως αποτέλεσμα την ρύθμιση της πρωτεϊνικής σταθερότητας και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Η δράση της αποακετυλάσης HDAC4 επάγει την συσσώρευση του HIF-1α και τη μεταγραφική του ενεργότητα, ενώ αποσιώπηση της HDAC4 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ακετυλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α (Lys-9, -10, -11, -19, -21) και την ανεξάρτητη από την pVHL πολυουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του στο 26S πρωτεάσωμα, με αντίστοιχες επιπτώσεις και στην μεταγραφική δράση του HIF-1 (139). Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, φαίνεται ότι η ακετυλίωση του HIF-1α στην λυσίνη 709 του καρβοξυτελικού άκρου από την p300 αυξάνει την σταθερότητα της πρωτεΐνης (140) και η ακετυλίωση από τον παράγοντα PCAF (P300/CBP-Associated Factor) στη Lys647 επάγει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις CBP/p300 (141), ενώ τα αντίθετα αποτελέσματα έχει η αποακετυλίωση στις παραπάνω θέσεις που πραγματοποιείται από τις σιρτουίνες 2 (SIRT2) και 1 (SIRT1) αντίστοιχα.

1.2.4.2.3.2 Μεθυλίωση

Η προσθήκη μεθυλομάδων στην ε-αμινομάδα της λυσίνης είναι μια συχνή και αναστρέψιμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που πραγματοποιείται από την KMT (K Methyl-Transferase) και αναιρείται από τις αντίστοιχες απομεθυλάσες (K Demethylase, KDM). Αν και έχει μελετηθεί κυρίως για την τροποποίηση των ιστονών, τα τελευταία χρόνια αναδεικνύεται η σημασία του μηχανισμού αυτού στην ρύθμιση της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων (142). Στον HIF-1α έχουν χαρακτηριστεί τρία κατάλοιπα λυσίνης που υπόκεινται μεθυλίωση. Η δράση της απομεθυλάσης LSD1 στις λυσίνες K32 και K391 επιβραδύνει την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α, ενώ η μεθυλοτρανσφεράση G9a/GLP ανταγωνίζεται την

ακετυλοτρανσφεράση PCAF για την λυσίνη 674 και μειώνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις CBP/p300 και κατά συνέπεια την μεταγραφική του ενεργότητα (143), (144), (145), (146).

1.2.4.2.3.3 S-νιτροζυλίωση

Η προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου σε σουλφυδρικές ομάδες κυστεΐνης, είναι μια τροποποίηση που μεταξύ άλλων, ρυθμίζει την λειτουργικότητα αρκετών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB, ο AP-1 και ο HIF-1. Η νιτροζυλίωση του HIF-1α στην κυστεΐνη 800 έχει χαρακτηριστεί από δύο ερευνητικές ομάδες έχοντας ωστόσο αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς την επίδραση στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα (147), (148). Ανεξάρτητα από την άμεση τροποποίηση του HIF-1α έχει βρεθεί ότι η νιτροζυλίωση αναστέλλει την δράση της PHD2 μειώνοντας έτσι την αποικοδόμηση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας, ενώ σε συνθήκες υποξίας συμβάλλει στην ενεργοποίηση του γονιδίου της PHD2 από τον HIF-1 με αποτέλεσμα την γρήγορη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα όταν το οξυγόνο γίνει πάλι διαθέσιμο (149).

1.2.4.2.3.4 Ουβικιτινίωση

Η προσθήκη πολλαπλών μορίων της πρωτεΐνης ουβικιτίνης σε κατάλοιπα λυσίνης εντός της ODD του HIF-1α από την pVHL συνιστά την κύρια οδό ρύθμισης του HIF-1α στους επαρκώς οξυγονωμένους ιστούς (Εικόνα 8). Ωστόσο η πολυουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α στο 26S πρωτεάσωμα μπορεί να προκληθεί και ανεξάρτητα από το οξυγόνο και την pVHL καθώς μια σειρά από πρωτεΐνες με ιδιότητα E3 λιγάσης έχει βρεθεί ότι πολυουβικιτινιώνουν τον HIF-1α σε συνθήκες που του επιτρέπουν να διαφεύγει από το μονοπάτι οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης:

➤ RACK1

Σε in-vitro πειράματα δείχθηκε ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά μέσω της PAS-A επικράτειας του με τον RACK1 (Receptor For Activated C Kinase 1) που προωθεί την πολυουβικιτινίωση του

και επάγει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας. Επιπλέον βρέθηκε ότι την δράση της RACK1 σταθεροποιεί η SSAT1 (Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1) που δεσμεύεται τόσο στον HIF-1α όσο και στην RACK1 (150), ενώ αντίθετο ρόλο σε αυτόν το μηχανισμό βρέθηκε ότι διαδραματίζει η SEPT9_v1 (151). Από την άλλη βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη μοριακή συνοδός Hsp90 (Heat shock protein 90) ανταγωνίζεται άμεσα την RACK1 για την ίδια θέση αλληλεπίδρασης με τον HIF-1α προστατεύοντας τον από την πολυουβικιτινίωση (152), ενώ δείχθηκε ότι επίδραση ειδικών μορίων αναστολέων της Hsp90 (150) ή απαλοιφή του γονιδίου που εκφράζει την Hsp90α (153) έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αποικοδόμηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας

➤ HAF

Ο παράγοντας HAF (Hypoxia Associated Factor) βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά in vitro και in vivo με τον HIF-1α. και με δράση E3 λιγάσης προωθεί την πολυουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του στο 26S πρωτεάσωμα (154).

➤ Mdm2

Η Mdm2 δρώντας ανεξάρτητα είτε ως σύμπλοκο με την p53 έχει βρεθεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες ότι μπορεί να προκαλεί την πολυουβικιτινίωση του HIF-1α οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση σε συνθήκες υποξίας. Αρχικά βρέθηκε ότι η p53 που επάγεται σε συνθήκες υποξίας, αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και μεσολαβεί για την ουβικιτινίωση του από την Mdm2 (155), ενώ η p53 έχει εμπλακεί και στην ρύθμιση της δραστηριότητας του HIF-1α ανταγωνιζόμενη τον μεταγραφικό παράγοντα για την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο CBP/p300 (156). Νεότερα δεδομένα προσφέρουν ενδείξεις ότι η Mdm2 ουβικιτινιώνει τον HIF-1α στο κυτταρόπλασμα υποξικών καρκινικών κυττάρων και ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζεται από την ενεργότητα του PI3K/AKT μονοπατιού αναδεικνύοντας έτσι την σημασία του τελευταίου όχι μόνο στην μετάφραση αλλά και στην σταθεροποίηση του HIF-1α στην υποξία (157).

1.2.4.2.3.5 Σουμοϋλίωση

Όπως συμβαίνει και με την ουβικιτινίωση, η συγκεκριμένη μεταμεταφραστική τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την ομοιοπολική σύνδεση μιας μικρής πρωτεΐνης 97 αμινοξέων που ονομάζεται SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Η προσθήκη γίνεται από μια σειρά τριών ενζύμων που έχουν ιδιότητες ενεργοποίησης (E1 SUMO activating), σύζευξης (E2 conjugating enzyme), και λιγάσης (E3 ligase) της SUMO πρωτεΐνης σε κατάλοιπα λυσίνης της υπό τροποποίηση πρωτεΐνης στόχου. Αν και έχουν ταυτοποιηθεί δύο θέσεις σουμοϋλίωσης εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD του HIF-1α, υπάρχουν αντικρουόμενα ερευνητικά αποτελέσματα για το αν η σουμοϋλίωση αυτή προωθεί ή αποτρέπει την πολυουβικιτινίωση του από την pVHL και ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση ή σταθεροποίηση του. Επιπλέον ποικίλει η έμμεση επίδραση της σουμοϋλίωσης στην ενεργότητα του HIF-1 καθώς σουμοϋλίωση του FIH τον οδηγεί σε αποικοδόμηση προωθώντας την ενεργότητα του HIF-1, ενώ σουμοϋλίωση των CBP/p300 οδηγεί στην απενεργοποίηση τους και κατά συνέπεια την μειωμένη ενεργότητα του HIF-1 (158).

1.2.4.3 Ρύθμιση του HIF-1α από την φωσφορυλίωση

Η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στο ελεύθερο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη είναι γνωστή ως φωσφορυλίωση και αποτελεί μια από τις συχνότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζει ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων μεταξύ των οποίων βρίσκεται και το σύνολο των μεταγραφικών παραγόντων. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν την φωσφορυλίωση είναι γνωστά ως κινάσες και χρησιμοποιούν μόρια ATP (Adenosine Triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη) ως δότη φωσφορικών. Η αντίστροφη τροποποίηση ονομάζεται αποφωσφορυλίωση και καταλύεται από τα ένζυμα φωσφατάσες.

Ο HIF-1α αποτελεί υπόστρωμα για την δράση αρκετών κινασών σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζουν την σταθερότητα, τον ετεροδιμερισμό με τον ARNT, την μεταγραφική ενεργότητα,

τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες και την χρωματίνη. Η σταθερότητα της πρωτεΐνης έχειδειχθεί ότι ρυθμίζεται αρνητικά από την φωσφορυλίωση στα αμινοξέα σερίνης 551/589 και θρεονίνης 555 από την κινάση GSK3 (Glycogene Synthase Kinase-3). Δείχθηκε ότι η GSK3 ενεργοποιείται σε συνθήκες μακροχρόνιας υποξίας λόγω της μείωσης της ενεργότητας των PI3K/AKT και προωθεί την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα ανεξάρτητα από την δράση των προλυλοϋδροξυλασών PHD1-4 και της pVHL (126, 127). Από την άλλη, η ρύθμιση του mTOR που ενεργοποιείται καθοδικά των PI3K/AKT και συνεισφέρει στην βιοσύνθεση του HIF-1α περιλαμβάνει ένα μονοπάτι αρνητικής ανατροφοδότησης καθώς έχειδειχθεί ότι ο HIF-1 επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης REDD1 η οποία ενεργοποιεί το σύμπλοκο TSC1/2 που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του mTOR (159). Στη ρύθμιση του mTOR από τον HIF-1 φαίνεται ότι συμμετέχει και η κινάση ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) καθώς έχειπροταθεί ότι όταν ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξικού στρες φωσφορυλιώνει τον HIF-1α και επάγει την ενεργότητα του που οδηγεί στην ρύθμιση του mTOR (160). Επιπρόσθετα, η κινάση Plk3 (Polo-like-kinase 3) που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και την απόκριση σε διάφορα είδη στρες βρέθηκε ότι ρυθμίζει την σταθερότητα του HIF-1α. Δείχθηκε ότι η απαλοιφή της σε πειραματόζωα οδηγεί σε όγκους με υψηλή αγγειογένεση και εν συνεχεία βρέθηκε ότι φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στις σερίνες 576/657 προωθώντας την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα ανεξάρτητα από την δράση των προλυλοϋδροξυλασών PHD1-4 (161). Επιπλέον έχειπροταθεί ότι ο HIF-1 δρα ρυθμιστικά για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και απουσία ρύθμισης μπορεί να επιφέρει παύση στην φάση G1. Η απαραίτητη ρύθμιση δείχθηκε ότι επαφίεται στην ισορροπία των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών Cdk1/Cdk2 που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α με αντιστρεπτά αποτελέσματα. Φωσφορυλίωση από την Cdk1 οδηγεί σε σταθερότητα της πρωτεΐνης (162), ενώ φωσφορυλίωση από την Cdk2 οδηγεί σε

αποικοδόμηση από τα λυσοσώματα προωθώντας την μετάβαση G1/S και τον πολλαπλασιασμό των υποξικών κυττάρων (163).

Η σταθεροποίηση του HIF-1α αναμένεται να οδηγήσει σε αυξημένη δραστικότητα όταν η πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT. Σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας βρέθηκε ότι η κινάση CK1δ (Casein Kinase 1δ) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην σερίνη 247 εντός της επικράτειας ετεροδιμερισμού και ως συνέπεια παρεμποδίζεται η συγκρότηση ενεργού συμπλόκου με τον ARNT (164). Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι ως συνέπεια της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η, επαγόμενη από τον HIF-1, σύνθεση της λιπίνης-1, η συσσώρευση λιποσταγονιδίων και εν τέλει η δυνατότητα των κυττάρων να προσαρμόζουν τον λιπιδιακό μεταβολισμό τους σε συνθήκες υποξίας (165). Επιπλέον, η δραστικότητα του HIF-1α, που αυξάνεται μετά την συσσώρευση και τον ετεροδιμερισμό του μεταγραφικού παράγοντα, προάγεται από φωσφορυλιώσεις που είτε επάγουν την αλληλεπίδραση του με συμπαραγόντες της μεταγραφής είτε αποτρέπουν την ρύθμιση του από παράγοντες που την καταστέλλουν. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α εντός της καρβοξυτελικής επικράτειας μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD, στην θρεονίνη 796, βρέθηκε αρχικά ότι είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον παράγοντα FKH, ο οποίος αναστέλλει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους CBP/p300 (166). Ο θετικός ρυθμιστής του HIF-1α βρέθηκε ότι είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης CK2 (Casein Kinase 2), για την οποία δείχθηκε αρχικά ότι αναστολή της έκφρασης της, οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (167). Ενώ, στην συνέχεια αποδόθηκε στην CK2 η φωσφορυλίωση του HIF-1α στην Thr796, η οποία παρεμποδίζει την ανασταλτική υδροξυλίωση του HIF-1α από την FKH υδροξυλάση και ευνοεί την αλληλεπίδραση με τους CBP/p300 (148). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η δράση της CK2 εμπλέκεται τόσο στην σταθερότητα όσο και με στην ενεργότητα

του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (168), ενώ η κινάση παίζει και ένα ευρύτερο ρόλο στην σύνθεση πρωτεϊνών που εξαρτάται από το μονοπάτι PI3K/AKT καθώς έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει άμεσα και ενεργοποιεί την AKT (169), ενώ φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την ρυθμιστική πρωτεΐνη PTEN (170). Τέλος, σε εναλλασσόμενες συνθήκες υποξίας-επανοξυγόνωσης βρέθηκε ότι ενεργοποιείται η κινάση PKA και φωσφορυλιώνει τον HIF-1α αυξάνοντας τόσο την σταθερότητα του όσο και την μεταγραφική του ενεργότητα μέσω της αλληλεπίδρασης του με τον συμπαράγοντα p300 (171).

Στην παρούσα διατριβή κεντρικό ρόλο κατέχει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2)(p44/p42 MAPK) που αναλύεται ξεχωριστά στην υποπαράγραφο 1.2.4.3.1.

1.2.4.3.1 Φωσφορυλίωση από τις ERK1/2

Ένας από τους σημαντικότερους και περισσότερο μελετημένους μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-1α αφορά την άμεση φωσφορυλίωση του από τις κινάσες ERK1/2. Το μονοπάτι που ενεργοποιεί τις ERK κινητοποιείται φυσιολογικά από παράγοντες αύξησης, κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια ορισμένα εκ των οποίων έχει βρεθεί ότι επάγονται σε συνθήκες υποξίας (172, 173). Τα εξωκυττάρια αυτά σήματα προσδέονται στου υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTK, Receptor Tyrosine Kinase) η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί σε φωσφορυλίωση της GTPάσης RAS. Καθοδικά του μονοπατιού σε 3 στάδια φωσφορυλίωσης ενεργοποιούνται με την σειρά οι κινάσες RAF (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK) και ERK1/2 (MAPK). Από τις πρώτες μελέτες που χαρακτήρισαν τον HIF-1α ως φωσφοπρωτεΐνη είχε δειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται in vivo από τις MAPK και ειδικά από τις p42/p44 MAPK (ERK1/2), ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τις p38 και JNK (c-Jun N-τελική κινάση) που κατατάσσονται επίσης στις MAPK (174).

Όπως καταγράφηκε νωρίτερα οι MAPK συμβάλλουν στην πρωτεϊνοσύνθεση του HIF-1α (Εικόνα 11), ωστόσο η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Αυτό δείχθηκε αρχικά με την χρήση ειδικών αναστολέων των MEK (PD98059 και U0126) (175). Παλαιότερα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας επιβεβαίωσαν την φωσφορυλίωση του HIF-α από τις ERK1/2, ενώ επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός των αμινοξικών καταλοίπων σερίνης 641 και 643 (Ser641 και Ser643) ως τις θέσεις φωσφορυλίωσης (54). Υπερέκφραση μεταλλαγμάτων του HIF-1α που καταργούν την φωσφορυλίωση στις συγκεκριμένες θέσεις (σερίνη 641 και σερίνη 643 σε αλανίνη, SA) ή προσθήκη του αναστολέα PD98059 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης του HIF-1α στον πυρήνα και κατά συνέπεια τη μειωμένη ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα σε σύγκριση με την υπερέκφραση αγρίου τύπου μορφής HIF-1α (WT). Αντίθετα, προσθήκη της ουσίας Leptomycin B (LMB), που αναστέλλει τη δράση της γενικής εξαπορτίνης των θηλαστικών CRM-1 (exportin 1) είχε ως αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη HIF-1α SA μορφή να συσσωρευθεί στον πυρήνα και να ανακτήσει εν μέρει τη μεταγραφική ενεργότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου μορφή. Έτσι προτάθηκε ότι η απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 αναστέλλει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α μέσω της εξαγωγής του στο κυτταρόπλασμα (54).

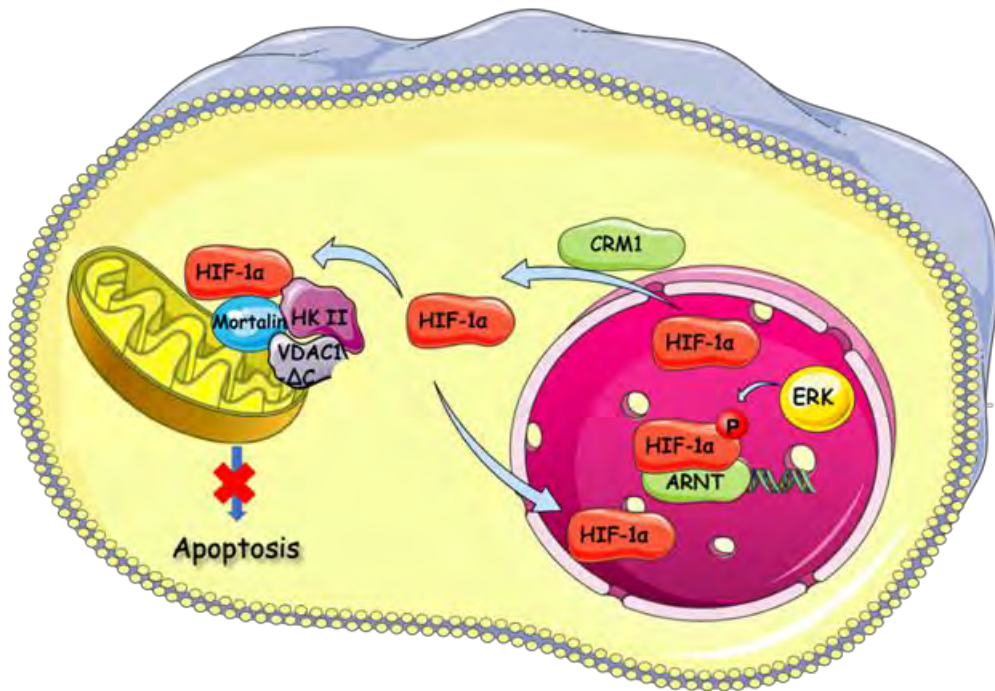
Σε συνέχεια της προηγούμενης μελέτης επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός ενός υδρόφοβου σήματος εξόδου από τον πυρήνα NES (⁶³²MEDIKILI⁶³⁹) γειτονικά στις σερίνες 641/643 που τροποποιούνται από τις ERK1/2. Καταστροφή του σήματος αυτού με σημειακές μεταλλάξεις (μορφή HIF-1α IA, ισολευκίνες 635,637,639 σε αλανίνες), είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα ακόμα και όταν καταργούνται ταυτόχρονα και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από της ERK1/2 (μορφή HIF-1α IA/SA). Ανασυνδυασμένος και υπερεκφρασμένος σε καρκινικά κύτταρα HIF-1α με φωσφομιμητική μετάλλαξη (σερίνη 641

σε γλουταμινικό οξύ, SE) είχε παρόμοια συμπεριφορά με τον αγρίου τύπου HIF-1α που μπορεί να φωσφορυλιωθεί, με ακόμα πιο ισχυρή πυρηνική συσσώρευση και μεταγραφική ενεργότητα, χωρίς μάλιστα να επηρεάζεται σημαντικά από αναστολείς των ERK1/2. Επιπλέον, οι μορφές του HIF-1α SA που είχαν απωλέσει την δυνατότητα φωσφορυλίωσης ανέκτησαν εν μέρει τις ιδιότητες της αγρίου τύπου μορφής του HIF-1α όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την ενεργότητα όταν είχε συγχρόνως μεταλλαχθεί-καταστραφεί το NES (μορφή HIF-1α IA/SA). Για να μελετηθούν περαιτέρω οι ιδιότητες της επικράτειας που περιέχει το NES και τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, η οποία ορίστηκε ως ETD (ERK Targeted Domain, αμινοξέα 616-658), παράχθηκε ως ανασυνδυασμένο πεπτιδίο η επικράτεια ETD σε μορφή αγρίου τύπου ή και με τις μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και επηρεάζουν το NES ή/και τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Εικόνα 13B). Βρέθηκε ότι τα πεπτιδία είχαν την ίδια ικανότητα φωσφορυλίωσης και τον ίδιο υποκυτταρικό εντοπισμό όπως ο πλήρους μεγέθους HIF-1α ανάλογα με τις εκάστοτε μεταλλάξεις, ενώ υπερέκφραση του αγρίου τύπου πεπτιδίου σε υποξικά καρκινικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πυρηνικού εντοπισμού και της ενεργότητας του ενδογενούς HIF-1α, χωρίς να παρατηρείται αντίστοιχη επίδραση από την υπερέκφραση του πεπτιδίου ETD SA που παρέμεινε στο κυτταρόπλασμα. Δείχθηκε εν τέλει ότι η έξοδος των πεπτιδίων από τον πυρήνα και κατά συνέπεια και του πλήρους μεγέθους HIF-1α είναι εξαρτώμενη από την δυνατότητα της CRM1 να αλληλεπιδράσει με το συγκεκριμένο NES, με την αλληλεπίδραση αυτή να ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση των παρακείμενων θέσεων σερίνης από τις ERK1/2 (55) (Εικόνα 13A).

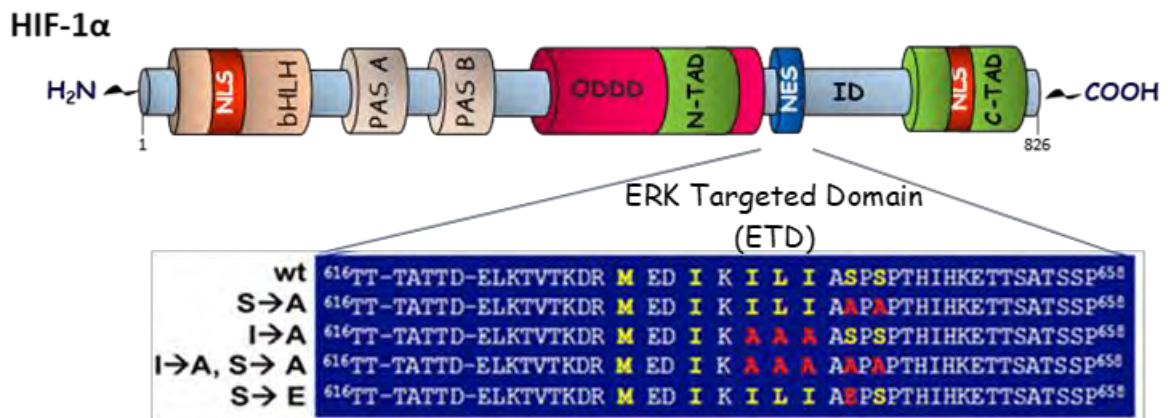
Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως εισαγωγή του φλαβονοειδούς καμφερόλη στο θρεπτικό υλικό κυττάρων ηπατοκαρκινώματος, το οποίο σταματάει το μονοπάτι των MAPK είχε ως αποτέλεσμα την έξοδο του ενδογενούς HIF-1α από τον πυρήνα με συνέπεια την μειωμένη δραστηριότητα του και την αδυναμία επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων (176) και της μεταβολικής προσαρμογής (100) στην υποξία. Ακόμη βρέθηκε ότι οι ERK1/2 ρυθμίζουν κατά

παρόμοιο τρόπο τον εντοπισμό και την ενεργότητα του HIF-2α, με την συντήρηση αυτής της ρύθμισης να φανερώνει τη σημασία της για την προσαρμογή στην υποξία (56).

A



B



Εικόνα 13 **(A)** Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Ο HIF-1α όταν σταθεροποιείται στην υποξία εισάγεται στον πυρήνα, όπου, αλληλεπιδρά με τον ARNT και ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους του. Σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 κατέχουν οι ERK1/2. Όταν είναι ενεργές φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α αποκρύπτοντας ένα σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES). Όταν ο HIF-1α δεν είναι φωσφορυλιωμένος το NES αναγνωρίζεται από την εξορτινή CRM1 που εξαγει τον HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, ο HIF-1α εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (με την εξωκινάση II (HK II), την mortalin και την ισομορφή του καναλιού VDAC1-ΔC) που έχει αντιαποπτωτική δράση. **(B)** Γραφική αναπαράσταση της επικράτειας ETD, της θέσης της πάνω στον HIF-1α και της αμινοξικής της αλληλουχίας στις μορφές wt, SA, IA, IA/SA και SE.

Επιπλέον χαρακτηρίστηκε ένας νέος, μη γενωμικός αντιαποπτωτικός ρόλος του HIF-1α σε σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες μορταλίνη, εξοκινάση II και VDAC1-ΔC στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ο οποίος εκδηλώνεται όταν δεν είναι δυνατή η φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2 στον πυρήνα των κυττάρων (57) (Εικόνα 13A). Τέλος επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση, υπερέκφραση και απομόνωση πεπτιδίων που περιέχουν την επικράτεια ETD με τις διάφορες μεταλλάξεις του NES και των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 που περιγράφηκαν παραπάνω, σε σύντηξη καρβοξυτελικά με επίτοπο FLAG (αμινοξική αλληλουχία DYKDDDDK) και αμινοτελικά με τμήμα της πρωτεΐνης TAT, η οποία προέρχεται από τον ιό HIV, το οποίο έδωσε την δυνατότητα στα πεπτίδια να διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να εισέρχονται σε κύτταρα καλλιέργειας όταν προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας. Τα πεπτίδια εισήλθαν στα κύτταρα και όλα εκτός από εκείνα που έφεραν την μετάλλαξη SA εντοπίστηκαν στον πυρήνα όπου έδρασαν ανταγωνιστικά προς τον ενδογενή HIF-1α εκτοπίζοντας τον από τον πυρήνα και μειώνοντας την δραστικότητα του και την κυτταρική προσαρμογή στις συνθήκες υποξίας. Έτσι επισφραγίστηκε η σημασία της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 στην λειτουργία του HIF-1α και παρουσιάστηκε μια υποσχόμενη μέθοδος στόχευσης αυτής ρύθμισης που μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αντικαρκινική θεραπεία (177). Η παρατήρηση ότι το πεπτίδιο ETD-SE, που δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 αλλά μιμείται μόνο την φωσφορυλίωση, έχει σημαντική επίδραση στην λειτουργία του ενδογενούς HIF-1α, υποδεικνύει ότι τον ανταγωνίζεται για έναν άλλο μηχανισμό προώθησης της δράσης του και όχι ως υπόστρωμα φωσφορυλίωσης.

Σε πειράματα που ακολούθησαν δείχθηκε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 καθώς και μεταλλάξεις στον HIF-1α που την μιμούνται επιδρούν αρνητικά στην κινητικότητα του μεταγραφικού παράγοντα εντός του πυρήνα υποδεικνύοντας ότι ο φωσφορυλιωμένος HIF-1α δεσμεύεται πιο ισχυρά στην χρωματίνη. Ακολούθησε μέσω πειραμάτων *in vitro* αλληλεπίδρασης και φασματοσκοπίας μαζών μια ευρεία αναζήτηση πρωτεϊνικών

αλληλεπιδράσεων που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την μειωμένη κινητικότητα του HIF-1α ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Βρέθηκε ότι μια πρωτεΐνη 36 kDa αλληλεπιδρά ειδικά με την επικράτεια ETD όταν αυτή φέρει μεταλλάξεις που μιμούνται την φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, ενώ κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας του ΥΔ ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη νουκλεοσομίνη (NPM1) και δείχθηκε ότι στην υποξία συνεντοπίζεται και αλληλεπιδρά με τον HIF-1α σε συνθήκες που επιτρέπουν την φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2. Τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν την βάση για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής και δημοσιεύτηκαν σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της τελευταίας (178).

1.2.5 Η ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HIF-1 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ

Η δράση του HIF-1 είναι κομβικής σημασίας για την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Στο καρκινικό μικροπεριβάλλον η σταθεροποίηση του HIF-1α προωθείται από την υποξία και την απενεργοποίηση των προλυλο-υδροξυλασών όπως και σε μη παθολογικές καταστάσεις, ωστόσο οι παράγοντες που χαρακτηρίζουν τα περιβάλλον των συμπαγών όγκων όπως περιεγράφηκαν στην ενότητα [1.1](#) προωθούν και με άλλους τρόπους την συσσώρευση του HIF-1α που εξαρτώνται από την συσσώρευση μεταλλάξεων και από την αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών κυττάρων.

Σημαντικός παράγοντας επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α είναι η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT που όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 1.2.4.2.2 επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση του HIF-1α μετά την σύνδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs). Η ανεξέλεγκτη ενεργότητα του μονοπατιού μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις τόσο των ίδιων των PI3K/AKT, αλλά συχνότερα σε μεταλλάξεις που υπερενεργοποιούν τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης ώστε να εκκινούν συνεχώς την

σηματοδότηση ανεξάρτητα από την δέσμευση εξωκυττάρων μορίων-σημάτων (179). Παράλληλα μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* που κωδικοποιεί για την φωσφατάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PIP3) και αναστέλλει την ενεργοποίηση της AKT συμβάλλουν στην ακόμα πιο ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν και δέχονται μεγάλο όγκο αυτοκρινών σημάτων όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες. Μάλιστα, ο HIF-1 προωθεί μέσω της μεταγραφής την παραγωγή πολλών αυξητικών παραγόντων όπως οι PGF (placental growth factor) και PDGF (platelet-derived growth factor) συμβάλλοντας έτσι στην κυτταρική αύξηση αλλά και ανατροφοδοτώντας την δική του έκφραση. Παράλληλα, όπως αναλύθηκε στην υποπαράγραφο 1.2.4.2.2, το μονοπάτι των κινασών MAPK είναι πολύ σημαντικό για την έκφραση και την δραστικότητα του HIF-1α. Καρκινικοί όγκοι που χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις και απορρύθμιση των ογκογονιδίων c-Ras και c-Raf χαρακτηρίζονται από συνεχή ενεργοποίηση των ERK1/2 με αντίστοιχα αποτελέσματα στην έκφραση του HIF-1α (180).

Κεντρικό ρόλο στον μηχανισμό οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης των HIF κατέχει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (pVHL) η οποία πραγματοποιεί την πολυουβικιτινίωση των HIF-α υπομονάδων και οδηγεί στην αποικοδόμηση τους στο πρωτεάσωμα. Σε πλήθος όγκων με κυριότερο το νεφρικό καρκίνωμα διαυγών κυττάρων (Clear Cell Renal Carcinoma, CCRC) παρατηρούνται μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της pVHL και προωθούν την επιθετική καρκινογένεση εν μέρει μέσω της σταθεροποίησης των HIF-α υπομονάδων (181), που σε κύτταρα CCRC έχει συνδεθεί με την προσαρμογή του μεταβολισμού των λιπιδίων ευνοώντας την συσσώρευση τους σε λιποσταγονίδια (101) έναντι της β-οξειδωσης στα μιτοχόνδρια (182). Από την άλλη, μεταλλάξεις στο γονίδιο του ενζύμου αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH) έχουν ως συνέπεια την συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος που όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.4.1 ανταγωνιζόμενο το ασκορβικό αναστέλλει τη δράση των PHDs με επακόλουθο την συσσώρευση του HIF-1α (183). Επιπρόσθετα, η δράση

του ογκογονιδίου c-Src μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ROS μέσω της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης NOX-1 (184), τα οποία μειώνουν το διαθέσιμο ασκορβικό οξύ, αναστέλλοντας έτσι τη δράση των PHDs (59), ενώ έχουν συσχετιστεί και με αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF-1A* (115).

Όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο [1.2.3](#) ο HIF-1 δρα στον πυρήνα επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων που συμβάλλουν σε όλο το φάσμα της καρκινογένεσης από την δημιουργία νέων αγγείων και την προώθηση του αναερόβιου μεταβολισμού μέχρι την διήθηση και την μετάσταση.

Για να μπορέσει ένας όγκος να αυξηθεί πέρα από ένα οριακό μέγεθος χρειάζεται η δημιουργία νέων αγγείων ώστε να αιματώνεται επαρκώς. Η αγγειογένεση προωθείται από μια σειρά αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων όπως οι ANGPT1/2 (angiopoietin 1 & 2), ANGPTL 4 (angiopoietin-like 4), PGF (Placental Growth Factor), PDGFB (Platelet-Derived Growth Factor B), SDF-1 (Stromal-Derived Factor 1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ο HIF-1 προωθεί την έκφραση και δράση αυτών των παραγόντων είτε άμεσα δεσμευόμενος στα HRE των υποκινητών των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους παράγοντες και τους υποδοχείς τους, είτε έμμεσα καθώς προωθεί την μεταγραφή κάποιων παραγόντων όπως του VEGF που στην συνέχεια θα εκκινήσουν ένα νέο καταρράκτη ενεργοποίησης και παραγωγής άλλων αγγειοποιητικών παραγόντων (π.χ. Placental Growth Factor PGF) (185). Παράλληλα ενεργοποιεί γονίδια που αυξάνουν τον αγγειακό τόνο όπως η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου NO (iNOS) προωθώντας έτσι την καλύτερη διαστολή των αγγείων και την αιμάτωση του όγκου (186).

Η ρύθμιση του μεταβολισμού είναι εξίσου σημαντική για την επιβίωση και ανάπτυξη των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην γλυκόλυση η οποία προωθείται ακόμα και σε συνθήκες επαρκούς οξυγόνωσης, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως Warburg effect. Ωστόσο στην υποξία η μεταβολική στροφή προς την αναερόβια γλυκόλυση προωθείται

πολύ πιο έντονα σε σημαντικό βαθμό λόγω της δράσης του HIF-1. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο [1.2.3.2](#) ο HIF-1 επάγει την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη και τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ επάγοντας την PDK-1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase-1) αναστέλλει την τροφοδότηση του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων με ακετυλοσυνένζυμο Α και προωθεί μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού Α (LDHA) την αναγωγή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ. Το τελικό μόριο της αναερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα αξιοποιείται ποικιλοτρόπως. Η αυξανόμενη συγκέντρωση γαλακτικού στα κύτταρα αντιμετωπίζεται από τον HIF-1, ο οποίος επάγει την έκφραση του μεταφορέα μονοκαρβοξυλικών οξέων MCT-4 ο οποίος εξάγει το γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη εκροή πρωτονίων H^+ , διατηρώντας έτσι ουδέτερο το κυτταροπλασματικό pH, οξινίζοντας παράλληλα το εξωκυττάριο (187). Η οξίνιση του εξωκυττάριου pH προωθείται από τον HIF-1 και μέσω της επαγωγής της έκφρασης της καρβονικής ανυδράσης IX (CAIX) μιας πρωτεΐνης που δρα συνεργατικά με μεταφορείς μονοκαρβοξυλικών οξέων και επιτηρεί την διατήρηση του όξινου εξωκυττάριου pH (188). Το όξινο εξωκυττάριο pH έχει συσχετιστεί θετικά με σημαντικές διεργασίες της ανάπτυξης των όγκων όπως η αγγειογένεση, η διήθηση και η μετάσταση (189), ενώ το γαλακτικό αποτελεί κομβικό μόριο για την διακυτταρική σηματοδότηση και την αποφυγή της ανοσιακής αντίδρασης στο καρκινικό μικροπεριβάλλον καταστέλλοντας την παραγωγή και δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (190). Έχει δειχθεί ότι καρκινικά κύτταρα σε γειτονικές οξυγονωμένες περιοχές μπορούν να προσλάβουν το γαλακτικό οξύ που εκκρίνεται από τα υποξικά-γλυκολυτικά καρκινικά κύτταρα και να το χρησιμοποιήσουν για την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος και την ενίσχυση του κύκλου του Krebs και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (191). Από την άλλη, σε αθανатоποιημένες καρκινικές σειρές προερχόμενες από καρκίνους των επιθηλίων του πνεύμονα (H460) και της μήτρας (HeLa) βρέθηκε ότι το γαλακτικό οξύ, εκτός από το να εξάγεται στον εξωκυττάριο χώρο, εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των ίδιων κυττάρων και μπορεί

να αξιοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή λιπιδίων, υποδεικνύοντας έτσι έναν δρόμο αξιοποίησης του γαλακτικού οξέος από τα καρκινικά κύτταρα που το παράγουν σε συνθήκες που ευνοούν το φαινόμενο Warburg (192). Εξάλλου η σημασία της ρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων τόσο ως πηγή ενέργειας όσο και για την αποφυγή της λιποτοξικότητας στα υποξικά κύτταρα αναλύθηκε στην παράγραφο [1.2.3.2](#) και μπορεί να συμβαίνει τόσο σε φυσιολογικούς όσο και καρκινικούς υποξικούς ιστούς. Ωστόσο σε καρκινικά κύτταρα παρατηρείται ευρεία de novo λιπογένεση αντίθετα με τους φυσιολογικούς ιστούς που συμβαίνει μόνο σε ηπατοκύτταρα και κύτταρα του λιπώδους ιστού. Αυτό εξυπηρετεί τις αυξημένες ανάγκες σύνθεσης νέων μεμβρανών και αποθήκευσης ενεργειακών αποθεμάτων και εν μέρει προωθείται και από την δράση του HIF-1 που ενεργοποιεί την έκφραση της συνθάσης λιπιδίων FASN (193)

Εκτός από την επιβίωση που επιτυγχάνεται μέσω του μεταβολισμού, της αγγειογένεσης και της αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει επίσης να αποφύγουν την ενεργοποίηση της απόπτωσης από ενδογενή σηματοδότηση αλλά και λόγω θεραπευτικής αγωγής. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο HIF-1 ενέχεται για την παρατηρούμενη στην υποξία επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών με αντιαποπτωτική δράση όπως είναι το μέλος της οικογένειας Bcl-2 αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia 1) (194). Επιπλέον, σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος βρέθηκε ότι ο HIF-1 ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) που εκδηλώνει ισχυρή αντιαποπτωτική δράση και προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη και ακτινοθεραπεία (195). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μη γενωμική αντιαποπτωτική δράση που εκφράζει ο HIF-1α όταν απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 σχηματίζει, στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες μορταλίνη, εξοκινάση II και VDAC1 (Voltage Dependent Anion Channel 1), αποτρέποντας την έξοδο του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την έναρξη της απόπτωσης (57). Από

την άλλη ο HIF-1 σε συνθήκες στρες προωθεί την αυτοφαγία των μιτοχονδρίων μέσω της μεταγραφής της BNIP3, που μπορεί να αποτελέσει έναν προσωρινό μηχανισμό αποφυγής της απόπτωσης (196). Ωστόσο η πρωτεΐνη BNIP3 έχει και σημαντική προ-αποπτωτική δράση (197). Επιπρόσθετα η αυξημένη μεταγραφή της πολυλειτουργικής και κυτταροπροστατευτικής πρωτεΐνης NPM1 στην υποξία έχει δείχθει ότι προωθείται από τον HIF-1 και οδηγεί σε αποφυγή της απόπτωσης μέσω αναστολής της ενεργοποίησης της p53 (198).

Εν τέλει, ο HIF-1 συμμετέχει και στην καταληκτική και πιο επικίνδυνη διεργασία των καρκινικών κυττάρων, την μετάσταση. Η μετάβαση από έναν ενδοθηλιακό φαινότυπο σε μεσεγγυματικό (Endothelial Mesenchymal Transition) προσδίδει την δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν χωρίς προσκόλληση στον πατρικό ιστό ώστε να μπου στην κυκλοφορία και να εξέλθουν εισβάλλοντας σε άλλους ιστούς όπου ανακτώντας των ενδοθηλιακό φαινότυπο θα δημιουργήσουν νέες αποικίες. Σημαντικό ρόλο σε ολόκληρη την εξέλιξη της μετάστασης παίζει η δυνατότητα τροποποίησης της εξωκυττάριας μήτρας που είναι υπεύθυνη για τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και την κυτταρική προσκόλληση. Στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα παρατηρείται η έκφραση και δράση μιας οικογένειας πρωτεασών του εξωκυττάριου χώρου γνωστές ως Matrix Metaloproteases (MMPs). Ο HIF-1 έχει δείχθει ότι επάγει την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για διάφορες μορφές MMPs ενώ επάγει και την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην τροποποίηση της κατανομής των ινών κολλαγόνου και ελαστίνης όπως η LOX-1 (Lysyl Oxidase) και οι PH4A-1/2 (199) (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1/2) (87, 200). Επιπλέον στον πολλαπλασιασμό και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων συμβάλλει και η προώθηση της βλαστικότητας που φυσιολογικά επάγεται από τον HIF-2 κατά την εμβρυογένεση, αλλά παρατηρείται και στα απορυθμισμένα κύτταρα των συμπαγών όγκων (201, 202).

Η υποξία των συμπαγών όγκων και τα υψηλά επίπεδα των HIF σε ανάλυση βιοψιών σχετίζονται αναπόφευκτα με αυξημένη μεταστατικότητα, κακή πρόγνωση για την πορεία των

ασθενών, και υψηλή θνησιμότητα (203). Για τον λόγο αυτό η έρευνα για φαρμακευτική παρέμβαση στην λειτουργικότητα των HIF είναι συνεχής. Σημαντικό βήμα προς αυτή την κατεύθυνση έγινε με την πρόσφατη ανακάλυψη και ανάπτυξη ορισμένων αναστολέων του HIF-2. Τα χημικά αυτά μόρια προσδένονται σε μία θέση εντός της PAS επικράτειας του HIF-2α και αποτρέπουν τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και έχουν δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε πειραματόζωα και κλινικές δοκιμές (204), ενώ μόλις τον Αύγουστο του 2021 εγκρίθηκε η κυκλοφορία ενός φαρμακευτικού σκευάσματος με την εμπορική ονομασία WELIREG “για χρήση από ασθενείς με νόσο Von Hippel Lindau, οι οποίοι χρειάζονται θεραπεία για όγκους νεφρού και παγκρέατος ή για γλοιοβλάστωμα κεντρικού νευρικού συστήματος” (205). Για την αντικαρκινική στόχευση του HIF-1 βρίσκονται υπό δοκιμή αρκετές ουσίες φυσικής προέλευσης, οι οποίες έχουν δείξει καλά αποτελέσματα σε *in vitro* μελέτες, με τα *in vivo* δεδομένα και τις κλινικές δοκιμές να περιορίζονται λόγω προβλημάτων τοξικότητας, δραστηριότητας και βιοδιαθεσιμότητας των φυσικών ουσιών (206). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα για δημιουργία συνθετικών κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδίων που στοχεύουν την λειτουργικότητα των HIF (207, 208). Σε αυτό το πλαίσιο είναι σημαντική η εργασία που προηγήθηκε στο εργαστήριο μας όπου επιτεύχθηκε η δημιουργία κυτταροδιεισδυτικών πεπτιδίων που προέρχονται από τον HIF-1α και δρουν ανταγωνιζόμενοι τον μεταγραφικό παράγοντα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που ενισχύουν την δραστηριότητα του, με σημαντικές επιπτώσεις στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία (177). Φαίνεται ότι η συνέχιση της έρευνας για την στόχευση των HIF μπορεί να αποδώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την αντικαρκινική θεραπεία.

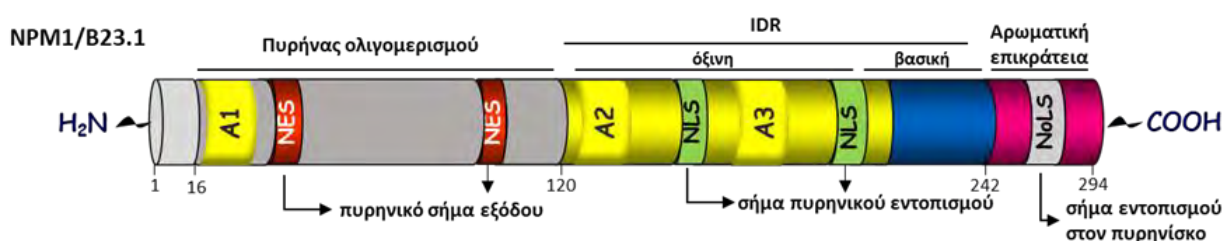
1.3 Η Νουκλεοφοσμίνη (NPM1)

Η νουκλεοφοσμίνη (nucleophosmin, B23, NPM1) είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Αποτελεί μέλος της οικογένειας των νουκλεοπλασμινών, η οποία στα σπονδυλωτά αποτελείται από την NPM1, την NPM2 (νουκλεοπλασμίνη) και την NPM3. Η νουκλεοπλασμίνη (NPM2) ήταν η πρώτη που ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε ως μοριακή συνοδός ιστονών (209), ενώ η NPM3 είναι η λιγότερο μελετημένη από τις τρεις και έχει συνδεθεί με την ρύθμιση της NPM1 (210). Επίσης, και για τα τρία μέλη έχει δειχθεί η ιδιότητα αποσυμπύκνωσης και αναδιοργάνωσης της σπερματικής χρωματίνης: σε κυτταρικά λύματα αυγών *Xenopus*, για ανασυνδυσασμένη NPM2 βατράχου (211), και σε ανασυνδυσασμένα μέλη νουκλεοσωμάτων των αυγών *Xenopus*, για την ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη NPM1 (212), ενώ για την NPM3 βρέθηκε αντίστοιχη δράση στα ωκύτταρα των θηλαστικών (213).

Η NPM1 ανακαλύφθηκε ως μια από τις φωσφοπρωτεΐνες του πυρηνίσκου καθώς ανιχνεύθηκε να ενσωματώνει υψηλό βαθμό ραδιενεργών ισotόπων φωσφόρου σε ανάλυση διαλυτών κλασμάτων πυρηνίσκων (214). Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη που συμμετέχει στον μηχανισμό βιογένεσης των ριβοσωμάτων (215), ωστόσο έκτοτε έχουν περιγραφεί πολλές διαφορετικές λειτουργίες της στον πυρηνίσκο, το πυρηνόπλασμα αλλά και το κυτταρόπλασμα καθώς διαθέτει αλληλουχίες-σήματα που της επιτρέπουν να μετακινείται στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα (216). Έτσι, έχει ρόλο στον διπλασιασμό του κεντροσώματος, στην ρύθμιση της μεταγραφής και την αλληλεπίδραση με τις ιστόνες, στην διατήρηση της ακεραιότητας του DNA και στην απόπτωση.

Το γονίδιο *NPM1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 στην περιοχή 5q35.1, περιέχει 12 εξόνια και κωδικοποιεί για 3 παράγωγα εναλλακτικού ματίσματος. Η πλήρους μεγέθους νουκλεοφοσμίνη NPM1.1 ή απλά NPM1 (συναντάται ακόμη ως B23 ή B23.1) αποτελείται από 294 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 37 kDa και είναι ευρέως μελετημένη ως προς την δομή και την λειτουργία

της. Τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος είναι λιγότερο μελετημένα, η NPM1.2 είναι μικρότερη κατά 30 αμινοξέα καθώς έχει χάσει το εξόνιο 8, ενώ το παράγωγο NPM1.3 έχει χάσει το εξόνιο 12, που κωδικοποιεί για τα 35 τελευταία αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου, με αποτέλεσμα να έχει απωλέσει το σήμα εντοπισμού στον πυρηνίσκο (217). Μεταλλάξεις στο γονίδιο της NPM1 έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό καθώς αποτελούν τις συχνότερες γενετικές ανωμαλίες που συνδέονται με το 30% των περιπτώσεων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (Acute Myeloid Leukaemia, AML) σε ενήλικους ανθρώπους (218) και στο 6-8% των παιδιατρικών περιπτώσεων. Σε αυτές τις περιπτώσεις μεταλλάξεις στα εξόνια 11 και 12 οδηγούν σε απώλεια του καρβοξυτελικού άκρου των 35 αμινοξέων και την δημιουργία ενός ισχυρού σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα που έχει ως αποτέλεσμα τον διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό του μεταλλάγματος που είναι γνωστό ως NPM1c (219).



Εικόνα 14 Απεικόνιση των δομικών επικρατειών της NPM1 (IDR : Intrinsically Disordered Domain, A(1-3) : Acidic tract).

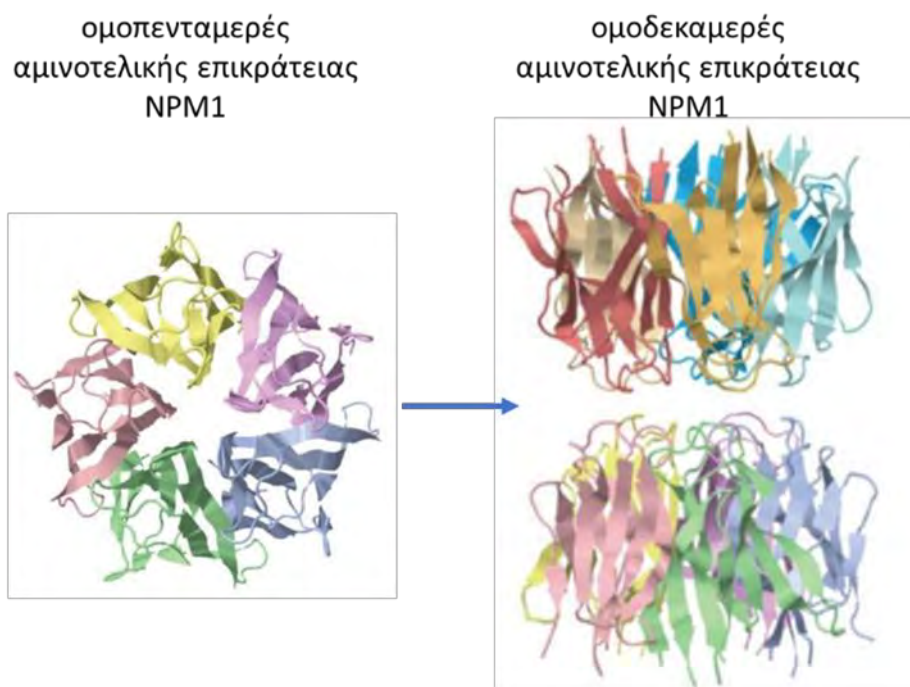
1.3.1 Οι λειτουργικές επικράτειες της NPM1

Η δομή των νουκλεοπλασμιών είναι αρκετά συντηρημένη σε όλα τα μέλη της οικογένειας. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία μια αμινοτελικής επικράτειας που λειτουργεί ως πυρήνας (N-terminal core) για τον σχηματισμό πενταμερών μεταξύ των ίδιων (ομοπενταμερή) ή και διαφορετικών μελών της οικογένειας ή των διαφορετικών μορφών εναλλακτικού ματίσματος (ετεροπενταμερή). Επιπλέον, σε όλες τις νουκλεοπλασμίνες παρατηρείται μία εγγενώς μη δομημένη επικράτεια (IDR, Intrinsically Disordered Domain) στο κεντρικό τμήμα του πολυπεπτιδίου που περιέχει όξινες και βασικές επικράτειες που ρυθμίζουν διάφορες

λειτουργίες της πρωτεΐνης. Αντίθετα το καρβοξυτελικό άκρο διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τριών μελών της οικογένειας των νουκλεοπλάσμιнов με αυτό της NPM1 να χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός σήματος εντοπισμού στον πυρηνίσκο που είναι απαραίτητο για τον κλασσικό φαινότυπο συσσώρευσης της NPM1 στον πυρηνίσκο (220).

1.3.1.1 Αμινοτελική επικράτεια

Η αμινοτελική επικράτεια της NPM1 έχει κρυσταλλογραφηθεί (221), εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 16-120 και αποτελείται από 8 πτυχώσεις με δομή β-βαρελιών. Μέσω της επικράτειας αυτής τα μονομερή NPM1 ενώνονται πλευρικά σχηματίζοντας ένα πενταμερές με μορφή δακτυλίου. Τα πενταμερή μπορούν επίσης να ενώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε, στο δεκαμερές που σχηματίζεται, το κάθε μονομερές του ενός πενταμερούς να έρχεται σε επαφή με ένα μόνο μονομερές του δεύτερου πενταμερούς (Εικόνα 15) (222). Μάλιστα, σε *in vitro* πειράματα δείχθηκε ότι η ισορροπία μεταξύ μονομερούς και πενταμερούς ρυθμίζεται από την ιονική ισχύ, την φωσφορυλίωση και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (223).



Εικόνα 15 Το αμινοτελικό άκρο της NPM1 σχηματίζει ομοπενταμερή που ενώνονται σε ομοδεκαμερή όπου κάθε μονομερές του ενός πενταμερούς έρχεται σε επαφή με ένα μόνο μονομερές του δεύτερου πενταμερούς. Προσαρμογή εικόνας από (222).

Καθεμία από τις καταστάσεις ολιγομερισμού φαίνεται ότι συνδέεται με διαφορετική λειτουργία και υποκυτταρικό εντοπισμό της NPM1. Το πενταμερές εντοπίζεται κυρίως στον πυρηνίσκο όπου, εκτός από την αλληλεπίδραση του με τον ARF, συμμετέχει στην βιογένεση των ριβοσωμάτων. Από την άλλη, εντός της αμινοτελικής επικράτειας εντοπίζονται 2 σήματα εξαγωγής από τον πυρήνα που αναγνωρίζονται από την CRM-1 και είναι πιθανό να γίνονται προσβάσιμα μόνο μετά την αποδιοργάνωση του πενταμερούς καθώς βάση δομικής ανάλυσης βρίσκονται στον πυρήνα του αναδιπλωμένου-οργανωμένου πενταμερούς. Η λειτουργικότητα του σήματος εξαγωγής βασίζεται στην φωσφορυλίωση της θρεονίνης 95 (T95) και σχετίζεται με την ρύθμιση του διπλασιασμού του κεντροσώματος που συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα (224). Έτσι, η λειτουργία αυτή φαίνεται να πραγματοποιείται από μια λιγότερο οργανωμένη μορφή του πενταμερούς ή και από τον μονομερές της NPM1. Από την άλλη το δεκαμερές της NPM1 έχει σχετιστεί με την αλληλεπίδραση της νουκλεοφοσμίνης με την χρωματίνη, ως μοριακή συνοδός των ιστονών και εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα (225). Με δοκιμές αλληλεπίδρασης βρέθηκε ότι η NPM1 αλληλεπιδρά με τον πυρήνα ιστονών των νουκλεοσωμάτων, λιγότερο ειδικά με το σύμπλοκο H2A/H2B, με μεγαλύτερη συγγένεια με το σύμπλοκο H3/H4 και ειδικότερα με την ιστόνη H3 (226). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούνται από την N-τελική επικράτεια ολιγομερισμού ωστόσο ενισχύονται σημαντικά από τις όξινες επικράτειες της NPM1 καθώς το αρνητικό φορτίο των επικρατειών αυτών προσομοιάζει στο DNA και αυξάνει την συγγένεια αλληλεπίδρασης με τις ιστόνες.

1.3.1.2 Κεντρική όξινη επικράτεια IDR

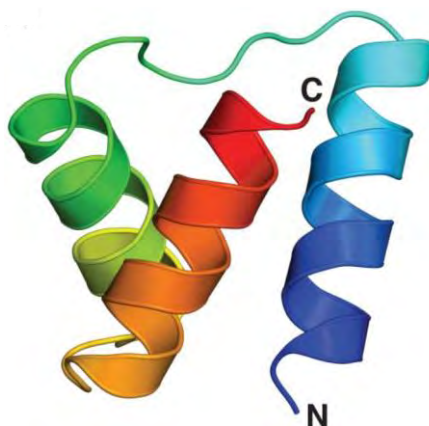
Η κεντρική επικράτεια της νουκλεοφοσμίνης παρουσιάζει χαμηλή οργάνωση και χαρακτηρίζεται ως εγγενώς μη δομημένη περιοχή IDR (Intrinsically Disordered Region). Εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 120-242 και διαχωρίζεται βάση φορτίου σε μια αρνητικά φορτισμένη όξινη επικράτεια αμινοτελικά και μια βασική επικράτεια 50 αμινοξέων που αποτελεί τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της νουκλεοφοσμίνης. Η κεντρική όξινη

επικράτεια οφείλει το φορτίο της σε 2 όξινες υποπεριοχές (acidic tracts A2 aa 120-132/ A3 aa 161-188). Μαζί με την αμινοτελική επικράτεια και την όξινη υποπεριοχή A1 (aa 34-39) που βρίσκεται σε αυτήν φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην συμμετοχή της NPM1 σε πολλές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Αυτές αφορούν κυρίως πρωτεΐνες με θετικά φορτισμένες υποπεριοχές όπως είναι αφενός οι ιστόνες και αφετέρου πρωτεΐνες με μοτίβα αργινίνης που ομοιάζουν σε σήματα εντοπισμού στον πυρηνίσκο και έχουν βρεθεί σε μια σειρά από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την NPM1 (227). Επιπλέον της ιδιότητας αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, στην κεντρική όξινη επικράτεια και πιο συγκεκριμένα στην όξινη υποπεριοχή A3 έχει αποδοθεί μέσω αφαιρετικών μεταλλάξεων η ιδιότητα ενδονουκλεάσης μορίων RNA. Εντός της όξινης IDR εντοπίζονται επίσης 2 σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που αναγνωρίζονται από την ιμπορτίνη α και είναι υπεύθυνα για την είσοδο της NPM1 στον πυρήνα (228). Μάλιστα παρά το γεγονός ότι η NPM1 έχει σήματα εντοπισμού τόσο για το κυτταρόπλασμα όσο και για το πυρηνόπλασμα, φαίνεται ότι σε φυσιολογικές συνθήκες η ισορροπία κλίνει υπέρ της εισόδου της νουκλεοφοσμίνης στον πυρήνα.

1.3.1.3 Καρβοξυτελική επικράτεια

Η καρβοξυτελική επικράτεια της NPM1 εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 188-294 και περιλαμβάνει την βασική καρβοξυτελική IDR της NPM1 (aa 188-242) και το καρβοξυτελικό άκρο 35 αμινοξέων που διαχωρίζει την πλήρη NPM1 από το συχνό προϊόν εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3. Η βασική υποεπικράτεια της IDR προσδίδει στην NPM1 την ικανότητα να δεσμεύει νουκλεϊκά οξέα. Σε αυτήν την ιδιότητα συνεισφέρει το θετικό φορτίο της επικράτειας που προσελκύει ηλεκτροστατικά τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα αλλά και η διαμόρφωση δέσμης 3 ελίκων του καρβοξυτελικού άκρου της NPM1 (Εικόνα 16) (229). Αυτή η ιδιότητα αφορά κυρίως στην αλληλεπίδραση με το ριβοσωμικό DNA (rDNA) και την δέσμευση των πρώιμων μορίων ριβοσωμικού RNA στην ωρίμανση των οποίων συνεισφέρει η δράση ριβονουκλεάσης της νουκλεοφοσμίνης (230). Επιπλέον σε αλληλεπίδραση με ένζυμα

επιδιόρθωσης βλαβών νουκλεϊκών οξέων, η NPM1 έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως πρωτεΐνη ποιοτικού ελέγχου της μεταγραφής του ριβοσωμικού DNA και των προϊόντων rRNA (231).



Εικόνα 16 Η διαμόρφωση δέσμης 3 ελίκων του καρβοξυτελικού άκρου της NPM1 (224).

Η NPM1 δεσμεύει με μεγαλύτερη ευκολία αλληλουχίες μονόκλωνων μορίων ωστόσο αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά και με αλληλουχίες δίκλωνου DNA πλούσιες σε νουκλεοτίδια Γουανίνης (G) που παίρνουν διαμόρφωση γνωστή ως G-Quadruplex. Έχει δειχθεί σε in vitro πειράματα ότι ανασυνδυασμένη μορφή NPM1 που περιέχει τα 70 καρβοξυτελικά αμινοξέα παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τους υποκινητές των γονιδίων *c-Myc* και *SOD2* που έχουν δομές G-Quadruplex, ενώ έχει προταθεί ότι η δέσμευση της νουκλεοφοσμίνης συμβάλλει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *SOD2* (232-234). Στα 35 τελευταία αμινοξέα της NPM1 παρατηρούνται ορισμένα αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη F, τυροσίνη Y, τρυπτοφάνη W) που καθορίζουν την διαμόρφωση και τις ιδιότητες του καρβοξυτελικού άκρου. Ιδιαίτερα οι W288 και W290, που βρίσκονται στον πυρήνα της διαμόρφωσης 3 ελίκων του καρβοξυτελικού άκρου, είναι απαραίτητα συστατικά του σήματος εντοπισμού στον πυρηνίσκο (Nucleolar Localization Signal, NoLS), ενώ μεταλλάξεις που αφαιρούν ή αντικαθιστούν το ένα ή και τα δύο αμινοξέα έχουν ως αποτέλεσμα μερική αποδιοργάνωση της δομής 3 ελίκων του καρβοξυτελικού άκρου, απώλεια του πυρηνισκικού εντοπισμού και μείωση της ικανότητας αλληλεπίδρασης με νουκλεϊκά οξέα (235).

1.3.2 Κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκεται η NPM1

Ιδιότητες που πηγάζουν από την δομή της νουκλεοφосμίνης και κάνουν δυνατό τον πολυμερισμό-αποπολυμερισμό της (αμινοτελική επικράτεια), την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές πλούσιες σε αργινίνη (όξινες υποεπικράτειες της IDR), την αλληλεπίδραση με το RNA (καρβοξυτελική επικράτεια) και την μεταπήδηση από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα και το κυτταρόπλασμα (αλληλουχίες-σήματα εντοπισμού) εμπλέκουν την NPM1 σε ένα μηχανισμό διαχωρισμού υγρών φάσεων (Liquid-liquid phase separation) που ρυθμίζει την συσσώρευση και κυκλοφορία των πρωτεϊνών και των ριβονουκλεϊκών οξέων μεταξύ πυρηνίσκου και πυρηνόπλάσματος καθορίζοντας πολλές κυτταρικές λειτουργίες (236). Η συμμετοχή και ο ρόλος της νουκλεοφосμίνης στην εκάστοτε κυτταρική διεργασία και η αλληλεπίδραση της με διάφορες πρωτεΐνες ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από το ισοζύγιο φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης της NPM1 η οποία αποτελεί στόχο πολλών κινασών και συγκεκριμένων φωσφατασών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις κρίσιμο ρόλο παίζουν και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η σουμοϋλίωση και η ακετυλίωση (216).

1.3.2.1 Βιογένεση του ριβοσώματος

Τα ριβοσώματα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούνται από 2 υπομονάδες (40S/60S) όπου αλληλεπιδρούν συνολικά 79 ριβοσωμικές πρωτεΐνες με 4 μόρια ριβοσωμικού RNA (18S/5S-5.8S-28S) και η σύνθεση τους συνιστά την πιο ενεργοβόρο κυτταρική διεργασία. Το ριβοσωμικό DNA χαρακτηρίζεται από πολλαπλές επαναλήψεις γονιδίων που μεταγράφονται στον πυρηνίσκο από την RNA πολυμεράση I και κωδικοποιούν ένα μεγάλο πρώιμο μόριο pre-rRNA που αποδίδει τα rRNA 28S, 5.8S και 18S (237). Το τμήμα του rDNA που δεν είναι ανοικτό για μεταγραφή κατανέμεται σε συμπαγείς αλληλουχίες ετεροχρωματίνης και η

διατήρηση των επαναλήψεων των γονιδίων που δεν μεταγράφονται είναι σημαντική για την υγεία του κυττάρου και των οργανισμών.

Η νουκλεοσομίνη συνεισφέρει στην βιογένεση των ριβοσωμάτων ρυθμίζοντας, είτε άμεσα είτε μέσω της συσσώρευσης κατάλληλων παραγόντων, την ενεργοποίηση και τον ποιοτικό έλεγχο της μεταγραφής του ριβοσωμικού DNA, την ωρίμανση του πρώιμου rRNA, την σύνδεση των ριβοσωμικών υπομονάδων και την μεταφορά τους εκτός των πυρηνίσκων με τελικό προορισμό το κυτταρόπλασμα (222).

Έχει δειχθεί ότι η NPM1 αλληλεπιδρά με παράγοντες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στην αναδιοργάνωση της ετεροχρωματίνης όπως είναι οι PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) (238, 239) και BRCA1 (Breast Cancer type1 susceptibility protein) και με παράγοντες της ετεροχρωματίνης όπως η ιστόνη linker (συνδέτης) H1.5 και η πρωτεΐνη της ετεροχρωματίνης kHP1-γ, ενώ απώλεια της NPM1 βρέθηκε πως οδηγεί σε διαταραχή της δομής της ετεροχρωματίνης που περιβάλλει τους πυρηνίσκους (240). Χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός φαίνεται ότι η NPM1 μπορεί να συμβάλλει έμμεσα τόσο στην διατήρηση της ακεραιότητας του ριβοσωμικού DNA όσο και στην διευκόλυνση της μεταγραφής του.

Στην ωρίμανση των πρώιμων μεταγράφων η NPM1 μπορεί να συμβάλλει άμεσα μέσω της ενδογενούς ενεργότητας ριβονουκλεάσης (215). Έχει προταθεί ότι η δράση της NPM1 είναι απαραίτητη κατά την διαδικασία ωρίμανσης του πρώιμου 30S RNA μορίου για την δημιουργία του 28S RNA. Διπλό ρυθμιστικό ρόλο στην συγκεκριμένη λειτουργία της NPM1 παίζει ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας p14 ARF που αφενός πολύ-ουβικιτινιώνει και αποσταθεροποιεί την NPM1 και αφετέρου προωθεί την σουμοϋλίωση της που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητάς της. Αντίθετα, η δράση της NPM1 στην βιογένεση των ριβοσωμάτων ενισχύεται από την σουμο-ειδική ισοπεπτιδάση SENP3 που αποσουμοϋλιώνει την νουκλεοσομίνη (241). Στο τελικό στάδιο της βιογένεσης των

ριβωσωμάτων η NPM1 συνεισφέρει βοηθώντας στην κινητικότητα και αλληλεπίδραση των ριβωσωμικών μορίων ώστε να σχηματιστούν οι ριβωσωμικές υπομονάδες και στην μετακίνηση των ριβωσωμικών υπομονάδων από τον πυρηνίσκο προς το κυτταρόπλασμα όπου συνθέτουν τα λειτουργικά ριβοσώματα (222, 242).

1.3.2.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής απόπτωσης

Η νουκλεοφωσφίνη συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα διαιρούμενα ευκαρυωτικά κύτταρα με διακριτούς μηχανισμούς. Μέχρι και το τέλος της φάσης G1 της μεσόφασης μόρια νουκλεοφωσφίνης εντοπίζονται σε αλληλεπίδραση με τα κεντροσώματα στο κυτταρόπλασμα παίζοντας προστατευτικό ρόλο καθώς αποτρέπουν την ασύγχρονη έναρξη του διπλασιασμού τους. Η φωσφορυλίωση της νουκλεοφωσφίνης στην θρεονίνη 199 (Thr-199) από την εξαρτώμενη από τις κυκλίνες κινάση Cdk2 κατά την μετάβαση G1/S οδηγεί σε αποδέσμευση της NPM1 από τα κεντροσώματα και αποτελεί εναρκτήριο βήμα στην διαδικασία διπλασιασμού τους, ενώ έκφραση μεταλλαγμάτων NPM1 που έχουν απωλέσει την συγκεκριμένη θέση φωσφορυλίωσης με ταυτόχρονη αποσιώπηση της έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία προώθησης του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, φωσφορυλίωση της NPM1 στις θέσεις θρεονίνης Thr234/237 αυξάνει την αλληλεπίδραση της με τα διπλασιασμένα κεντροσώματα κατά την μίτωση βοηθώντας στην οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου (243, 244). Επίσης, ρυθμιστικό ρόλο παίζει και η εξπορτίνη CRM1 που σε σύμπλοκο με την GTPάση Ran αναγνωρίζει το NES της NPM1 και την εξάγει ενεργά στο κυτταρόπλασμα ώστε να συνδεθεί με τα μη διπλασιασμένα κεντροσώματα. Η εξαγωγή της NPM1 είναι πιθανό να ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση της εντός του NES στην θρεονίνη 95 καθώς φωσφομιμητική μετάλλαξη στην συγκεκριμένη θέση είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της σύνδεσης της NPM1 με τα κεντροσώματα με συνέπεια τον διπλασιασμό τους, ενώ αντίθετα αποτελέσματα είχε μετάλλαξη μίμησης απώλειας φωσφορυλίωσης (245).

Εκτός από την μετάβαση G1/S η ρύθμιση της NPM1 από την φωσφορυλίωση έχει συσχετιστεί και με την έναρξη της μίτωσης κατά την μετάβαση G2/M. Έχει προταθεί ότι η ισορροπία μεταξύ Cdk1 και της φωσφατάσης PP1 σε επίπεδο ενεργότητας ρυθμίζει τον κύκλο φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της NPM1 κατά την μίτωση στις θέσεις Ser10/Ser70/Thr95/Thr199/Thr234/Thr237 (246). Φωσφορυλίωση της NPM1 από την εξαρτώμενη από τις κυκλίνες κινάση CDK στις σερίνες Ser10 και ser70 έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της Cdk1 με την Cdc25C, μιας κυκλίνης που αποφωσφορυλιώνει συγκεκριμένες θέσεις της Cdk1 και παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ενεργότητας του συμπλόκου Cdk1/cyclin B1 και την μετάβαση στην φάση της μίτωσης (247), ενώ σημαντική για την σωστή μιτωτική λειτουργία έχει δειχθεί ότι είναι η φωσφορυλίωση στην θέση σερίνης Ser4 από την κινάση Plk-1 (248).

1.3.2.3 Έλεγχος της γονιδιακής ακεραιότητας

Ο έλεγχος της γονιδιακής ακεραιότητας διακρίνεται σε διεργασίες ανίχνευσης των βλαβών στο DNA, ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, επαγωγής μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών ή/και προώθηση της κυτταρικής απόπτωσης. Τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι κεντρικό ρόλο για την ανίχνευση και την απόκριση στις βλάβες του DNA παίζει ο πυρηνίσκος. Η νουκλεοφосμίνη έχει εμπλακεί στους μηχανισμούς απόκρισης πολλών ειδών στρες που έχουν αντίκτυπο στην ακεραιότητα των πυρηνίσκων όπως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (249, 250), το θερμικό σοκ (251), η συσσώρευση ιϊκών πρωτεϊνών (252), το οξειδωτικό στρες (253) και η έκθεση σε κυτταροτοξικούς (254) και γενοτοξικούς παράγοντες (255). Κοινή συνισταμένη στις παραπάνω περιπτώσεις φαίνεται να αποτελεί η παρατηρούμενη μετατόπιση της NPM1 από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα, ενώ διαφορετικές μελέτες έχουν προτείνει ότι σημαντικό ρόλο στην μετατόπιση της NPM1 παίζει η κατάσταση φωσφορυλίωσης της NPM1, η ενεργότητα των κινασών JNK (255) και η αποσύνδεση της NPM1 από τα νουκλειικά οξέα των πυρηνίσκων μετά από S-γλουταθειονυλίωση (253).

Αν και ο τρόπος δράσης της NPM1 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως στην βιβλιογραφία, κεντρικό ρόλο στην αντιμετώπιση των βλαβών του DNA φαίνεται να παίζει η ρύθμιση δύο σημαντικών ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών· της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος pRb και της πρωτεΐνης p53 που αμφότερες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και προωθούν την επιδιόρθωση των γενετικών βλαβών ή/και την έναρξη της κυτταρικής απόπτωσης. Η pRb είναι μια πρωτεΐνη που φυσιολογικά καταστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου έως ότου το κύτταρο να είναι έτοιμο να μπει στην φάση S. Εκδηλώνει την δράση της απομονώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1 που ελέγχει γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο αλλά και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες στρες που επάγει βλάβες στο DNA, η NPM1 αποφοσφωριώνεται στις θέσεις Thr199, Thr234/237 από την φωσφατάση PP1β και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη αλληλεπίδραση της με τον παράγοντα pRb. Έτσι, απελευθερώνεται ο E2F1 από την αυστηρή ρύθμιση και επάγει γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA (256).

Η p53 είναι μια πρωτεΐνη που ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες και προωθεί αρχικά την παύση του κυτταρικού κύκλου και εν συνεχεία την κυτταρική απόπτωση. Ρυθμίζεται φυσιολογικά από την πρωτεΐνη MDM2 που με δράση E3 λιγάσης οδηγεί σε πολυουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της p53 στο πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες στρες η MDM2, είτε λόγω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ATM που ενεργοποιούνται ως απόκριση στις βλάβες του DNA, είτε λόγω δέσμευσης της από την διάχυτη στο πυρηνόπλασμα ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF, σταματά να ρυθμίζει την p53 (257). Η p53 που διαφεύγει της αποικοδόμησης φωσφορυλιώνεται εν συνεχεία στην σερίνη Ser15 και παρουσιάζει αυξημένη δραστικότητα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η νουκλεοφοσμίνη, απουσία στρες, αλληλεπιδρά με τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα ARF με αποτέλεσμα να απομονώνονται και οι δύο πρωτεΐνες στον πυρηνίσκο και η MDM2 να δρα αποτρέποντας την συσσώρευση της p53 (258-260). Ωστόσο σε συνθήκες στρες, όπως συσσώρευση βλαβών στο DNA η NPM1 αποσυνδέεται από

τον ARF, ο οποίος επάγει την σταθεροποίηση της p53 ώστε να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος και να αντιμετωπιστούν οι βλάβες ή να εκκινήσει η απόπτωση του κυττάρου (261). Μάλιστα, έχει προταθεί ότι η επίδραση της NPM1 στην σταθεροποίηση της p53 κατά την διάρκεια έντονου στρες μπορεί να εκδηλώνεται με άμεσο τρόπο χωρίς να περνάει μέσα από την δράση του ARF αλλά εξαρτώμενη από την έξοδο της NPM1 από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα (253). Η συγκεκριμένη δράση της NPM1 στο πυρηνόπλασμα φαίνεται ότι προωθείται από την αποφοσφωρυλίωση της σε συγκεκριμένες θέσεις τυροσίνης από την φωσφατάση DUSP3 που δρα έτσι ως ρυθμιστής της δραστηριότητας της p53 σε συνθήκες γενοτοξικού στρες (262).

Περαιτέρω εμπλοκή της νουκλεοφοσμίνης στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA επιτυγχάνεται με την γενική δράση της ως πρωτεΐνη μοριακή συνοδός ιστονών που συνεισφέρει στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, διεργασία που είναι απαραίτητη για την επιτυχή πρόσβαση των ενζύμων που πραγματοποιούν την επιδιόρθωση στις κατάλληλες θέσεις της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Από την άλλη ένα μικρό μόνο κλάσμα της φωσφορυλιωμένης στην Thr199 νουκλεοφοσμίνης έχει εντοπιστεί στις ουβικιτινωμένες περιοχές θραύσης της διπλής έλικας του DNA όπου προσδένονται διάφορες πρωτεΐνες που βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών και ο εντοπισμός αυτός της NPM1 ενδέχεται να δρα ενισχυτικά για την δέσμευση των πρωτεϊνών αυτών στις συγκεκριμένες θέσεις όπως έχει προταθεί για τον παράγοντα BRCA1 (Breast Cancer Suppressor 1) μια E3 λιγάση που αναγνωρίζει την NPM1 ως υπόστρωμα (263).

1.3.2.4 Ρύθμιση της μεταγραφής

Η νουκλεοφοσμίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής μέσα από πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν αφενός στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ώστε να γίνει προσβάσιμη για παράγοντες του γενικού μηχανισμού της μεταγραφής και αφετέρου

ενισχύοντας την πρόσδεση ορισμένων εξειδικευμένων πρωτεϊνικών ενεργοποιητών της μεταγραφής στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους.

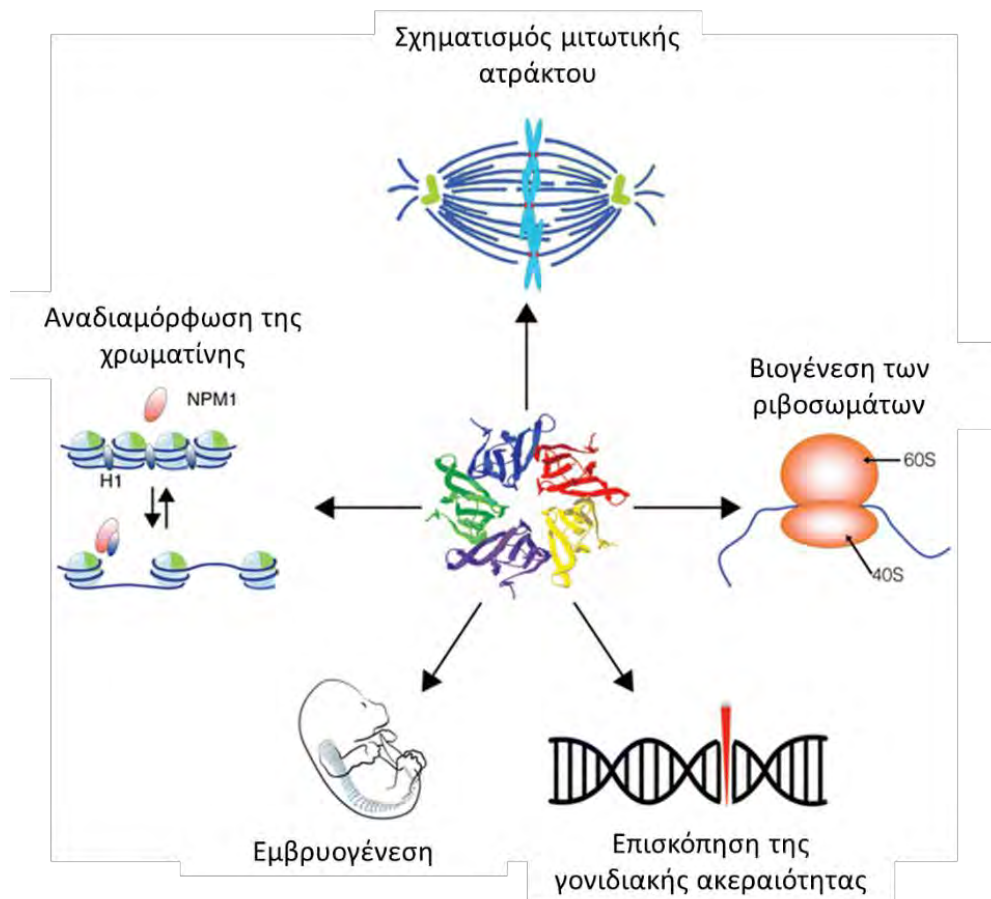
Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η χρωματίνη που είναι ενεργή μεταγραφικά έχει μια «ανοιχτή» διαμόρφωση απαλλαγμένη από την αυστηρή οργάνωση και συσπείρωση του DNA στις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων (264). Μάλιστα περισσότερο πρόσφατα ευρήματα από μελέτες τις τρισδιάστατης δομής της χρωματίνης δείχνουν την οργάνωση της σε διαμερίσματα ανοιχτής και κλειστής διαμόρφωσης (compartments A/B) (265) και τοπολογικά συνδεδεμένες επικράτειες (TADs, Topologically Associating Domains) (266). Σημαντικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν αντιστρεπτά την οργάνωση της χρωματίνης είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και ειδικότερα η ακετυλίωση και η μεθυλίωση. Η νουκλεοφοσμίνη ως πρωτεΐνη μοριακή συνοδός βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με τις ιστόνες του πυρήνα του νουκλεοσώματος και συμμετέχει στον μηχανισμό αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και την καθιστά προσβάσιμη στην RNA πολυμεράση II και τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Για να επιτευχθεί η δράση της έχειδειχθεί ότι χρειάζεται η πολλαπλή ακετυλίωση της σε περισσότερες από 10 θέσεις λυσίνης που κατανέμονται σε ολόκληρη την επικράτεια της NPM1. Η τροποποίηση αυτή αυξάνει την συγγένεια αλληλεπίδρασης της NPM1 με τις ακετυλιωμένες ιστόνες και προωθεί την συσπείρωση των νουκλεοσωμάτων (212). Επιπρόσθετες μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας έδειξαν ότι η προσθήκη των ακετυλομάδων γίνεται από την ακετυλοτρανσφεράση p300 και ευνοεί την συσσώρευση της νουκλεοφοσμίνης στο νουκλεόπλασμα, όπου συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ενεργό σύμπλοκο της μεταγραφής και την RNA πολυμεράση II, τουλάχιστον πάνω στις περιοχές υποκινητή του υπό μελέτη γονιδίου *TNF* που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα TNF- α (Tumor Necrosis Factor - α). Η μεταγραφή του γονιδίου ήταν ανάλογη της έκφρασης της NPM1 και ρυθμιζόμενη από την ισορροπία ακετυλίωσης-αποακετυλίωσης, τροποποιήσεις

που όπως δείχθηκε με πειράματα αποσιώπησης έκφρασης διαμεσολαβούνται από την ακετυλοτρανσφεράση p300 και την SIRT1 (Sirtuin 1) αντίστοιχα (267).

Η επίδραση της νουκλεοφοσμίνης στην μεταγραφή είναι πιθανό να εκδηλώνεται και μέσα από την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση της με τον παράγοντα CTCF (268) μια πρωτεΐνη που μπορεί να δρα τόσο ως ενεργοποιητής όσο και ως καταστολέας της μεταγραφής καθώς δημιουργεί αναδιπλώσεις στην χρωματίνη φέρνοντας σε αλληλεπίδραση απόμακρες αλληλουχίες DNA που μπορεί να περιέχουν ενισχυτές (enhancer elements) ή αποσιωπητές (silencer elements) (269). Μάλιστα έχει προταθεί ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της νουκλεοφοσμίνης NPM1c που παρατηρούνται στις περιπτώσεις ασθενών με AML και εντοπίζονται διάχυτες στο κυτταρόπλασμα, μετατοπίζουν τον CTCF από τον πυρήνα με σημαντικές επιπτώσεις στην διαμόρφωση της χρωματίνης και την αυξημένη μεταγραφή του υπό μελέτη γονιδίου HOXA9 που σχετίζεται με την διαφοροποίηση και φυσιολογικά ρυθμίζεται από τον CTCF (270).

Επιπλέον, η νουκλεοφοσμίνη έχει εμπλακεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες στην προώθηση της δραστηριότητας ορισμένων μεταγραφικών ενεργοποιητών. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν την δέσμευση της NPM1 σε στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα (ARE), με την παρουσία της εκεί να ευνοεί μέσω αλληλεπίδρασης την αποτελεσματική δέσμευση στα ίδια στοιχεία του υποδοχέα ανδρογόνων που λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής (271). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η NPM1 συμβάλλει στην μεταγραφή μια ομάδας γονιδίων που επάγονται από την ιντερφερόνη γ (IFN-γ). Δείχθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 μειώνει τόσο την επαγόμενη από την IFN-γ έκφραση των εν λόγω γονιδίων όσο και την έκφραση και την *in vitro* δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων STAT-1 (Signal transducer and activator of transcription 1) και IRF-1 (interferon regulatory factor 1) που αναγνωρίζουν στοιχεία απόκρισης πάνω στους υποκινητές των συγκεκριμένων γονιδίων και ρυθμίζουν θετικά την μεταγραφή τους, για τους

οποίους δείχθηκε επίσης ότι αλληλεπιδρούν με την αμινοτελική επικράτεια της NPM1 (272). Επιπρόσθετα, η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η νουκλεοφοσμίνη αλληλεπιδρά μέσω της βασικής καρβοξυτελικής επικράτειας με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor kappa B) και προωθεί την δραστική δέσμευση του πάνω στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του και κατ' επέκταση την μεταγραφή γονιδίων φλεγμονής που επάγονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί ο TNF-α (273). Μάλιστα, ένα διαφορετικό γονίδιο στόχος του NF-κB έχει προταθεί ότι επηρεάζεται από την παρουσία της NPM1 για την αποτελεσματική μεταγραφή του. Το γονίδιο *SOD2* που κωδικοποιεί για την δισμουτάση 2 του υπεροξειδίου φέρει μια μονοκλωνική θηλιά πλούσια σε νουκλεοτίδια γουανίνης στην οποία δείχθηκε ότι προσδένεται η NPM1 και συμβάλλει στην μεταγραφή του γονιδίου σε σύμπλοκο με τον NF-κB (234). Παρόμοιες αλληλουχίες DNA που έχουν την διαμόρφωση G-Quadruplex έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζονται από την NPM1 και η παρουσία τους σε υποκινητές γονιδίων όπως των *SOD2* και *c-myc* μπορεί να οδηγεί σε δέσμευση αυτών των στοιχείων από την NPM1 και την εμπλοκή της τελευταίας στην μεταγραφική τους ενεργοποίηση (232, 233). Παρομοίως, πρόσφατη ερευνητική εργασία σε κύτταρα τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού έδειξε δράση της NPM1 που προσομοιάζει σε μεταγραφικό ενεργοποιητή για το γονίδιο PD-L1 (Programmed cell Death protein-ligand 1) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη συνδέτη η οποία συμβάλλει στην διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και την αύξηση της επιβίωσης τους. Μέσω δοκιμών συγκατακρήμνισης και φασματοσκοπίας μαζών η ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η NPM1 δια της καρβοξυτελικής αρωματικής επικράτειας δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου και μάλιστα η σύνδεση βασίζεται σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία πλούσια σε γουανίνη, ενώ με δοκιμές *in vitro* δραστικότητας έδειξαν ότι η δέσμευση της NPM1 ενισχύει την ενεργοποίηση του υποκινητή (274).



Εικόνα 17 Απεικόνιση των κυτταρικών διεργασιών της οποίες εμπλέκεται η NPM1. Προσαρμογή εικόνας από (217)

1.3.3 Νουκλεοφοσμίνη και καρκίνος

Οι ιδιότητες της νουκλεοφοσμίνης στην επιτήρηση της ακεραιότητας του DNA και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς απόκρισης σε στρες, προβάλλουν μια φυσιολογικά κυτταροπροστατευτική και αντικαρκινική δράση της NPM1. Ωστόσο, η απορρύθμιση της έκφρασης της NPM1 έχει συσχετιστεί με την προώθηση της καρκινογένεσης και την κακή πρόβλεψη σε πολλούς συμπαγείς όγκους (275), ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* και μετατοπίσεις στο χρωμόσωμα 5q όπου εδρεύει, αποτελούν το γενετικό υπόβαθρο για την εμφάνιση και εξέλιξη μεγάλου αριθμού λευχαιμιών (276).

Ειδικότερα η NPM1 εμφανίζεται μεταλλαγμένη σε αιματολογικές νεοπλασίες όπως η Οξεία Προμυελωτική Λευχαιμία (APL) (277) και η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML) (278), το Αναπλαστικό Μεγαλοκυτταρικό Λέμφωμα (ALCL) (279), το Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (MDS) (280) και η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία Τ κυττάρων (T-ALL) (281). Ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα εξόνια 11 και 12 η αγρίου τύπου NPM1 αντικαθίσταται από μεταλλάγματα που χάνουν τον εντοπισμό στον πυρηνίσκο και εντοπίζονται διάχυτα στο κυτταρόπλασμα (NPM1c). Έτσι χάνεται ο ρυθμιστικός ρόλος της νουκλεοφοσμίνης στους πυρηνίσκους που αναλύθηκε παραπάνω, ενώ ταυτόχρονα πολλές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την αμινοτελική επικράτεια της NPM1 μπορεί να εκτοπίζονται μαζί με τα μεταλλάγματα εκτός πυρηνίσκων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p14ARF (282), αλλά και την λιγάση Fbw7γ που προωθεί την αποικοδόμηση του ογκογόνου *c-myc* στο πρωτεάσωμα (283). Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και μετατοπίσεις έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών που φέρουν τουλάχιστον το αμινοτελικό άκρο της NPM1 σε σύνδεση με διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών όπως ο παράγοντας 1 μυελοειδούς λευχαιμίας (MLF1) (280), ο υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος A (RARA) (284) και οι κινάσες ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) (285) και TYK2 (Tyrosine Kinase 2) (286), οι οποίες συμβάλλουν σε ένα διαφορετικό φαινότυπο που προωθεί την καρκινογένεση και την αποφυγή της απόπτωσης. Από την άλλη, στο τύπο non-Hodgkin λεμφώματος (NHL) που χαρακτηρίζεται ως διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα λέμφωμα (DLBCL) η αυξημένη έκφραση της φυσιολογικής νουκλεοφοσμίνης έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση για την πορεία της νόσου (287).

Παρομοίως, η NPM1, χωρίς να παρουσιάζει μεταλλάξεις, υπερεκφράζεται σε διαφορετικούς συμπαγείς όγκους όπως το ηπατοκαρκίνωμα, ο καρκίνος του μαστού (288), ο καρκίνος του προστάτη (271) και της ουροδόχου κύστης (289), ο καρκίνος του παχέος εντέρου (290), ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (291) και οι όγκοι του θυρεοειδούς και του θύμου

αδένα (288). Ο τρόπος δράσης της νουκλεοφοσμίνης στην προώθηση της καρκινογένεσης σχετίζεται με την ρύθμιση της απόπτωσης και του πολλαπλασιασμού (292). Η υπερέκφραση της NPM1 σε συμπαγείς όγκους μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση της με τον p14ARF στους πυρηνίσκους η οποία, όπως περιγράφηκε νωρίτερα, οδηγεί σε μείωση της αλληλεπίδρασης του p14ARF με την Mdm2 και την αυξημένη δράση της τελευταίας που προωθεί την αποσταθεροποίηση της p53. Επιπρόσθετα σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος δείχθηκε ότι η NPM1 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα ATF5 (Activating Transcription Factor 5) και προωθεί την αποικοδόμηση του, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δράση του, η οποία σχετίζεται με την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (293). Από την άλλη, έχειδειχθεί ότι η NPM1 μετά την υπερέκφραση της σε συμπαγείς όγκους επάγει την δράση του ογκογονιδίου c-myc (294). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι σε συνθήκες υποξίας στην υπερέκφραση της NPM1 συμβάλλει άμεσα η μεταγραφική δράση του HIF-1. Έχειδειχθεί ότι η υπερεκφρασμένη σε συνθήκες υποξίας NPM1 προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση μειώνοντας έμμεσα την ενεργοποίηση της p53 (198).

Έχει προταθεί ότι η στόχευση της νουκλεοφοσμίνης έχει λογική ως στρατηγική για την αντιμετώπιση συμπαγών όγκων καθώς βρέθηκε ότι η καταπολέμηση όγκων με ακτινοβολία σε μεταλλαγμένα ποντίκια που δεν εκφράζουν νουκλεοφοσμίνη ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με μη μεταλλαγμένα πειραματόζωα (291). Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η δράση του μορίου YTR107 που επάγει την κυτταρική ευαισθησία στην ακτινοβολία, εκδηλώνεται μέσα από την παρέμβαση του στην ικανότητα της σουμοϋλιωμένης NPM1 να δημιουργεί εμπυρήνωση πρωτεϊνών που αντιμετωπίζουν τις βλάβες στο DNA (295) (296).

Φαίνεται λοιπόν ότι η ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της νουκλεοφοσμίνης που επάγουν την καρκινογένεση μπορεί να προσφέρει στην επιστημονική κοινότητα νέους στόχους στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Κεφάλαιο 2 Σκοπός

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α σε συνάρτηση με την ενεργότητα των ERK1/2 και η μελέτη του ρόλου αυτού του μηχανισμού στην δράση του HIF-1 ως μεταγραφικού παράγοντα αλλά και στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Πρακτικοί στόχοι της διδακτορικής διατριβής ήταν:

1. Μελέτη της ικανότητας των ανασυνδυασμένων μορφών NPM1 και HIF-1α να αλληλεπιδρούν παρουσία ή απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος και χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης.
2. Ανίχνευση της αλληλεπίδρασης NPM1/HIF-1α εντός των κυττάρων και μελέτη του ρόλου των ERK1/2 στην ρύθμιση της αλληλεπίδρασης.
3. Διερεύνηση της επίδρασης της NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα και τον μηχανισμό δράσης του HIF-1.
4. Μελέτη του ρόλου του συμπλόκου HIF-1α/NPM1 στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

Κεφάλαιο 3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *Escherichia Coli*

TOP10 (Invitrogen). Τα στελέχη αυτά έχουν γονότυπο $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK \lambda^- rpsL(Str^R) endA1 nupG$. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη και χρησιμοποιήθηκαν για των πολλαπλασιασμό και την απομόνωση των μετασχηματισμένων σε αυτά πλασμιδιακών φορέων.

BL21-CodonPlus-RIL strain3 (Invitrogen). Τα στελέχη αυτά έχουν γονότυπο *E. Coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU ileY leuW] Camr*. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην γλωραμφαινικόλη. Εκφράζουν tRNA, των αμινοξέων αργινίνη, λευκίνη, και ισολευκίνη, σε σύνδεση με αντικωδικόνια που είναι σπάνια στα στελέχη E.Coli και σημαντικά για την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Δεν εκφράζουν τις πρωτεάσες lon και ompT επιτρέποντας μικρότερη αποικοδόμηση των ετερόλογων πρωτεϊνών που εκφράζονται σε αυτά.

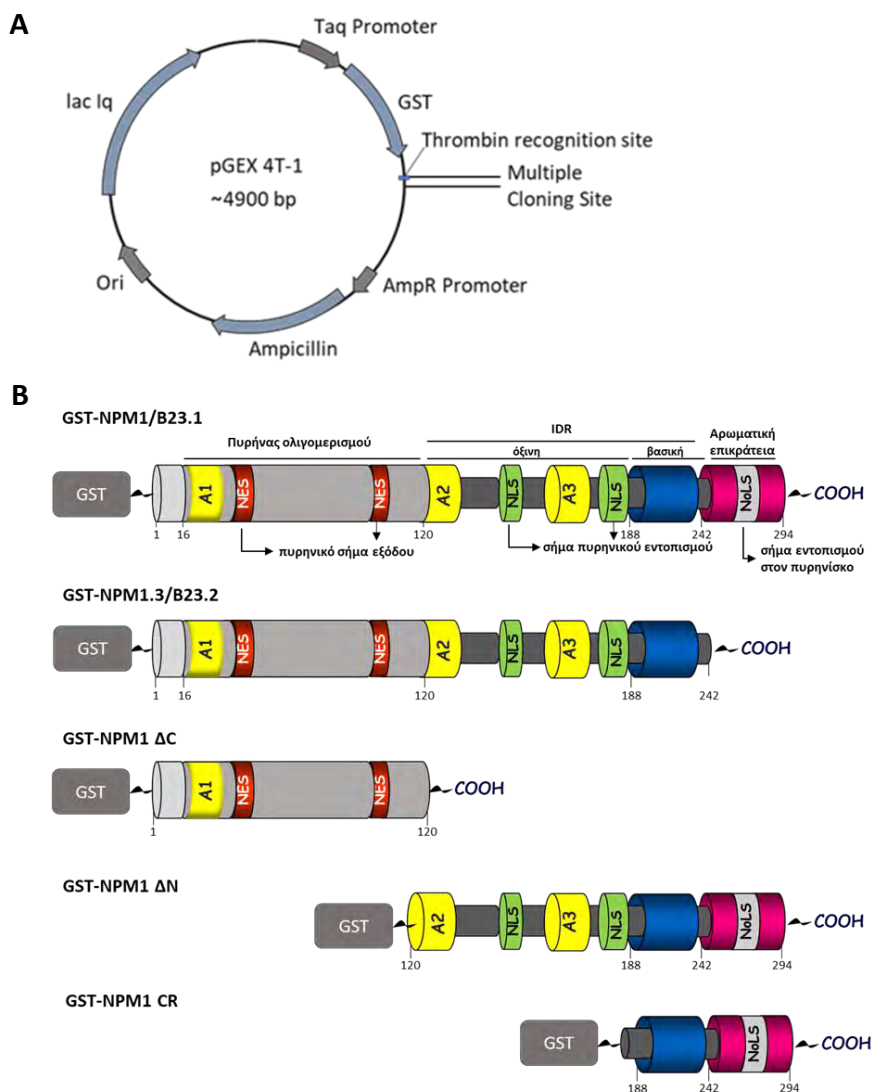
3.1.2 Πλασμιδιακοί Φορείς

➤ pGEX-2T, pGEX-4T-1.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX-2T και το παράγωγό του pGEX-4T-1 χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST και ανασυνδυασμένων τμημάτων της NPM1 ή του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο GST στο αμινοτελικό τους άκρο σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL. Φέρουν αφενός γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και αφετέρου τον υβριδικό υποκινητή tac, ενώ εκφράζουν ανασυνδυασμένη S τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) του οργανισμού *Schistosoma japonicum*. Τα cDNA

που κωδικοποιούν για τις επιθυμητές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έχουν εισαχθεί με κλωνοποίηση στη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS) στο 5' - άκρο του οποίου σχηματίζεται μια θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση θρομβίνη (Thrombin recognition site) (Εικόνα 18Α).

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν πλήρους μεγέθους ή τμήματα της NPM1 ήταν ευγενική προσφορά του Dr Mitsuru Okuwaki από το πανεπιστήμιο της Tsukuba, Japan (226, 297). Τα cDNA ενθέματα κωδικοποιούν για τα τμήματα της NPM1 1-294 (B23.1 ολικού μήκους), 1-259 (B23.1.2), 1-117 (ΔC, αμινοτελική επικράτεια), 120-294 (ΔN, χωρίς αμινοτελικό άκρο), 188-294 (CR, καρβοξυτελική επικράτεια) (Εικόνα 18B).

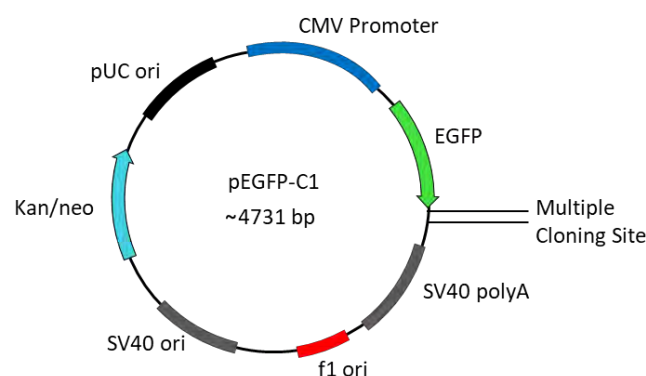


Εικόνα 18 (A) Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pGEX 4T-1, (B) Απεικόνιση των ανασυνδυασμένων τμημάτων NPM1 με αμινοτελικό επίτοπο GST.

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν τα τμήματα HIF-1α (348-826) ήταν αποτέλεσμα προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου (54) και περιείχαν cDNA που εκφράζουν την περιοχή του HIF-1α 348-826 είτε ως αγρίου τύπου μορφή (wt), είτε με μεταλλάξεις που κωδικοποιούσαν για αλλαγή των σερινών 641 και 643 σε αλανίνες (SA) ή της σερίνης 641 σε γλουταμινικό (SE). Επιπλέον κλωνοποιήθηκε, μέσω κατάλληλων εκκινήτων, μια αλληλουχία που κωδικοποιεί για μια θέση αναγνώρισης-πέψης από την πρωτεάση TEV του ιού Tobacco Etch Virus, έτσι ώστε να εκφράζεται αμινοτελικά των πρωτεϊνικών τμημάτων HIF-1α.

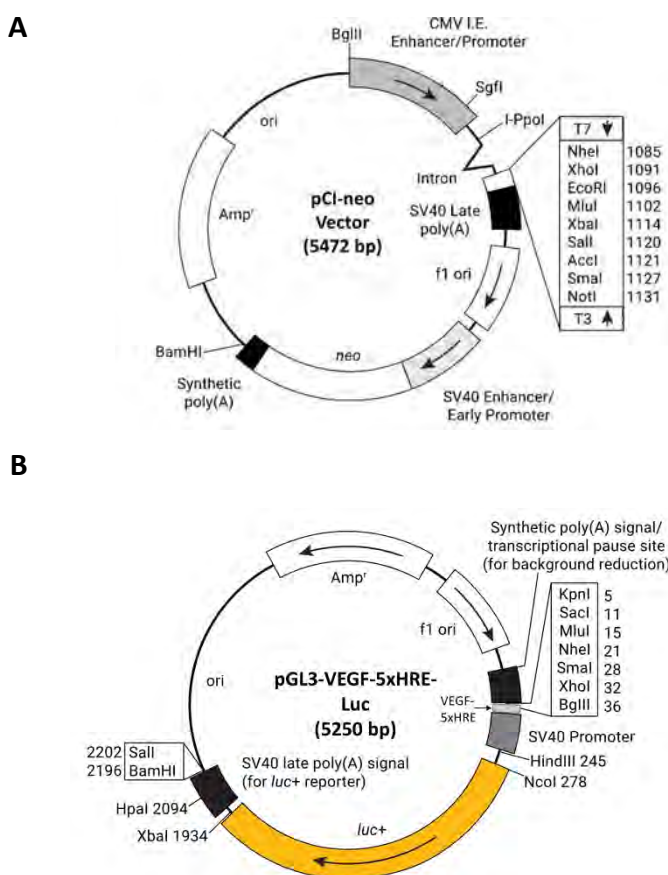
➤ pEGFP-C1

Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GFP (green fluorescent protein) ή κλωνοποιημένων cDNA του HIF-1α με αμινοτελικό επίτοπο GFP σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa. Φέρει τον υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, ενώ για επιλογή σε κύτταρα θηλαστικών φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη (Εικόνα 19). Τα cDNA ενθέματα του HIF-1α κωδικοποιούν είτε για την αγρίου τύπου μορφή, είτε φέρουν μεταλλάξεις που αλλάζουν τις ισολευκίνη 637, λευκίνη 638, ισολευκίνη 639 σε αλανίνες και σερίνη 641, 643 σε αλανίνες IA/SA, την σερίνη 641 σε γλουταμινικό SE, την σερίνη 247 σε αλανίνη SA ή την σερίνη 247 σε ασπαρτικό οξύ SD. Οι πλασμιδιακές κατασκευές και τα μεταλλάγματα δημιουργήθηκαν σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου (55).



Εικόνα 19 Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1

➤ pCI-renilla (Promega) / pGL3-VEGF-5xHRE-Luc



Εικόνα 20 (Α) Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pCI-neoVector, προσαρμογή εικόνας από (<https://worldwide.promega.com>). (Β) Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pGL3-VEGF-5xHRE-Luc, προσαρμογή εικόνας από (<https://worldwide.promega.com>)

Ο φορέας έκφρασης pCI-renilla φέρει υποκινητή CMV I.E.(immediate early) που προωθεί την συνεχή μεταγραφή του κλωνοποιημένου cDNA της λουσιφεράσης του ανθόζωου *Renilla Reniformis* σε κύτταρα θηλαστικών. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη, ενώ για επιλογή σε κύτταρα θηλαστικών φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη (Εικόνα 20 Α). Το πλασμίδιο ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr. M. U. Muckenthaler (University of Heidelberg, Germany) και χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της λουσιφεράσης της *Renilla* ως μάρτυρα του ποσοστού διαμόλυνσης, για την κανονικοποίηση των μετρήσεων μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-VEGF-5xHRE-Luc φέρει, κλωνοποιημένο ανοδικά του υποκινητή SV40, έναν τεχνητό υποκινητή με 5 διαδοχικά HRE του γονιδίου *VEGF*, ο οποίος ελέγχεται από τους HIF. Κωδικοποιεί για την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (firefly luciferase) που χρησιμοποιείται ως δείκτης της ενεργοποίησης του κλωνοποιημένου υποκινητή (Εικόνα 20 Β). Ο πλασμιδιακός φορέας ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr.A. J. Giacina (Stanford University) (298).

3.1.3 Ευκαρυωτικές καρκινικές σειρές

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

- HeLaS3 (CVCL_0058) / HeLa M (CVCL_R965) πρόκειται για ανθρώπινης προέλευσης αθανοτοποιημένες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκινικά κύτταρα HeLa του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Τα HeLa M χρησιμοποιήθηκαν επειδή σε αντίθεση με τα S3 εκφράζουν το γονίδιο *EPAS1* που κωδικοποιεί για τον HIF-2α.
- HUH7 (CVCL_0336), πρόκειται για ανθρώπινης προέλευσης αθανοτοποιημένη κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων επιθηλίου ηπατοκαρκινώματος.

3.1.4 Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Από τις εταιρείες BIOCHROME (U.K.), Biowest (USA) και Gibco Life Technologies Limited (U.K.) χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high glucose
- Ορός βόειου εμβρύου (Fetal Bovine Serum, FBS) (τελική συγκέντρωση 1-10%, χρήση μετά από απενεργοποίησης με επώαση 30 min στους 56°C)
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (συγκέντρωση χρήσης 50 U/ml)
- Θρυψίνη (Trypsin-EDTA σε διάλυμα PBS)

3.1.5 Εταιρείες προμήθειας χημικών αντιδραστηρίων και ενζύμων

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Sigma Aldrich (USA), PanReac AppliChem ITW Reagents (Germany), Merck (Germany), Biosolve (France), Becton Dickinson and Company (USA).

Τα ένζυμα και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα ήταν προϊόντα των εταιρειών Takara Bio (Japan), New England Biolabs (USA), Sigma Aldrich (USA) και Thermo Fisher Scientific (USA).

3.1.6 Υλικά χρωματογραφίας

Σφαιρίδια Σεφαρόζης-Γλουταθειόνης (Protino[®] Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel). Τα σφαιρίδια αυτά φέρουν ανηγμένη γλουταθειόνη που αποτελεί υπόστρωμα για την S-τρασνφεράση της γλουταθειόνης (GST). Χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των GST χημικών πρωτεϊνών από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγγιστείας και σε συγκατακρημνίσεις πρωτεϊνών ευκαρυωτικών κυττάρων με δόλωμα πρωτεΐνες με GST επίτοπο (pull down assays).

Σφαιρίδια Αγαρόζης-protein A (Agarose Bead Technologies, USA). Τα σφαιρίδια αυτά αποτελούνται από αγαρόζη και φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένη ανασυνδυασμένη protein A του *Staphylococcus aureus* που παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για μεγάλο εύρος ανοσοσφαιρινών. Χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

Σφαιρίδια Αγαρόζης-Νικελίου (Ni-NTA Agarose, Qiagen, Germany). Τα σφαιρίδια αυτά περιέχουν νικέλιο-νιτριλοτριοξικό οξύ (Ni-NTA) συνδεδεμένο σε σεφαρόζη. Η σύνδεση των πρωτεϊνών στα σφαιρίδια αυτά βασίζεται στην αυξημένη ικανότητα που έχει το αμινοξύ ιστιδίνη (His) να δημιουργεί δεσμούς με ιόντα νικελίου. Έτσι, κλωνοποίηση πλασμιδιακών φορέων ώστε να εκφράζουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με επίτοπο 6 ιστιδινών (His-tag),

αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την συγγένεια σύνδεσης αυτών των πρωτεϊνών σε σφαιρίδια Αγαρόζης-Νικελίου. Χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TEV με επίτοπο His-tag, μετά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε βακτήρια BL21-CodonPlus-RIL.

Σφαιρίδια GFP-Trap (Chromotek). Τα σφαιρίδια αυτά αποτελούνται από αγαρόζη και έχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένη πάνω τους μια τροποποιημένη επικράτεια της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος έναντι της GFP. Χρησιμοποιούνται για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης GFP-χημικών πρωτεϊνών.

3.1.7 Ολιγονουκλεοτιδικοί Εκκινητές

Ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για την πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου μετά από ανάστροφη μεταγραφή (RT-PCR) καθώς και για την ανάλυση των χρωματινικών περιοχών που ανακτήθηκαν από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (CHIP). Για την ενίσχυση οποιουδήποτε τμήματος δίκλωνου DNA χρειάζεται ένα ζεύγος εκκινητών που αποτελείται από τον πρόσθιο – νοηματικό εκκινητή (Forward Primer, F) και το ανάστροφο – αντινοηματικό εκκινητή (Reverse Primer, R).

Πίνακας 1 Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση περιοχών cDNA (χρήση σε RT-PCR) ή χρωματινικών περιοχών (χρήση για ανάλυση CHIP)

Ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία (5'-3')
Χρήση σε RT-PCR	
hLPIN1+141-F	TTTCCACGTCCGCTTTGGG
hLPIN1+314-R	GTGGCCAGGTGCATAGGG
hsP4HA1-F	AGGGGTTGCTGTGGATTACC
hsP4HA1-R	GTCATGTACTGTAGCTCGGC
hsACTIN-F	CCAACCGCGAGAAGATGA
hsACTIN-R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
ALDOC-F	CTGCCACTGAGGAGTTCATC
ALDOC-R	CTCCACCATCTTCTCCACTG
FA2H-F	AACGAGCCTGTAGCCCTTGA
FA2H-R	ACTGCCACCGTGTACTCTGT

TGFBI-F	GTCCACAGCCATTGACCTTT
TGFBI-R	ACCGCTCACTTCCAGAGAGA
BIRC3-F	CTTTGCCTGTGGTGGAAAAT
BIRC3-R	ACTTGCAAGCTGCTCAGGAT
<i>Χρήση για ανάλυση CHIP</i>	
hLPIN1CHIPF1	TGGGATCCTTTCTGCCCGGG
hLPIN1CHIPR1	CACTGCTGAGCCCAGCTGGT
AGPAT2 HRE 5-6 (-1013 to -778) F	AAAAAGAGGGGCCGTGCTC
AGPAT2 HRE 5-6 (-1013 to -778) R	GTTACATCCGCTTGGCAG
AGPAT2 HRE 4 (-685 to -492) F	AGACACACGCCCCAGTTG
AGPAT2 HRE 4 (-685 to -492) R	CAGAACCACAGCTCCCCAAG
AGPAT2 HRE 1-3 (-330 to -140) F	GTAACCTGGCAGAAGGCTGT
AGPAT2 HRE 1-3 (-330 to -140) R	CAGGGAAGGGCTAGGTGC
HSPB HRE F	GTTCCAGATGAGGGCTGAAC
HSPB HRE R	TCTGGACGTCTGCTCAGAAA
HSPBneg F	CTCAAACGGGTCATTG
HSPBneg R	TCGGCTGCGCTTTTAT
HAMP F	CACATCTCAAGGGTCTGACAC
HAMP R	ATGAGCAGAATCAAGGTTCC
CASP9 F	GTGACGCAAGAGCGAATCCTT
CASP9 R	CAGGGCCAAGCCTCCCAT

3.1.8 Αλληλουχίες μικρών παρεμβατικών μορίων RNA

Για πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν μικρά παρεμβατικά μόρια RNA (siRNA) που στοχεύουν βάση συμπληρωματικότητας το mRNA των γονιδίων στόχων *NPM1* και *HIF1A* και ως συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιείται siRNA που δεν αναγνωρίζει κάποιο mRNA ως στόχο (Non target siRNA, Nt).

Πίνακας 2 Μικρά παρεμβατικά siRNA που χρησιμοποιήθηκαν είτε ως συνθήκη ελέγχου είτε για την αποσιώπηση της έκφρασης των αναφερόμενων πρωτεϊνών

siRNA	Αλληλουχία (5'-3')	Πηγή
AllStars Non target siRNA	Μη κοινοποιημένη αλληλουχία	Qiagen (cat. No. 1027280)
HIF-1α HP siRNA	AGGAAGA ACTATGAACATAAA	Qiagen (cat. No. SI02664053)
NPM1 Predesign Chimera RNAi	Μη κοινοποιημένη αλληλουχία	Abnova (cat. No. H00004869_R01)
NPM1 FlexiTube siRNA	AAAGGTGGTTCTCTTCCCAA	Qiagen (cat. No. SI2654960)

3.1.9 Αντισώματα

Πίνακας 3 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού

Αντίσωμα	Πηγή	Αραίωση χρήσης
Πολυκλωνικό έναντι HIF-1α από ορό κουνελιού	Lyberopoulou et al., 2007	Ανοσοαποτύπωση 1:2000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι HIF-1α	BD Transduction Laboratories, 610959	Ανοσοφθορισμός 1:500
Πολυκλωνικό έναντι NPM1 από ορό κουνελιού	Millipore, ABS667	Ανοσοαποτύπωση 1:2000, Ανοσοφθορισμός 1:1000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι NPM1	Millipore, MAB937	Ανοσοαποτύπωση 1:3000
Πολυκλωνικό έναντι HIF-2α από ορό κουνελιού	Novus Biologicals, NB100-122	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι ARNT	BD Transduction Laboratories, 611079	Ανοσοαποτύπωση 1:500
Πολυκλωνικό έναντι p44/42 MAPK από ορό κουνελιού	Cell Signaling, 9102S	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Πολυκλωνικό έναντι φωσφορυλιωμένης p44/42 MAPK από ορό κουνελιού	Cell Signaling, 9101S	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Πολυκλωνικό έναντι Lipin-1 από ορό κουνελιού	Grimsey et al., 2008	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Πολυκλωνικό έναντι caspase 3 από ορό κουνελιού	Cell Signaling, 9662S	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Πολυκλωνικό έναντι cleaved caspase 3 από ορό κουνελιού	Cell Signaling, 9664S	Ανοσοαποτύπωση 1:1000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι β-Actin	Cell Signaling, 3700S	Ανοσοαποτύπωση 1:5000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι α-Tubulin	Cell Signaling, 3873S	Ανοσοαποτύπωση 1:10000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι FLAG	Sigma-Aldrich, F4042	Ανοσοαποτύπωση 1:10000
Πολυκλωνικό έναντι GFP από ορό κουνελιού	Thermo Fisher Scientific, A6455	Ανοσοαποτύπωση 1:2000
Πολυκλωνικός αντιορός έναντι GFP από ορό κουνελιού	Dr.H.Boleti (Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece)	Ανοσοαποτύπωση 1:2000
Μονοκλωνικό έναντι GST από ορό ποντικού	Ximbio, 15TF2-1D10	Ανοσοαποτύπωση 1:10000
Μονοκλωνικό ποντικού έναντι Acetyl Histone H4 (K5, K8,K12 or16)	Ximbio, 3HH4-2C2	Ανοσοαποτύπωση 1:1000

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Επεξεργασία βακτηριακών στελεχών ώστε να καταστούν δεκτικά για μετασχηματισμό

Η συγκεκριμένη τεχνική καθιστά δυνατή την εισαγωγή εξωγενούς πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia Coli*. Το αρνητικό φορτίο του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος αποτρέπει την προσέγγιση του όμοια φορτισμένου DNA. Διαδοχική κατεργασία των βακτηρίων με κατιόντα Ca^{2+} προερχόμενα από $CaCl_2$ ανατρέπει αυτή τη συνθήκη εξουδετερώνοντας το φορτίο τους. Τα δεκτικά πλέον βακτήρια με κατάλληλο θερμικό σοκ μπορούν να προσλάβουν τα εξωγενή πλασμίδια. Η διαδικασία έγινε για δύο διαφορετικά στελέχη *E. Coli* τα TOP10 και BL21-RIL, με την μεθοδολογία να διαφέρει μόνο στο αντιβιοτικό επιλογής. Συγκεκριμένα εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού μέσου TYM (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0,1 M NaCl, 10mM $MgSO_4$) με αποικίες Top10 ή BL21-RIL παρουσία 25 $\mu g/ml$ στρεπτομυκίνης ή χλωραμφαινικόλης αντίστοιχα και επωάζονται για 16h με ανάδευση στους 37°C. Ακολούθως για να συγχρονιστούν στη φάση εκθετικής ανάπτυξης τα βακτήρια επωάζονται μετά από δύο διαδοχικές αραιώσεις. Αρχικά 1:100 σε όγκο 3 ml θρεπτικού μέσου TYM με επώαση 3h παρουσία αντιβιοτικού επιλογής υπό ανάδευση στους 37°C και στη συνέχεια 1:200 σε όγκο 50 ml θρεπτικού μέσου TYM χωρίς αντιβιοτικό επιλογής υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει σε οπτική πυκνότητα $OD_{600} = 0.4$. Σε αυτό το στάδιο τα βακτήρια συλλέγονται ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση 800 x g, 10 min, 4°C για να ακολουθήσει η κατεργασία που θα τα κάνει δεκτικά. Αρχικά επαναιωρούνται σε 25 ml διαλύματος TFB-I (100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% γλυκερόλη και 100 mM CH_3COOK , pH 7) και επωάζονται στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 min, 800 x g και επαναιώρηση σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7). Μετά από επώαση σε πάγο για 60 min η διαδικασία ολοκληρώνεται και τα κύτταρα μοιράζονται σε κλάσματα των 100 μl σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου Eppendorf) και αποθηκεύονται στους -80°C.

3.2.2 Μετασχηματισμός στελεχών *E.Coli* με εξωγενές πλασμίδιο

Τα βακτήρια έχουν την φυσιολογική ιδιότητα να προσλαμβάνουν ετερόλογο πλασμιδιακό DNA με μια διαδικασία γνωστή ως οριζόντια μεταφορά γονιδίων που εξελικτικά φαίνεται ότι τους έχει προσδώσει πολλές προσαρμοστικές ιδιότητες. Ο στοχευμένος μετασχηματισμός δεκτικών στελεχών βακτηρίων με επιθυμητούς ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς είναι ευρεία διαδεδομένος στην Βιοτεχνολογία. Σε αυτή τη διατριβή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα *E.Coli* TOP10 και την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ανασυνδυασμένες ευκαρυωτικές πρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.Coli* BL21-RIL.

Η μεθοδολογία εφαρμόζεται ως εξής. Σε 50-100 μl αιωρήματος δεκτικών βακτηρίων προστίθεται πλασμιδιακό DNA από καθαρή απομόνωση (50-100 ng DNA) ή 25 μl εκλούσματος πλασμιδίου από χαρτί Whatman 3MM {500 ng πλασμιδίου, αποθηκευμένου σε χαρτί Whatman 3MM εκλούστηκε σε 50 μl 10 mM Tris, pH7.6 με ισχυρή ανάδευση, επώαση 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση 1 min 10000 x g (299)}. Ακολουθούν επώαση στον πάγο 30 min και θερμικό σοκ 2 min, 42°C ώστε να προσλάβουν το εξωγενές πλασμίδιο. Το σοκ σταματάει με ταχεία προσθήκη θρεπτικού υλικού 0.5-0.7 ml LB (LURIA BROTH-Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και έπειτα τα βακτήρια επωάζονται 1h στους 37°C, ώστε να επανέλθουν από το θερμικό σοκ. Αφού ολοκληρωθεί ο μετασχηματισμός τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο Πετρί με θρεπτικό LB άγαρ που περιέχει 25 μg/ml από το αντιβιοτικό επιλογή, ανθεκτικότητα στο οποίο προσδίδει το εξωγενές πλασμίδιο όταν έχει επιτευχθεί ο μετασχηματισμός. Το ποσοστό των κυττάρων που επιστρώνεται εξαρτάται από το πλήθος των αποικιών που αναμένεται να αναπτυχθούν, με στόχο πάντα να υπάρχουν πολλές μεν, διακριτές δε αποικίες. Έτσι σε αντιδράσεις που αναμένεται μικρό πλήθος αποικιών γίνεται φυγοκέντρωση 800 x g, 1 min επαναιώρηση σε 50-100 μl LB και επίστρωση του συνόλου των κυττάρων, ενώ όταν υπάρχει μεγάλη απόδοση σε

αποικίες τότε επιστρώνεται το 1/10 του αρχικού αιωρήματος μετασηματισμού. Τέλος, τα τρυβλία Πετρί επωάζονται ανεστραμμένα για 16h στους 37°C.

3.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Η μέθοδος βασίζεται στην σύντομη έκθεση των βακτηριακών κυττάρων σε αποδιατακτικούς παράγοντες, στοχεύοντας στην λύση των κυττάρων και την αναστρέψιμη αποδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, έτσι ώστε να μπορέσει να ανακτήσει την διαλυτή του μορφή και να διαχωριστεί με φυγοκέντρηση από το χρωμοσωμικό DNA και τις βακτηριακές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA γίνεται παρουσία χαοτροπικών αλάτων που προωθούν την δέσμευση του DNA σε ειδικές στήλες καθαρισμού, οι οποίες περιλαμβάνονται σε εμπορικά κιτ και στο τέλος της μεθόδου γίνεται έκλυση του DNA από τις στήλες με υδατικό διάλυμα έκλυσης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν στήλες καθαρισμού που βασίζονται στην τεχνολογία silica membrane και περιέχονται στα εμπορικά διαθέσιμα Plasmid Mini Kit της εταιρείας Bioline (Canada) και το DNA Purification kit της εταιρείας Macherey-Nagel (Germany). Συνοπτικά η εφαρμογή του πρωτοκόλλου ακολουθεί τα παρακάτω βήματα.

Αρχικά εμβολιάζονται 3-5 ml θρεπτικού LB με μια διακριτή βακτηριακή αποικία, προερχόμενη από μετασηματισμό κυττάρων *E.Coli* Top10, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής και επωάζονται για 16h στους 37°C με ανάδευση 150 rpm, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο και να παραχθούν πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδιακού DNA. Έπειτα, η καλλιέργεια ισομοιράζεται σε μικροσωληνίσκους και φυγοκεντρείται στις 800 x g για 2 min για να αφαιρεθεί το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο. Στην συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρούνται αρχικά σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος buffer P1 ή διάλυμα TE-RNase A (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8, 0.1 mg/ml RNase A). Η παρουσία ριβονουκλεάσης είναι σημαντική για την πέψη και μετέπειτα

απομάκρυνση των μορίων RNA. Στη συνέχεια προστίθεται 250 µl διαλύματος λύσης buffer P2 ή εναλλακτικά διάλυμα που περιέχει 1% SDS, 0.2 M NaOH, τα κύτταρα ανακινούνται ήπια ώστε να μην σπάσει το χρωμοσωμικό DNA και επώάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εξουδετέρωση με προσθήκη 300 µl διαλύματος buffer P3 ή εναλλακτικά διάλυμα που περιέχει οξικό κάλιο ή οξικό νάτριο ($\text{CH}_3\text{COOK}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 3 M, pH 5), ανακίνηση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στα παραπάνω δύο διακριτά στάδια επιτυγχάνεται αρχικά μερική αποδιάταξη των μακρομορίων, ενώ με την ακόλουθη προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης τα μικρά μόρια πλασμιδιακού DNA ανακτούν γρήγορα την δίκλωνη και διαλυτή διάταξη τους, ενώ το μεγάλο χρωμοσωμικό DNA και οι πρωτεΐνες παραμένουν αδιάλυτα και με φυγοκέντρηση 11000 x g για 10 min ιζηματοποιούνται. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υλικό που προήρθε από αρχική καλλιέργεια μέχρι 5 ml περνάει από μια στήλη, φορτώνοντας μέχρι 700 µl τη φορά, και φυγοκεντρείται με 11000 x g για 1 min. Τα μόρια DNA προσδένονται στην επιφάνεια της στήλης, ενώ τα λύματα που δεν συγκρατούνται απορρίπτονται σε υποκείμενο σωληνίσκο. Ακολουθεί πλύση της στήλης με 600 µl διαλύματος buffer PW2 και φυγοκέντρηση 11000 x g για 1 min και διαδοχική φυγοκέντρηση 11000 x g για 2 min ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα πλύσης. Η στήλη τελικά μεταφέρεται σε νέο μικροσωληνίσκο και προστίθενται 30-50 µl Elution Buffer P ή εναλλακτικά διάλυμα έκλουσης 10 mM Tris-HCL pH 8.5, επώάζεται για 1 min και το DNA συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση 11000 g για 1 min και αποθηκεύεται στους -20°C .

3.2.4 Φασματοφωτομετρικός υπολογισμός συγκέντρωσης μακρομορίων

Ο φασματοφωτομετρικός υπολογισμός της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε δείγμα βασίζεται στον νόμο των Lambert-Beer που αναφέρει ότι η ισχύς μια ακτινοβολίας όταν διέρχεται μέσα από μια ουσία μειώνεται εξαρτώμενη από την συγκέντρωση της ουσίας και την απόσταση που θα διανύσει. Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm ενώ οι πρωτεΐνες στα 280 nm.

Η συγκέντρωση των μορίων DNA και RNA υπολογίστηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου NanoDrop 2000. Η συγκεκριμένη συσκευή υπερτερεί σε ακρίβεια μέτρησης, σε σύγκριση με τα κλασικά φασματοφωτόμετρα, καθώς το δείγμα μπορεί να μετρηθεί χωρίς αραιώση και χωρίς να παρεμβάλλεται το τοίχωμα κάποιας κυψελίδας. Για την χρήση της συσκευής, η κεφαλή καθαρίζεται με χαρτί και απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό στην αρχή και στο τέλος της χρήσης ενώ από μέτρηση σε μέτρηση ο καθαρισμός με νερό είναι προαιρετικός και αρκεί το σκούπισμα της κεφαλής με χαρτί. Η συσκευή ρυθμίζεται με τυφλό 2 μl H₂O και στη συνέχεια τοποθετείται στην κεφαλή 1-2 μl δείγματος για μέτρηση απορρόφησης. Με βάση την εφαρμογή του νόμου των Lambert-Beer το φωτόμετρο μετράει την απορρόφηση και το λογισμικό την μεταφράζει αυτόματα σε συγκέντρωση. Επιπλέον, ως ποιοτικό έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος αποδίδονται αυτόματα από την συσκευή οι λόγοι $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ και $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ που εκφράζουν προσμίξεις με πρωτεΐνες και αρωματικές ενώσεις αντίστοιχα. Τιμές $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8$ ή 2 είναι δείκτης καθαρού, από προσμίξεις με πρωτεΐνες, διαλύματος DNA ή RNA, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, δείκτη καθαρότητας από προσμίξεις με μέσα καθαρισμού όπως οι φαινόλες και το EDTA αποτελεί ο λόγος $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ όταν έχει τιμές μεταξύ 2 και 2,2 τόσο για τα διαλύματα DNA όσο και εκείνα του RNA.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διάλυμα χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού και εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 που χρησιμοποιείται σε αυτή την μέθοδο έχει μέγιστο απορρόφησης ακτινοβολίας στα 460 nm όμως αυτό μετατοπίζεται στα 595 nm όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει την δημιουργία πρότυπης καμπύλης που επιτεύχθηκε με φωτομέτρηση διαδοχικών αραιώσεων δείγματος αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η αντιστοίχιση απορρόφησης-συγκέντρωσης. Η χρήση της πρότυπης καμπύλης επιτρέπει στην συνέχεια τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο διάλυμα με Για την φωτομέτρηση τα δείγματα ετοιμάζονται σε

μικροσωληνίσκο με 200 μl από το αντιδραστήριο Bradford (Biorad), 5 μl δείγματος ή χωρίς δείγμα για δύο τυφλά και H₂O σε τελικό όγκο 1 ml, αναδεύονται με χρήση vortex μεταγγίζονται σε κυβέτες και φωτομετρούνται στα 595 nm.

3.2.5 Ποιοτικός έλεγχος του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες βακτηριακής προέλευσης που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες δίκλωνου DNA και το πέπτουν με ακρίβεια στη θέση αναγνώρισης και στις δύο αλυσίδες. Είναι εργαλεία εξαιρετικής σημασίας στην κλωνοποίηση καθώς χρησιμοποιούνται για την στοχευμένη πέψη πλασμιδιακών φορέων ώστε να επιτευχθεί η εισαγωγή σε αυτούς εξωγενών γονιδίων.

Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα για τον έλεγχο της ύπαρξης και του σωστού προσανατολισμού κλωνοποιημένων ενθεμάτων cDNA που κωδικοποιούν για διάφορες μορφές και πρωτεϊνικά τμήματα της NPM1 σε σύντηξη με την GST εισαγμένα σε φορείς pGEX-2T η κλωνοποίηση των οποίων έγινε σε εξωτερικό εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκαν BamHI για τον έλεγχο του ενθέματος και διπλές πέψεις με συνδυασμό EcoRV-Sty1 ή EcoRV-BglIII για έλεγχο προσανατολισμού. Το μείγμα (2 unit ενζύμου/1 μg DNA/1x Buffer (CutSmart ή NEB)/H₂O) τελικού όγκου 20 μl επωάστηκε για 1h στους 37°C και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση.

3.2.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται σε πηκτή που σχηματίζεται από διάλυμα αγαρόζης σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA pH 7.7-8). Το διάλυμα θερμαίνεται με μικροκύματα και στη συνέχεια ψύχεται με κρύο νερό. Όταν πέσει η θερμοκρασία σε ανεκτά επίπεδα και πριν αρχίσει να πήζει το διάλυμα, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5-1 μg/ml και αναμειγνύεται με ανάδευση του διαλύματος. Στη συνέχεια το διάλυμα της πηκτής τοποθετείται στη συσκευή

ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει. Για την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα DNA αραιώνονται με διάλυμα φόρτωσης που περιέχει γλυκερόλη και δύο χρωστικές ώστε να διακρίνονται τα δείγματα κατά την φόρτωση και την ηλεκτροφόρηση (Loading Buffer 1x, 5% γλυκερόλη, 0.2-0.4% μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου). Με την εφαρμογή τάσης τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα μετακινούνται προς τον θετικό πόλο μέσα από τους πόρους που σχηματίζει η αгарόζη και διαχωρίζονται με βάση κατά κύριο λόγο το μέγεθός τους και σε μικρότερο βαθμό λόγω του σχήματός τους. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων και όταν απορροφά προσπίπτουσα υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει αποκαλύπτοντας τις ζώνες που σχηματίζουν τα ηλεκτροφορημένα νουκλεϊκά οξέα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση του ενθέματος απομονωμένων πλασμιδιακών φορέων μετά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού, καθώς και για ανάλυση DNA μορίων που απομονώθηκαν από ευκαρυωτικά κύτταρα και ενισχύθηκαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με την χρήση ειδικών εκκινητών.

3.2.7 Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα

Για την αποδοτική παραγωγή ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται αφενός ταχέως πολλαπλασιαζόμενα βακτηριακά στελέχη που έχουν την δυνατότητα αποδοτικής έκφρασης ευκαρυωτικών πρωτεϊνών και αφετέρου πλασμιδιακοί φορείς με ρυθμιζόμενα συστήματα έκφρασης ώστε να μπορεί να επαχθεί η έκφραση του κλωνοποιημένου σε αυτούς cDNA. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *E.Coli* BL-21 RIL καθώς διαθέτουν, συνδεδεμένα με τα tRNA των αμινοξέων αργινίνη της, ισολευκίνη (I) και λευκίνη (L), τα κατάλληλα αντι-κωδικόνια ώστε να αναγνωρίζουν τα κωδικόνια ευκαρυωτικού mRNA που αντιστοιχούν στα παραπάνω αμινοξέα. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pGEX-4T και pGEX-2T στους οποίους η έκφραση βασίζεται στον υβριδικό υποκινητή tac και ελέγχεται μέσω του καταστολέα lac. Με την χρήση IPTG

(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), ενός μη μεταβολιζόμενου χημικού ανάλογου της λακτόζης/αλλολακτόζης επιτυγχάνεται η μόνιμη αναστολή της δράσης του καταστολέα lac και η επαγωγή της έκφρασης.

Η μέθοδο εφαρμόστηκε με την παρακάτω ακολουθία για την επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένων τμημάτων HIF-1 α 348-826 SE και NPM1 (B23.1, B23.2, Δ N, Δ C, CR) με αμινοτελικό επίτοπο GST καθώς και της βακτηριακής πρωτεάσης TEV με επίτοπο πολυιστιδινών (his-tag). Μια απομονωμένη αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιείται για την δημιουργία αρχικής καλλιέργειας 5 ml σε L.B. με ολονύχτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C. Από αυτήν εμβολιάζεται καλλιέργεια 40 ml ώστε να επιτευχθεί O.D._{600nm} = 0.05 και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C έως ότου επιτευχθεί O.D._{600nm} = 0.5 οπότε και η καλλιέργεια βρίσκεται στο βέλτιστο σημείο εκθετικής αύξησης. Αφού κρατηθεί δείγμα ελέγχου της έκφρασης προστίθεται στην καλλιέργεια 0.1 mM IPTG και ακολουθεί επώαση 2h στους 22.5°C. Στη συνέχεια κρατείται δείγμα ελέγχου της έκφρασης μετά την επαγωγή και τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση 800 x g, 20 min στους 4°C, ξεπλένονται με H₂O με προαιρετική παρουσία 0.1 mM AEBSF για την αναστολή των πρωτεασών και κατακρημνίζονται. Το ίζημα των κυττάρων μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα ή ακολουθεί άμεσα λύση των κυττάρων και καθαρισμός της πρωτεΐνης. Για τη έκφραση της his-TEV γίνεται προσθήκη IPTG σε O.D._{600nm} = 0.4 και ακολουθεί επώαση 3h στους 30°C.

3.2.8 Λύση βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος.

Για την λύση των βακτηρίων γίνεται επαναιώρηση των ιζημάτων σε διάλυμα λύσης (1 ml Lysis Buffer/40 ml αρχικής καλλιέργειας) που συνίσταται από 20 mM Tris pH 7.6, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF, χρησιμοποιώντας συνεχώς λουτρό πάγου για να παραμένουν ανενεργές οι βακτηριακές πρωτεάσες. Στη συνέχεια τα

κύτταρα υποβάλλονται διαλειμματικά σε λύση με υπερήχους για 5 min (10 sec/min, amplitude 60) έτσι ώστε να διαρρηχθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και να είναι δυνατός ο διαχωρισμός του διαλυτού πρωτεϊνικού κλάσματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο 10000 x g, 4°C, για 30 min. Κρατείται 20 µl δείγμα υπερκειμένου (supernatant) για ανάλυση πρωτεϊνών και το υπόλοιπο χρησιμοποιείται για απομόνωση της υπερεκφρασμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στο ίζημα προστίθενται 1 ml διαλύματος λύσης επωάζεται στον πάγο και επαναιωρείται, ενώ κρατείται δείγμα 20 µl για ηλεκτροφορητική ανάλυση. Για την λύση των βακτηρίων που υπερεκφράζουν his-TEV χρησιμοποιείται διάλυμα λύσης 50 mM Tris pH 7.6, 200 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.1% triton-X-100, 5% γλυκερόλη, 1mM DTT, 0.1 mM AEBSF, ενώ υποβάλλονται σε κρούσεις με υπερήχους για 5 min (15 sec/min, amplitude 60).

3.2.9 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας.

Η απομόνωση πρωτεϊνών που φέρουν συγκεκριμένο επίτοπο από ένα διάλυμα πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας με βάση τις ιδιότητες του επιτόπου. Για τις πρωτεΐνες με επίτοπο GST χρησιμοποιείται ως προσδέτης γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης. Η GST αναγνωρίζει και δεσμεύει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη συγκρατώντας τις υπό καθαρισμό πρωτεΐνες στα σταθερά σφαιρίδια. Επακόλουθα, επώαση με περίσσεια γλουταθειόνης έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση των GST-πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια. Οι πρωτεΐνες με επίτοπο 6 ιστιδινών (his-tag) καθαρίζονται σε σφαιρίδια αγαρόζης που φέρουν ως προσδέτη τον χηλικό παράγοντα νιτριλοτριοξικό οξύ και ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose). Οι ιστιδίνες μέσω των μορίων ιμιδαζολίου που περιέχουν επιχληλιώνουν το νικέλιο και συνδέονται με αυτό σε βασικό pH, ενώ, η σύνδεση αυτή μπορεί να ανατραπεί είτε με πτώση του pH είτε διαβιβάζοντας στο διάλυμα περίσσεια ιμιδαζολίου ή ιστιδινών που θα ανταγωνιστούν τον επίτοπο για τη δέσμευση του νικελίου.

Σε κάθε περίπτωση, διάλυμα σφαιριδίων όγκου 40 μL εξισορροπείται ως προς το pH με αραιώση σε όγκο 400 μl του ίδιου Lysis Buffer που χρησιμοποιείται για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και 3 πλύσεις εξισορρόπησης των 10 min με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 8°C , με ενδιάμεση φυγοκέντρηση 3 min, 800 x g, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση σε νέο διάλυμα λύσης. Μετά την απόρριψη της τελευταίας πλύσης προστίθεται όλο το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα στα εξισορροπημένα σφαιρίδια και το μείγμα επωάζεται για 1 ώρα με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 8°C . Για την έκλυση των πρωτεϊνών με επίτοπο GST γίνονται 3 πλύσεις των 10 min με το ίδιο διάλυμα λύσης και στη συνέχεια προσθήκη 50 μl διαλύματος 10 mM ανηγμένης γλουταθειόνης, 25 mM Tris-HCl pH 8.5, ακολουθούμενη από ισχυρή ανάδευση vortex και επώαση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση 3 min 800 x g συλλέγεται το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να παραληφθεί και δεύτερο έκλουσμα. Για την έκλυση των πρωτεϊνών με επίτοπο his γίνονται αρχικά 3 πλύσεις των 10 min με διάλυμα 50 mM Tris pH 8, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, 50mM ιμιδαζόλιο για να απομακρυνθούν οι μη ειδικά προσκολλημένες πρωτεΐνες από την στήλη και ακολουθούν 2 εκλούσεις με 65 μl διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου 300 mM, 50 mM Tris pH 8, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT. Μετά την έκλυση για να απομακρυνθεί η περίσσεια ιμιδαζολίου γίνεται διαπίδυση με χρήση ημιπερατής μεμβράνης και ολονύχτια επώαση των εκλουσμάτων σε διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο.

3.2.10 Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

Για την καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών χρησιμοποιείται θάλαμος επώασης που εξασφαλίζει αποστειρωμένο περιβάλλον με θερμοκρασία 37°C , ατμόσφαιρα με 5% CO_2 για την διατήρηση φυσιολογικού pH και 85-95% υγρασία για τον περιορισμό της εξάτμισης του θρεπτικού μέσου. Οι κυτταρικές σειρές HeLa και Huh7 καλλιεργήθηκαν σε εμπορικά διαθέσιμο θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) παρουσία 10% ορού

βοδινού εμβρύου (Fetal Bovine Serum, FBS) και των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100 U/ml. Για την επαναιώρηση των καλλιεργούμενων σε τρυβλία κυττάρων γίνεται επώαση με διάλυμα θρυψίνης σε PBS (Phosphate-Buffered Saline) για 3-5 min στους 37°C. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και αραιώνονται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο ανά 2-4 ημέρες και όταν έχουν αυξηθεί και καλύπτουν >80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Η κατεργασία των καλλιεργούμενων κυττάρων γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.2.11 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη καρκινικών σειρών

Για την συντήρηση και αποθήκευση των κυτταρικών σειρών τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια συλλέγονται ως αιώρημα μετά από επεξεργασία με θρυψίνη, φυγοκεντρώνται σε 2500 g σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρούνται με PBS και φυγοκεντρώνται ξανά για να απομακρυνθεί η περίσσεια θρυψίνης. Εν τέλει επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος ψύξης που περιέχει DMEM, 10% FBS και 10% DMSO (διμεθυλσουλφοξείδιο) και μεταφέρονται σε σωλήνες κρυοσυντήρησης (cryotubes, Greiner) όπου ψύχονται σταδιακά στου -20°C, -80°C και τελικά για μακρά συντήρηση σε θαλάμους υγρού αζώτου (-196°C).

Η απόψυξη και επανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι μια γρήγορη διαδικασία που εκτελείται με γρήγορη θέρμανση του παγωμένου κυτταρικού αιωρήματος στους 37°C και μεταφορά του σε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm με 7 ml θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κύτταρα επανακαλλιεργούνται για ένα διάστημα 3-4 διπλασιασμών μέχρι να ανακτήσουν τον φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης και στη συνέχεια μέρος των κυττάρων συλλέγεται για κρυοσυντήρηση και το υπόλοιπο χρησιμοποιείται για πειραματισμό.

3.2.12 Συνθήκες σταθεροποίησης των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων HIF

Για την φυσιολογική σταθεροποίηση των HIF- α τα καρκινικά κύτταρα επωάζονται σε υποξικό θάλαμο IN VIVO2 200 (Baker Ruskin, Sanford, ME). Εφαρμόστηκε συνθήκη ήπιας υποξίας 1% O₂ που ομοιάζει φυσιολογικές συνθήκες συμπαγών όγκων για χρονικό διάστημα 4-48h.

Επαγωγή των HIF- α επιτεύχθηκε επίσης με χημικά μέσα που σταματούν την αποικοδόμησή του σε συνθήκες νορμοξίας. Έγινε επώαση είτε με τον αναστολέα των προλυλοϋδροξυλασών DMOG (dimethylxalylglycine) σε συγκέντρωση 1 mM για 4-8h, είτε με τον αναστολέα του 26 S πρωτεασώματος MG132 σε συγκέντρωση 10 μ M για 4-8h.

3.2.13 Εκχύλιση πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα

Η εκχύλιση πρωτεϊνών γίνεται με λύση των κυττάρων με αποδιατακτικούς ή μη παράγοντες. Τα προσκολλημένα στο τρυβλίο κύτταρα της καλλιέργειας πλένονται με PBS και αποκολλώνται με ξύστρα κυττάρων μετά από επίδραση του επιθυμητού διαλύματος λύσης και συλλέγονται σε σωληνίσκους φυγοκέντρου. Όταν στόχος είναι η απομόνωση ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος που θα αναλυθεί ηλεκτοφορητικά τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα φόρτωσης Laemmli Buffer δύο φορές πυκνό (2x) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4.6 % SDS, 20% glycerol, 0.1 % (w/v) Bromophenol blue, 50 mM DTT), που αναμένεται μαζί με τον όγκο των κυτταρικών λυμάτων να αραιωθεί 2 φορές και να φτάσει σε συγκέντρωση χρήσης. Τα κυτταρικό διάλυμα στη συνέχεια υποβάλλεται σε υπερήχους για 5 sec amplitude 60 και βρασμό στους 95°C για 5-10 min ώστε να είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση. Όταν είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος είναι εύκολα διαλυτές και επιθυμητό να μην χάσουν την φυσιολογική τους διαμόρφωση τότε χρησιμοποιείται διάλυμα λύσης 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton-X-100, 1% DTT, 0.1 mM AEBSF. Τα κύτταρα συλλέγονται και ομογενοποιούνται με τη χρήση πιπέτας, επωάζονται για 30 min σε πάγο και

φυγοκεντρώνονται 18000 x g 4°C 15 min, ώστε το κλάσμα διαλυτών πρωτεϊνών να απομονωθεί στο υπερκείμενο.

3.2.14 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος με βάση το μοριακό τους βάρος. Όταν εφαρμόζεται διαφορά τάσης στα άκρα ενός πήκτωματος τότε τα διάφορα μόρια κινούνται προς τον αντίθετα φορτισμένο πόλο με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με το μέγεθος, τη δομή και το φορτίο τους. Η μέθοδος SDS-PAGE βασίζεται στο αποδιατακτικό απορρυπαντικό SDS που δεσμεύεται ισομερώς πάνω στις πρωτεΐνες (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης) και καταστρέφει την τριτοταγή τους δομή, προσδίδοντας ταυτόχρονα ίσο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να διαχωρίζονται αποκλειστικά ως συνέπεια του μοριακού τους βάρους.

Στη παρούσα διατριβή για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές των εταιριών BIORAD και HOFFER. Σε αυτές τις συσκευές το πήκτωμα δημιουργείται κατακόρυφα μέσα σε γυάλινο καλούπι προσαρμόσιμου πάχους, τοποθετείται σε κασέτες μέσα σε δοχείο που πλημμυρίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 250 mM Tris, 1.92 M glycine, 0.5% SDS, 10 mM EDTA) και μέσω ηλεκτροδίων εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής τάσης (120 V). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο τμήματα. Αρχικά δημιουργείται η πηκτή διαχωρισμού ως υδατικό διάλυμα που περιέχει 10-15% ακρυλαμίδιο, διάλυμα διαχωρισμού (1.5 M Tris, 8 mM EDTA, 0.4% SDS, ρυθμισμένο σε pH 8.8 με HCl), 0.04% υπερθειϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS), 0.02% TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινοαιθάνιο). Προσθήκη νερού πάνω από το υπό πήξη διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού συμβάλλει στην ευθυγράμμιση της πηκτής. Αφού ολοκληρωθεί η πήξη αφαιρείται το νερό και προστίθεται το διάλυμα που σχηματίζει την πηκτή επιστοιβάξης που συνίσταται από 4.5% ακρυλαμίδιο, διάλυμα διαχωρισμού (0.5 M Tris, 8 mM EDTA, 0.4% SDS, ρυθμισμένο σε pH 6.8 με HCl),

0.08% APS, 0.04% TEMED και H₂O. Πριν ολοκληρωθεί η πήξη τοποθετείται μήτρα που σχηματίζει στην πηκτή επιστοιβάξης τα βοθρία όπου θα γίνει η φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Ο σχηματισμός του πηκτώματος βασίζεται στον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA με τη συμβολή ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται από το APS με καταλύτη το TEMED, σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα που συλλέχθηκαν με υπόκεινται σε επεξεργασία με διάλυμα φόρτωσης Laemmli Buffer πυκνότητας 4 φορές πυκνό (4x) (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2 % SDS, 40% glycerol, 0.2 % (w/v) Bromophenol blue, 100 mM DTT), έτσι ώστε στον τελικό όγκο το Buffer να έχει πυκνότητα χρήσης 1x (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3 % SDS, 10% glycerol, 0.05 % w/v Bromophenol blue, 25 mM DTT) και να αποτελεί το ¼ του συνολικού όγκου, ενώ το δείγμα να καταλαμβάνει τα ¾ του συνολικού όγκου. Ακολουθεί βρασμός στους 95°C και φυγοκέντρηση 10000 x g, 1 min. Μετά την εφαρμογή τάσης τα δείγματα ξεκινούν να κινούνται με ευκολία εντός του διαλύματος επιστοιβάξης χωρίς να υπάρχει διαχωρισμός των πρωτεϊνών, καθώς η μικρή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου έχει ως αποτέλεσμα μεγάλους και αραιούς πόρους στο πηκτώμα. Τα ανιόντα χλωρίου που βρίσκονται στην πηκτή προπορεύονται των όμοια αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών ενώ η ουδέτερη σε pH 6.8 γλυκίνη που προέρχεται από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ακολουθεί τις πρωτεΐνες δημιουργώντας έτσι ένα δίπολο κλοιό που συμβάλει στην στοίβαξη των πρωτεϊνών ώστε να φτάσουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Στην πηκτή διαχωρισμού το βασικό pH καθιστά τα μόρια γλυκίνης αρνητικά φορτισμένα με αποτέλεσμα να κινούνται ταχύτατα προς τον θετικό πόλο μαζί με τα ιόντα χλωρίου προσπερνώντας τις πρωτεΐνες που πλέον διαχωρίζονται αργά ανάλογα με το μοριακό τους βάρος ενώ οι προπορευόμενες αυτών βρίσκονται στην ζώνη που διακρίνεται από το μπλε της βρωμοφαινόλης που προέρχεται από το διάλυμα φόρτωσης.

3.2.15 Μονιμοποίηση και χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου μπορεί να μονιμοποιηθεί με διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος, ενώ ταυτόχρονα είναι δυνατή η χρώση των πρωτεϊνών με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Η χρώση Coomassie χρησιμοποιείται για την εμφάνιση του συνόλου των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται με SDS-PAGE. Συγκεκριμένα, έγινε επώαση με υδατικό διάλυμα που περιείχε 45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 3 g/L Coomassie brilliant blue για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε πλύση με υδατικό διάλυμα που περιείχε 10% οξικό οξύ και 10% αιθανόλη για 50 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ καταληκτικά έγινε πλύση με H₂O όπου και διατηρήθηκε η πηκτή. Εναλλακτικά η πηκτή τοποθετήθηκε σε υγρό απορροφητικό χαρτί Whatman σκεπάστηκε με μεμβράνη νάιλον και τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη παγίδα κενού για 20 min στους 70°C όπου το πήκτωμα αποξηράθηκε και αποτυπώθηκε πάνω στο χαρτί.

3.2.16 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για να γίνει ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από το σύνολο των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών πάνω σε μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης.

Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτρομεταφορά και αποτύπωση του συνόλου των πρωτεϊνών από την πηκτή πάνω σε ειδική μεμβράνη όπου μετά από επώαση με εξειδικευμένα αντισώματα θα μπορέσει να ανιχνευθεί μέσω χημειοφωταύγειας η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Για την ηλεκτρομεταφορά χρησιμοποιήθηκε συσκευή Semi-Dry Blotter της εταιρείας Peqlab®. Σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 125 mM Tris-Borate (pH 8.5), 0.2% SDS, 0.5 mM DTT ενεργοποιείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εμβαπτίζονται 4 χαρτάκια (Whatman 3MM) και η πηκτή πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια στοιβάζονται στη βάση της συσκευής που φέρει τον θετικό πόλο με την σειρά 2 χαρτάκια, η μεμβράνη, η πηκτή και άλλα

2 χαρτάκια, επιστεγάζονται με το καπάκι της συσκευής που φέρει τον αρνητικό πόλο και εφαρμόζεται σταθερή τάση 10 V για 65 min. Έτσι οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες κινούμενες προς τον θετικό πόλο παγιδεύονται και αποτυπώνονται στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μια γρήγορη μέθοδος αξιολόγησης της ηλεκτρομεταφοράς είναι η χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με την χρωστική Ponceau S. Για τον λόγο αυτό γίνεται επώαση με υδατικό διάλυμα που περιέχει 0.5% w/v Ponceau S και 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται με νερό και σε συνεχή ανάδευση με διάλυμα P-S - 0.1% Tween-20.

Για την ανίχνευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης χρειάζεται η χρήση ειδικού για αυτήν αντισώματος. Αρχικά γίνεται κορεσμός (blocking) της μεμβράνης με επώαση με 5% σκόνη γάλακτος σε PBS- 0.1% Tween-20 για 1h υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να καλυφθούν όλες οι θέσεις μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις με PBS- 0.1% Tween-20 στις ίδιες συνθήκες και εν τέλει γίνεται ολονύχτια επίδραση του ειδικού αντισώματος υπό συνεχή ανάδευση στους 8°C. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3. Την επόμενη μέρα η μεμβράνη υποβάλλεται σε 3 πλύσεις των 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με PBS – 0.1% Tween 20 και ακολουθεί επώαση με δευτερεύον αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού αντισώματος και συνδέεται ειδικά μαζί του, ενώ έχει υποστεί τροποποίηση ώστε να φέρει το ένζυμο Horseradish peroxidase. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με PBS – 0.1% Tween 20 και στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται για 1 λεπτό με διάλυμα που περιέχει 30 μl H₂O₂, 10 ml Luminol (1.24 mM σε Tris-HCl pH 8.5 και H₂O) και 100 μl p-cummaric acid (6.8 mM σε DMSO). Το ένζυμο της υπεροξειδάσης αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το H₂O₂ και δημιουργεί ρίζες υπεροξειδίου. Αυτές προκαλούν την οξειδωση του κουμαρικού οξέος που ενισχύουν και την οξειδωση της λουμινόλης ώστε η τελευταία να μετατραπεί διαδοχικά σε κυκλικό υπεροξείδιο και φορτισμένο 3-αμινοφθαλικό ανιόν απελευθερώνοντας 1 μόριο αερίου N₂. Εν

τέλει το 3-αμινοφθαλικό μεταπίπτει στην βασική του κατάσταση με την έκλυση ενός φωτονίου 425 nm. Για τον εντοπισμό της χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και το λογισμικό Alliance Software. Για την ανίχνευση περισσοτέρων του ενός πρωτεϊνών στην ίδια μεμβράνη έγιναν 3 πλύσεις των 15 min σε θερμοκρασία δωματίου με PBS – 0.1% Tween 20 και επώαση με διαφορετικό αντίσωμα ώστε να επαναληφθεί η διαδικασία.

3.2.17 Δοκιμή in vitro συγκατακρήμνισης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (In vitro pull-down assay)

Η μέθοδος της in vitro συγκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Πρόκειται για μέθοδο χρωματογραφίας αγκιστείας όπου μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη φέρει επίτοπο που της επιτρέπει να στερεώνεται πάνω σε σφαιρίδια και να χρησιμοποιείται ως δόλωμα για την δέσμευση πρωτεϊνών μετά από επώαση με κυτταρικά εκχυλίσματα. Στη παρούσα διατριβή διάφορες ανασυνδυασμένες μορφές και μεταλλαγμένα τμήματα των πρωτεϊνών HIF-1α και NPM1 που φέρουν επίτοπο GST χρησιμοποιήθηκαν ως δόλωμα για πρωτεΐνες από νορμοξικά και υποξικά κύτταρα HeLa αντίστοιχα.

Σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης όγκου 25 μl υποβλήθηκαν σε 3 πλύσεις των 10 min με ρυθμιστικό μη αποδιατακτικό υδατικό διάλυμα λύσης (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton-X-100, 1% DTT, 0.1 mM AEBSF), κυκλική ανάδευση στους 8°C και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις 800 x g 3 min. Για την αφαίρεση του διαλύματος πλύσης χρησιμοποιήθηκε σύριγγα τύπου ινσουλίνης. Έπειτα, 10 μg καθαρισμένων πρωτεϊνών/συνθήκη και ίδια ποσότητα καθαρισμένης GST ως συνθήκη ελέγχου επώαστηκαν με τα σφαιρίδια σε όγκο διαλύματος λύσης 500 μl για 1h στους 8°C με κυκλική ανάδευση ώστε μέσω του καρβοξυτελικού επιτόπου GST να δεσμευτούν στα σφαιρίδια. Κατά την

διάρκεια της επώασης έγινε η κατεργασία των καλλιευγόμενων κυττάρων. Μετά από δύο γρήγορες πλύσεις με PBS εγχέονται 150 µl διαλύματος λύσης/ τρυβλίο 100 mm, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδική ξύστρα σε σωληνίσκους φυγοκέντρου, επώαστηκαν για 30 min στον πάγο και φυγοκεντρήθηκαν για 20 min 18000 x g στους 4°C ώστε να διαχωριστούν στο υπερκείμενο οι διαλυτές πρωτεΐνες. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωληνίσκο φυγοκέντρου και από αυτό το σύνολο κρατήθηκε το 1/10 του όγκου ως δείγμα ελέγχου και το υπόλοιπο ισομοιράστηκε στους σωληνίσκους που περιέχουν τα σφαιρίδια με τα συνδεδεμένα δολώματα ακολούθησε επώαση για 16h στους 8°C με κυκλική ανάδευση. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν για την απομάκρυνση μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με 3 πλύσεις των 10 min με διάλυμα λύσης, κυκλική ανάδευση στους 8°C και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις 800 x g, 3 min. Εν τέλει, προστέθηκαν 25 µl Laemmli Buffer 2x, δηλαδή ίσος όγκος με εκείνον των σφαιριδίων ώστε στο τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση χρήσης 1x. Με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και παρεμβαλλόμενη ισχυρή ανάδευση, επιτεύχθηκε έκλυση των πρωτεϊνών. Ανακτήθηκαν 40 µl εκλούσματος, προστέθηκαν επιπλέον 10 µl Laemmli buffer 4 φορές πυκνό (4x) (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2 % SDS, 40% glycerol, 0.2 % (w/v) Bromophenol blue, 100 mM DTT), για την καλύτερη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, και επώαστηκαν για 10 min στους 95°C πριν την ανάλυση τους με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

3.2.18 Δοκιμές in vitro αλληλεπίδρασης καθαρών πρωτεϊνών

Η μέθοδος ελέγχου της in vitro αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-HIF-1α (348-826 SE) και GST-NPM1 και με τη χρήση μεταλλαγμένων τμημάτων των πρωτεϊνών να χαρτογραφηθεί η πρωτεϊνική επικράτεια της NPM1 που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το προερχόμενο από τον HIF-1α φωσφομιμητικό πεπτίδιο TAT-ETD SE-FLAG.

Για την πρώτη συνθήκη επειδή ο καθαρισμός γίνεται με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης ήταν απαραίτητη η αφαίρεση του επιτόπου GST από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-HIF-1α 348-826 SE. Αυτό ήταν δυνατό λόγω της θέσης αναγνώρισης για πέψη από την TEV πρωτεάση (TEV recognition site) που βρίσκεται στην αμινοξική αλληλουχία που συνδέει τον επίτοπο GST με την πρωτεΐνη HIF-1α. Αρχικά 70 µg GST-HIF-1α 348-826 SE επώαστηκαν με 10 µg his-TEV, με τις πρωτεΐνες να ισομοιράζονται σε 9 αντιδράσεις με τελικό όγκο 100 µl σε διάλυμα 50 mM Tris-HCL pH 8, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT και H₂O, για 16h, 8°C υπό κυκλική ανάδευση. Ακολούθως οι αντιδράσεις φυγοκεντρούνται για 5 min, 18000 x g, 8°C για να απομακρυνθούν τυχόν αδιάλυτα προϊόντα και τα υπερκείμενα ενώνονται σε νέο σωληνίσκο, ενώ κρατείται δείγμα για τον έλεγχο της πέψης με ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie. Εφόσον η πέψη κριθεί επιτυχής απομακρύνονται τα υπολείμματα GST ή άκοπα μόρια GST-HIF με δέσμευση του σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Έγιναν 2 επαναλήψεις ισομοιράζοντας τα 900 µl της πέψης σε 3 στήλες σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης όγκου 50 µl. Για την δέσμευση στα σφαιρίδια έγινε επώαση 30 min, 8°C υπό κυκλική ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με 800 x g για 2 min και συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα που μοιράστηκαν σε 2η σειρά από σφαιρίδια και επαναλήφθηκε η επώαση 30 min, 8°C υπό κυκλική ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με 800 x g για 2 min και τα τελικά απαλλαγμένα από GST υπερκείμενα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie και χρησιμοποιήθηκαν για δέσμευση στις διάφορες μορφές GST-NPM.

Οι GST-NPM μορφές και η καθαρισμένη GST δεσμεύτηκαν αρχικά σε σφαιρίδια όπως περιγράφηκε για την *in vitro* συγκατακρήμνιση και στη συνέχεια επώαστηκαν σε αναλογία 3:1 και 1:1 με τις πρωτεϊνικές, προερχόμενες από HIF-1α, μορφές 348-826 SE και TAT-ETD SE-FLAG αντίστοιχα, σε συνθήκες 8°C υπό κυκλική ανάδευση για 16h. Ακολούθησαν πλύσεις με διάλυμα λύσης και έκλουση με πυκνό Laemmli Buffer όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη

παράγραφο. Τα εκλούσματα αναλύονται ηλεκτροφορητικά με χρήση καθαρής GST ως δείγμα ελέγχου.

3.2.19 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με φορείς έκφρασης (DNA transfection) και μικρά παρεμβατικά RNA (siRNA transfection)

Η τεχνική της παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε για την παροδική εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (πλασμιδιακό DNA ή siRNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Για να επιτευχθεί η διαμόλυνση χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια που δημιουργούν ένα θετικά φορτισμένο λιπόφιλο πλέγμα γύρω από τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα ώστε να γίνει δυνατή η προσέγγιση της αρνητικά φορτισμένης πλασματικής μεμβράνης, η ενδοκύτωσή τους και η αποτελεσματική απελευθέρωση από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα. Η έκφραση του πλασμιδιακού DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα προϋποθέτει την εισαγωγή του στον πυρήνα ώστε να μεταγραφεί η γενετική πληροφορία. Αυτό στα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα επιτυγχάνεται κυρίως μετά την λύση του πυρηνικού φακέλου κατά την διάρκεια της μίτωσης. Επιπλέον υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα πλασμίδια μετά την απελευθέρωσή τους από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που τα προστατεύουν από νουκλεάσες και μεσολαβούν για την κινητοποίησή τους στο κυτταρόπλασμα από την δυνεΐνη των μικροσωληνίσκων αλλά και την ενεργή εισαγωγή τους στον πυρήνα από τις μπορτίνες. Από την άλλη η αποσιώπηση της έκφρασης μιας πρωτεΐνης με παρεμβατικό RNA επιτυγχάνεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί το απελευθερωμένο από τα ενδοσώματα δίκλωνο siRNA πέπτεται από το ένζυμο dicer σε μικρότερα δίκλιωνα τμήματα. Στη συνέχεια το δίκλωνο μόριο διαχωρίζεται σε δύο μονόκλιωνα όπου ο ένας κλώνος θα αποικοδομηθεί και ο δεύτερος αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη Argonaute του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου RISC (RNA Induced Silencing Complex) και χρησιμεύει ως εκμαγείο για την δέσμευση των συμπληρωματικών mRNA του γονιδίου-στόχου που έχουν

εξέλθει από τον πυρήνα στα κυτταροπλασματικά πολυριβωσώματα. Η αποικοδόμηση των mRNA έχει ως συνέπεια την αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου.

Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα χημικά μέσα παροδικής διαμόλυνσης όπως το φωσφορικό ασβέστιο, κατιονικά λιπιδιακά μέσα (Lipofectamine) και κατιονικά πολυμερή (Turbofect, PEI, DEAE-δεξτράνη). Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια JetPrime™ (Polyplus Transfection) και VIROMER RED/VIROMER BLUE (VIROMER). Το JetPrime™ είναι ένα κατιονικό πολυμερές που η δομή του δεν έχει δημοσιευτεί ωστόσο φαίνεται ότι δεσμεύει ισχυρά το φορτίο διαμόλυνσης και το εξάγει αποτελεσματικά από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα βασιζόμενο στη δημιουργία οσμωτικής πίεσης εντός του ενδοσώματος που καταλήγει σε διάρρηξη της μεμβράνης των ενδοσωματικών κυστιδίων (proton-sponge theory). Είναι παράγοντας διαμόλυνσης ευρείας χρήσης που δίνει την δυνατότητα ταυτόχρονης διαμόλυνσης με πλασμιδιακό DNA και siRNA, ιδιότητα που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ελέγχου της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της νουκλεοφοσμίνης (NPM1) σε συνδυασμό με δίκλινα παρεμβατικά RNA (siRNA). Από την άλλη το VIROMER έχει διακριτά προϊόντα για διαμόλυνση με DNA (VIROMER RED) ή siRNA (VIROMER BLUE). Η τεχνολογία του VIROMER βασίζεται σε μια συνθετική μίμηση του μηχανισμού διαμόλυνσης που παρουσιάζει ο ιός της γρίπης μέσω τροποποίησης της πολυαιθυλενιμίνης (PEI) με προσθήκη ανιονικών πλευρικών αλυσίδων στην πολυκατιονική της δομή. Η τελική δομή επιτρέπει μια αλλαγή στο θετικό φορτίο του συμπλόκου διαμόλυνσης εντός των ενδοσωμάτων ώστε να προωθείται η ενεργή εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα. Οι παραπάνω παράγοντες διαμόλυνσης και των δύο εταιρειών παρουσίασαν υψηλή αποδοτικότητα διαμόλυνσης και χαμηλή κυτταροτοξικότητα, ενώ επιτρέπουν την χρήση πλήρους θρεπτικού μέσου κατά την διαμόλυνση.

Τα πειράματα διαμόλυνσης με πλασμιδιακό DNA πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HeLa ώστε να επιτευχθεί έκφραση ανασυνδυασμένου GFP (Green fluorescence protein) ως συνθήκη

ελέγχου και ανασυνδυσμένου HIF-1α με επίτοπο GFP και μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης από την κινάση CK1δ (Ser247). Τα κύτταρα καλλιεργούνται ώστε να καλύπτουν 50-70% της επιφάνειας τριβλύων κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 100 mm. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο VIROMER RED για τη διαμόλυνση με 6 μg πλασμιδιακού DNA. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ετοιμάζονται δύο διαλύματα. Σε ένα σωληνίσκο αραιώνεται το DNA σε viomer buffer σε συγκέντρωση 11 ng/μl, που αντιστοιχεί σε 6 μl DNA συγκέντρωσης 1 μg/μl σε 534 μl buffer. Σε δεύτερο σωληνίσκο προστίθεται στο τοίχωμα σωληνίσκου 2.4 παράγοντας VIROMER RED και στη συνέχεια αναμειγνύεται με buffer για τελικό όγκο 60 μl. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ακολουθεί μετάγγιση του πρώτου διαλύματος στο δεύτερο, ανάδευση με την πιπέτα και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια του συμπλόκου διαμόλυνσης αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από την κυτταροκαλλιέργεια και τα κύτταρα ξεπλένονται με 1x PBS. Προστίθενται 4-5 ml πλήρες θρεπτικό μέσο και μετά τη δεκάλεπτη επώαση το μίγμα επιμόλυνσης όγκου 600 μl μεταφέρεται σταγόνα-σταγόνα στο τρυβλίο με την κυτταροκαλλιέργεια. Τα κύτταρα επωάζονται για 4h στους 37°C, χρονικό διάστημα που αρκεί για να εισέλθουν τα πλασμίδια στα κύτταρα. Στη συνέχεια είτε αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, γίνεται μια πλύση με PBS 1x και προστίθενται 7 ml πλήρους θρεπτικού μέσου για να φύγουν υπολείμματα των αντιδραστηρίων από την καλλιέργεια, είτε απλά γίνεται προσθήκη 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου καθώς το αντιδραστήριο VIROMER έχει μικρή κυτταροτοξικότητα. Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται για 24h ώστε να εκφραστούν οι επιθυμητές πρωτεΐνες που θα υποβληθούν σε ανοσοκατακρήμιση. Πειράματα διαμόλυνσης με μικρά παρεμβατικά siRNA έγιναν για να επιτευχθεί αποσιώπηση της έκφρασης είτε της νουκλεοσομίνης NPM1 είτε του HIF-1α. Κύτταρα HeLa ή Huh7 καλλιεργήθηκαν σε τριβλύα διαμέτρου 60 mm για απομόνωση ολικού RNA ή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, 100 mm για ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης, 24-well για πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α και 96-well για μέτρηση κυτταρικού θανάτου. Οι

χρησιμοποιούμενες ποσότητες siRNA (τελική συγκέντρωση 25-50 nM) και παραγόντων διαμόλυνσης καθορίστηκαν βάση πρωτοκόλλου VIROMER BLUE ή JetPRIME. Η διαδικασία διαμόλυνσης siRNA παραμένει ίδια με αυτήν της διαμόλυνσης DNA για τα αντιδραστήρια VIROMER, ενώ για τον JetPRIME στον ίδιο σωληνίσκο αραιώνεται πρώτα τον siRNA σε ειδικό buffer και στην συνέχεια προστίθεται στο ίδιο διάλυμα ο παράγοντας JetPRIME. Τα πρωτόκολλα των δύο αντιδραστηρίων συμπίπτουν και ως αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl παράγοντα διαμόλυνσης/ml τελικής καλλιέργειας με 25 nM siRNA. Τα χρονικά σημεία ελέγχου της αποσιώπησης ήταν 24, 48 και 72h μετά την διαμόλυνση.

3.2.20 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1

Για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδο λουσιφεράσης. Οι λουσιφεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις βιοφωταύγειας. Το πλασμίδιο pGL3-VEGF-5xHRE-Luc (εικόνα 20B), το οποίο φέρει 5 στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) που προέρχονται από τον υποκινητή του γονιδίου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και καθοδικά αυτών φέρει γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί για το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (Firefly luciferase). Όταν το πλασμίδιο αυτό εισαχθεί και εκφραστεί σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε υποξικές συνθήκες, τότε ο λειτουργικός ενδογενής HIF-1 προωθεί την μεταγραφή και εντέλει την έκφραση της λουσιφεράσης. Ως πλασμίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla (εικόνα 20A), που εκφράζεται ανεξάρτητα από τον HIF-1 και κωδικοποιεί για την λουσιφεράση του ανθόζωου *Renilla Reniformis*. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν για 24h με τα παραπάνω πλασμίδια ταυτόχρονα με μικρό παρεμβατικό RNA (siRNA) για την αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου *NPM1* με χρήση του παράγοντα διαμόλυνσης JetPRIME. Η διαμόλυνση έγινε 6 well πιάτα κυτταροκαλλιέργειας. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο 2 μg πλασμιδιακού DNA αραιώθηκαν σε 200 μl JetPRIME buffer και προστέθηκε στον ίδιο σωληνίσκο siRNA με στόχο την τελική συγκέντρωση 25 nM στα 2 ml καλλιέργειας. Στο μίγμα

προστέθηκαν 4 μl παράγοντα JetPRIME και ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 10 min, ώστε να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα διαμόλυνσης του παράγοντα με το DNA και το siRNA. Έπειτα, το μίγμα εκχύθηκε στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων και ακολούθησε επώαση για 16h σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας ώστε να επιτευχθεί επαγωγή του HIF-1. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Τα κύτταρα λύθηκαν με το διάλυμα λύσης του kit και ακολούθησε επώαση με το διάλυμα LAR (Luciferase Assay Reagent) που περιέχει το υπόστρωμα λουσιφερίνη που αναγνωρίζεται από το την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας. Η αντίδραση βιοφωταύγειας ανιχνεύθηκε με λουμινόμετρο Turner Designs. Αμέσως μετά την πρώτη μέτρηση προστέθηκε το διάλυμα STOP&GLOW που σταματάει την αντίδραση που καταλύεται από την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας ενώ περιέχει μια διαφορετική μορφή λουσιφερίνης την κολεντεραζίνη που αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από την λουσιφεράση της Renilla. Μετά από σύντομη επώαση μετρήθηκε το αποτέλεσμα της νέας αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της αρχικής αντίδρασης που εξαρτάται από την δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1.

3.2.21 Η μέθοδος της Ανοσοκατακρήμνισης

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μια μέθοδος απομόνωσης ενδογενών πρωτεϊνών. Πρόκειται για μια χρωματογραφία συγγένειας όπου η κινητή φάση αποτελείται από κυτταρικά εκχυλίσματα που περιέχουν την ενδογενή πρωτεΐνη-αντιγόνο και επωάζονται με ειδικό αντίσωμα το οποίο είναι καθηλωμένο ή έχει συγγένεια σύνδεσης με μια στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως σφαιρίδια αγαρόζης/σεφαρόζης συνδεδεμένα με τις βακτηριακές πρωτεΐνες protein A του *Staphylococcus aureus* ή/και protein G των *Streptococcus* που έχουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης σε ανοσοσφαιρίνες. Ύστερα από ένα χρονικό διάστημα επώασης, που επιτρέπει την προσκόλληση του συνδεδεμένου στη πρωτεΐνη-αντιγόνο αντισώματος στα σφαιρίδια, ακολουθεί έκπλυση των σφαιριδίων για την απομάκρυνση μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών

και εντέλει οι ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται με τη χρήση διαλύματος που καταργεί την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τα σφαιρίδια. Η κατάλληλη κατεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων επιτρέπει την απομόνωση της πρωτεΐνης-αντιγόνο με τη μορφή του φυσιολογικού συμπλόκου στο οποίο βρισκόταν την στιγμή που λύθηκαν τα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο η ανοσοκατακρήμιση μπορεί να δώσει μια εικόνα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εντός του κυτταρικού περιβάλλοντος στις εκάστοτε υπό μελέτη συνθήκες.

3.2.21.1 Πειράματα Ανοσοκατακρήμισης πρωτεϊνών

Καρκινικά κύτταρα HeLa λύνονται σε ρυθμιστικό μη αποδιατακτικό υδατικό διάλυμα λύσης 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton-X-100, 1% DTT, 0.1 mM AEBSF, επώστηκαν για 30 min σε πάγο και φυγοκεντρήθηκαν για 15 min, 18000 x g, 4°C. Το 1/10 του διαλυτού κλάσματος χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου (input), ενώ το υπόλοιπο (IP) επώζεται με 1 μg αντισώματος με κυκλική ανάδευση για 2h 8°C. Τα σφαιρίδια υπόκεινται σε 3 πλύσεις των 10 min με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια επώζονται με το μείγμα αντισώματος-πρωτεϊνών για 16h στους 8°C. Ακολουθεί έκπλυση των σφαιριδίων με τον ίδιο τρόπο και έκλυση των πρωτεϊνών με αποδιατακτικό διάλυμα λύσης Laemmli Buffer δύο φορές πυκνό (2x) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4.6 % SDS, 20% glycerol, 0.1 % (w/v) Bromophenol blue, 50 mM DTT), το οποίο προστίθεται σε όγκο ίσο με των σφαιριδίων ώστε να έχει τελική συγκέντρωση χρήσης 1x. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με παρεμβαλλόμενη ισχυρή ανάδευση και μεταφορά των εκλουσμάτων σε νέους σωληνίσκους.

3.2.21.2 Πειράματα Ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, CHIP)

Κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 καλλιεργημένα σε τρυβλία υπόκεινται σε θρυψινοποίηση που απενεργοποιείται με 3:1 πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και συλλέγονται ως αιώρημα σε

σωλήνες φυγοκέντρου όπου και ιζηματοποιούνται. Στη συνέχεια επαναιωρούνται σε μείγμα πλήρους DMEM με 1/10 υδατικό διάλυμα μονιμοποίησης (A) 11% HCHO, 20 mM HEPES pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA κυκλική ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απενεργοποίηση της φορμαλδεΐδης με προσθήκη 125 mM γλυκίνης. Στη συνέχεια ακολουθεί ένας κύκλος διαδοχικών πλύσεων με διαφορετικά διαλύματα μέσω φυγοκέντρωσης 800 x g, επαναιώρησης σε 3-5 ml διαλύματος με συνεχή χρήση πάγου και κυκλικής ανάδευσης 10 min στους 8°C. Το πρώτο διάλυμα είναι παγωμένο διάλυμα φωσφορικών PBS 1x, ακολουθεί διάλυμα λύσης (B) 0.25% triton-X-100, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 7.5, διάλυμα έκπλυσης 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 7.5 και διάλυμα επώασης (D) 20 mM HEPES pH 8, 0.15% SDS, 1% triton-X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA.

Στη συνέχεια τα ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml διάλυμα επώασης και μέσα σε λουτρό πάγου γίνεται κατεργασία με υπερήχους ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή θραυσματοποίηση της χρωματίνης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων Vibra cell™ της εταιρείας SONICS & MATERIALS INC. (DAMBURY, CT U.S.A) εντάσεως 50 W και με ρύθμιση του amplitude στο 40, τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ένα σετ υπερήχων 2 επαναλήψεων των 10 sec με ενδιάμεσο διάλειμμα 30 sec, ακολουθούμενο από δεύτερο σετ 9 επαναλήψεων των 10 sec με ενδιάμεσο διάλειμμα 50 sec. Ο στόχος της συγκεκριμένης κατεργασίας ήταν η θραύση της χρωματίνης σε τμήματα μήκους περίπου 500 bp. Από το συνολικό 1 ml λυμάτων 100 μl κρατούνται για δείγμα ελέγχου (input) και σε αυτό το σημείο, πριν προχωρήσει η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με τα υπόλοιπα 9/10 των κυτταρικών λυμάτων, γίνεται έλεγχος της χρωματίνης με PCR και ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης. Τα τελευταία ισομοιράζονται σε σωληνίσκους φυγοκέντρωσης όπου προστίθεται 1.5 μg είτε ειδικού αντισώματος ανοσοκατακρήμισης είτε ανοσοσφαιρινών G (IgG) για έλεγχο μη ειδικών αλληλεπιδράσεων και παρουσία 0.1 mM AEBSF για αναστολή των πρωτεασών

επωάζονται για 2h με κυκλική ανάδευση στους 8°C. Παράλληλα σε άλλους σωληνίσκους ετοιμάζονται σφαιρίδια protein A με διαδοχικές πλύσεις στο διάλυμα επώασης D. Σε κάθε περίπτωση στα διαλύματα επώασης προστίθενται BSA και Salmon Sperm DNA σε συγκέντρωση 1 µg/100 µl για κορεσμό των θέσεων μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών και χρωματίνης αντίστοιχα. Μετά τη 2ωρη επώαση το αιώρημα κυτταρικού εκχυλίσματος-αντισωμάτων αναμειγνύεται με τα σφαιρίδια protein A και επωάζονται για 16h με κυκλική ανάδευση στους 8°C.

Μετά την ανοσοκατακρήμιση ακολουθούν διαδοχικές 10λεπτες πλύσεις των σφαιριδίων με διαφορετικά διαλύματα. Συγκεκριμένα γίνεται μια πλύση με το 1ο διάλυμα πλύσης (0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% triton-X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8), ακολουθούν δύο πλύσεις με αυξημένο NaCl στο 2ο διάλυμα πλύσης (0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% triton-X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8), μια πλύση με το τρίτο (0,25 M LiCl, 0.5% DOC, 0.5% NP-40, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8) και 2 πλύσεις με το 4ο διάλυμα πλύσης (1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES pH 8). Μετά το τέλος των πλύσεων μπορεί να γίνει η έκλουση των ανοσοκατακρημισμάτων από τα σφαιρίδια. Με επίδραση διαλύματος έκλουσης 0.1 M NaHCO₃, 1% SDS, κυκλική ανάδευση 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 12000 στροφές για 20 sec τα υπερκείμενα εκλούσματα συλλέγονται σε νέους σωληνίσκους φυγοκέντρησης, ενώ η διαδικασία φυγοκέντρησης-συλλογής επαναλαμβάνεται εφόσον τα υπερκείμενα είναι καθαρά.

Σε περίπτωση που είναι επιθυμητό να διερευνηθεί εάν στο σύμπλοκο χρωματίνης-πρωτεΐνης αντιγόνου που ανοσοκατακρημίστηκε συμμετέχει και άλλη πρωτεΐνη τότε είναι δυνατή η πραγματοποίηση διαδοχικής ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (Sequential Chromatin Immunoprecipitation, re-CHIP). Για να επιτευχθεί, χρησιμοποιείται διαφορετικό διάλυμα έκλουσης Tris-EDTA 1x, 2% SDS, 15 mM DTT, γίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex), επώαση

10 min σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση 1 min 10000 x g και συλλογή των εκλουσμάτων ως υπερκείμενα. Τα τελευταία χωρίζονται σε δύο μέρη, το ένα εκ των οποίων χρησιμοποιείται για διαδοχική ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με την ίδια ακριβώς μέθοδο που έγινε και η αρχική, με τη χρήση αυτή τη φορά διαφορετικού αντισώματος έναντι της νέας πρωτεΐνης στόχου.

Στο τελικό στάδιο γίνεται αποσύνδεση των πρωτεϊνών από τα τμήματα χρωματίνης και ακολουθεί καθαρισμός και απομόνωση του DNA, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος των κομματιών χρωματίνης μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφορητικής ανάλυσης σε πηκτή αγαρόζης και η ποσοτική τους ανάλυση μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR, Quantitative Real-Time PCR). Για την αποσύνδεση των πρωτεϊνών από την χρωματίνη τα δείγματα επωάζονται σε διάλυμα που περιέχει 0,2 M NaCl για 4-5h στους 65°C. Για τον καθαρισμό του DNA προστίθεται 1:1 όγκος διαλύματος χλωροφαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία (25:24:1) και μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex) 1 min και φυγοκέντρηση 10000 x g 3 min θερμοκρασία δωματίου προκύπτει διαχωρισμός της υδατικής φάσης που περιέχει το DNA από μια κατώτερη οργανική φάση που περιέχει την φαινόλη με διάφορα οργανικά κατάλοιπα ως ίζημα και μια ενδιάμεση φάση μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέους σωληνίσκους και γίνεται προσθήκη 1:1 όγκου διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αναλογίας 24:1 και με την ίδια κατεργασία καθαρίζεται ακόμη περισσότερο το DNA από κατάλοιπα της φαινολικής φάσης. Η νέα υδατική φάση μεταφέρεται σε νέους σωληνίσκους όπου προστίθεται 1:2.7 όγκος 100% αιθανόλης, ενώ για περισσότερο αποτελεσματική κατακρήμιση του DNA προστίθενται 0.05 μg/μl γλυκογόνου και το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C για διάστημα > 2h, ώστε να κατακρημνιστεί επαρκώς το DNA. Τελικά, μετά από ισχυρή φυγοκέντρηση 18000 x g, 15 min, 4°C αφαιρείται το υπερκείμενο και το DNA βρίσκεται ως ίζημα στον σωληνίσκο όπου και επαναιωρείται σε H₂O.

3.2.22 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για ενίσχυση τμημάτων γονιδιακών υποκινητών

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δίνει την δυνατότητα ταχείας ενίσχυσης μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA από ένα υπόστρωμα που μπορεί να περιέχει ένα πλήθος διαφορετικών μορίων DNA. Για την επίτευξη της ειδικής ενίσχυσης τα δίκλινα μόρια DNA αποδιατάσσονται (denaturation) και στη συνέχεια στον νοηματικό και αντινοηματικό κλώνο υβριδίζονται αντίστοιχοι εκκινητές (annealing) βάσει συμπληρωματικότητας. Οι εκκινητές επιτρέπουν την ειδική δέσμευση μιας DNA πολυμεράσης που συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο χρησιμοποιώντας ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) που προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης (extension). Ως αποτέλεσμα το αρχικό προϊόν διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο. Η εναλλαγή της θερμοκρασίας επώασης του δείγματος είναι το στοιχείο που καθορίζει τα διαφορετικά στάδια κάθε κύκλου PCR. Η ανακάλυψη των θερμοάντοχων DNA πολυμερασών έκανε δυνατή την συνεχή εναλλαγή των κύκλων χωρίς να χρειάζεται να προστεθεί νέο ένζυμο στην αντίδραση. Ως συμπαράγοντας της πολυμεράσης προστίθεται $MgCl_2$ στο διάλυμα της αντίδρασης.

Στη παρούσα διατριβή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση περιοχών υποκινητή των γονιδίων *LPIN1*, *AGPAT2*, *HSPB*, *HAMP* και *CASP9* σε DNA που απομονώθηκε από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης. Χρησιμοποιήθηκε Vent ή απλή Taq DNA πολυμεράση της εταιρείας New England Biolabs με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Η Vent Taq DNA pol παρουσιάζει βέλτιστη επιμήκυνση στους 72°C ενώ η απλή Taq DNA pol στους 68°C. Χρησιμοποιείται H_2O απαλλαγμένο από (δεοξυ)ριβονουκλεάσες για μίγμα αντίδρασης που περιέχει 100 ng DNA εκμαγείο, 1x Thermopol Buffer, 1 unit Taq Polymerase, 2 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 50 pmol/μl πρόσθιου και 50 pmol/μl ανάστροφου εκκινητή (Πίνακας 1) σε τελικό όγκο 50 μl . Για την καλύτερη διαλυτότητα των εκκινητών του γονιδίου *AGPAT2* χρησιμοποιήθηκε DMSO (Dimethyl Sulfoxide) σε συγκέντρωση 5%. Στον

θερμοκυκλοποιητή Mastercycler gradient (Eppendorf) εφαρμόστηκε το παρακάτω πρόγραμμα αντίδρασης:

94°C 5 min, αρχική αποδιάταξη	}	30 κύκλοι
94°C 30 sec αποδιάταξη		
60°C 45 sec, υβριδοποίηση εκκινητών		
72°C/68°C 45 sec, επιμήκυνση		
72°C/68°C 4 min, τελική επιμήκυνση		
4°C, ψύξη και απενεργοποίηση		

3.2.23 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα

Απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α και της NPM1 στην μεταγραφή τόσο συγκεκριμένων γονιδίων όσο και στο σύνολο του μεταγραφώματος καρκινικών κυττάρων HeLa καλλιεργημένων σε συνθήκες φυσιολογικής ή μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου. Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL (Macherey-Nagel) και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρο σε συνθήκες που προστατεύουν τα δείγματα από έκθεση σε ένζυμα που υδρολύουν το RNA (Ριβονουκλεάσες). Κύτταρα προσκολλημένα σε τριβλύα διαμέτρου 60 mm μετά από έκπλυση με PBS επαναιωρούνται σε 400 μl NucleoZOL, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρου και τα αιωρήματα ομογενοποιούνται με πιπέτα και επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επέλθει αποτελεσματική λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστίθενται 160 μl RNase free H₂O και τα αιωρήματα αναδεύονται ισχυρά σε συσκευή Vortex ώστε να αναμειχθεί η υδατική με την φαινολική φάση του NucleoZOL και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 min, 10000 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Στην υπερκείμενη υδατική φάση περιέχεται το RNA ενώ στην υποκείμενη φαινολική φάση

απομακρύνονται πρωτεΐνες, DNA και πολυσακχαρίτες. Η υδατική φάση όγκου 500-600 μl μεταφέρεται σε νέους σωλήνες φυγοκέντρου, τύπου Eppendorf, και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 10 min, 10000 x g. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται 2 φορές με 400 μl διαλύματος 75% αιθανόλης σε νερό και φυγοκέντρωση 3min, 10000 x g. Αφαιρείται η αιθανόλη και ξαναγίνεται φυγοκέντρωση 10000 x g για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 30 μl ελεύθερο ριβονουκλεασών H_2O , προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C .

3.2.24 Ανάστροφη μεταγραφή, RT-PCR

Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό συναντάται φυσιολογικά στους ρετροϊούς όπου χρησιμοποιεί το ιικό μονόκλωνο RNA ως εκμαγείο για να συνθέσει συμπληρωματικό κλώνο DNA ώστε το γενετικό υλικό του ιού να μπορέσει να ενσωματωθεί μέσα σε αυτό του κυττάρου ξενιστή. Αντίστοιχα στην μοριακή βιολογία χρησιμοποιείται για την σύνθεση δίκλωνου cDNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Στα πλαίσια της χρήσης του προϊόντος για ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού (qPCR) χρόνου αρκεί η σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA από το απομονωμένο RNA που θα αποτελέσει την βάση για τη σύνθεση δίκλωνων μορίων DNA από την DNA πολυμεράση που θα χρησιμοποιηθεί σε επόμενο στάδιο για την qPCR.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το SensiFAST cDNA Synthesis Kit της εταιρείας BIOLINE και το PrimeScript™ RT reagent kit της εταιρείας Takara. Ως αρχικό εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1 μg RNA και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε Dnase/RNase υδατικό διάλυμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα, ολιγο νουκλεοτιδικούς εκκινητές (oligo-DT primers), τυχαία εξαμερή (random hexamers) και ανάστροφη μεταγραφάση που περιέχονται στο kit και σε συγκεντρώσεις που προτείνει το εκάστοτε πρωτόκολλο. Τα δείγματα

επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή σε συνθήκες που επιτρέπουν την σύνδεση των εκκινητών, την αναστροφή μεταγραφής, την απενεργοποίηση του ενζύμου και την συντήρηση-ψύξη του τελικού προϊόντος στους 4°C με τις θερμοκρασίες και τους χρόνους του κάθε βήματος να ορίζονται από το πρωτόκολλο του εκάστοτε kit. Στο τέλος του κύκλου τα δείγματα cDNA φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.25 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qPCR)

Η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qPCR) προσφέρει την δυνατότητα καθορισμού της αρχικής ποσότητας ενός δίκλωνου μορίου DNA σε ένα δείγμα που μπορεί να περιέχει πολλά διαφορετικά μόρια DNA. Βασίζεται στην λειτουργία της απλής PCR καθώς μέσα από κυκλική διαδοχή σταδίων αποδιάταξης των δύο κλώνων, σύνδεσης εξειδικευμένων εκκινητών και επιμήκυνσης από μια DNA πολυμεράση επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του αρχικού προϊόντος. Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται σε χημικά μόρια που προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια στα δίκλινα μόρια του ενισχυόμενου DNA είτε εξειδικευμένα βάση συμπληρωματικών αλληλουχιών (probes) είτε μη ειδικά (SYBR Green) και η πρόσδεση αυτή τους προσδίδει δυνατότητα φθορισμού. Η αυξανόμενη, ανά κύκλο PCR, ένταση φθορισμού ανιχνεύεται από κατάλληλο εξοπλισμό και αποδίδεται ως καμπύλη ενίσχυσης σήματος. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Κρίσιμη τιμή για την ποσοτικοποίηση του αρχικού προϊόντος είναι ο αριθμός κύκλων (Ct) στον οποίο το σήμα φθορισμού θα ξεπεράσει ένα όριο (threshold). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αρχικού προϊόντος τόσο ταχύτερα, δηλαδή σε μικρότερο αριθμό κύκλων, η ενίσχυσή του θα ξεπεράσει το threshold. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι απόλυτη και να υπολογίζεται ο ακριβής αριθμός κλώνων του αρχικού προϊόντος ή να είναι σχετική και να εκφράζεται σε αναλογία με την ενίσχυση μορίων

αναφοράς. Στο τελικό στάδιο της αντίδρασης εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία που έχει ως αποτέλεσμα αφενός την απενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και αφετέρου την αποδιάταξη των τελικών προϊόντων που αποτυπώνεται σε μια καμπύλη τήξης. Το μήκος του δίκλωνου μορίου και η περιεκτικότητα σε δεσμούς γουανίνης-κυτοσίνης καθορίζουν την θερμοκρασία τήξης του προϊόντος. Συνεπώς διαφορετικές κορυφές στην καμπύλη τήξης αντιπροσωπεύουν διαφορετικό προϊόν και έτσι παρέχεται μια εικόνα της καθαρότητας της αντίδρασης PCR.

Στη παρούσα διατριβή η τεχνική της RT-qPCR χρησιμοποιήθηκε για την σχετική ποσοτικοποίηση της μεταβολής των επιπέδων mRNA που προκύπτουν από την μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-1 μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε νορμοξία και υποξία. Ενώ qPCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε και για την ποσοτικοποίηση της δέσμευσης των HIF-1α και NPM1 σε συγκεκριμένες περιοχές υποκινητών γονιδίων, μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Στην πρώτη περίπτωση ως εκμαγείο για την RT-qPCR χρησιμοποιείται cDNA πρώτου κλώνου που προκύπτει από ανάστροφη μεταγραφή του απομονωμένου από τα κύτταρα RNA ενώ στην δεύτερη περίπτωση ως εκμαγείο για την qPCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιούνται δίκλινα τμήματα γονιδίων που απομονώθηκαν μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ως προς τα επίπεδα mRNA ήταν τα *PH4A1*, *LPIN1*, *ALDOC*, *BIRC3*, *FA2H*, *TGFBI* με το γονίδιο της ακτίνης να χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Για την ανάλυση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ενισχύθηκαν περιοχές του υποκινητή των γονιδίων *LPIN1*, *AGPAT2*, *HSPB*, *HAMP*, *CASP9* ενώ η συγκέντρωση αυτών των τμημάτων στο ολικό κυτταρικό λύμα (input) και η τυχαία συγκατακρήμνιση τους από ανοσοσφαιρίνες IgG χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ενίσχυσης με qPCR.

Για την ανάλυση με qPCR χρησιμοποιήθηκε το σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) και το αντιδραστήριο SYBR Green mix (των εταιρειών KapaBiosystems και Takara) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, MgCl₂, dNTPs και

σταθεροποιητές. Για το κάθε γονίδιο χρησιμοποιούνται ειδικοί πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.5 pMol/μl. Όταν κρίθηκε απαραίτητο προστέθηκε στο διάλυμα 5% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) που αποτρέπει τον διμερισμό των εκκινητών. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται δείγμα απουσίας του DNA υποστρώματος και δείγμα όπου το αρχικό RNA εκμαγείο υπέστη αντίδραση σύνθεσης cDNA απουσία του ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης.

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

95°C 3 min, αρχική αποδιάταξη	} 35-50 κύκλοι 2 step amplification
95°C 3 sec, αποδιάταξη	
60°C 30 sec, υβριδοποίηση εκκινητών/επιμήκυνση	
95°C 10 sec	
60°C 30 sec	
97°C 1 sec.	} αποδιάταξη των προϊόντων
37°C 30 sec, διακοπή της αντίδρασης	

3.2.26 Υποκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και ποσοτικός προσδιορισμός του συνεντοπισμού τους

Η μικροσκοπία ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Η μέθοδος βασίζεται στη δέσμευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών από εξωγενώς χορηγούμενο αντίσωμα που είτε είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική (άμεσος ανοσοφθορισμός) είτε αναγνωρίζεται από δευτερεύον αντίσωμα που φέρει την φθορίζουσα ουσία (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Για τον φθορισμό και την αναγνώριση του σήματος που εκπέμπεται χρησιμοποιείται οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού που αφού στοχεύσει το υπό-εξέταση δείγμα με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος στη συνέχεια εντοπίζει τον φθορισμό των φθορίζουσων ομάδων που υποδεικνύει την θέση της πρωτεΐνης εντός του κυττάρου.

Για να είναι δυνατή η αποτύπωση της θέσης των πρωτεϊνών-αντιγόνων την στιγμή που ξεκινά η κατεργασία των κυττάρων αρχικά γίνεται σταθεροποίηση των κυττάρων με κατάλληλο διάλυμα που συνήθως περιέχει φορμαλδεΰδη. Στη συνέχεια με διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό καθίσταται διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη ώστε να μπορούν τα χορηγούμενα αντισώματα να προσεγγίσουν τις πρωτεΐνες-αντιγόνα. Οι πιθανές μη ειδικές θέσεις δέσμευσης των αντισωμάτων καλύπτονται μετά από επώαση με διάλυμα κορεσμού το οποίο χρησιμοποιείται και για την επώαση με τα αντισώματα. Στο τελικό βήμα πριν την μικροσκοπία οι καλυπτρίδες σταθεροποιούνται επάνω σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση διαλύματος πολυμερισμού ενώ στο ίδιο διάλυμα όταν είναι επιθυμητό προστίθεται η χρωστική DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη) που προσδένεται στην χρωματίνη και όταν ακτινοβολείται με υπεριώδες φως εκπέμπει στα 461 nm απεικονίζοντας σε μπλε απόχρωση τους πυρήνες των κυττάρων, προσφέροντας έναν τρόπο εντοπισμού των πυρήνων με μικροσκοπία φθορισμού μετά από χρώση.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και της NPM1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας με αναστολή ή μη του μονοπατιού ενεργοποίησης των ERK1/2 ενώ στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε ο συνεντοπισμός τους. Τα κύτταρα αρχικά καλλιεργήθηκαν για 24h σε καλυπτρίδες και στη συνέχεια επώαστηκαν στις διάφορες υπό μελέτη συνθήκες. Η κατεργασία των κυττάρων για τον ανοσοφθορισμό ακολουθεί τα παρακάτω βήματα. Δύο πλύσεις με PBS, επώαση 5 min με διάλυμα μονιμοποίησης PBS – 3% φορμαλδεΰδης σε θερμοκρασία δωματίου, τρεις πλύσεις των 5 min με PBS υπό ανάδευση, επώαση με διάλυμα διαπερατοποίησης– P–S - 0.1% Triton X-100 για 15 min στους 4°C, τρεις πλύσεις των 5 min με PBS υπό ανάδευση, επώαση με διάλυμα κορεσμού 1% BSA σ– P–S - 0.1% Tween20, επώαση με τα πρώτα αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα 1% BSA σ– P–S - 0.1% Tween20 για καθορισμένο ως προς το κάθε αντίσωμα χρονικό διάστημα, τρεις πλύσεις των 5 min μ– P–S - 0.1% Tween 20 υπό

ανάδευση, επώαση με τα δευτερεύοντα αντισώματα αραιωμένα 1:500 σε διάλυμα 1% BSA σ-P-S - 0.1% Tween20 για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, μια πλύση με PBS - 0.1% Tween20, μια με PBS και μια με αποστειρωμένο απιονισμένο H₂O. Εν συνεχεία οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma), παρουσία 2 μg/ml DAPI, στεγνώνουν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 30 min και στη συνέχεια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

Χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2 με ξηρούς αντικειμενικούς φακούς που αποδίδουν μεγέθυνση 10x, 20x, 40x και ελαιοκαταδυτικό φακό για μεγέθυνση 100x. Το μικροσκόπιο χρησιμοποιεί ως πηγή φωτός την λάμπα HXP 120 ενώ έχει την δυνατότητα ακτινοβολίας σε 4 κανάλια διαφορετικού μήκους κύματος διέγερσης (lex = 405, 488, 568, 660) προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορετικές χρωστικές σε ένα δείγμα. Η ρύθμιση των καναλιών βασίζεται στο λογισμικό ZEN, ενώ η λήψη των φωτογραφιών γίνεται με την ενσωματωμένη κάμερα AxioCam MRm. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα κανάλια με ακτινοβολία διέγερσης 405, 488 και 568 nm για την ανίχνευση των χρωστικών DAPI (κυανό) και των συνδεδεμένων σε δευτερεύοντα αντισώματα Alexa Fluor 488 (πράσινο), και Alexa Fluor 568 (κόκκινο).

Για την ανάλυση του ενδοπυρηνικού συνεντοπισμού των σημάτων ανοσοφθορισμού των NPM1 και HIF-1α χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο λογισμικό ImageJ. Ελέγχθηκε η συνεπικάλυψη των δύο σημάτων φθορισμού (σε διαφορετικά κανάλια) που εκφράζεται στις τιμές των μεταβλητών συνεντοπισμού Pearson και Manders και απεικονίζεται σε διάγραμμα διασποράς (scatter plot). Οι τιμές του συντελεστή Pearson κυμαίνονται από την -1 έως +1 δίνοντας μια ποιοτική ανάλυση της συνεπικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού (-1: Αρνητική επικάλυψη, 0: Τυχαία επικάλυψη, +1: Θετική επικάλυψη). Ο συντελεστής Manders είναι μια επέκταση του συντελεστή Pearson και εκφράζει ποσοτικά το ποσοστό επικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού και κυμαίνεται από το 0 (καθόλου συνεπικάλυψη) έως το +1 (100%

συνεπικάλυση). Οι έλεγχοι βασίστηκαν στα πρόσθετα εργαλεία (plugin) του Image J: Colocalization Threshold και JACoP. Οι τιμές των συντελεστών Manders που αφορούσαν ένα σύνολο 35 κυττάρων ανά συνθήκη εισήχθησαν στο πρόγραμμα GraphPad Prism για τη ποσοτικοποίηση της συνεπικάλυσης των δύο καναλιών. Οι στατιστικές διαφορές των τριών ομάδων δεδομένων υπολογίστηκαν με το στατιστικό κριτήριο t (**P < 0.001).

3.2.27 Υποκυτταρικός εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός του σχηματισμού λιποσταγονιδίων

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός λιποσταγονιδίων χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Ο εντοπισμός τους επιτυγχάνεται με μικροσκοπία φθορισμού μετά από χρώση με την χρωστική NileRed, η οποία προσδένεται στις ουδέτερες τριακυλογλυκερόλες που εντοπίζονται στον υδρόφοβο πυρήνα των λιποσταγονιδίων. Ανιχνεύθηκαν σε κύτταρα HeLa καλλιεργημένα για 24h σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας μετά από 24ωρη διαμόλυνση με control non-target (Nt) ή παρεμβατικό siRNA για το mRNA της NPM1. Ως δείκτης της υποξίας και της αποσιώπησης της έκφρασης της NPM1 χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονος έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό του HIF-1α και της NPM1 αντίστοιχα. Μετά την επώαση των δευτερευόντων αντισωμάτων όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 min μ- P-S - 0.1% Tween20 και μια πλύση με PBS και στη συνέχεια έγινε επώαση με την χρωστική NileRed σε διάλυμα με PBS για 20 min στο σκοτάδι. Η χρωστική αποθηκεύεται στο σκοτάδι σε συγκέντρωση 1000 μg/ml σε ακετόνη και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1 μg/ml σε PBS. Μετά την επώαση ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 min με PBS, εμβάπτιση των καλυπτρίδων σε νερό και σταθεροποίησή τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες με Mowiol παρουσία DAPI. Η χρωστική Nile-Red που εκπέμπει σε μήκος κύματος 638 nm ανιχνεύθηκε μετά από διέγερση με ακτινοβολία μήκους κύματος 568 nm. Για την μέτρηση του φθορισμού της χρωστικής Nile Red χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ. Ο σχηματισμός λιποσταγονιδίων εκφράστηκε ως Corrected Total Cell Fluorescence

(CTCF) που υπολογίζεται μετά την αφαίρεση από την μετρούμενη ένταση ενός ή περισσοτέρων κυττάρων, του γινομένου της έκτασης των κυττάρων αυτών επί της έντασης τυχαίας περιοχής του περικυτταρικού πλαισίου (background). Τα αποτελέσματα εισήχθησαν στο λογισμικό GraphPad Prism για να εκφραστούν σε διαγράμματα.

3.2.28 Χρωματομετρικός προσδιορισμός κυτταρικού θανάτου

Για τον υπολογισμό του κυτταρικού θανάτου χρησιμοποιήθηκε το LDH Cytotoxicity Detection Kit (TAKARA). Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο που όταν τα κύτταρα νεκρωθούν ή αρχίσει η διάρρηξη της πλασματικής τους μεμβράνης διαχέεται στον εξωκυττάριο χώρο και συλλέγεται μαζί με το θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας. Ανάμειξη του κυτταρικού υπερκειμένου με κατάλληλο μείγμα αντιδραστηρίων του Kit έχει ως συνέπεια την παραγωγή ενός προϊόντος κόκκινης απόχρωσης που συνδέει άμεσα την εξωκυττάρια συγκέντρωση της LDH με τον κυτταρικό θάνατο.

Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνουν χώρα δύο χημικές αντιδράσεις κατά την επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι του κυτταρικού υπερκειμένου με μείγμα αντιδραστηρίων που παρέχονται από το kit και περιλαμβάνουν τα κατάλληλα υποστρώματα, ένζυμα και συνένζυμα. Αρχικά η LDH καταλύει την μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο NAD^+ που ανάγεται σε NADH/H^+ . Το τελευταίο επανοξειδώνεται από μια αφυδρογονάση του NADH/H^+ (diaphorase), η οποία ταυτόχρονα καταλύει την μετατροπή του κίτρινου υποστρώματος τετραζολίου σε κόκκινη φορμαζάνη που αποτελεί και το τελικό προϊόν. Η συγκέντρωση της φορμαζάνης υπολογίζεται φωτομετρικά με την μέτρηση της απορρόφησης στα 490 nm χρησιμοποιώντας της συσκευή SPARK[®] της εταιρείας Tecan Group Ltd. (Männedorf, Switzerland) και το λογισμικό Magellan[™]. Η κυτταροτοξικότητα - κυτταρικός θάνατος εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό %, όπου το 100% αντιπροσωπεύει την οπτική απορρόφηση του προϊόντος που προκύπτει από την

συνολική LDH, η οποία ανακτάται από λύση του 100% των κυττάρων με διάλυμα 2% triton-X-100 σε DMEM 1% FBS. Τόσο από την μέγιστη απορρόφηση όσο και από την μετρούμενη σε κάθε συνθήκη αφαιρείται η απορρόφηση που προκύπτει από την LDH του θρεπτικού μέσου (background). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του θανάτου κύτταρων HeLa καλλιιεργημένων σε αρχική πυκνότητα 2500 κύτταρα ανά βοθρίο 96-well plate για 24h, που στη συνέχεια διαμολύνθηκαν για 24h με non-target (Nt) ή ειδικό για την έκφραση την NPM1 παρεμβατικό siRNA (si) και μετά από αυτό το χρονικό σημείο που τέθηκε ως ώρα μηδέν (0h) επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 48h.

3.2.29 Εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός διατάραξης της ασυμμετρίας της κυτταρικής μεμβράνης

Ένα από τα πρώτα και αντιστρεπτά στάδια επερχόμενης κυτταρικής απόπτωσης είναι η διατάραξη της ασυμμετρίας της πλασματικής μεμβράνης που υποδεικνύεται από την μετατόπιση του λιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Η Annexin V είναι μια πρωτεΐνη που απομονώνεται από κύτταρα ανθρώπινου πλακούντα και παρουσία ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} επιδεικνύει υψηλή συγγένεια για κατάλοιπα φωσφατιδυλοσερινών. Στο kit Annexin V (Biotium) η πρωτεΐνη που παρέχεται συνδεδεμένη με μια φθορίζουσα ομάδα ως Annexin V, CFTM555 Conjugate, δίνει την δυνατότητα για σήμανση, εντοπισμό και ποσοτικοποίηση των εκτεθειμένων στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης φωσφατιδυλοσερινών μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκτίμησης της κυτταρικής απόπτωσης.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της απόπτωσης κύτταρων HeLa καλλιιεργημένων επάνω σε καλυπτρίδες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας 24h μετά από διαμόλυνση 24h με non-target (Nt) ή ειδικό για την έκφραση την NPM1 παρεμβατικό siRNA (si). Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν δύο φορές με PBS, τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν με επώαση

για 2 min με διάλυμα 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS, πλύθηκαν μια φορά με PBS και άλλες δύο φορές με το περιέχων ιόντα ασβεστίου ειδικό διάλυμα δέσμησης του kit μετά της αραίωσή του σε συγκέντρωση χρήσης (1x) με απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί επώαση 30 min, θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι με το μόριο συνδέτη Annexin V, CFTM555 Conjugate διαλυμένο στο διάλυμα δέσμησης σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Ακολουθεί πλύση με το διάλυμα δέσμησης στο οποίο έχει προστεθεί 2 µg/ml DAPI για την σήμανση των πυρηνών. Από το ίδιο διάλυμα τοποθετείται μια σταγόνα 10 µl σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετείται ανάστροφα επάνω η καλυπτρίδα ώστε να παρατηρηθεί άμεσα με μικροσκοπία φθορισμού, χρησιμοποιώντας το Zeiss Axio Imager Z2 με φακό εστίασης 20x. Η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης εκφράστηκε ως % ποσοστό των θετικών σε Annexin V κυττάρων έναντι του συνολικού αριθμού κυττάρων ανά συνθήκη (n=150).

3.2.30 Εντοπισμός και ποσοτικός προσδιορισμός θραύσεων της χρωματίνης

Όταν τα κύτταρα έχουν προχωρήσει μη αντιστρεπτά στο μονοπάτι της απόπτωσης επέρχεται θραύση της χρωματίνης από ενδονουκλεάσες που ενεργοποιούνται από τις εκτελεστικές κασπάσες. Οι θραύσεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ελεύθερων άκρων 3'-OH στο DNA. Η μέθοδος TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) βασίζεται στην προσθήκη σε αυτά τα άκρα σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική δεοξυνουκλεοτιδίων, που πραγματοποιείται από το ένζυμο Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) και δίνει την δυνατότητα οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης των θραύσεων του DNA με την χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Η μέθοδος TUNEL χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση θραύσεων χρωματίνης σε κύτταρα HeLa καλλιεργημένων επάνω σε καλυπτρίδες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24h μετά από διαμόλυνση 24h με non-target (Nt) ή ειδικό για την έκφραση την NPM1 παρεμβατικό siRNA (si). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το *In situ* Apoptosis Detection

Kit (Takara-Clontech, Mountain View, CA, USA) και εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Αρχικά προπαρασκευάστηκε το διάλυμα σήμανσης που περιέχει το ένζυμο TdT διαλυμένο στο ειδικό Labeling Safe Buffer και επώαστηκε στον πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, μονιμοποιήθηκαν με επώαση 5 min σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 3% σε PBS και πλύθηκαν ξανά 2 φορές με PBS. Ακολούθως οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε πάγο, όπου γίνεται επώαση για 5 min με 100 μl διαλύματος διαπερατοποίησης της πλασματικής μεμβράνης που περιέχεται στο kit και ξεπλένεται με PBS. Προστίθενται 50 μl παγωμένου διαλύματος σήμανσης και οι καλυπτρίδες επωάζονται για 60 min στους 37°C. Η αντίδραση τερματίζεται μετά από μια πλύση με PBS και στη συνέχεια τα κύτταρα σταθεροποιούνται και σημαίνονται οι πυρήνες με Mowiol παρουσία DAPI. Στο μικροσκόπιο φθορισμού μετρήθηκαν 250 κύτταρα ανά συνθήκη και έγινε ποσοτικοποίηση των φθορίζοντων ανά συνολικό αριθμό κυττάρων.

3.2.31 Ανάλυση Βάσεων δεδομένων γονιδιακής έκφρασης σε όγκους και κλινικής εικόνας καρκινοπαθών

Χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη στο διαδίκτυο πλατφόρμα GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) (300) για την ανάλυση δεδομένων μεταγραφώματος καρκινικών ιστών και δεδομένων κλινικής εικόνας καρκινοπαθών που ανακτήθηκαν από τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων TCGA (The Cancer Genome Atlas) και GTEx (Genotype-Tissue Expression). Ως πηγή για την δημιουργία κλινικά σημαντικής γονιδιακής υποξικής υπογραφής χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη γονιδίων που επάγονται στην υποξία https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/HALLMARK_HYPOXIA.

Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα

4.1 Μελέτη και χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α

4.1.1 Υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών τμημάτων σε βακτηριακά κύτταρα *E.Coli* BL21 RIL

Με σκοπό την μελέτη της πιθανής *in vitro* αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α παράχθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο [3.2.7](#) οι παρακάτω ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και πρωτεϊνικά τμήματα.

Αρχικά υπερεκφράστηκαν και καθαρίστηκαν πρωτεΐνες NPM1 πλήρους μεγέθους (B23.1), το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3 (B23.2) και τα πρωτεϊνικά τμήματα NPM1 που περιέχουν μόνο το καρβοξυτελικό άκρο (CR), στερούνται (ΔN) ή φέρουν μόνο το αμινοτελικό άκρο (ΔC). Οι συγκεκριμένες πρωτεϊνικές μορφές είναι ανασυνδυασμένες σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-2T και φέρουν αμινοτελικά επίτοπο GST. Τα στάδια υπερέκφρασης και καθαρισμού τους φαίνονται στην Εικόνα 21. Ακόμη παράχθηκε το πρωτεϊνικό τμήμα HIF-1α 348-826 SE που είναι ανασυνδυασμένο στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T και φέρει επίσης αμινοτελικό επίτοπο GST. Το συγκεκριμένο παράγωγο του HIF-1α στερείται του αμινοτελικού άκρου έως και την επικράτεια PAS, ενώ φέρει μετάλλαξη που αλλάζει την σερίνη 641 σε γλουταμινικό οξύ με αποτέλεσμα να μιμείται το φορτίο που προσδίνει η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 στο ίδιο κατάλοιπο σερίνης. Δείγματα από τα στάδια υπερέκφρασης και καθαρισμού αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά και με χρώση Coomassie Brilliant Blue (Εικόνα 21).

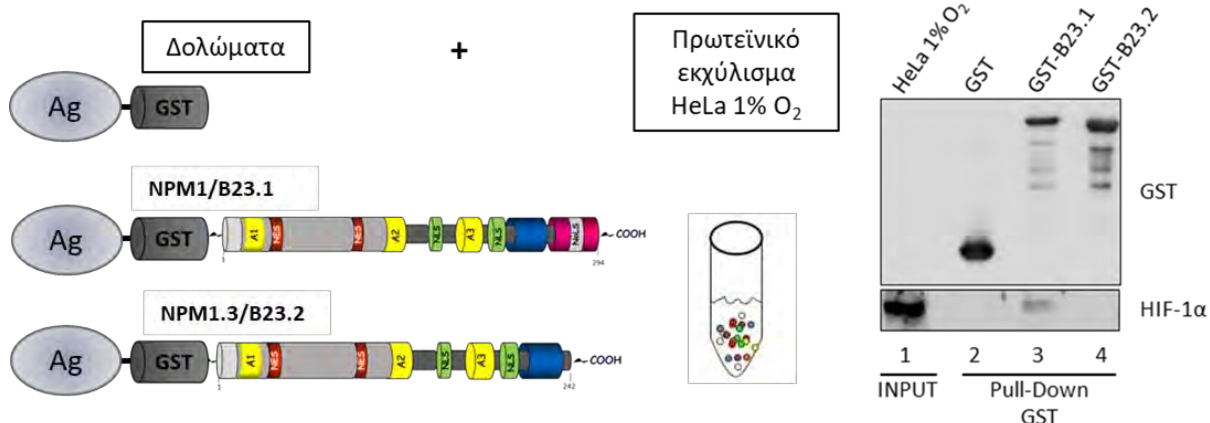
εκλούσεων των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια αγκιστείας (διαδρομές 6 και 7) αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση της πηκτής με Coomassie brilliant blue.

Στην ανάλυση των σταδίων υπερέκφρασης και καθαρισμού των παραπάνω πρωτεϊνών διακρίνεται η επαγωγή τους μετά την επώαση παρουσία IPTG (Εικόνα 21, διαδρομές 1-2). Επιπλέον, η ανάκτηση της πλειονότητας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος στο διαλυτό υπερκείμενο παρά στο ίζημα είναι ενδεικτική της καταλληλότητας των συνθηκών επώασης και λύσης των βακτηρίων (Εικόνα 21, διαδρομές 3-4), ενώ ο καθαρισμός της πρωτεΐνης μετά την δέσμευση σε σφαιρίδια αγκιστείας και δύο στάδια διαδοχικών εκλούσεων (Εικόνα 21, διαδρομές 6-7) φαίνεται ότι είναι επαρκής όσον αφορά την ποσότητα και την καθαρότητα της πρωτεΐνης στο δείγμα ελέγχου.

4.1.2 Μελέτη της *in vitro* αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πλήρους μεγέθους NPM1 B23.1, B23.2 με κυτταρικό HIF-1α

Με σκοπό την ανίχνευση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ καθαρισμένων πλήρους μεγέθους GST-NPM1 με κυτταρικό HIF-1α οι πρωτεϊνικές μορφές GST-B23.1 και GST-B23.2 δεσμεύτηκαν ως δολώματα πάνω σε σφαιρίδια αραρόζης-γλουταθειόνης και έγινε *in vitro* δοκιμή αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες εκχυλίσματος κυττάρων HeLa που είχαν καλλιεργηθεί για 16h σε συνθήκες υποξίας έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί η έκφραση του HIF-1α (βλ. [3.2.17](#)). Ο προερχόμενος από υποξικά κύτταρα HeLa HIF-1α (Εικόνα 22, διαδρομή 1) δεν αλληλεπίδρασε με πρωτεΐνη δόλωμα καθαρής GST (Εικόνα 22, διαδρομή 2), ενώ δείχθηκε ότι συγκατακρημνίζεται όταν χρησιμοποιείται ως δόλωμα ανασυνδυασμένη GST-NPM1 (Εικόνα 22, διαδρομή 3). Ωστόσο, ο HIF-1α δεν συγκατακρημνίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα το παράγωγο εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3 (B23.2) σε σύντηξη με την GST (Εικόνα 22, διαδρομή 4). Η διαφορά μεταξύ των δύο μορφών νουκλεοσομίνης έγκειται στην παρουσία μιας αρωματικής επικράτειας 37 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο αποκλειστικά

της πρώτης μορφής NPM1.1 (B23.1). Τα πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης απέδειξαν ότι οι πλήρους μεγέθους NPM1 και HIF-1α αλληλεπιδρούν και ότι η καρβοξυτελική αμινοτελική επικράτεια της NPM1 είναι σημαντική για την πραγματοποίηση της αλληλεπίδρασης με τον HIF-1α.



Εικόνα 22 Ο προερχόμενος από υποξικά κύτταρα HeLa HIF-1α αλληλεπιδρά με την ανασυνδυασμένη GST-NPM1/B23.1 και όχι με την GST-NPM1.3/B23.2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποξικών κυττάρων HeLa (INPUT) συγκατακρημνίστηκε *in vitro* με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-B23.1 και GST-B23.2 και ως συνθήκη ελέγχου ανασυνδυασμένη GST (Pull-Down GST).

4.1.3 Μελέτη και χαρτογράφηση της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ ανασυνδυασμένων μορφών NPM1 και HIF-1α

Με σκοπό να απαντηθεί το ερώτημα εάν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα έγιναν πειράματα *in vitro* δοκιμής αλληλεπίδρασης με χρήση καθαρών πρωτεϊνών απαλλαγμένων από το κυτταρικό περιβάλλον.

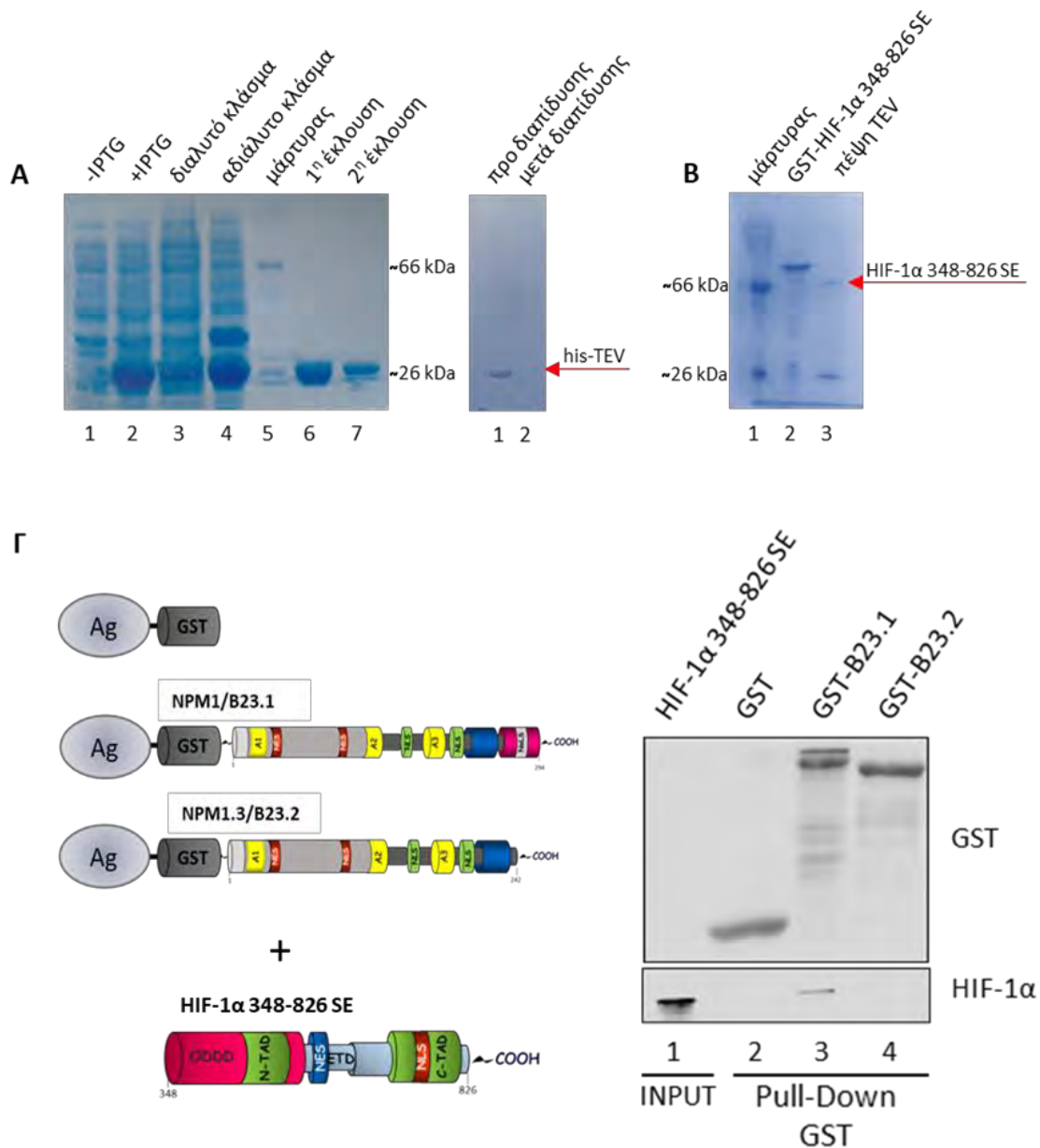
Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι GST χμαιρικές NPM1 των δύο μορφών εναλλακτικού ματίσματος (B23.1, B23.2) και το ανασυνδυασμένο πρωτεϊνικό τμήμα HIF-1α 348-826(SE) για το οποίο είχε δειχθεί σε επίπεδο μεταπτυχιακής εργασίας ότι αλληλεπιδρά ισχυρά με την ενδογενή νουκλεοφοσμίνη (<http://hdl.handle.net/11615/48868>). Το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-1α 348-826(SE) έχει κλωνοποιηθεί ώστε να φέρει στη σύνδεση με την GST μια αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση TEV (Tobacco Etch Virus) [TEV

recognition site: ENLYFQ(G/S)]. Με σκοπό την απομόνωση HIF-1α 348-826(SE) χωρίς επίτοπο GST η πρωτεάση TEV παράχθηκε με επίτοπο 6 ιστιδινών (His-tag) σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21-RIL και καθαρίστηκε με σφαιρίδια αγαρόζης-νικελίου, όπως περιγράφεται στις παραγράφους (3.2.7-3.2.9). Στην συνέχεια, έγινε πέψη του GST-HIF-1α 348-826(SE) με την πρωτεάση και καθαρισμός του προϊόντος όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3.2.18. Τα στάδια υπερέκφρασης και καθαρισμού της πρωτεάσης TEV αλλά και η απαραίτητη για την λειτουργικότητα της διαπίδυση, που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.9 αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά όπως φαίνεται στην εικόνα 23 A. Φαίνεται στην διαδρομή 2 η επαγωγή της έκφρασης της TEV σε μοριακό βάρος ~ 28 kDa μετά την προσθήκη IPTG, ενώ συγκρίνοντας τις διαδρομές 3 και 4 παρατηρείται ότι μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης καθιζάνει στο αδιάλυτο κλάσμα. Πάρα την χαμηλή ανάκτηση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα, το οποίο οδηγείται προς καθαρισμό με σφαιρίδια αγαρόζης-νικελίου, φαίνεται ότι ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης his-TEV δεσμεύτηκε και εκλούστηκε σε καθαρή μορφή από τα σφαιρίδια αγαρόζης-νικελίου (Εικόνα 23 A, διαδρομές 6-7). Σημαντική ποσότητα χάνεται και κατά την διάρκεια της διαπίδυσης των καθαρισμένων μορίων his-TEV, βήμα απαραίτητο για την απομάκρυνση της μεγάλης ποσότητας μιδαζολίου που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια αγαρόζης νικελίου (Εικόνα 23 A δεξιά, διαδρομές 1-2). Ωστόσο η τελική ποσότητα καθαρής his-TEV ήταν αρκετή για να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα για την πέψη GST-HIF-1α 348-826 SE, καθώς 10 μg πρωτεάσης έκοψε αποτελεσματικά 70 μg υποστρώματος. Δείγματα πριν και μετά την πέψη του HIF-1α και την απαλοιφή του επιτόπου GST αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie (Εικόνα 23 B).

Η δοκιμή in vitro αλληλεπίδρασης έγινε, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.18, μετά την δέσμευση των ανασυνδυασμένων μορφών NPM1 σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, με την επώαση τους σε αναλογία 3:1 με τον καθαρό HIF-1α 348-826 SE. Η ανάλυση των εκλουσμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε ότι ο καθαρός HIF-

1α 348-826 SE δεν αλληλεπιδρά με καθαρή GST ενώ, όπως και ο κυτταρικός HIF-1α, αλληλεπιδρά μόνο με την GST-B23.1 και όχι με την GST-B23.2 (Εικόνα 23 Γ).

Τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση HIF-1α/NPM1 είναι άμεση καθώς συμβαίνει και *in vitro*, απουσία του κυτταρικού περιβάλλοντος. Ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται, ότι η καρβοξυτελική αρωματική επικράτεια, που υπάρχει μόνο στην NPM1 και όχι στο προϊόν εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3, είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση.



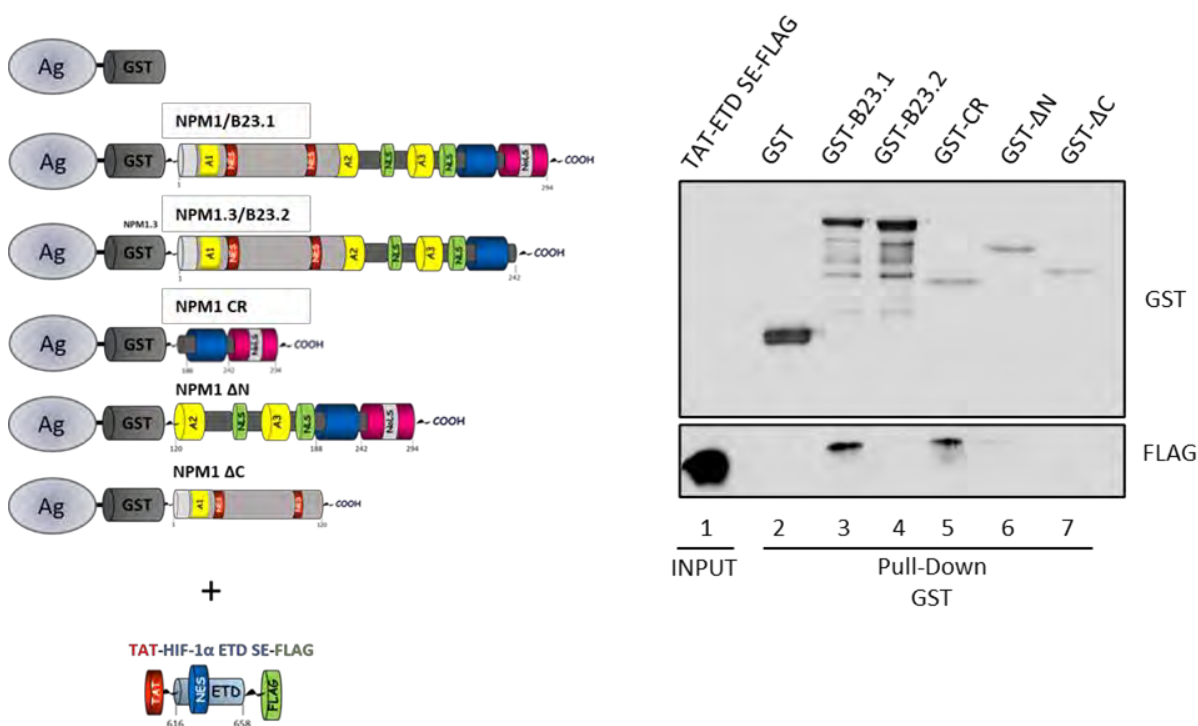
Εικόνα 23 Ο καθαρισμένος HIF-1α 348-826 SE αλληλεπιδρά μόνο με την GST-NPM1 (B23.1) και όχι με την GST-NPM1.3 (B23.2) (A) Τα στάδια υπερέκφρασης, καθαρισμού (αριστερά) και διαπίδυσης (δεξιά) της πρωτεάσης his-TEV αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με Coomassie, (B) Δείγμα του ανασυνδυασμένου τμήματος GST-HIF-1α(348-826)

SE πριν και μετά από πέψη με την πρωτεάση TEV αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie, (Γ) Το ανασυνδυασμένο πρωτεϊνικό τμήμα HIF-1α(348-826) SE (INPUT) χρησιμοποιήθηκε για δοκιμή in vitro αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες GST-B23.1 και GST-B23.2 και ως συνθήκη ελέγχου ανασυνδυασμένη GST (Pull-Down GST). Για την ανοσοαποτύπωση έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Για να χαρτογραφηθεί περαιτέρω η επικράτεια της NPM1 που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με την ETD επικράτεια του HIF-1α έγιναν πειράματα in vitro δοκιμής αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφόρων ανασυνδυασμένων τμημάτων της NPM1 με αμινοτελικό επίτοπο GST και του πεπτιδίου TAT-ETD(SE)-FLAG που είχε παραχθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας (177) (Εικόνα 24). Το πεπτίδιο αυτό επιλέχθηκε αφενός επειδή περιέχει την επικράτεια του HIF-1α όπου έχει εντοπιστεί η αλληλεπίδραση με την νουκλεοσομίνη και φέρει την μετάλλαξη SE που μιμείται την φωσφορυλίωση από τις ERK ευνοώντας την αλληλεπίδραση. Αφετέρου, δεν περιέχει επίτοπο GST αλλά FLAG στο καρβοξυτελικό του άκρο επιτρέποντας τον διαχωρισμό του από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης όταν δεν υπάρχει αλληλεπίδραση με το εκάστοτε πρωτεϊνικό κομμάτι GST-NPM1.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται στην ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 24) και υποδεικνύει ότι ικανή για την αλληλεπίδραση είναι η πλήρους μεγέθους GST-B23.1 (Εικόνα 24, διαδρομή 3), ωστόσο επαρκές είναι και το τμήμα GST-NPM1(CR) που περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό άκρο της NPM1 που περιλαμβάνει και την αρωματική καρβοξυτελική επικράτεια 37 αμινοξέων (Εικόνα 24, διαδρομή 5). Τόσο το τμήμα GST-NPM1(ΔC) που περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο όσο και το GST- B23.2 που περιλαμβάνει το παράγωγο εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3 δεν αλληλεπιδρούν με το πεπτίδιο TAT-ETD(SE)-FLAG, επιβεβαιώνοντας την σημασία των 37 καρβοξυτελικών αμινοξέων της NPM1 για την επιτυχή αλληλεπίδραση με την ETD επικράτεια του HIF-1α. Το τμήμα GST-NPM1(ΔN), παρά το γεγονός ότι φέρει αυτούσια την καρβοξυτελική επικράτεια που περιέχεται και στο τμήμα CR, παρουσιάζει ασθενέστερη αλληλεπίδραση με το πεπτίδιο TAT-ETD(SE)-FLAG. Η αιτία αυτής της διαφοροποίησης δεν μελετήθηκε περαιτέρω ωστόσο είναι πιθανό να

οφείλεται σε παραλλαγμένη διαμόρφωση του συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου πρωτεϊνικού τμήματος.



Εικόνα 24 Το καθαρό πρωτεϊνικό τμήμα HIF-1α TAT-HIF-1α ETD SE-FLAG (INPUT) αλληλεπιδρά άμεσα με την πλήρους μεγέθους καθαρή GST-B23-1 και το καρβοξυτελικό άκρο της NPM1 GST-CR. Δοκιμή *in vitro* αλληλεπίδρασης (Pull-Down GST) με δολώματα τις καθαρές πρωτεΐνες GST-B23.1, GST-B23.2, GST-CR, GST-ΔN, GST-ΔC και ως συνθήκη ελέγχου την ανασυνδυασμένη GST και INPUT το καθαρισμένο πεπτικό TAT-HIF-α ETD SE-FLAG. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την ανοσοαποτύπωση έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν την άμεση αλληλεπίδραση της NPM1 με τον HIF-1α και φανερώνουν ότι για την πραγματοποίηση της αλληλεπίδρασης είναι απαραίτητες και επαρκείς η καρβοξυτελική επικράτεια της NPM1 και η ETD επικράτεια του HIF-1α. Σε συνδυασμό με προκαταρκτικά πειράματα που είχαν αναδείξει την ικανότητα καθαρισμένων τμημάτων HIF-1α με φωσφομιμητική μετάλλαξη SE να συγκατακρημνίσουν ενδογενή NPM1 από κύτταρα HeLa, ολοκληρώνουν την εικόνα της *in vitro* αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων NPM1 και HIF-1α.

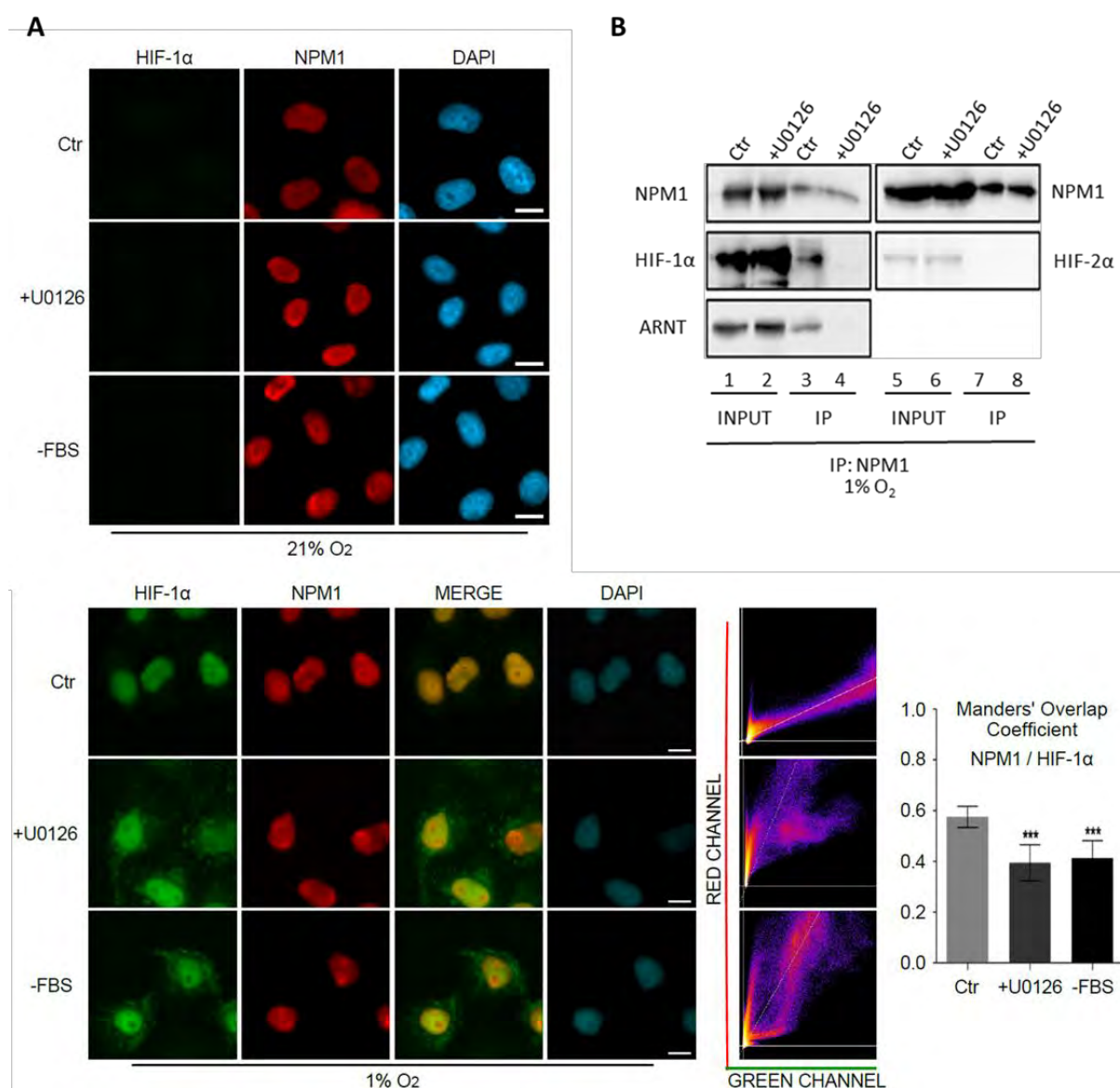
4.2 Η αλληλεπίδραση NPM1/HIF-1α εντός των κυττάρων και ο ρόλος των ERK1/2 στην ρύθμιση της αλληλεπίδρασης.

4.2.1 Εντοπισμός των NPM1/HIF-1α εντός κυττάρων HeLa και επιβεβαίωση της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης τους σε συνθήκες που επιτρέπουν την ενεργοποίηση των ERK1/2.

Στοχεύοντας στη διερεύνηση της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και NPM1 διενεργήθηκαν πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα HeLa. Η NPM1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας εντοπίζεται στους πυρήνες των κυττάρων με πιο έντονο εντοπισμό στην περιφέρεια των πυρηνίσκων. Ο HIF-1α, όταν σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας, εντοπίζεται διάχυτος στο πυρηνόπλασμα. Ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών βρέθηκε ότι είναι ισχυρός σε φυσιολογικές συνθήκες υποξίας εντός των πυρήνων των κυττάρων (Εικόνα 25A, 1% O₂ Ctr). Όταν αναστέλλεται το μονοπάτι ενεργοποίησης των ERK1/2, είτε με τον αναστολέα των MEK (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase) (Εικόνα 25A, +U0126), είτε με στέρηση ορού από το θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας (Εικόνα 25A, -FBS), δεν διακρίνεται αλλαγή στον εντοπισμό της NPM1. Ωστόσο, ένα μέρος του HIF-1α εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο πυρηνικός HIF-1α που παραμένει στον πυρήνα συνεντοπίζεται σε σημαντικά μειωμένο βαθμό με την NPM1 (Εικόνα 25A, 1% O₂, MERGE και διάγραμμα Manders' Overlap Coefficient).

Για την απόδειξη της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι της NPM1 σε υποξικά κύτταρα HeLa Μ καλλιιεργημένα σε συνθήκες ελέγχου και παρουσία 10 μΜ U0126 για την αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης των ERK1/2. Αρχικά, εξετάζοντας τα κυτταρικά λύματα, φαίνεται ότι η αναστολή της ενεργοποίησης των ERK1/2 δεν επηρέασε την έκφραση των NPM1, HIF-1α, HIF-2α και ARNT (INPUT, Εικόνα 25B, διαδρομές 1-2, 5-6). Βρέθηκε ότι η νουκλεοσομίνη, που ανοσοκατακρημνίζεται σε όλες τις συνθήκες, βρίσκεται σε σύνδεση με τον HIF-1α μόνο στη

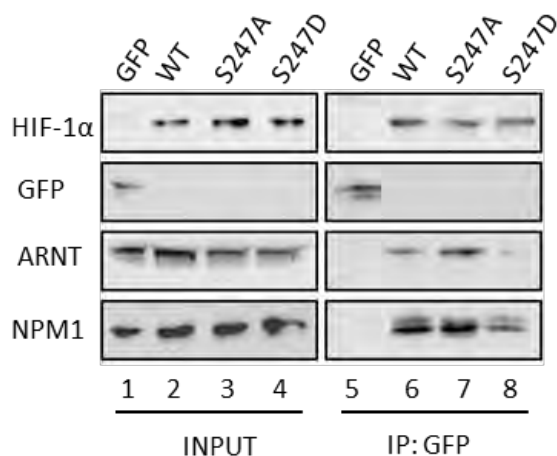
συνθήκη ελέγχου οπότε και είναι δυνατή η ενεργοποίηση των ERK1/2 (Εικόνα 25B, διαδρομή 3). Ταυτόχρονα η ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της NPM1 σε κύτταρα που εκφράζουν και τον HIF-2α κάνει δυνατή την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης ως προς τις HIF υπομονάδες. Αφενός φαίνεται ότι η νουκλεοφωσμίνη αλληλεπιδρά μόνο με τον HIF-1α (Εικόνα 25B, διαδρομή 3) και όχι με τον HIF-2α (Εικόνα 25B διαδρομή 7). Αφετέρου έλεγχος του Western blot με αντίσωμα έναντι του ARNT δείχνει ότι ο HIF-1α συγκατακρημνίζεται με την NPM1 ως διμερές με τον ARNT (Εικόνα 25B, διαδρομή 3).



Εικόνα 25 Σε υποξικά καρκινικά κύτταρα HeLa οι HIF-1α και NPM1 συνεντοπίζονται και αλληλεπιδρούν σε συνθήκες που επιτρέπουν την ενεργοποίηση των ERK1/2. (A) Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των ενδογενών πρωτεϊνών HIF-1α και NPM1 σε κύτταρα HeLa καλλιεργημένα σε περιβάλλον 21% O₂ (πάνω) ή 1% O₂ (κάτω) σε

συνθήκες πλήρους θρέψης (Ctr) και αναστολής είτε των MEK με αναστολέα (+U0126), είτε των MAPK με στέρηση ορού από το θρεπτικό (-FBS). Στο πράσινο κανάλι εμφανίζεται ο HIF-1α, στο κόκκινο κανάλι η NPM1 και στο μπλε κανάλι η χρώση των πυρήνων με DAPI. (Κάτω αριστερά) Στη τρίτη στήλη παρατίθεται η επικάλυψη των δύο καναλιών (MERGE) σαν ένδειξη συνεντοπισμού των πρωτεϊνών. (Κάτω στη μέση) Διαγράμματα διασποράς (scatterplots) που υποδεικνύουν την ένταση των pixels σε κάθε κανάλι. (Κάτω δεξιά) Το διάγραμμα υποδεικνύει την τιμή της μεταβλητής Manders όπως υπολογίστηκε για τον φθορισμό των πυρήνων 35 κυττάρων ανά συνθήκη (\pm τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, ***:P<0.001, two-tailed Student's t-test). **(B)** Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (INPUT), καλλιεργημένων στην υποξία σε συνθήκες ελέγχου (Ctr) ή αναστολής (+U0126) των ERK1/2, ανοσοκατακρημνίστηκε με αντίσωμα έναντι της νουκλεοφωσμίνης (IP: NPM1). Για την ανοσοαποτύπωση έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Η σημασία της παρουσίας του ετεροδιμερούς HIF-1 για την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την NPM1 επιβεβαιώθηκε μετά από διαμόλυνση κυττάρων HeLa ώστε να παράγουν σε συνθήκες νορμοξίας GFP χμιαρικό HIF-1α αγρίου τύπου (wt) και μεταλλαγμένων μορφών που αναιρούν (S247A) ή μιμούνται (S247D) την φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ, με αποτέλεσμα να επάγεται ή να αναστέλλεται ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT (164). Ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι του GFP έδειξε ότι η αλληλεπίδραση με την NPM1 ευνοείται από τον σχηματισμό του λειτουργικού ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT (Εικόνα 26, διαδρομή 7) και αναστέλλεται εν μέρει όταν παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του (Εικόνα 26, διαδρομή 8). Παρατηρείται λοιπόν ότι, παρά την ικανότητα των δύο πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν άμεσα in vitro, εντός του κυττάρου η νουκλεοφωσμίνη αλληλεπιδρά κυρίως με το μεταγραφικά λειτουργικό ετεροδιμερές HIF-1α/ARNT .



Εικόνα 26 Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την NPM1 ευνοείται από τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς HIF-1α/ARNT. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (INPUT), που εκφράζουν μετά από διαμόλυνση GFP ή την αναγραφόμενη μορφή ανασυνδυασμένου GFP-HIF-1α, ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP (IP:GFP). Για την ανοσοαποτύπωση έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Με τα πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών αποδείχθηκε ότι οι NPM1 και HIF-1α συνεντοπίζονται και αλληλεπιδρούν εντός των πυρήνων υποξικών κυττάρων και ότι η φωσφορυλίωση της επικράτειας ETD του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 προωθεί την αλληλεπίδραση. Παράλληλα βρέθηκε ότι η NPM1 αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-1α και όχι με τον HIF-2α, ενώ δείχθηκε ότι συνδέεται με το ετεροδιμερές HIF-1α/ARNT. Τα παραπάνω πειράματα, σε συνδυασμό με προκαταρκτικά πειράματα στα οποία η αλληλεπίδραση δείχθηκε με ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α σε υποξικά κύτταρα (178), ολοκλήρωσαν την διερεύνηση της εξαρτώμενης από τις ERK1/2 ενδογενούς αλληλεπίδρασης των NPM1/HIF-1α και στην συνέχεια της διατριβής μελετήθηκε η σημασία της NPM1 στην δράση του HIF-1 και στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία.

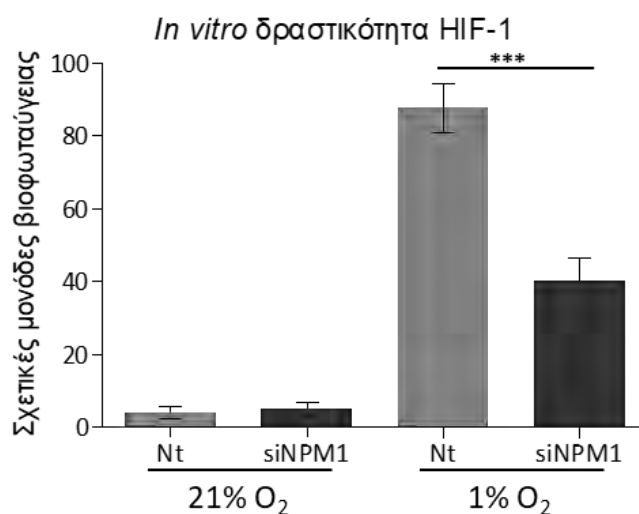
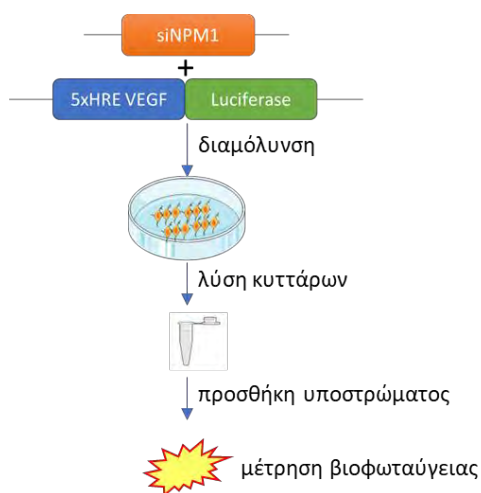
4.3 Διερεύνηση της επίδρασης της NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα και τον μηχανισμό δράσης του HIF-1.

4.3.1 Μελέτη της συμβολής της NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1

Η εξάρτηση της αλληλεπίδρασης HIF-1α/NPM1 από την ενεργότητα των ERK1/2 και τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς HIF-1 υπέδειξε ότι η αλληλεπίδραση εμπλέκεται στην δραστηριότητα του HIF-1. Για να διερευνηθεί ο ρόλος της NPM1 στην μεταγραφική δράση του HIF-1 έγινε αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοσομίνης σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, μετά από διαμόλυνση με ειδικό siRNA που αναγνωρίζει το mRNA της NPM1 και το οδηγεί προς αποικοδόμηση όπως περιγράφεται στην παράγραφο [3.2.19](#). Σε κάθε περίπτωση επιτεύχθηκε αποσιώπηση της NPM1 σε ποσοστό >70% (Εικόνα 28, διαδρομές 2 και 4). Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της NPM1 αφενός στην ενεργοποίηση από τον HIF-1 ενός τεχνητού υποκινητή-δείκτη μεταγραφικής ενεργότητας, αφετέρου στα επίπεδα mRNA και στην πρωτεΐνη της λιπίνης-1, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την έκφραση της οποίας αποτελεί γνωστό στόχο του HIF-1 (100).

4.3.1.1 Επίδραση της αποσιώπησης της NPM1 στην ικανότητα του HIF-1 να ενεργοποιεί τεχνητούς υποκινητές

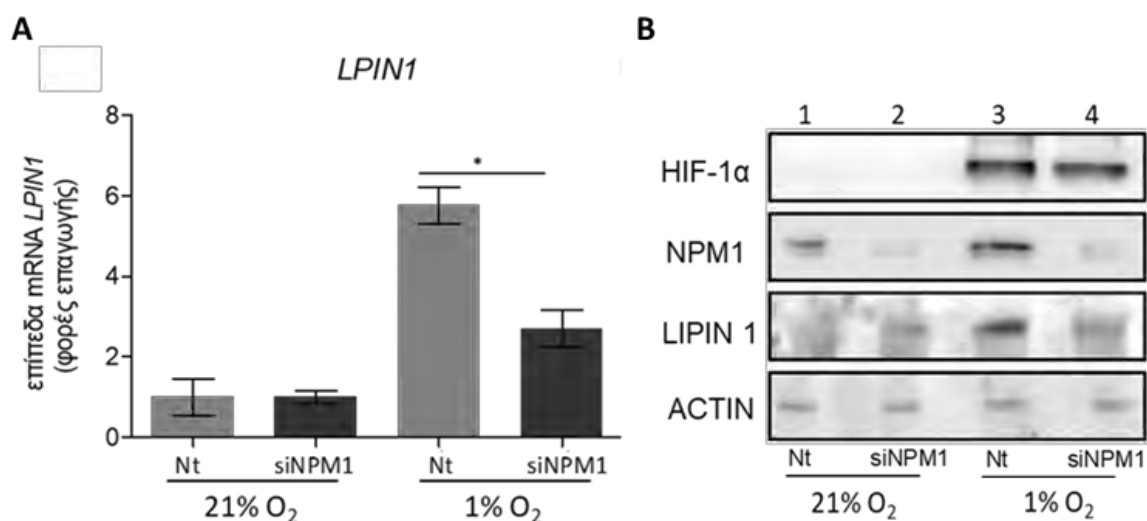
Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa S3 κατεργασμένα ώστε να εκφράζουν τα πλασμίδια VEGF-5xHRE-LUC, pCI-Renilla με ταυτόχρονη διαμόλυνση με non-targeting (Nt) ή ειδικό για το mRNA της NPM1 siRNA (siNPM1), όπως περιεγράφηκε στη παράγραφο 3.2.20. Ανιχνεύθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, σημαντική ενεργοποίηση του τεχνητού υποκινητή VEGF-5xHRE στην υποξία, 90 φορές περισσότερο σε σύγκριση με την νορμοξία, ως αποτέλεσμα της δράσης του HIF-1. Ωστόσο, η ενεργοποίηση αυτή αναστέλλεται σε βαθμό άνω του 50% όταν έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 στην υποξία (Εικόνα 27). Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της NPM1 και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.



Εικόνα 27 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 μείωσε της ικανότητα του HIF-1 να ενεργοποιεί σε συνθήκες υποξίας ένα τεχνητό υποκινητή που φέρει πολλαπλά HRE. Μέτρηση της επαγόμενης από τον HIF-1 δράσης της λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa διαμολυσμένα με τα πλασμίδια VEGF-5xHRE-LUC και pCI-Renilla και παράλληλα με siRNA ελέγχου (Nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1). Οι τιμές εκφράζονται ως λόγος της μετρούμενης βιοφωταύγειας της επαγόμενης λουσιφεράσης προς εκείνη της σταθερά εκφραζόμενης λουσιφεράσης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με 4 τιμές ανά συνθήκη στο καθένα και σύνολο 8 τιμών (\pm τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, ***: $P < 0,005$, two-tailed student's t-test).

4.3.1.2 Επίδραση της αποσιώπησης της NPM1 στην έκφραση του γονιδίου *LPIN1* που αποτελεί στόχο του HIF-1

Περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της NPM1 στην δραστικότητα του HIF-1 επιτεύχθηκε ελέγχοντας την επίδραση της αποσιώπησης της στα επίπεδα mRNA αλλά και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λιπίνης-1. Τα επίπεδα mRNA αναλύθηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου μετά από απομόνωση του RNA (Μέθοδοι 3.2.23-25), ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα μελετήθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνικών λυμάτων κυττάρων HeLa και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 28A τα επίπεδα mRNA της λιπίνης-1 αυξάνονται 6 φορές κατά την μετάβαση από νορμοξία σε υποξία όμως όταν έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 η αύξηση αυτή υποδιπλασιάζεται. Κατά παρόμοιο τρόπο στα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης βλέπουμε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λιπίνης-1 γίνονται ανιχνεύσιμα στην υποξία ωστόσο μειώνονται σημαντικά όταν έχει επιτευχθεί αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε ποσοστό >70%, όπως αυτή υπολογίστηκε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ακτίνης (Εικόνα 28B, δεξιά).



Εικόνα 28 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 μείωσε την έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης της λιπίνης 1. Κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν για 24 με siRNA ελέγχου (nt) ή έναντι της NPM1 (si) και στη συνέχεια επώασησαν για 16h σε συνθήκες νορμοξίας (N) και υποξίας (H). **(A)** Το διάγραμμα αναπαριστά την μεταβολή στα επίπεδα mRNA στην υποξία σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη νορμοξίας με κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, τριπλών δειγμάτων (v=6) (±τυπική

απόκλιση, *: $P < 0,05$), **(B)** Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων αναλύθηκε με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.3.1 σε συνδυασμό με προκαταρκτικά πειράματα που έδειξαν παρόμοια επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της NPM1 στα επίπεδα mRNA ενός ακόμα γονιδίου στόχου του HIF-1, του *PH4A1*, αποδεικνύουν την θετική συμβολή της νουκλεοφοσμίνης στην δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 και την έκφραση των γονιδίων στόχων του σε συνθήκες υποξίας.

4.3.2 Ο ρόλος της NPM1 στον μηχανισμό δράσης του HIF-1

4.3.2.1 Ο ρόλος των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του HIF-1α με λειτουργικά HRE που δεσμεύονται από την NPM1

Για να επιτευχθεί η διαλεύκανση του μηχανισμού που εμπλέκει τις ERK1/2 και την NPM1 στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 διερευνήθηκε με πειράματα διαδοχικής ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης η σύνδεση των NPM1/HIF-1α σε υποκινητές γονιδίων στόχων του HIF-1, σε συνθήκες που επιτρέπουν ή αναστέλλουν την ενεργότητα των ERK1/2 (Εικόνα 29, *πάνω*).

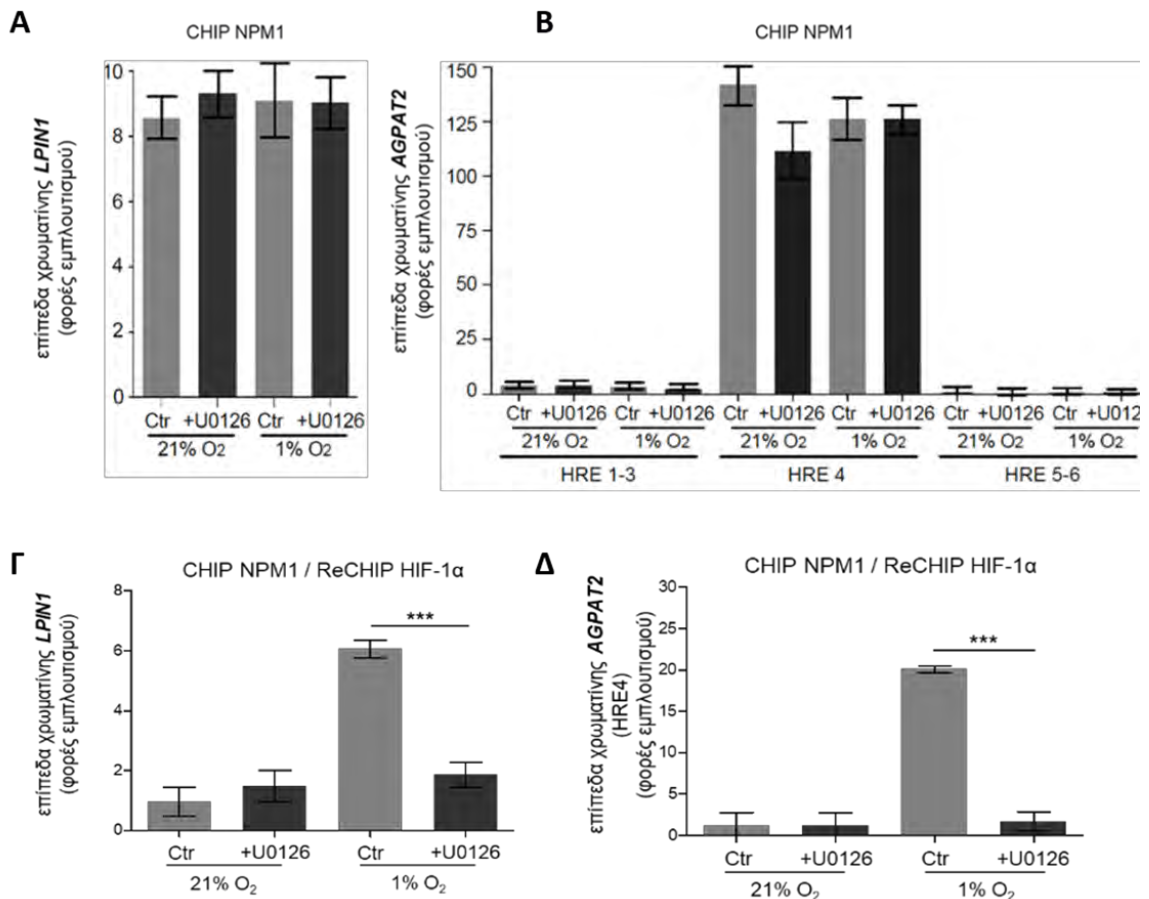
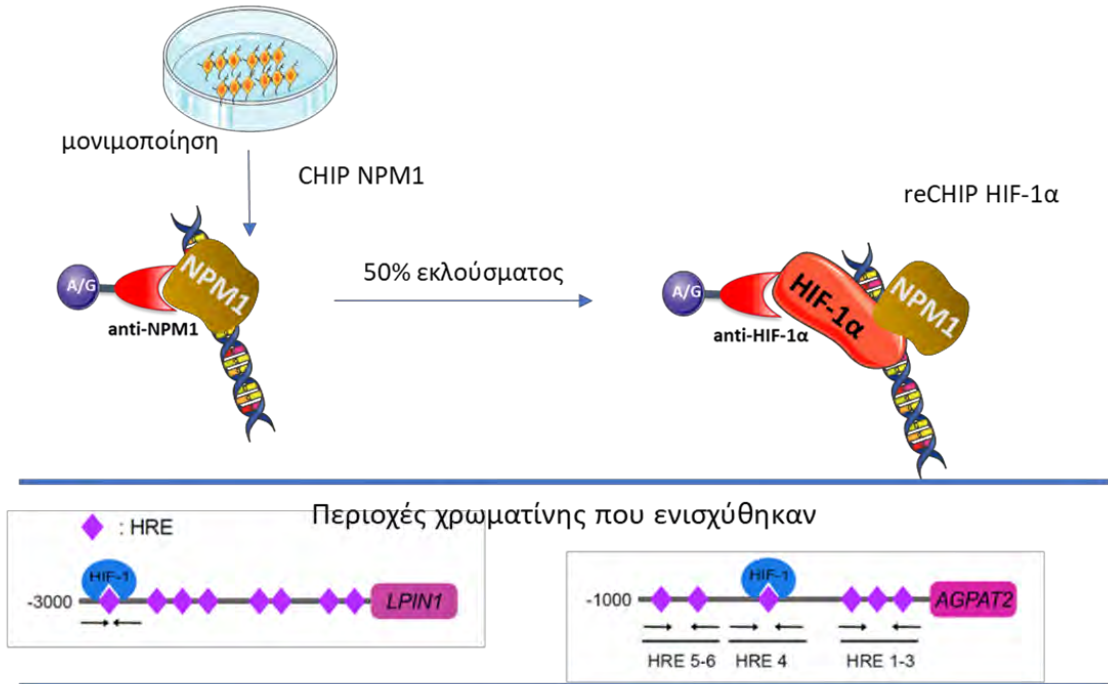
Αρχικά σχεδιάστηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της νουκλεοφοσμίνης σε κύτταρα Huh7 καλλιεργημένα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας παρουσία ή όχι του ειδικού αναστολέα του μονοπατιού ενεργοποίησης των ERK1/2 U0126. Μελετήθηκε έτσι εάν η NPM1 συνδέεται σε HRE που αναγνωρίζονται από τον HIF-1 και αν η σύνδεση αυτή επηρεάζεται από τα επίπεδα οξυγόνου ή από την ενεργότητα των ERK1/2. Με χρήση κατάλληλων εκκινήτων (Πίνακας 1) και την μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Μέθοδοι 3.2.25) ενισχύθηκαν περιοχές στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του HIF-1α *LPIN-1* και *AGPAT2* που περιλαμβάνουν καλά χαρακτηρισμένες αλληλουχίες HRE (99, 100). Βρέθηκε ότι (Εικόνα 29 A-B) η NPM1 συνδέεται στα λειτουργικά HRE και των δύο

γονιδίων στόχων του HIF-1 σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες. Αντιθέτως δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση της NPM1 με τις περιοχές του υποκινητή της AGPAT2 που περιέχουν HRE τα οποία δεν αναγνωρίζονται από τον HIF-1 (Εικόνα 29 Β, HRE 1-3/ 5-6) για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (99). Συνεπώς η NPM1 είναι δυνατόν να παίζει ρόλο στην αναγνώριση των κατάλληλων HRE από τον HIF-1.

Παράλληλα, η μισή ποσότητα του εκλούσματος της ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι της NPM1 χρησιμοποιήθηκε για δεύτερη, διαδοχική ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του HIF-1α. Με αυτό τον τρόπο ελέγχθηκε εάν στις διάφορες συνθήκες του πειράματος τα στοιχεία χρωματίνης που συγκατακρημνίζονται με την NPM1 βρίσκονται ταυτόχρονα σε αλληλεπίδραση με τον HIF-1α. Παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α βρίσκεται στο σύμπλοκο που κατακρημνίζεται από την NPM1 σε φυσιολογικές συνθήκες υποξίας. Ωστόσο, η παρουσία του εκεί αναιρείται σε σημαντικό βαθμό όταν έχει γίνει αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης των ERK1/2 και κατά συνέπεια της φωσφορυλίωσης του HIF-1α στις σερίνες 641, 643 (Εικόνα 29, Γ-Δ).

Σε αυτά τα αποτελέσματα επαληθεύεται ο ρόλος των ERK1/2 ως ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α και επιπλέον αναδεικνύεται ότι μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης ρυθμίζουν την ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα να προσδεθεί ισχυρά στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία ώστε να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Επίσης, η παρουσία της NPM1 στα ενεργά HRE υποδεικνύει ότι η νουκλεοφοσμίνη ενισχύει την μεταγραφική δράση του HIF-1 βοηθώντας την δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα στα κατάλληλα HRE των υποκινητών γονιδίων στόχων του.

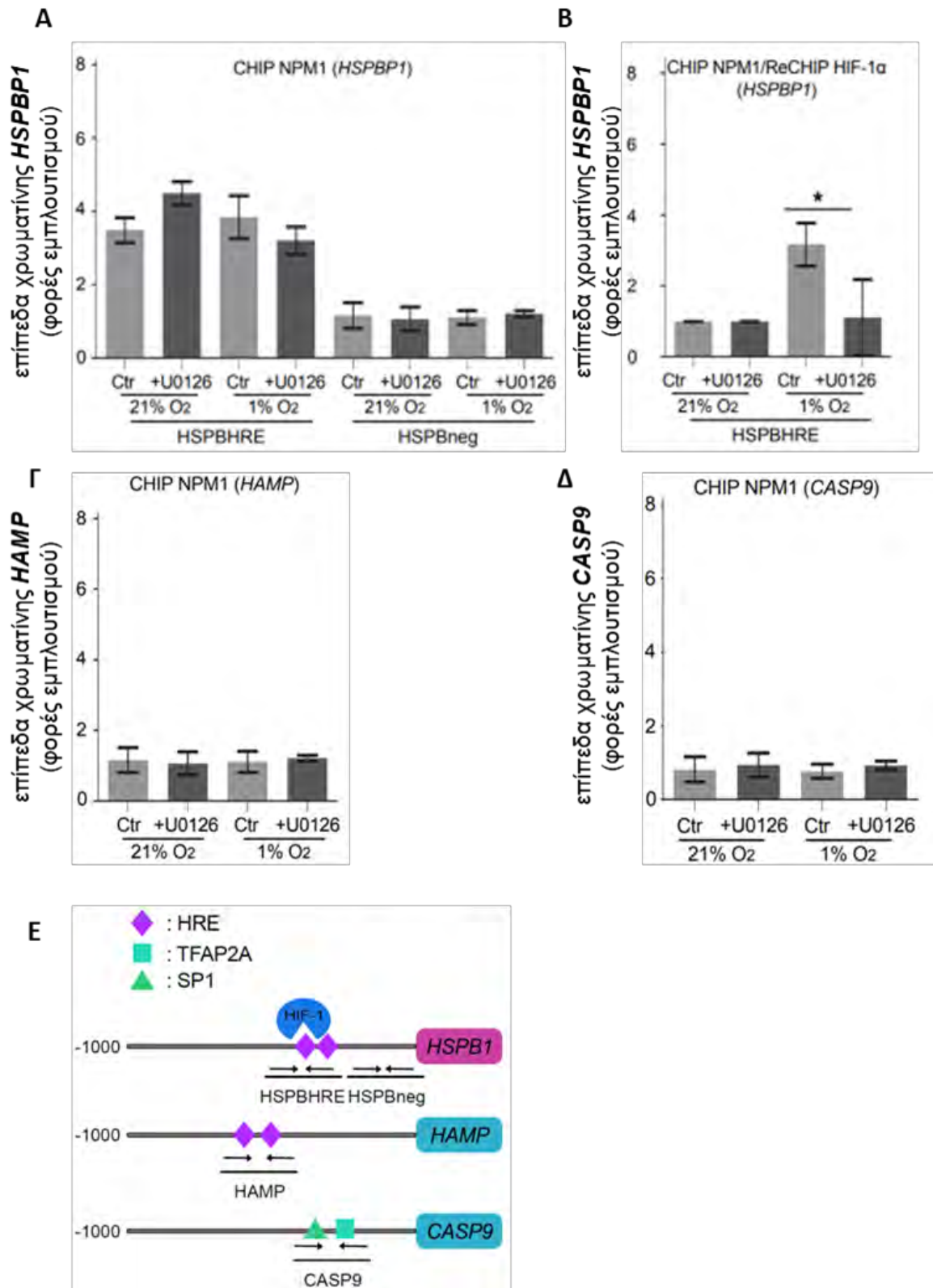
Διαδοχική Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης CHIP-reCHIP



Εικόνα 29 Η NPM1 αλληλεπιδρά με τις περιοχές των λειτουργικών HRE της AGPAT2 και της LPIN1 και ο HIF-1α έχει την δυνατότητα να δεσμεύεται πάνω στα ίδια στοιχεία μόνο όταν οι ERK είναι ενεργοποιημένες σε συνθήκες υποξίας. (Πάνω) Γραφική απεικόνιση της μεθοδολογίας για την εκτέλεση CHIP-reCHIP (Μέση) Γραφική απεικόνιση των υποκινητών των γονιδίων που ελέγχθηκαν. Με βέλη απεικονίζεται η υποπεριοχή που ενισχύθηκε με την χρήση κατάλληλων εκκινητών. (Κάτω) Χρωματίνη που ανοσοκατακρημνίστηκε αρχικά με αντίσωμα έναντι της NPM1 (A-B) και στην συνέχεια με αντίσωμα

έναντι του HIF-1α (Γ-Δ) αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση υποπεριοχών που περιέχουν HRE των υποκινητών των γονιδίων *LPIN1* (αριστερά Α/Γ) και *AGPAT2* (δεξιά Β/Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με 3 τιμές ανά συνθήκη στο καθένα και σύνολο 6 τιμών (\pm τυπική απόκλιση, ***: $P < 0,001$).

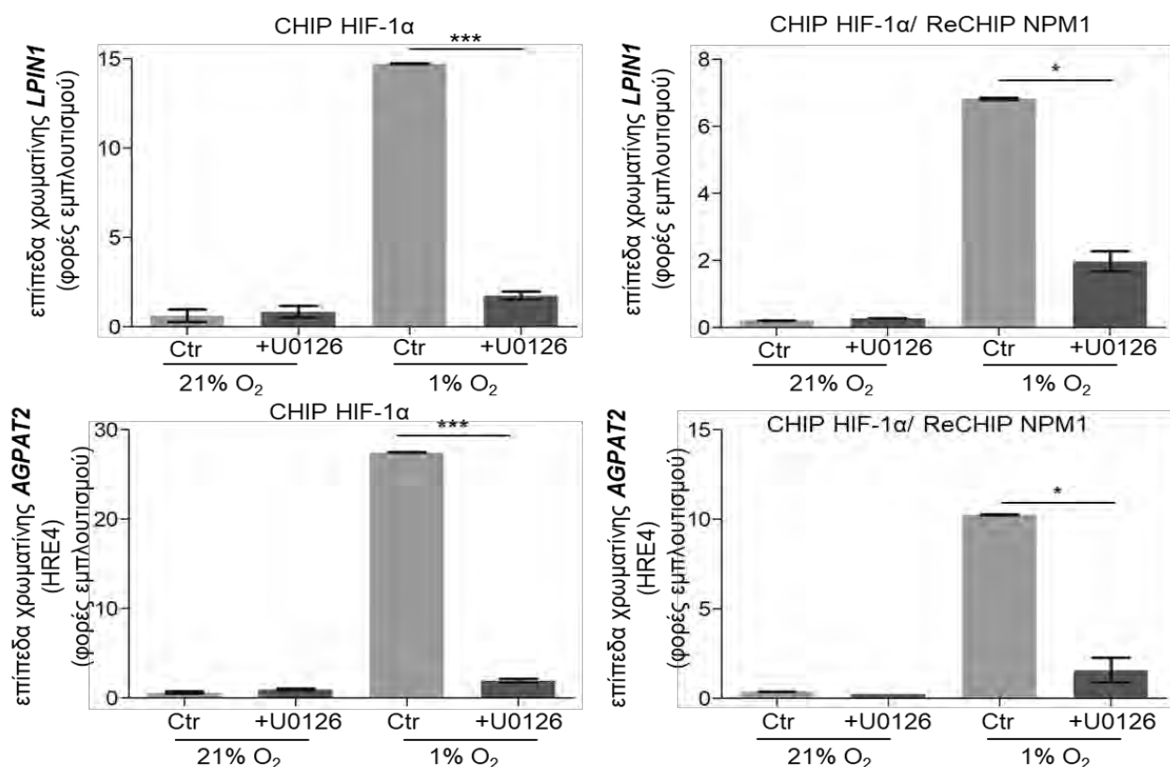
Για να επιβεβαιωθεί ότι η NPM1 συνδέεται ειδικά με υποκινητές που περιέχουν λειτουργικά στοιχεία απόκρισης στην υποξία επιλέχθηκε μια σειρά από γονίδια και με κατάλληλους εκκινητές ελέγχθηκε η παρουσία τμημάτων των υποκινητών τους στα ανοσοκτακρημνίσματα της NPM1 και εν συνεχεία του HIF-1α. Ο υποκινητής του γονιδίου *HSPB1*, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακή συνοδό που επάγεται ως απόκριση σε στρες, φέρει λειτουργικά HRE στην αλληλουχία του (301). Ενίσχυση μιας επικράτειας του υποκινητή που φέρει HRE έδειξε ότι όπως και στις περιπτώσεις των *LPIN1* και *AGPAT2* η NPM1 δεσμεύεται σε αυτήν την περιοχή (Εικόνα 30Α, HSPBHRE) και ο HIF-1α δεσμεύεται επίσης όταν οι ERK1/2 είναι ενεργές στην υποξία (Εικόνα 30Β). Αντίθετα τμήματα του ίδιου υποκινητή που δεν φέρουν HRE δείχθηκε ότι δεν δεσμεύονται από την NPM1 (Εικόνα 30Α HSPBneg). Σε συμφωνία με αυτήν την παρατήρηση περιοχές υποκινητών του γονιδίου *HAMP* που φέρει αλληλουχίες που ομοιάζουν αλλά δεν συνιστούν λειτουργικά HRE (302) και του γονιδίου *CASP9* που δεν φέρει HRE (303) δεν δεσμεύονται σε καμία συνθήκη από την NPM1 (Εικόνα 30 Γ και Δ αντίστοιχα). Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι όντως η NPM1 παρουσιάζει μια εξειδίκευση για τα λειτουργικά μόνο HRE των γονιδίων στόχων του HIF-1 και ενισχύεται η ένδειξη ότι η παρουσία της βοηθά στην αναγνώριση των ίδιων στοιχείων από τον HIF-1.



Εικόνα 30 Η NPM1 συνδέεται ειδικά με υποκινητές που περιέχουν λειτουργικά HRE και βοηθά στην σύνδεση του HIF-1α στα ίδια στοιχεία. Χρωματίνη που ανοσοκατακρημνίστηκε διαδοχικά, πρώτα με αντίσωμα έναντι της NPM1 (Α-Δ) και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι του HIF-1α (Β) αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση υποπεριοχών των εκκινητών των γονιδίων *HSPBP1* (Α-Β) [με (HSPBHRE) ή χωρίς HRE (HSPBneg)], *HAMP* (Γ) και *CASP9* (Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με 3 τιμές ανά συνθήκη στο καθένα και

σύνολο 6 τιμών (\pm τυπική απόκλιση, $*:P < 0,05$). (Ε) Γραφική απεικόνιση των υποκινητών των γονιδίων που ελέγχθηκαν. Με βέλη απεικονίζεται η υποπεριοχή που ενισχύθηκε με την χρήση κατάλληλων εκκινήτων.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των παραπάνω ευρημάτων, επαναλήφθηκε σε κύτταρα Huh7 το παραπάνω πείραμα διαδοχικής ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, στις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά πρώτα το αντίσωμα έναντι του HIF-1α και στη συνέχεια το αντίσωμα έναντι της NPM1. Επαληθεύτηκε ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τα ενεργά HRE των γονιδίων *LPIN1* και *AGPAT2* στην υποξία, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση μειώνεται σημαντικά όταν ανασταλεί η ενεργοποίηση των ERK1/2 (Εικόνα 31, αριστερά). Παράλληλα δείχθηκε ότι η νουκλεοσομίνη, που σύμφωνα με τα ευρήματα του προηγούμενου πειράματος βρίσκεται συνεχώς πάνω στα συγκεκριμένα στοιχεία χρωματίνης, αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και το σύμπλοκο της πρώτης ανοσοκατακρήμνισης μόνο όταν οι ERK1/2 είναι φυσιολογικά ενεργές στην υποξία (Εικόνα 31, δεξιά).



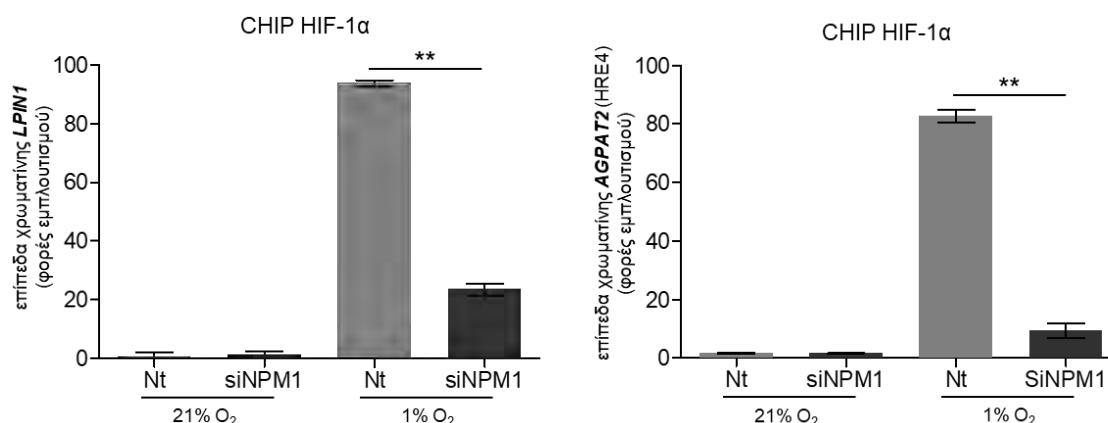
Εικόνα 31 Ο HIF-1α αλληλεπιδρά ισχυρά με λειτουργικά HRE μόνο σε συνθήκες υποξίας με ενεργές τις ERK1/2, ενώ στην αλληλεπίδραση συμμετέχει και η NPM1. (Αριστερά) Χρωματίνη που ανοσοκατακρήμνιστηκε με αντίσωμα έναντι του HIF-1α αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση υποπεριοχών των εκκινήτων των γονιδίων *LPIN1* (πάνω) και *AGPAT2* (κάτω). (Δεξιά) Χρωματίνη που ανοσοκατακρήμνιστηκε διαδοχικά, πρώτα με αντίσωμα

έναντι του HIF-1α και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι της NPM1 αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση υποπεριοχών των εκκινητών των γονιδίων *LPIN1* (πάνω) και *AGPAT2* (κάτω). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 4 τιμών ανά συνθήκη (\pm τυπική απόκλιση, * $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$).

4.3.2.2 Η σημασία της NPM1 για την δέσμευση του HIF-1α σε λειτουργικά HRE

Για να αποδειχθεί η σημασία της NPM1 στην δέσμευση των λειτουργικών HRE από τον HIF-1, μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της NPM1 στην αλληλεπίδραση του HIF-1α με λειτουργικά HRE. Για τον λόγο αυτό, μετά από διαμόλυνση με siRNA ελέγχου (non-targeting, Nt) ή siRNA ειδικού της το mRNA της NPM1 (siNPM1), κύτταρα Huh7 καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας και χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του HIF-1α.

Παρατηρήθηκε ότι ο HIF-1α σε συνθήκες υποξίας συνδέεται στο λειτουργικό HRE του *LPIN1* (Εικόνα 32, αριστερά) και σε αυτό του *AGPAT2* (Εικόνα 32, δεξιά). Ωστόσο η σύνδεση αυτή αναστέλλεται σημαντικά όταν έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 (Εικόνα 32). Το αποτέλεσμα αυτό εναρμονίζεται με αυτά των πειραμάτων ελέγχου της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και δείχνει ότι η παρουσία της NPM1 είναι σημαντική για την δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα στα HRE και εντέλει την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του.



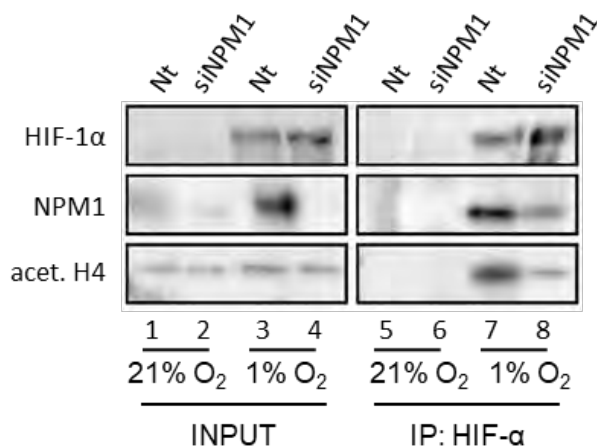
Εικόνα 32 Η παρουσία της NPM1 είναι απαραίτητη για την ισχυρή αλληλεπίδραση του HIF-1α με λειτουργικά HRE. Χρωματίνη κυττάρων Huh7 που ανοσοκατακρήμνίστηκε με αντίσωμα έναντι του HIF-1α αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση υποπεριοχών των εκκινητών των γονιδίων *LPIN1* (πάνω) και *AGPAT2*

(κάτω). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων με 3 τιμές ανά συνθήκη στο καθένα και σύνολο 6 τιμών (\pm τυπική απόκλιση, **:P< 0,01).

4.3.2.3 Η σημασία της NPM1 για την αλληλεπίδραση του HIF-1α με στοιχεία της ανοιχτής χρωματίνης.

Ως συνέχεια των ευρημάτων της επίδρασης της αποσιώπησης της NPM1 στην δέσμευση του HIF-1α σε HRE, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του HIF-1α με πρωτεΐνες- δείκτες της ανοιχτής χρωματίνης όπως είναι η ακετυλιωμένη ιστόνη 4 (acet. H4). Πρωτεϊνικά λύματα από κύτταρα HeLa καλλιεργημένα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 με ειδικό siRNA, χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών με αντίσωμα έναντι του HIF-1α. Τα εκλούσματα ηλεκτροφορήθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 33).

Η έκφραση της NPM1 αυξήθηκε σημαντικά στην υποξία (Εικόνα 34 διαδρομή 3 NPM1) σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (198) και μειώθηκε ως συνέπεια της δράσης του siRNA (Εικόνα 34 διαδρομή 2 και 4 NPM1). Επαληθεύτηκε ότι ο HIF-1α σταθεροποιείται στην υποξία χωρίς να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα από την αποσιώπηση της NPM1 (Εικόνα 33 διαδρομή 3 και 4 HIF-1α), ενώ η ακετυλιωμένη ιστόνη 4 εκφράζεται στον ίδιο βαθμό σε όλες τις συνθήκες (Εικόνα 33, διαδρομές 1-4 acet. H4). Ωστόσο ο HIF-1 που δεσμεύτηκε σε όμοιο βαθμό στις στήλες ανοσοκατακρήμνισης στις συνθήκες υποξίας, αλληλεπίδρασε διαφορετικά με την acet. H4, καθώς παρατηρείται μειωμένη δέσμευση στην συνθήκη που έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της NPM1 στην υποξία (Εικόνα 33, διαδρομές 7-8). Με αυτό το πείραμα επαληθεύτηκε περαιτέρω ο σημαντικός ρόλος της NPM1 στην αποτελεσματική αλληλεπίδραση του HIF-1 με την χρωματίνη.



Εικόνα 33 Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την ακετυλιωμένη ιστόνη 4 αναστέλλεται μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφωσμίνης. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (INPUT), που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας και εκφράζουν μετά από διαμόλυνση είτε μη ειδικό (Nt), είτε ειδικό για την έκφραση της νουκλεοφωσμίνης (siNPM1) siRNA ανοσοκατακρημνίστηκε με αντίσωμα έναντι του HIF-1α (IP:HIF-1α). Για την ανοσοαποτύπωση έγινε επώαση με αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

Συνολικά τα πειράματα της παραγράφου 4.3.2 υποδεικνύουν ότι η νουκλεοφωσμίνη βοηθά στην αναγνώριση των κατάλληλων περιοχών χρωματίνης από τον HIF-1 και είναι απαραίτητη για την ισχυρή δέσμευση του HIF-1 πάνω σε λειτουργικά HRE, έτσι ώστε να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Παράλληλα, όπως δείχθηκε και με τις μελέτες της αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-1α, βρέθηκε ότι πολύ σημαντική για την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τα λειτουργικά HRE και την NPM1 είναι η ενεργότητα των κινασών ERK1/2 που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α.

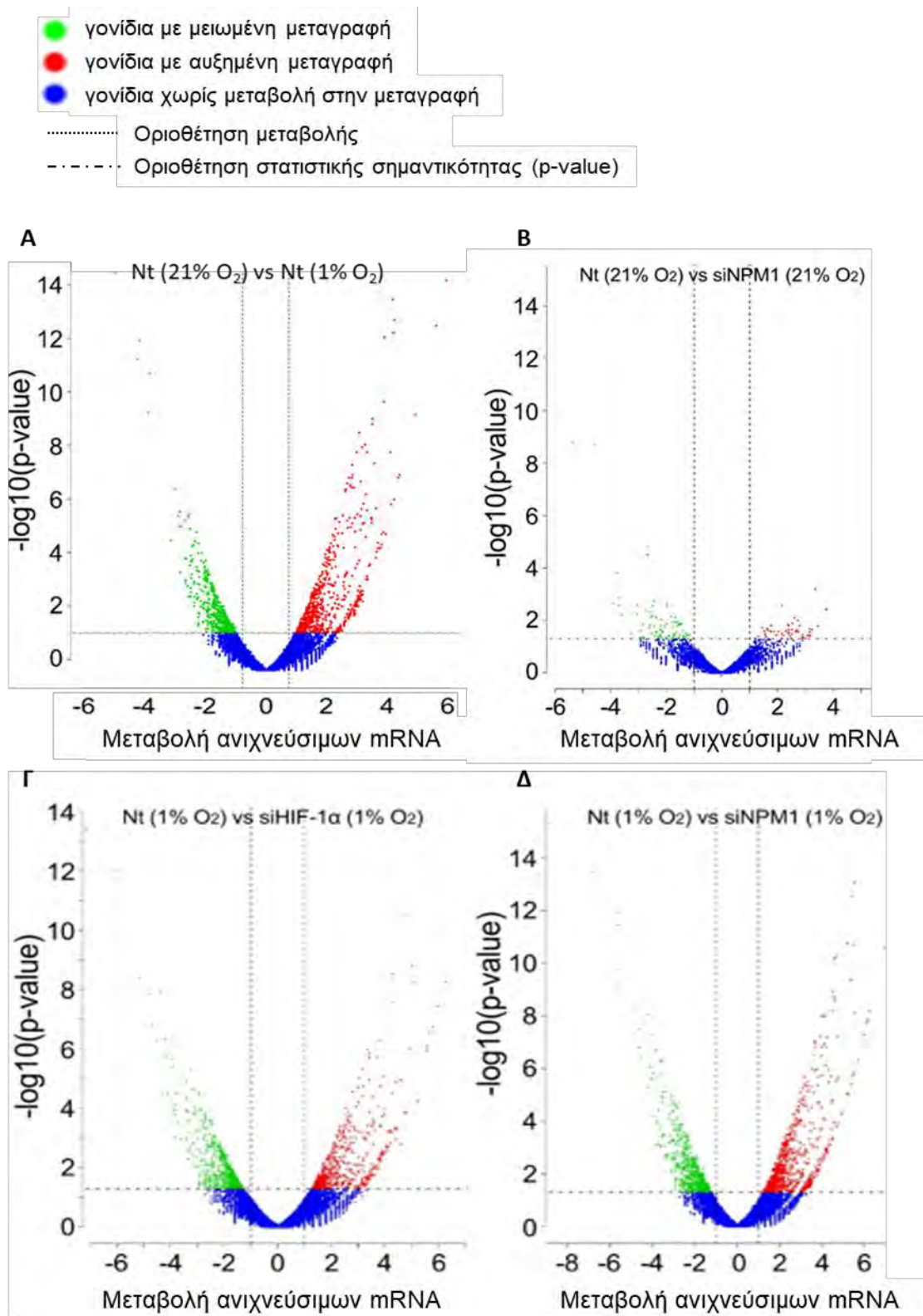
4.3.3 Ο ρόλος της NPM1 στην μεταγραφική απόκριση σε συνθήκες υποξίας

Με σκοπό να μελετηθεί η γενικότερη σημασία της NPM1 στην ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HIF-1, σχεδιάστηκαν πειράματα αλληλούχισης RNA για την μελέτη της επίδρασης των δύο πρωτεϊνών στο σύνολο του υποξικού μεταγραφώματος. Για τον λόγο αυτό κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με siRNA ελέγχου (Nt) ή ειδικό siRNA για την έκφραση του HIF-1α (siHIF-1α) ή της NPM1 (siNPM1) και καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για αλληλούχιση RNA. Η

αλληλούχιση RNA (Quant-seq analysis) έγινε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ” και αναλύθηκε από τον επίκουρο καθηγητή κ. Αντώνη Γιακουντή όπως περιγράφεται στη δημοσίευση του ΥΔ (178).

Από την μελέτη αυτή προέκυψαν πολλαπλά ευρήματα. Αρχικά δείχθηκε ότι κατά την μετάβαση από φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου σε υποξία, όπως φαίνεται στο volcano plot (Εικόνα 34Α), μεταβάλλεται η μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων (ξεπερνούν τα 1000 γονίδια). Ήσσονος σημασίας φαίνεται να είναι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 στην νορμοξία καθώς επηρεάζει μικρό αριθμό γονιδίων (114 γονίδια Εικόνα 34Β). Ορισμένα από τα γονίδια που μεταβάλλεται η έκφραση τους μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες νορμοξίας (35 γονίδια), επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο κατά την μετάβαση από νορμοξία σε υποξία και σχετίζονται με διεργασίες ανοσολογική απόκρισης. Από την άλλη υψηλή ήταν η επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α στην υποξία, καθώς απορυθμίστηκαν 844 γονίδια (Εικόνα 34Γ), με πολλά από αυτά (257 γονίδια) να είναι κοινά με εκείνα που επάγονται κατά την μετάβαση από την νορμοξία στην υποξία (Εικόνα 35Α). Σε αντίθεση με την νορμοξία, παρατηρήθηκε ότι επηρεάζεται η έκφραση σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού γονιδίων όταν γίνεται αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες υποξίας (761 γονίδια, Εικόνα 34Δ).

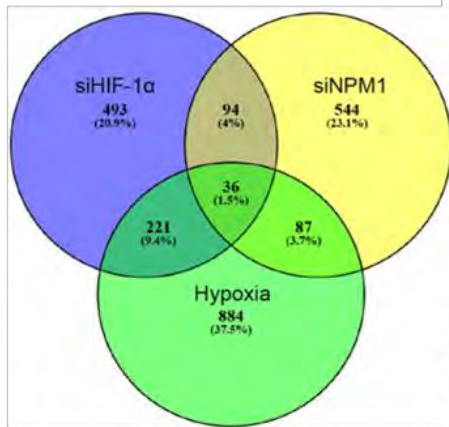
Εκτός από την αναμενόμενη επίδραση της μετάβασης από νορμοξία σε υποξία, αλλά και της αποσιώπησης της έκφρασης του κυριότερου μεταγραφικού παράγοντα της υποξίας, τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν ότι και η NPM1 παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή σε συνθήκες υποξίας. Αν και δεν αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα φαίνεται ότι μπορεί να συμπεριφέρεται ως συμπαράγοντας της μεταγραφής που βοηθά στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.



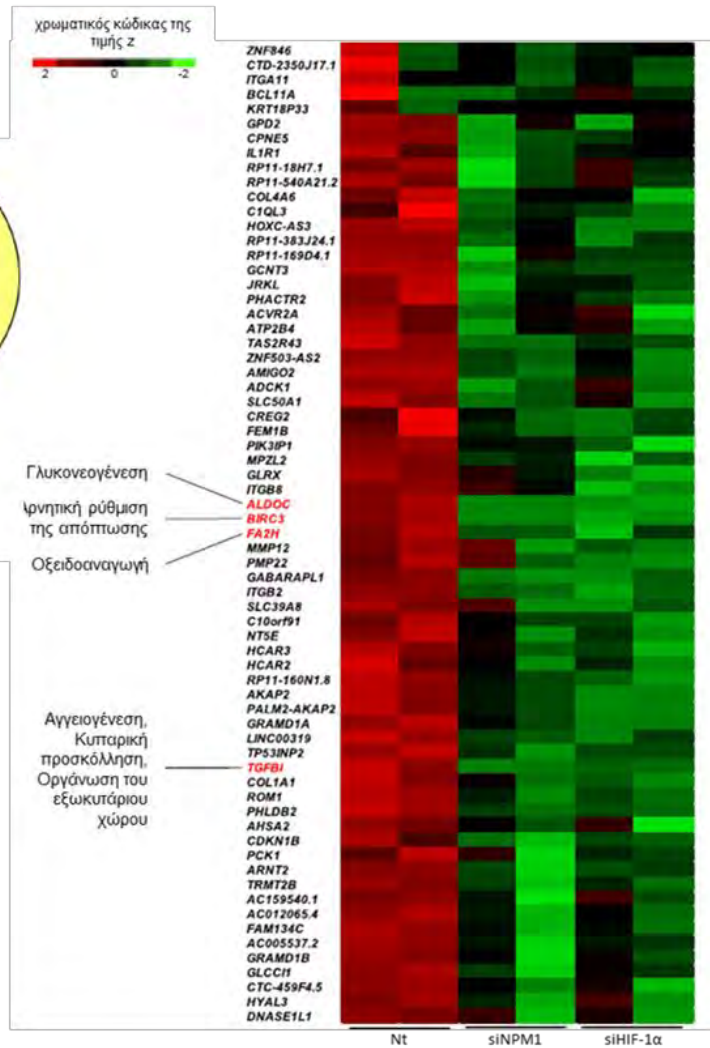
Εικόνα 34 Η αποσιώπηση της έκφρασης είτε του HIF-1α είτε της NPM1 επηρεάζει την μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων σε συνθήκες υποξίας. Ολικό RNA από κύτταρα HeLa καλλιεργημένα σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας μετά από διαμόλυνση με siRNA ελέγχου (Nt) ή siRNA για την έκφραση της NPM1 (siNPM1), χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση μέσω αλληλούχισης (RNA-sequencing). Τα διαγράμματα αναπαριστούν τα γονίδια των οποίων η μεταγραφή μειώνεται (πράσινο) ή αυξάνεται (κόκκινο) κατά την εναλλαγή (A) νορμοξία σε υποξία, (B) νορμοξία και αποσιώπηση της NPM1, (Γ) υποξία και αποσιώπηση του HIF-1α, (Δ) υποξία και αποσιώπηση της NPM1. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Το σημαντικότερο αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης ήταν ότι ένα σύνολο 130 γονιδίων ρυθμίζεται κοινά από τον HIF-1 και την NPM1, και ειδικότερα 67 από αυτά βασίζονται τόσο στον HIF-1 όσο και στην NPM1 για την επαγωγή της έκφρασής τους στην υποξία (Εικόνα 35A). Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται σε διεργασίες χαρακτηριστικές για την ρυθμιζόμενη από τον HIF-1 απόκριση στην υποξία όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, η οργάνωση του εξωκυττάριου χώρου, η οξειδοαναγωγή, η ρύθμιση της αγγειογένεσης, του μεταβολισμού και της απόπτωσης (Εικόνα 35B). Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης RNA, δημιουργήθηκαν cDNA από μια μικρή ποσότητα RNA προερχόμενη από αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση. Στη συνέχεια με χρήση κατάλληλων εκκινητών αναλύθηκε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου η μεταβολή των επιπέδων mRNA 4 γονιδίων που επιλέχθηκαν από την λίστα των 67 γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται θετικά από τον HIF-1 και την NPM1. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες ALDOC, BIRC3, FA2H και TGFBI, που εμπλέκονται στην ρύθμιση της γλυκόλυσης, της απόπτωσης, της οξειδοαναγωγής και των διεργασιών αγγειογένεσης-κυτταρικής προσκόλλησης-οργάνωσης εξωκυττάριου χώρου αντίστοιχα. Πράγματι επαληθεύτηκε ότι τα επίπεδα mRNA των γονιδίων αυτών στην υποξία μειώνονται σημαντικά όταν γίνεται αποσιώπηση της έκφρασης είτε του HIF-1α, είτε της NPM1 (Εικόνα 35Γ). Συνολικά τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων υποστηρίζουν ότι στα υποξικά καρκινικά κύτταρα με ενεργοποιημένες τις ERK1/2, η NPM1 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, σταθεροποιεί την πρόσδεση του HIF-1 σε ενεργά HRE γονιδίων στόχων του και προωθεί την μεταγραφική προσαρμογή.

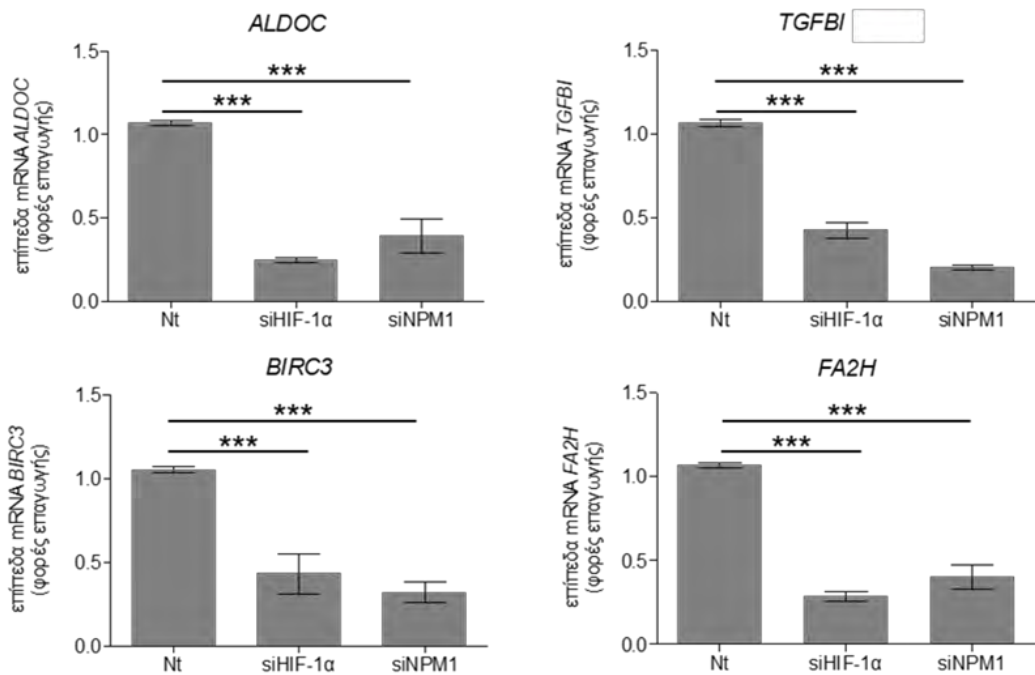
A



B



Γ



*Εικόνα 35 Η μεταγραφή ενός σημαντικού πλήθους γονιδίων επηρεάζεται με τον ίδιο τρόπο από τον HIF-1 και την NPM1 σε συνθήκες υποξίας. (Α) Διάγραμμα Venn που αναπαριστά το πλήθος και την σύγκλιση των γονιδίων που απορρυθμίζονται μετά από αποσιώπηση σε συνθήκες υποξίας είτε του HIF-1α (μπλε) είτε της NPM1 (κίτρινο) καθώς και εκείνα που απορρυθμίζονται από το υποξικό στρες. Η επικάλυψη των τριών συνόλων παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p=1.569E^{-97}$), (Β) Θερμικός χάρτης που αναπαριστά την μείωση στη μεταγραφή 67 κοινά ρυθμιζόμενων γονιδίων από την αποσιώπηση της NPM1 και του HIF-1α, (Γ) Μεταβολή στα επίπεδα mRNA των αναγραφόμενων γονιδίων μετά από αποσιώπηση της έκφρασης είτε του HIF-1α είτε της NPM1 στην υποξία σε σύγκριση με την συνθήκη ελέγχου (Nt). Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, τετραπλών δειγμάτων ($n=8$). (\pm τυπική απόκλιση, ***: $P<0,001$).*

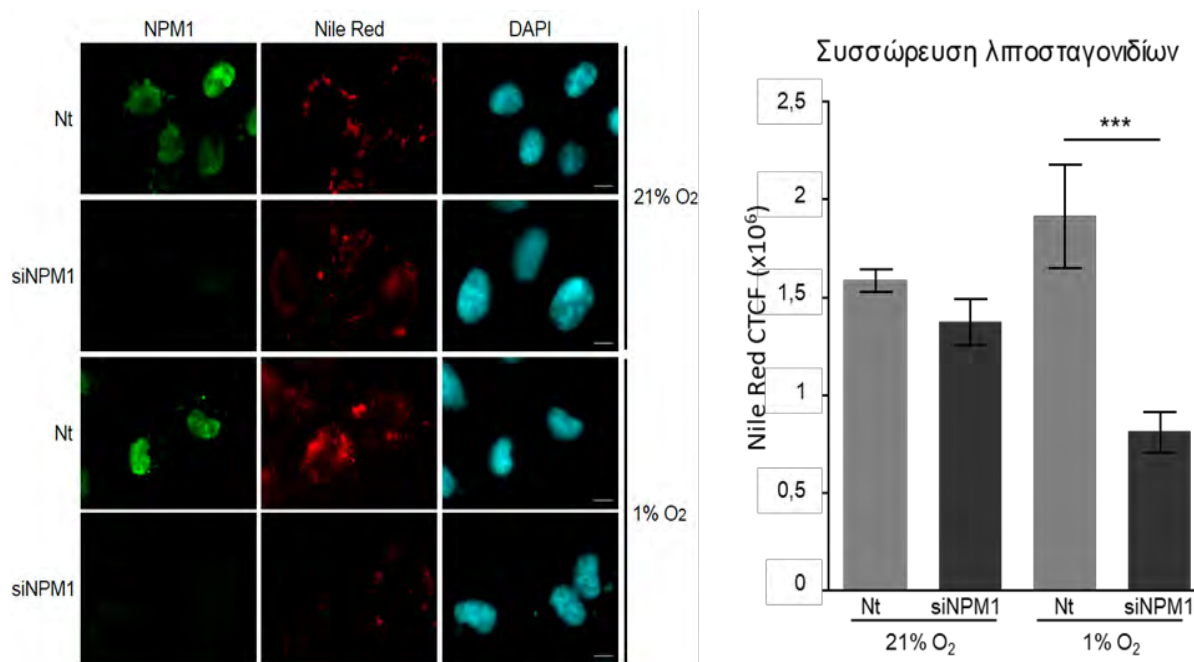
4.4 Ο ρόλος του συμπλόκου HIF-1α/NPM1 στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας

Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου είναι ένα σημαντικό στρες του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο στους συμπαγείς όγκους οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων που προωθούν με διαφορετικούς τρόπους την προσαρμογή και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε εάν η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 που επηρεάζει σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 έχει αντίστοιχες επιπτώσεις στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.

4.4.1 Ο ρόλος της NPM1 στην μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

Σημαντική παράμετρος της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία αποτελεί η μεταβολική προσαρμογή, που περιλαμβάνει και αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Στα υποξικά καρκινικά κύτταρα η παρατηρούμενη αύξηση της εισροής και σύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά και η αναστολή της β-οξειδωσης ενέχουν τον κίνδυνο της λιποτοξικότητας λόγω συσσώρευσης ελεύθερων λιπαρών οξέων. Οι HIF συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του κινδύνου με την επαγωγή της έκφρασης ενζύμων που μετατρέπουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σε τριγλυκερίδια, αλλά και με την επαγωγή δομικών πρωτεϊνών των λιποσταγονιδίων στα οποία αποθηκεύονται τα τριγλυκερίδια (103). Η αυξημένη συσσώρευση λιποσταγονιδίων κατά την μετάβαση από νορμοξία σε υποξία παρατηρήθηκε πειραματικά με χρώση Nile Red (Εικόνα 37, Nt 21% O₂ vs

1% O₂). Αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοφοσμίνης σε καρκινικά κύτταρα HeLa πέρα από την επίδραση που είχε στην δέσμευση του HIF-1α στα HRE των υποκινητών των γονιδίων της Lipin-1 και της AGPAT2 (Εικόνα 32) είχε επίσης ως αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική μειωμένη συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε σύγκριση με την συνθήκη ελέγχου στην υποξία, χωρίς ωστόσο να έχει αντίστοιχη επίδραση στην νορμοξία (Εικόνα 36, 1%O₂ Nt vs siNPM1).

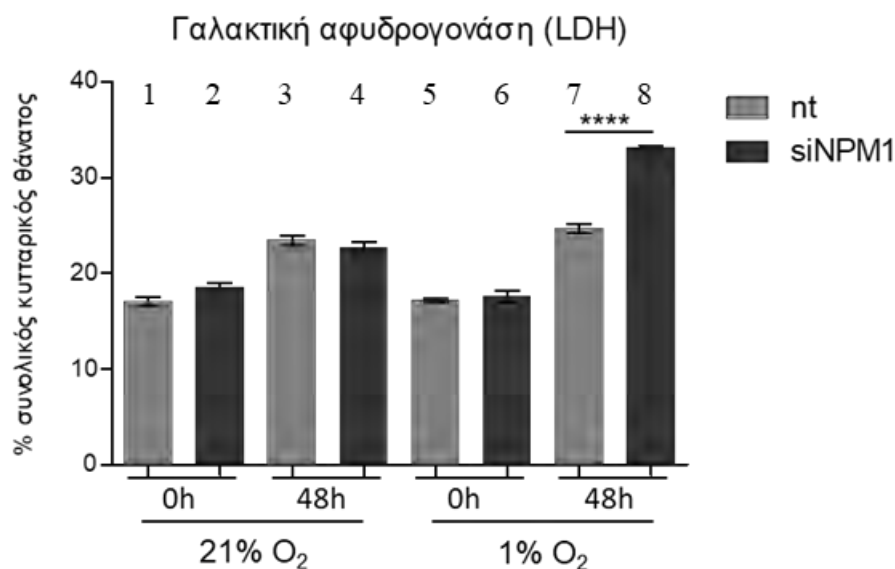


Εικόνα 36 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες υποξίας μειώνει την προσαρμογή του μεταβολισμού των λιπιδίων. (Αριστερά) Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση NPM1 (πράσινο), λιποσταγονιδίων (κόκκινο, Nile Red) και πυρήνων (μπλε, DAPI) κυττάρων HeLa καλλιεργημένων σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας μετά από διαμόλυνση με siRNA ελέγχου (Nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1). (Δεξιά) Διάγραμμα που απεικονίζει τον συνολικό μετρούμενο φθορισμό της χρωστικής Nile Red ως προς το σύνολο των κυττάρων (Corrected Total Cell Fluorescence, CTCF). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 35 μετρούμενων κυττάρων ανά συνθήκη (± τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, ***P<0.001).

4.4.2 Ο ρόλος της NPM1 στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.

Για να εκτιμηθεί ο ρόλος της νουκλεοφοσμίνης στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ελέγχθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της NPM1 στον κυτταρικό θάνατο και στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της κυτταρικής απόπτωσης.

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν διαμολύθηκαν για 24h με non-target (nt) ή ειδικό για την έκφραση την NPM1 παρεμβατικό siRNA (siNPM1) και μετά από αυτό το χρονικό σημείο, που ορίστηκε ως ώρα μηδέν (0h), επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 48h. Έτσι, ο κυτταρικός θάνατος μετρήθηκε, όπως περιγράφεται στη παράγραφο [3.2.28](#), σε δύο χρονικά σημεία (0h και 48h). Στο χρονικό σημείο 0h ο κυτταρικός θάνατος δεν έχει διαφορά μεταξύ συνθήκης ελέγχου και αποσιώπησης της NPM1 (Εικόνα 37, Στήλες 1-2/5-6). Στο χρονικό σημείο 48h παρατηρήθηκε ότι στην νορμοξία η αποσιώπηση της NPM1 δεν είχε κάποια επίδραση στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 37, στήλες 3-4). Ακόμη η υποξία σε συνθήκη ελέγχου δεν επέφερε αυξημένο κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση με την νορμοξία στο ίδιο χρονικό σημείο ελέγχου (Εικόνα 37 στήλες 3 vs 7). Ωστόσο 48h επώαση στην υποξία με αποσιώπηση της NPM1 είχε ως συνέπεια την αύξηση του κυτταρικού θανάτου σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 37, στήλες 7-8).

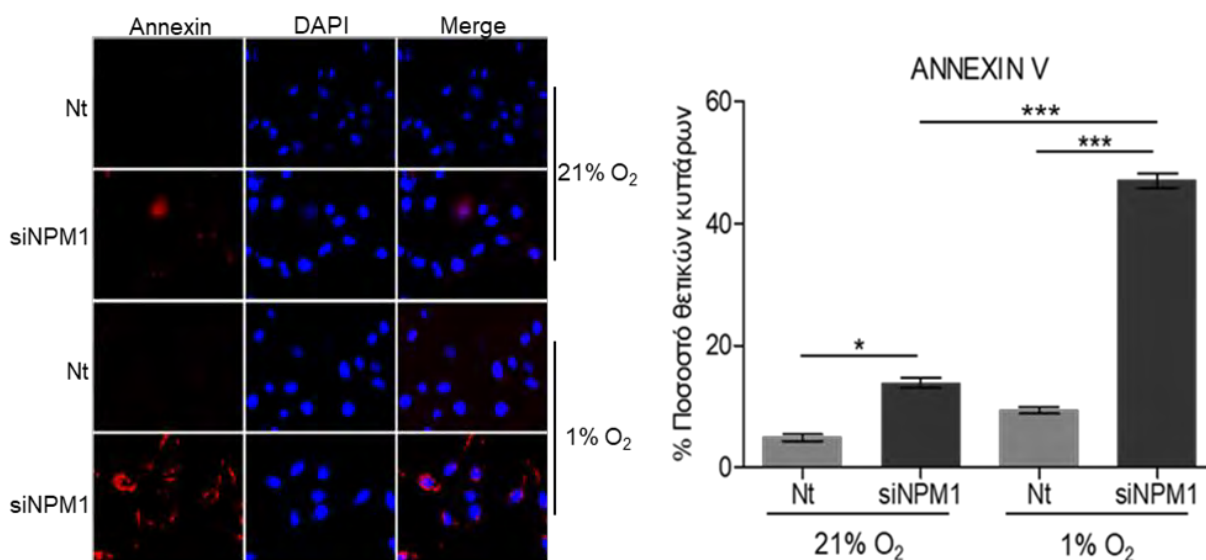


Εικόνα 37 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες υποξίας αυξάνει τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Μέτρηση κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα HeLa που διαμολύθηκαν για 24h με siRNA ελέγχου (nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1) και επώαστηκαν για 48h σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων τετραπλών δειγμάτων ανά συνθήκη (n=8) (±τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, ****P<0.0001).

Για να διερευνηθεί αν ο κυτταρικός θάνατος επήλθε ως συνέπεια ενεργοποίησης του μονοπατιού κυτταρικής απόπτωσης αναλύθηκαν τρεις σημαντικοί αποπτωτικοί δείκτες, ύστερα

από 24h επώαση στην υποξία κυττάρων HeLa που έχουν υποστεί διαμόλυνση για 24h με siRNA ελέγχου (Nt) ή siRNA έναντι της NPM1 (siNPM1). Ως αρχικό στάδιο της απόπτωσης παρατηρήθηκε η απώλεια της ασυμετρίας της πλασματικής μεμβράνης, ως μεταγενέστερο στάδιο η ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης 3 και ως τελικό στάδιο του αποπτωτικού μονοπατιού ανιχνεύθηκε η θραύση του DNA.

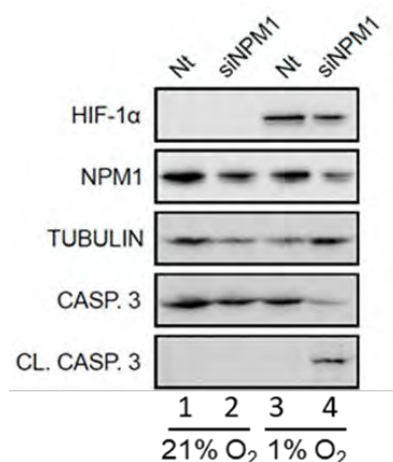
Η απώλεια της ασυμετρίας της πλασματικής μεμβράνης είναι ένα πρώιμο και αντιστρεπτό στάδιο της κυτταρικής απόπτωσης. Ο υπολογισμός της βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της φωσφατιδυλοσερίνης που μετατοπίζεται από την εσωτερική στη εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και εντοπίζεται με χρώση ANNEXIN V. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο [3.2.29](#) παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 είχε ως αποτέλεσμα την σήμανση και τον εντοπισμό φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης σε σημαντικό ποσοστό του συνόλου των κυττάρων σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου στην νορμοξία, αλλά πολύ περισσότερο στην υποξία (Εικόνα 38).



Εικόνα 38 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες υποξίας αυξάνει την απώλεια της ασυμετρίας της πλασματικής μεμβράνης. Η απώλεια της ασυμετρίας της πλασματικής μεμβράνης κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν για 24h με siRNA ελέγχου (Nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1) και επώαση για 24h σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας ανιχνεύθηκε με μικροσκοπία φθορισμού και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. (αριστερά)

Αντιπροσωπευτικό δείγμα της μικροσκοπίας φθορισμού με χρήση ANNEXIN V (κόκκινο) χρώση των πυρηνών με DAPI (μπλε) και επικάλυψη των δύο καναλιών (Merge). (δεξιά) Το διάγραμμα αναπαριστά το % ποσοστό των θετικών σε ANNEXIN-V κυττάρων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που ελέγχθηκαν ανά συνθήκη (n=150)(±τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, *P<0.05, ***P<0.001).

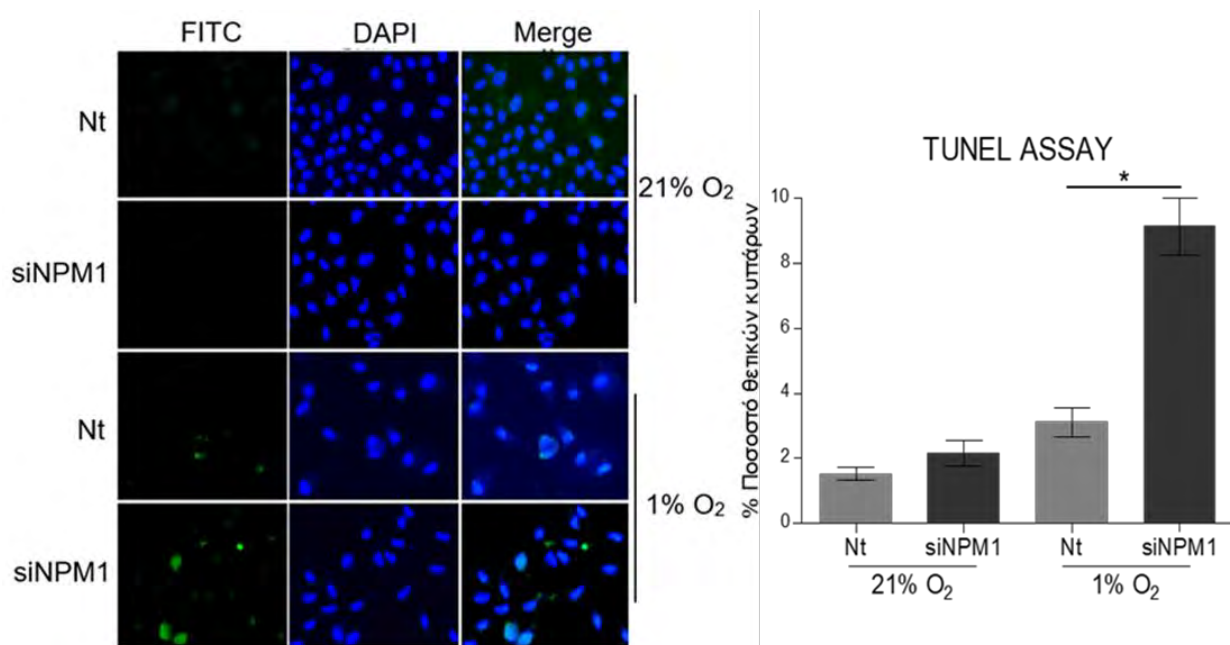
Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της κασπάσης 3 παρατηρήθηκε, μετά από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western, ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 στην υποξία έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 (Εικόνα 39, διαδρομή 4), χωρίς να έχει την ίδια επίδραση σε συνθήκες νορμοξίας (Εικόνα 39, διαδρομή 2). Ο εντοπισμός των ενεργοποιημένων κασπασών δείχνει ότι σημαντικό πλήθος κυττάρων έχει προχωρήσει μη αντιστρεπτά στο μονοπάτι της απόπτωσης.



Εικόνα 39 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες επάγει την εμφάνιση της εκτελεστικής κασπάσης 3. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν για 24h με siRNA ελέγχου (Nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1) και επώστηκαν για 24h σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας αναλύθηκε με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα που στοχεύουν τις αναγραφόμενες πρωτεΐνες.

Περαιτέρω επαλήθευση της απόπτωσης, που πυροδοτείται από την αποσιώπηση της έκφρασης της νουκλεοσομίνης σε συνθήκες υποξίας, επιτεύχθηκε με την μέθοδο TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση θραύσεων στο DNA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.30. Παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένη θραύση του DNA στην υποξία, χωρίς να εντοπίζεται σημαντική επίδραση στην νορμοξία, σε σύγκριση

πάντα με την εκάστοτε συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 40). Σε συνδυασμό με τα προηγούμενα ευρήματα φαίνεται ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω του μονοπατιού της απόπτωσης, μόνο όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου.



Εικόνα 40 Η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 σε συνθήκες υποξίας επάγει την δημιουργία θραύσεων στο DNA. Οι θραύσεις του DNA κυττάρων HeLa που διαμολύνθηκαν για 24h με siRNA ελέγχου (Nt) ή έναντι της NPM1 (siNPM1) και επώαστηκαν για 24h σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας, ανιχνεύθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού και ποσοτικοποιήθηκαν με το λογισμικό ImageJ. (αριστερά) Αντιπροσωπευτικό δείγμα της μικροσκοπίας φθορισμού με χρώση των θραύσεων του DNA (FITC, πράσινο) χρώση των πυρήνων με DAPI (μπλε) και επικάλυψη των δύο καναλιών (Merge). (δεξιά) Το διάγραμμα αναπαριστά το % ποσοστό των θετικών κυττάρων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που ελέγχθηκαν ανά συνθήκη (n=250) (± τυπικό σφάλμα μέτρησης SEM, *P<0.05).

Συγκεντρωτικά, με τα πειράματα των παραγράφων 4.4.1-4.4.2 αποδείχθηκε ότι η νουκλεοσομίνη, σε συνθήκες υποξίας, είναι απαραίτητη για την βέλτιστη μεταβολική προσαρμογή και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, χωρίς ωστόσο να εκδηλώνει αντίστοιχο ρόλο σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Έτσι, σε συνδυασμό με τα πειράματα που έδειξαν την σημασία της NPM1 στον μηχανισμό δράσης του HIF-1, αναδεικνύεται ότι απώλεια της NPM1 αναστέλλει την δράση του HIF-1 και ως συνέπεια αυτού του γεγονότος αναστέλλει και την κυτταρική απόκριση στην υποξία.

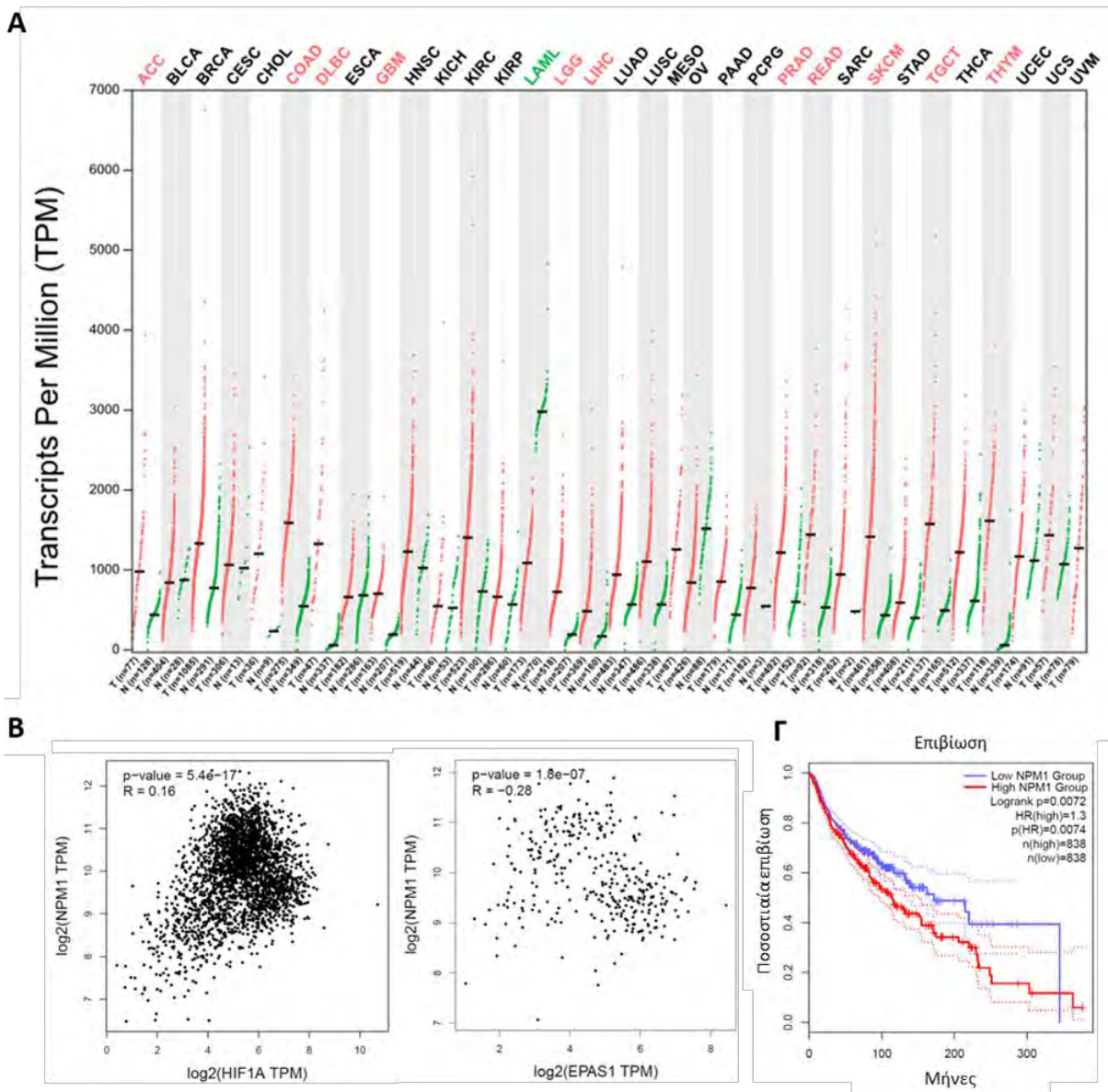
4.4.3 Ο ρόλος της *NPM1* και των γονιδίων που επάγει στην υποξία μαζί με τον HIF-1α, αναλύθηκε σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους.

Στην βιβλιογραφία έχει περιγραφεί η αυξημένη έκφραση της *NPM1* σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους (275). Έτσι, τελικό στόχο της διατριβής αποτέλεσε η ανάλυση, σε δεδομένα καρκινοπαθών, της έκφρασης και του ρόλου της *NPM1* στην ανάπτυξη διαφορετικών καρκινικών τύπων και η συσχέτιση της με την υποξία των όγκων, τον HIF-1α και τα γονίδια που όπως δείχθηκε επάγει από κοινού με τον μεταγραφικό παράγοντα.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιώντας το εργαλείο GEPIA 2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) (300), αναλύθηκαν δεδομένα έκφρασης γονιδίων από τις βάσεις δεδομένων TCGA (The Cancer Genome Atlas) και GTEx (Genotype Tissue Expression). Εξετάζοντας δεδομένα από όλους τους διαθέσιμους καρκινικούς τύπους βρέθηκε ότι σε 11 καρκίνους το γονίδιο *NPM1* παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 41Α). Παράλληλα σε αυτούς του 11 καρκίνους συσχετίζεται θετικά με το γονίδιο *HIF1A* αλλά όχι το *EPAS1* (Εικόνα 41Β), ενώ η αυξημένη έκφραση του έχει αρνητική συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών (Εικόνα 41Γ).

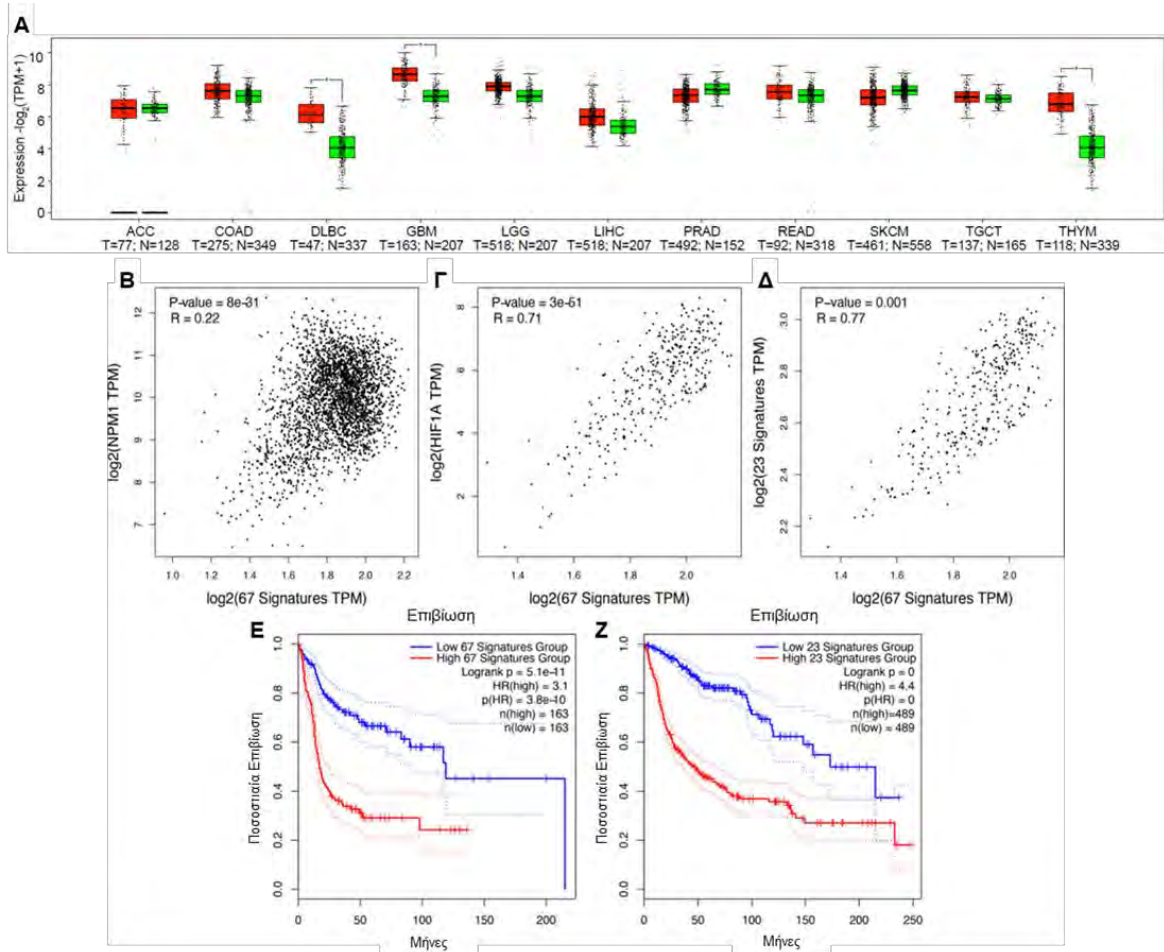
Στην συνέχεια, για να συνδεθούν τα δεδομένα ανάλυσης μεταγραφώματος σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 35) με τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης καρκινοπαθών, μελετήθηκε στους 11 καρκινικούς τύπους που παρουσιάζουν αυξημένη μεταγραφή του *NPM1*, η έκφραση των 67 γονιδίων που επάγονται από τον HIF-1α και την *NPM1*. Βρέθηκε ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε 3 από τους 11 καρκινικούς τύπους και συγκεκριμένα τους DLBCL (Diffuse Large B Cell Lymphoma), GBM (Glioblastoma Multiforme), THYM (Thymoma) (Εικόνα 42Α). Επιπλέον, μετά από ανάλυση βάσεων δεδομένων μεταγραφώματος καρκινικών όγκων επιλέχτηκαν 23 γονίδια που συσχετίζονται εντονότερα με τον HIF-1α και χρησιμοποιήθηκαν ως «υποξική υπογραφή». Με βάση αυτήν, 5 από τους 11 καρκίνους που υπερεκφράζουν την *NPM1* χαρακτηρίστηκαν ως υποξικοί και 3

από τους 5 ήταν οι ίδιοι (DLBCL, GBM, THYM) με αυτούς που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των 67 κοινά ρυθμιζόμενων γονιδίων. Στους 3 αυτούς καρκινικούς τύπους η έκφραση των 67 κοινά ρυθμιζόμενων γονιδίων συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των NPM1, HIF-1α αλλά και των 23 γονιδίων υποξικής υπογραφής (Εικόνα 42 Β-Δ). Εν τέλει, η αυξημένη έκφραση, τόσο των 23 γονιδίων υποξικής υπογραφής όσο και των 67 κοινά επαγόμενων από NPM1 και HIF-1α γονιδίων, συσχετίστηκε αρνητικά με την επιβίωση των ασθενών (Εικόνα 42 Ε-Ζ).



Εικόνα 41 Η έκφραση του γονιδίου NPM1 παρουσιάζεται αυξημένη σε 11 διαφορετικούς καρκινικούς τύπους σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Της της καρκινικούς τύπους συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του γονιδίου HIF1A και αρνητικά με την επιβίωση των ασθενών. (Α) Γράφημα κουκίδων που αναπαριστά την έκφραση του γονιδίου NPM1 σε όλους της διαφορετικούς καρκινικούς τύπους (κόκκινες κουκίδες), με δημόσια διαθέσιμα δεδομένα που αντλήθηκαν από το TCGA, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό (πράσινες κουκίδες). Κάθε κουκίδα εκπροσωπεί την έκφραση του NPM1 σε διαφορετικό ασθενή. Τα αρχικά των καρκινικών τύπων φαίνονται πάνω από το διάγραμμα, με μαύρο χρώμα όταν δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού, με κόκκινο χρώμα όταν στον καρκινικό ιστό παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση και με πράσινο όταν παρατηρείται μειωμένη έκφραση. (Β) Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της NPM1 και της έκφρασης είτε του HIF1A (αριστερά) είτε του EPAS1 (δεξιά) γονιδίου στο σύνολο των 11 καρκινικών τύπων με αυξημένη έκφραση NPM1 (Γ) Kaplan–Meier διάγραμμα επιβίωσης ασθενών για το σύνολο των 11 καρκινικών τύπων με αυξημένη έκφραση NPM1 και διαχωρισμός των περιπτώσεων χαμηλής έκφρασης NPM1 (μπλε) και υψηλής έκφρασης NPM1 (κόκκινο

Συνοπτικά, βρέθηκε ότι η μεταγραφή του *NPM1* επάγεται σε διαφορετικούς όγκους και σε ορισμένους από της, που χαρακτηρίζονται ως υποξικοί, συσχετίζεται με την έκφραση του *HIF1A* και των 67 γονιδίων που επάγονται από την συνέργεια HIF-1α και *NPM1* σε συνθήκες υποξίας. Μάλιστα, η από κοινού αυξημένη έκφραση των παραπάνω γονιδίων συσχετίζεται με μειωμένη επιβίωση των καρκινοπαθών. Συμπερασματικά, της παρατηρήθηκε και για καρκινικά κύτταρα καλλιέργειας, επαληθεύτηκε και σε δεδομένα καρκινοπαθών ότι η *NPM1*, σε συνέργεια με τον HIF-1, συνεισφέρει στην προσαρμογή των καρκινικών όγκων στο υποξικό μικροπεριβάλλον.



Εικόνα 42 Η από κοινού αυξημένη έκφραση σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, του *NPM1* και των 67 γονιδίων που επάγονται σε συνθήκες υποξίας από HIF-1α και *NPM1* συσχετίστηκε με την υποξία των όγκων και την μειωμένη επιβίωση των καρκινοπαθών. **(Α)** Ιστογράμματα που συγκρίνουν την έκφραση των 67 επαγόμενων σε συνθήκες υποξίας γονιδίων, από τον HIF-1α και την *NPM1* (Εικόνα 35B), μεταξύ των 11 καρκινικών τύπων που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφής του *NPM1* (κόκκινο) και των αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών (πράσινο) (*P<0.05) **(B-Δ)** Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων *NPM1* (Δ), του *HIF1A* ΤΗΣ ή των 23 γονιδίων υποξικής υπογραφής (Ζ) και της έκφρασης των 67 επαγόμενων από τον HIF-1 και την *NPM1* γονιδίων στην υποξία, στο σύνολο των δειγμάτων που προέρχονται από τρεις καρκινικούς τύπους (DLBC, GBM and THYM). **(Ε, Ζ)** Kaplan–Meier διάγραμμα επιβίωσης για ασθενείς με καρκίνο που αντιστοιχεί σε έναν από της τρεις τύπους (DLBC, GBM and THYM) σε συσχέτιση με την χαμηλή (μπλε) ή υψηλή (κόκκινο) έκφραση είτε των 67 κοινά αυτορρυθμιζόμενων γονιδίων (Ε) είτε των 23 γονιδίων υποξικής υπογραφής (Ζ). Η μη παραμετρική συσχέτιση Spearman στα Β, Γ, Δ και η ανάλυση της επιβίωσης στα διαγράμματα Ε, Ζ έγινε με την χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας GEPIA2 (300). Οι συνεχείς μπλε και κόκκινες γραμμές στα διαγράμματα Ε, Ζ αναπαριστούν την μέση τιμή ενώ οι διακεκομμένες την διακύμανση.

Κεφάλαιο 5 Συζήτηση

Η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου που αναφέρεται ως υποξία αποτελεί έναν από της σημαντικότερους παράγοντες στρες που χαρακτηρίζουν το μικροπεριβάλλον των συμπαγών όγκων. Στο πλαίσιο του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος η υποξία προκαλείται από την αδυναμία των αγγείων να προσεγγίσουν τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, αλλά και από την χαοτική αγγειογένεση των στερεών όγκων (14). Η υποξία συναντάται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, ωστόσο η εγκαθίδρυση της υποξίας ως χαρακτηριστικό των όγκων που συμβάλλει στην καρκινογένεση και την μετάσταση, καθιστούν την μελέτη της αναπόσπαστο κομμάτι της αντικαρκινικής έρευνας. Η απόκριση στην υποξία περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία οι οποίες κατά κύριο λόγο στηρίζονται στην ρύθμιση της μεταγραφής από μια οικογένεια ενεργοποιητών της μεταγραφής που επάγονται από την υποξία, οι οποίοι είναι γνωστοί ως HIFs (Hypoxia Inducible Factors) (24). Έτσι, η στόχευση της αντικαρκινικής έρευνας στην υποξία αφορά σε μεγάλο βαθμό την παρέμβαση στην έκφραση και δράση των HIFs (304). Στην βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών που αφορά την ρύθμιση της HIF-α υπομονάδας και ιδίως της εκφραζόμενης στο σύνολο σχεδόν των ιστών HIF-1α ισομορφής. Ο HIF-1α ρυθμίζεται κατά βάση από το οξυγόνο, ωστόσο υπάρχουν πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν την πρωτεΐνη ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα οξυγόνου (124).

Η παρούσα διατριβή εμβαθύνει στην σημασία της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 και αποτελεί τμήμα της επί σειράς ετών μελέτης της συγκεκριμένης ρύθμισης από το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έπειτα από την παρατήρηση της η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 προάγει την δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα επάγοντας την συσσώρευση του στον πυρήνα (54), η επικράτεια που φέρει την θέση φωσφορυλίωσης και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού ορίστηκε ως ETD (ERK Target Domain) (55). Μάλιστα, δείχτηκε ότι αναστολή της φωσφορυλίωσης της ETD και

της πυρηνικής συσσώρευσης του HIF-1α έχει αρνητικές επιπτώσεις στις επαγόμενες από τον HIF-1 διεργασίες προσαρμογής του μεταβολισμού των λιπιδίων (100) και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (177). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση της ETD όχι μόνο αυξάνει την πυρηνική συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα αλλά επιπλέον μειώνει την κινητικότητα του εντός του πυρήνα (178). Το συγκεκριμένο εύρημα οδήγησε στην υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση της ETD από τις ERK1/2 προωθεί πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α εντός του πυρήνα. Πράγματι, με πειράματα συγκατακρήμνισης, βρέθηκε ότι η επικράτεια ETD αλληλεπιδρά ισχυρά με την πρωτεΐνη νουκλεοφοσμίνη NPM1 όταν περιέχει μετάλλαξη που μιμείται την φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 στην σερίνη 641 (HIF-1α ETD SE).

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των HIF-1α και NPM1, η εξάρτηση της από τις ERK1/2 και η σημασία της για την δράση του HIF-1 και την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Τα αποτελέσματα της διατριβής ανέδειξαν την άγνωστη μέχρι τώρα εμπλοκή της NPM1 στον μηχανισμό δράσης του HIF-1. Προτείνεται ότι η NPM1 συνδέεται με την χρωματίνη στις περιοχές ενεργών HRE γονιδίων στόχων του HIF-1 και σε συνθήκες υποξίας βοηθάει ενεργοποίηση των υποκινητών από το ετεροδιμερές HIF-1 αλληλεπιδρώντας άμεσα με τον φωσφορυλιωμένο από τις ERK1/2 HIF-1α. Μέσω αυτού του μηχανισμού η NPM1 συνεισφέρει στην μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων από τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Εν τέλει αναδεικνύεται η σημασία αυτού του μηχανισμού για την προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία. Τα συμπεράσματα αυτά βασίστηκαν σε μια σειρά πειραμάτων, τα οποία έδειξαν ότι :

α. η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και NPM1 είναι άμεση καθώς διαμεσολαβείται από την καρβοξυτελική αρωματική επικράτεια της NPM1 και την ETD επικράτεια του HIF-1α, ενώ ενισχύεται σημαντικά όταν η ETD μπορεί να φωσφορυλιωθεί τις ERK1/2 ή φέρει μετάλλαξη που μιμείται την φωσφορυλίωση.

β. η αλληλεπίδραση συμβαίνει τόσο *in vitro* όσο και εντός των πυρήνων υποξικών κυττάρων, όπου αφορά ειδικά τον HIF-1α και όχι τον HIF-2α, ενώ εννοείται όταν ο HIF-1α συμμετέχει ως ετεροδιμερές HIF-1.

γ. η NPM1 δεσμεύεται σε στοιχεία χρωματίνης που περιέχουν λειτουργικά HRE και η παρουσία της εκεί είναι απαραίτητη για την ισχυρή αλληλεπίδραση του φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α με τα ίδια στοιχεία χρωματίνης.

δ. η συνύπαρξη και αλληλεπίδραση μεταξύ NPM1 και HIF-1α είναι απαραίτητη για την μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων σε συνθήκες υποξίας.

ε. η NPM1, μέσω της συνεισφοράς της στην δράση του HIF-1, είναι απαραίτητη για διεργασίες κυτταρικής απόκρισης στην υποξία όπως η προσαρμογή του μεταβολισμού και η αποφυγή της απόπτωσης.

ζ. η συγχρόνως αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για την NPM1 και τον HIF1-α, αλλά και των γονιδίων που από κοινού επάγουν στην υποξία, παρατηρήθηκε σε δεδομένα καρκινοπαθών με 3 διαφορετικούς καρκινικούς τύπους και συσχετίστηκε με την υποξία των όγκων και την μειωμένη επιβίωση των ασθενών.

Η νουκλεοφωσφίνη (NPM1) είναι μια πρωτεΐνη του πυρήνισκου που έχει την δυνατότητα να εντοπίζεται και στα υπόλοιπα υποκυτταρικά διαμερίσματα και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες μέσω οριοθετημένων δομικά επικρατειών, οι οποίες μπορεί να παρουσιάζουν συνεργική λειτουργικότητα (228). Η επικράτεια που συμμετέχει στην άμεση αλληλεπίδραση με τον HIF-1α αφορά το καρβοξυτελικό άκρο της NPM1 που είναι συντηρημένο μόνο στην ισομορφή 1 (NPM1.1). Έχει προταθεί ότι η NPM1 μπορεί να ρυθμίζεται από τον σχηματισμό ετερογενών ολιγομερών με τις συγγενικές NPM2 και NPM3 της οικογένειας των νουκλεοπλάσμιων λόγω υψηλής συγγένειας των αμινοτελικών τους επικρατειών (305-307) ενώ πολύ πιθανό το ίδιο να ισχύει και για το συχνό παράγωγο

εναλλακτικού ματίσματος NPM1.3 που φέρει απaráλλακτη την αλληλουχία της NPM1 με μόνη απουσία την καρβοξυτελική αρωματική επικράτεια που διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση με τον HIF-1α. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ρυθμίζεται και η συγγένεια αλληλεπίδρασης των ολιγομερών NPM1 με τον HIF-1α.

Η κύρια λειτουργία της καρβοξυτελικής αρωματικής επικράτειας είναι η συσσώρευση της NPM1 στον πυρηνίσκο καθώς περιέχει το αντίστοιχο σήμα εντοπισμού (217). Μάλιστα μεταλλάξεις που καταστρέφουν την δομή του καρβοξυτελικού άκρου έχουν ως αποτέλεσμα τον διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό της NPM1 που αποτελεί χαρακτηριστικό αρκετών λευχαιμιών και πάνω από το 30% των περιπτώσεων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML), γεγονός που οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να κατηγοριοποιήσει την NPM1 ως σημαντικό παράγοντα της AML (308). Ωστόσο, η αρωματική καρβοξυτελική επικράτεια της NPM1 φαίνεται ότι είναι σημαντική και για δράσεις της NPM1 εκτός πυρηνίσκων. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι είναι απαραίτητη για την δέσμευση από την NPM1 του υποκινητή του γονιδίου PD-L1 που συμβάλλει στην μεταγραφική ενεργοποίηση του τελευταίου (274), ενώ παρόμοια δράση της NPM1 έχει προταθεί για τα γονίδια SOD2 και c-MYC (234) (232, 233). Εξάλλου η σύνδεση της NPM1 με την μεταγραφή έχει προταθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες έδειξαν ότι η δράση της NPM1 ως μοριακή συνοδός των ιστονών και μέλος του μηχανισμού ανασυνδυασμού της χρωματίνης εκδηλώνεται συνεργικά από την αμινοτελική επικράτεια ολιγομερισμού και την όξινη κεντρική επικράτεια, ενώ ενισχύεται από την πολλαπλή ακετυλίωση της NPM1 και των ιστονών από την p300 και συμβάλλει στην δράση της RNA πολυμεράσης II (212, 267). Πιο πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η NPM1 εμπλέκεται στην μεταγραφή σε συνθήκες φλεγμονής, επάγοντας την έκφραση και δράση των μεταγραφικών παραγόντων IRF-1 και STAT-1 (272), ενώ βρέθηκε ότι μέσω της βασικής επικράτειας του καρβοξυτελικού της άκρου αλληλεπιδρά με τον NF-κB και συνεισφέρει στην αποδοτική του δέσμευση πάνω στα στοιχεία απόκρισης υποκινητών των γονιδίων που ελέγχει (273).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής εμπλουτίζουν την βιβλιογραφία που αφορά την εμπλοκή της NPM1 στην ρύθμιση της μεταγραφής καθώς δείχθηκε ότι η νουκλεοφωσμίνη αποτελεί σημαντικό συμπαράγοντα για την δράση του HIF-1 και την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού γονιδίων ως απόκριση στην υποξία. Από την άλλη σε συνθήκες νορμοξίας η NPM1 δεν συμμετέχει στην μεταγραφή των ίδιων γονιδίων αλλά συνδέεται με γονίδια στόχους μεταγραφικών παραγόντων που συμβάλλουν στην απόκριση στην φλεγμονή, όπως του NF-κΒ. Τα παραπάνω δημιουργούν μια εικόνα που περιγράφει την εμπλοκή της NPM1 στην μεταγραφή όχι ως ενεργοποιητή γονιδίων αλλά ως συμπαράγοντα συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Άλλωστε έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες στρες του πυρηνίσκου η NPM1 μετατοπίζεται από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα (253) και δεν είναι απίθανο η μετατόπιση αυτή να σχετίζεται και με την συμμετοχή της στην απόκριση στο στρες μέσω της μεταγραφής. Κοινό χαρακτηριστικό της δράσης των διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων που δρουν σε συνθήκες στρες είναι η δέσμευση τους σε στοιχεία ανοιχτής μεταγραφικά χρωματίνης, που χαρακτηρίζεται από την προεγκατεστημένη RNApol II. Η παρατήρηση ότι η νουκλεοφωσμίνη βρίσκεται τόσο σε νορμοξία όσο και υποξία συνδεδεμένη σε λειτουργικά HRE γονιδίων στόχων του HIF-1 αλλά όχι σε μη λειτουργικά HRE υποδεικνύει έναν ρόλο της NPM1 στην σήμανση των υποκινητών γονιδίων στόχων που είναι κατάλληλοι για πρόσδεση από τον HIF-1. Ένας τέτοιος ρόλος της NPM1 είναι συμβατός με την επικρατούσα την τελευταία δεκαετία άποψη ότι η δράση του HIF-1 προϋποθέτει προσβάσιμες θέσεις δέσμευσης σε περιοχές ενεργής μεταγραφικά χρωματίνης (65), όπου η RNA-pol II βρίσκεται ήδη δεσμευμένη και σε κατάσταση παύσης, ενώ η δέσμευση του HIF-1 σε αλληλεπίδραση με την κινάση CDK8, μέλος του συμπλόκου Mediator, και το σύμπλοκο επιμήκυνσης της μεταγραφής SEC (Super Elongation Complex) πυροδοτεί την μετάβαση της RNA-pol II στο στάδιο επιμήκυνσης της μεταγραφής (66-69).

Από την άλλη, η NPM1 στους πυρηνίσκους εντοπίζεται ως λειτουργικό πενταμερές και δεκαμερές, σε έναν αντιστρεπτό ολιγομερισμό που ρυθμίζεται από την φωσφορυλίωση (223), πραγματοποιείται από την αμινοτελική επικράτεια της NPM1 και έχει την δυνατότητα εκτέλεσης δυναμικών εμπυρηνώσεων, που χαρακτηρίζονται ως διαχωρισμός υγρής-υγρής φάσης (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS). Με τον μηχανισμό αυτό η NPM1 στους πυρηνίσκους ρυθμίζει την συσσώρευση πρωτεϊνών που σχετίζονται κυρίως με την βιογένεση των ριβοσωμάτων αλλά έχει επίσης εμπλακεί και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (236). Αν και το αμινοτελικό άκρο της NPM1 δεν είναι απαραίτητο για την *in vitro* αλληλεπίδραση με τον HIF-1α είναι αρκετά πιθανό να παίζει αντίστοιχο ρόλο για την συσσώρευση συμπαραγόντων της μεταγραφής στις κατάλληλες χρωματινικές περιοχές. Με αυτή την υπόθεση συναινεί η αλληλεπίδραση της NPM1 με τις ιστόνες ως λειτουργικό δεκαμερές, ο σχηματισμός του οποίου προϋποθέτει την ικανότητα δυναμικού ολιγομερισμού της NPM1 μέσω της αμινοτελικής της επικράτειας (267). Υποθετικά η δυναμική φύση του ολιγομερούς NPM1 μπορεί να βοηθά στην συσσώρευση πρωτεϊνικών συμπλόκων που συνεισφέρουν στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και την αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων με την χρωματίνη και την RNA πολυμεράση II. Έχει άλλωστε προταθεί ότι η RNA πολυμεράση II μαζί με τον Μεσολαβητή (Mediator), σημαντικό μέλος του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης, συμμετέχουν σε φαινόμενα διαχωρισμού φάσης που συμπυκνώνουν και αποσυμπυκνώνουν μόρια της μεταγραφικής μηχανής ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση γονιδίων (309). Ένας τόσο σημαντικός ρόλος της NPM1 στην ρύθμιση της μεταγραφής θα μπορούσε να εξηγήσει και το μεγάλο πλήθος των γονιδίων που βρέθηκαν να απορρυθμίζονται μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 στην υποξία.

Η παρούσα μελέτη προσφέρει σημαντικά δεδομένα για τον μηχανισμό ρύθμισης και δράσης του HIF-1 και αποτελεί ένα νέο στοιχείο που τον διαφοροποιεί από την δράση του HIF-2, καθώς δείχθηκε απουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ NPM1 και HIF-2α. Αυτό το αποτέλεσμα

ήταν αναμενόμενο διότι στον HIF-2α δεν είναι συντηρημένη η επικράτεια ETD που βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την NPM1. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί στην βιβλιογραφία ότι HIF-1α και HIF-2α αναγνωρίζουν τα ίδια μοτίβα στα HRE που δεσμεύουν, ωστόσο ενεργοποιούν διαφορετικά γονίδια (65, 310, 311). Είναι πιθανό για αυτήν την διαφοροποίηση να είναι εν μέρει υπεύθυνη η NPM1 προσελκύοντας τον HIF-1α στα HRE όπου βρίσκεται δεσμευμένη. Η διαφοροποίηση τόσο της ρύθμισης όσο και της μεταγραφικής στόχευσης των HIF-1 και HIF-2 στο υποξικό καρκινικό μικροπεριβάλλον απασχολεί αρκετά ερευνητικά εργαστήρια του πεδίου και η διαλεύκανση της αναμένεται να βελτιώσει τις προσπάθειες στόχευσης τους κατά την αντικαρκινική θεραπεία (312, 313).

Στοχευμένη αναστολή της αλληλεπίδρασης NPM1/HIF-1α αναμένεται να έχει σημαντικά αρνητικό αντίκτυπο στην δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων για προσαρμογή και επιβίωση στην υποξία και την ανθεκτικότητα τους σε θεραπείες. Αυτό υποδεικνύουν πειράματα που έδειξαν ότι η NPM1 ιδίως σε συνθήκες υποξίας έχει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της NPM1 αφενός αναστέλλει την επαγόμενη από τον HIF-1 προσαρμογή του μεταβολισμού των λιπιδίων και αφετέρου οδηγεί σε αύξηση της κυτταρικής απόπτωσης σε συνθήκες υποξίας. Η αναγκαιότητα της συσσώρευσης των μη μεταβολιζόμενων στην υποξία ελεύθερων λιπαρών οξέων σε λιποσταγονίδια ώστε να αποφευχθεί η λιποτοξικότητα, αλλά και ο ρόλος του HIF-1 στην ενεργοποίηση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού μηχανισμού έχουν αναδειχθεί εκτενώς στην βιβλιογραφία (103, 314). Μάλιστα τα δεδομένα της αλληλούχισης RNA έδειξαν ότι HIF-1 και NPM1 σε συνθήκες υποξίας ρυθμίζουν από κοινού γονίδια που σχετίζονται με την αποφυγή της απόπτωσης, όπως είναι το γονίδιο BIRC3 (195), η έκφραση του οποίου εξετάστηκε και με ειδικούς εκκινητές. Το γεγονός ότι ο ισχυρός κυτταροπροστατευτικός ρόλος της NPM1 αναδείχθηκε μόνο σε συνθήκες υποξίας υποδεικνύει ότι η συνεισφορά της έγκειται στην προώθηση της δράσης του HIF-1 και όχι σε κάποια σταθερή αντιαποπτωτική δράση. Σε

συμφωνία βρίσκονται βιβλιογραφικά δεδομένα που έδειξαν ότι απώλεια της έκφρασης της NPM1 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος δεν προκάλεσε από μόνη της κυτταρικό θάνατο αλλά στρες των πυρηνίσκων που έκανε τα κύτταρα περισσότερο ευάλωτα σε θεραπεία (315). Από την άλλη τόσο ο HIF-1 όσο και η NPM1 έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη των όγκων (275, 316). Ωστόσο αναδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις δύο πρωτεΐνες μπορεί να παρουσιάζει θετική μεταξύ τους συσχέτιση σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους και ταυτόχρονα να συσχετιστεί αρνητικά με την επιβίωση των ασθενών. Μάλιστα σε ορισμένους από αυτούς τους καρκινικούς τύπους παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων που βρέθηκε ότι επάγονται σε συνθήκες υποξίας από την κοινή παρουσία του HIF-1α και της NPM1. Σε αυτές τις περιπτώσεις η έκφραση των γονιδίων συσχετίστηκε θετικά με δείκτες υποξίας των όγκων και αρνητικά με την επιβίωση των ασθενών.

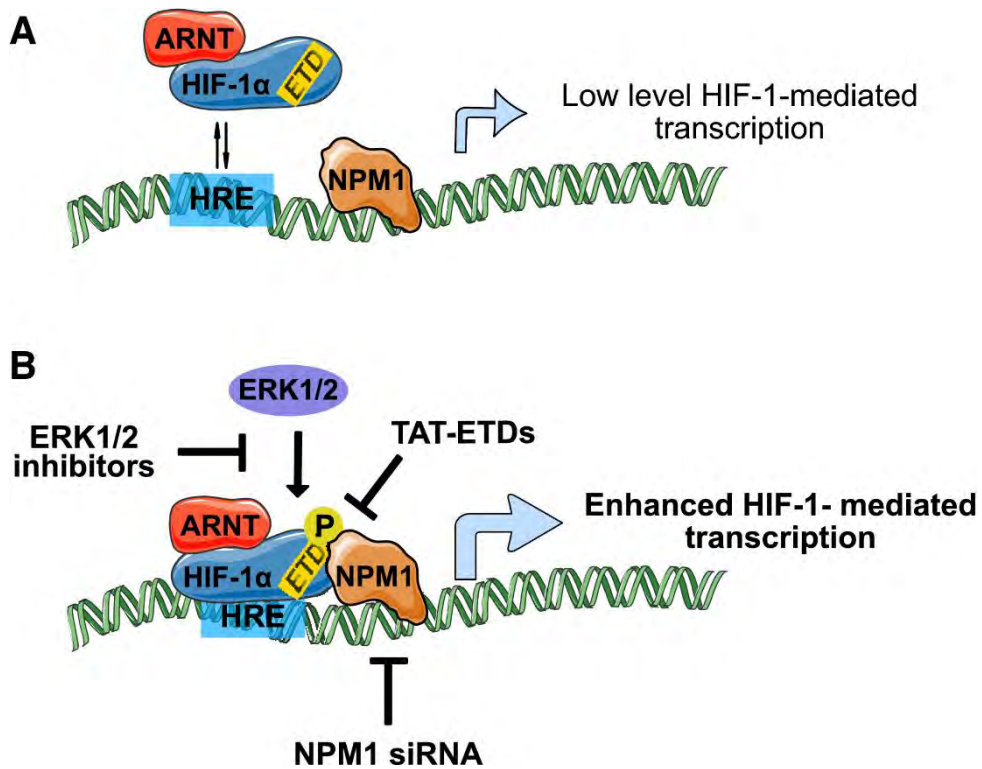
Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η στόχευση της αλληλεπίδρασης NPM1/HIF-1α μπορεί, σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους, να είναι κομβικής σημασίας. Από την άλλη η ανάδειξη των ERK1/2 ως ρυθμιστή της αλληλεπίδρασης HIF-1α/NPM1 εμπλουτίζει περαιτέρω το ευρύ φάσμα της ρυθμιστικής σηματοδότησης των κινασών MAPK και σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αποτελέσματα της διατριβής εμπλέκουν τις ERK1/2 στην προώθηση της προσαρμοστικότητας και επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Είναι πιθανό ότι στους συμπαγείς όγκους η αλληλεπίδραση NPM1/HIF-1α να αποτελεί συχνό φαινόμενο καθώς οι ERK1/2 και το μονοπάτι των MAPK είναι συνήθως σε ενεργή κατάσταση η οποία προωθείται από εξωκυττάρια σήματα, από μεταλλάξεις αλλά και από την υποξία (317). Ταυτόχρονα, η ανάδειξη της σημασίας της φωσφορυλίωσης της ETD επικράτειας του HIF-1α από τις ERK1/2, για την ρύθμιση της αλληλεπίδρασης του με την NPM1, προσφέρει έναν σημαντικό στόχο για μελλοντική ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Σε συμφωνία με αυτήν την πρόταση, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου δείχθηκε ότι όταν εισέρχονται σε υποξικά καρκινικά

κύτταρα κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια που περιέχουν την επικράτεια ETD μειώνουν την ενεργότητα του ενδογενή HIF-1α και αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο(177). Στα πλαίσια της δημοσίευσης της παρούσας ερευνητικής μελέτης (178), σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Αγγελική Καραγιώτα, τα ίδια πεπτίδια ETD εισήχθησαν σε καλλιεργούμενα καρκινικά κύτταρα και όταν έφεραν την φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641Glu (SE) δέσμευσαν την ενδογενή NPM1 και μείωσαν σε σημαντικό βαθμό την αλληλεπίδραση της με τον HIF-1α. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων, μπορούν να αποτελέσουν την βάση για εξέλιξη της έρευνας σε επίπεδο πειραματόζωων και φαρμακευτικής ανάπτυξης.

Κεφάλαιο 6 Σύνοψη

Τα αποτελέσματα της διατριβής μπορούν να συνοψιστούν στο παρακάτω μοντέλο. Η νουκλεοφοσμίνη δεσμεύει και πιθανώς αναδιοργανώνει περιοχές της χρωματίνης κοντά στους υποκινητές γονιδίων που μεταγράφονται ως απόκριση στην υποξία και η παρουσία της εκεί λειτουργεί ως σήμανση για την προσέγγιση των υποκινητών από τον HIF-1 :

- (A) Απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ο HIF-1α αλληλεπιδρά ασθενώς με την NPM1 με αποτέλεσμα την μη αποδοτική πρόσδεση του HIF-1 στο παρακείμενο HRE και την ασθενή ενεργοποίηση του υποκινητή.
- (B) Σε καρκινικά κύτταρα με συνεχώς ενεργό μονοπάτι των MAPK ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 εντός της ETD και αλληλεπιδρά ισχυρά με την NPM1 ώστε να αυτή να οδηγήσει το ετεροδιμερές HIF-1 στην λειτουργική πρόσδεση με τα παρακείμενα HRE και την βέλτιστη ενεργοποίηση της μεταγραφής. Αναστολή του μηχανισμού μέσω αποσιώπησης της έκφρασης της NPM1 με παρεμβατικά RNA, αναστολή των ERK1/2 με χημικά μέσα ή εισαγωγή στα κύτταρα πεπτιδίων που σταματούν την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών (TAT-ETD) οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων στόχων του HIF-1, και αναστέλλει την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό στρες, με συνέπεια την ενεργοποίηση της απόπτωσης και τον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 43 Το μοντέλο που περιγράφεται στο κείμενο της σύνοψης αναπαριστά τον μηχανισμό με τον οποίο η ρυθμιζόμενη από τις ERK1/2 αλληλεπίδραση του HIF-1α με την NPM1 προωθεί την δράση του HIF-1 (178).

Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31-46.
2. Sonugür FG, Akbulut H. The Role of Tumor Microenvironment in Genomic Instability of Malignant Tumors. *Frontiers in Genetics*. 2019;10.
3. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):220-8.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
5. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell*. 2007;130(6):986-8.
6. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1238:3-25.
7. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):76.
8. Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):1050-5.
9. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998;280(5366):1036-7.
10. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59(19):5002-11.
11. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
12. Oudin MJ, Weaver VM. Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2016;81:189-205.
13. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current opinion in biotechnology*. 2016;40:41-8.
14. Zanutelli MR, Reinhart-King CA. Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1092:91-112.
15. Liu Q, Luo Q, Ju Y, Song G. Role of the mechanical microenvironment in cancer development and progression. *Cancer biology & medicine*. 2020;17(2):282-92.
16. Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, et al. Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers*. 2019;11(3):316.
17. Koltai T. Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:6343-60.
18. Finicle BT, Jayashankar V, Edinger AL. Nutrient scavenging in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(10):619-33.

19. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, NZ)*. 2015;3:83-92.
20. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.
21. Kim HN, Habbit NL, Su C-Y, Choi N, Ahn EH, Lipke EA, et al. Microphysiological Systems as Enabling Tools for Modeling Complexity in the Tumor Microenvironment and Accelerating Cancer Drug Development. *Advanced Functional Materials*. 2019;29(22):1807553.
22. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *The New England journal of medicine*. 2011;365(6):537-47.
23. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(6):1239-53.
24. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *WIREs Systems Biology and Medicine*. 2010;2(3):336-61.
25. McElroy GS, Chandel NS. Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia. *Experimental cell research*. 2017;356(2):217-22.
26. Crabtree HG, Cramer W, Murray JA. The action of radium on cancer cells. II.—Some factors determining the susceptibility of cancer cells to radium. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 1933;113(782):238-50.
27. Mottram JC. A Factor of Importance in the Radio Sensitivity of Tumours. *The British Journal of Radiology*. 1936;9(105):606-14.
28. Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer metastasis reviews*. 1994;13(2):139-68.
29. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(13):5680-4.
30. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(12):5510-4.
31. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1; regulates the *VEGF* expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(9):4273-8.
32. Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997;173(2):206-10.
33. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8581-93.

34. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*. 1997;11(1):72-82.
35. Minassian LM, Cotechini T, Huitema E, Graham CH. Hypoxia-Induced Resistance to Chemotherapy in Cancer. In: Gilkes DM, editor. *Hypoxia and Cancer Metastasis*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 123-39.
36. Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(2):333-9.
37. Luo W, Wang Y. Epigenetic regulators: multifunctional proteins modulating hypoxia-inducible factor- α protein stability and activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(6):1043-56.
38. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang B-H, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney International*. 1997;51(2):553-5.
39. Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(23):3885-901.
40. Tolonen J-P, Heikkilä M, Malinen M, Lee H-M, Palvimo JJ, Wei G-H, et al. A long hypoxia-inducible factor 3 isoform 2 is a transcription activator that regulates erythropoietin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(18):3627-42.
41. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*. 1991;252(5008):954-8.
42. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19(3):184-97.
43. Erbel PJ, Card PB, Karakuzu O, Bruick RK, Gardner KH. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15504-9.
44. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3 α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287(4):808-13.
45. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-40.
46. Hu C-J, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18(11):4528-42.
47. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014;49(1):1-15.
48. Jiang B-H, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1 α : MODULATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY BY OXYGEN TENSION*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(31):19253-60.

49. O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(4):2060-71.
50. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. A Nuclear Localization Signal of Human Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator/Hypoxia-inducible Factor 1 β Is a Novel Bipartite Type Recognized by the Two Components of Nuclear Pore-targeting Complex*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(28):17640-7.
51. Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 α , 2 α and 3 α). *Oncogene*. 2001;20(12):1435-44.
52. 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 (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008;1783(3):394-404.
53. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Görlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):235-40.
54. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(44):33095-106.
55. 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.
56. Gkoutinakou I-M, Befani C, Simos G, Liakos P. ERK1/2 phosphorylates HIF-2 α and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling. *Journal of Cell Science*. 2019;132(7):jcs225698.
57. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci*. 2017;130(2):466-79.
58. Lisy K, Peet DJ. Erratum: Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(4):805-.
59. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005;2005(306):re12.
60. Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *European journal of biochemistry*. 1998;253(3):771-7.
61. Rössler J, Stolze I, Frede S, Freitag P, Schweigerer L, Havers W, et al. Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;93(1):153-61.
62. Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(36):21021-7.

63. Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)DNA recognition site. *Nucleic Acids Research*. 1995;23(22):4542-50.
64. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):4089-96.
65. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):e207-17.
66. Galbraith Matthew D, Allen Mary A, Bensard Claire L, Wang X, Schwinn Marie K, Qin B, et al. HIF1A Employs CDK8-Mediator to Stimulate RNAPII Elongation in Response to Hypoxia. *Cell*. 2013;153(6):1327-39.
67. Choudhry H, Schödel J, Oikonomopoulos S, Camps C, Grampp S, Harris AL, et al. Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2. *EMBO reports*. 2014;15(1):70-6.
68. Platt JL, Salama R, Smythies J, Choudhry H, Davies JOJ, Hughes JR, et al. Capture-C reveals preformed chromatin interactions between HIF-binding sites and distant promoters. *EMBO reports*. 2016;17(10):1410-21.
69. Andrysik Z, Bender H, Galbraith MD, Espinosa JM. Multi-omics analysis reveals contextual tumor suppressive and oncogenic gene modules within the acute hypoxic response. *Nature Communications*. 2021;12(1):1375.
70. Fisher RP. Taking Aim at Glycolysis with CDK8 Inhibitors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2018;29(5):281-2.
71. Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;225(2):485-8.
72. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze C, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*. 2003;17(2):271-3.
73. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*. 2000;157(2):411-21.
74. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood*. 1998;92(7):2260-8.
75. Menrad H, Werno C, Schmid T, Copanaki E, Deller T, Dehne N, et al. Roles of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) versus HIF-2 α in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*. 2010;51(6):2183-92.
76. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12(12):5447-54.
77. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gökmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Current hematology reports*. 2003;2(6):465-70.

78. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(4):1068-77.
79. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. 2010;116(16):3039-48.
80. Yeo EJ, Cho YS, Kim MS, Park JW. Contribution of HIF-1alpha or HIF-2alpha to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. *Annals of hematology*. 2008;87(1):11-7.
81. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-13.
82. Rankin EB, Rha J, Unger TL, Wu CH, Shutt HP, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene*. 2008;27(40):5354-8.
83. Braile M, Marcella S, Cristinziano L, Galdiero MR, Modestino L, Ferrara AL, et al. VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(15):5294.
84. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong Carmen C-L, Russo A, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(40):E2707-E16.
85. Jiang X, Tian W, Tu AB, Pasupneti S, Shuffle E, Dahms P, et al. Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-2 α Is Required for the Maintenance of Airway Microvasculature. *Circulation*. 2019;139(4):502-17.
86. Simon M-P, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;217(3):809-18.
87. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
88. Melegh Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(11).
89. Vander Heiden Matthew G, Cantley Lewis C, Thompson Craig B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
90. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(38):23757-63.
91. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of physiology*. 2021;599(1):23-37.
92. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-97.
93. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:97-106.

94. Liu Y, Ma Z, Zhao C, Wang Y, Wu G, Xiao J, et al. HIF-1 α and HIF-2 α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 α -mediated fatty acid β -oxidation. *Toxicology letters*. 2014;226(2):117-23.
95. Han JS, Lee JH, Kong J, Ji Y, Kim J, Choe SS, et al. Hypoxia Restrains Lipid Utilization via Protein Kinase A and Adipose Triglyceride Lipase Downregulation through Hypoxia-Inducible Factor. *Mol Cell Biol*. 2019;39(2).
96. Hu B, Guo Y, Garbacz WG, Jiang M, Xu M, Huang H, et al. Fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol*. 2015;63(4):855-62.
97. Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ Axis Underlies the Integration of Glycolytic and Lipid Anabolic Pathways in Pathologic Cardiac Hypertrophy. *Cell Metabolism*. 2009;9(6):512-24.
98. 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 Res*. 2008;68(4):1003-11.
99. Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2018;1863(9):1142-52.
100. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniosoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 14):3485-93.
101. Qiu B, Ackerman D, Sanchez DJ, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, et al. HIF2 α -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discovery*. 2015;5(6):652-67.
102. Gimm T, Wiese M, Teschemacher B, Deggerich A, Schödel J, Knaup KX, et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(11):4443-58.
103. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*. 2019;8(3).
104. Petruzzelli R, Christensen DR, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. HIF-2 α Regulates NANOG Expression in Human Embryonic Stem Cells following Hypoxia and Reoxygenation through the Interaction with an Oct-Sox Cis Regulatory Element. *PLOS ONE*. 2014;9(10):e108309.
105. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo j*. 1998;17(11):3005-15.
106. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Developmental biology*. 1999;209(2):254-67.
107. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine*. 2002;8(7):702-10.

108. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes & development*. 1998;12(21):3320-4.
109. Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes & Diseases*. 2019;6(4):328-32.
110. Strowitzki MJ, Cummins EP, Taylor CT. Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? *Cells*. 2019;8(5).
111. Chinopoulos C. Which way does the citric acid cycle turn during hypoxia? The critical role of α -ketoglutarate dehydrogenase complex. *Journal of neuroscience research*. 2013;91(8):1030-43.
112. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, et al. Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Generation of Hydrogen Peroxide: ROLE IN EGF RECEPTOR-MEDIATED TYROSINE PHOSPHORYLATION*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(1):217-21.
113. Cho KH, Choi MJ, Jeong KJ, Kim JJ, Hwang MH, Shin SC, et al. A ROS/STAT3/HIF-1 α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion. *The Prostate*. 2014;74(5):528-36.
114. Gorlach A. Regulation of HIF-1 α at the Transcriptional Level. *Current Pharmaceutical Design*. 2009;15(33):3844-52.
115. Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(2):321-6.
116. Potteti HR, Noone PM, Tamatam CR, Ankireddy A, Noel S, Rabb H, et al. Nrf2 mediates hypoxia-inducible HIF1 α activation in kidney tubular epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021;320(3):F464-F74.
117. Kim T-H, Hur E-g, Kang S-J, Kim J-A, Thapa D, Lee YM, et al. NRF2 Blockade Suppresses Colon Tumor Angiogenesis by Inhibiting Hypoxia-Induced Activation of HIF-1 α . *Cancer Research*. 2011;71(6):2260-75.
118. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
119. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):755-61.
120. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF-kappaB. *The Biochemical journal*. 2008;412(3):477-84.
121. BelAiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia Up-Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Transcription by Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase and Nuclear Factor κ B in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18(12):4691-7.
122. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is Required for Hypoxia-Inducible Factor-1 α RNA Expression in Both Tumor Cells and Tumor-Associated Myeloid Cells. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(7):1099-105.

123. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2 α Kinase PKR Modulates the Hypoxic Response by Stat3-Dependent Transcriptional Suppression of HIF-1 α . *Cancer Research*. 2010;70(20):7820-9.
124. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, Sée V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):268.
125. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience*. 2020;10(1):31.
126. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(33):31277-85.
127. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3253-65.
128. Gkoutinakou I-M, Kechagia E, Pazaitou-Panayiotou K, Mylonis I, Liakos P, Tsakalof A. Calcitriol Suppresses HIF-1 and HIF-2 Transcriptional Activity by Reducing HIF-1/2 α Protein Levels via a VDR-Independent Mechanism. *Cells*. 2020;9(11):2440.
129. Gkoutinakou IM, Mylonis I, Tsakalof A. Vitamin D and Hypoxia: Points of Interplay in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1791.
130. Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Front Microbiol*. 2016;7:183.
131. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical journal*. 2008;412(2):179-90.
132. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:913-63.
133. Yi T, Papadopoulos E, Hagner PR, Wagner G. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) promotes cap-dependent translation of selective mRNAs through up-regulating initiation factor eIF4E1 in breast cancer cells under hypoxia conditions. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(26):18732-42.
134. Joshi S, Plataniias LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J Biol Chem*. 2014;5(3):321-33.
135. Agani F, Jiang B-H. Oxygen-independent Regulation of HIF-1: Novel Involvement of PI3K/ AKT/mTOR Pathway in Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2013;13(3):245-51.
136. Wu J, Stratford AL, Astanehe A, Dunn SE. YB-1 is a Transcription/Translation Factor that Orchestrates the Oncogenome by Hardwiring Signal Transduction to Gene Expression. *Translational oncogenomics*. 2007;2:49-65.
137. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, Grunewald TG, Negri GL, Somasekharan SP, et al. Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer cell*. 2015;27(5):682-97.
138. Qian M, Yan F, Yuan T, Yang B, He Q, Zhu H. Targeting post-translational modification of transcription factors as cancer therapy. *Drug discovery today*. 2020;25(8):1502-12.

139. Geng H, Harvey CT, Pittsenbarger J, Liu Q, Beer TM, Xue C, et al. HDAC4 protein regulates HIF1 α protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(44):38095-102.
140. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, et al. HIF1 α ; Protein Stability Is Increased by Acetylation at Lysine 709 ^{*}. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(42):35496-505.
141. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular cell*. 2010;38(6):864-78.
142. Liu X, Chen Z, Xu C, Leng X, Cao H, Ouyang G, et al. Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(10):5081-98.
143. Kim Y, Nam HJ, Lee J, Park DY, Kim C, Yu YS, et al. Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis. *Nature Communications*. 2016;7(1):10347.
144. Lee JY, Park JH, Choi HJ, Won HY, Joo Hs, Shin DH, et al. LSD1 demethylates HIF1 α to inhibit hydroxylation and ubiquitin-mediated degradation in tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2017;36(39):5512-21.
145. Liu X, Chen Z, Xu C, Leng X, Cao H, Ouyang G, et al. Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(10):5081-98.
146. Bao L, Chen Y, Lai H-T, Wu S-Y, Wang JE, Hatanpaa KJ, et al. Methylation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α by G9a/GLP inhibits HIF-1 transcriptional activity and cell migration. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(13):6576-91.
147. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Letters*. 2003;549(1-3):105-9.
148. Cho H, Ahn D-R, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1 α . *FEBS Letters*. 2007;581(8):1542-8.
149. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(3):1788-96.
150. Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL. Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase-1 Binds to Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and RACK1 and Promotes Ubiquitination and Degradation of HIF-1 α *. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(46):33358-66.
151. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabweesh NJ. SEPT9_v1 Up-regulates Hypoxia-inducible Factor 1 by Preventing Its RACK1-mediated Degradation*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(17):11142-51.
152. Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: Competition for HIF-1 α Degradation vs. Stabilization. *Cell Cycle*. 2007;6(6):656-9.
153. Tang X, Chang C, Hao M, Chen M, Woodley DT, Schönthal AH, et al. Heat shock protein-90 α (Hsp90 α) stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in support of spermatogenesis and tumorigenesis. *Cancer Gene Therapy*. 2021;28(9):1058-70.

154. Koh MY, Darnay BG, Powis G. Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 α , leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol.* 2008;28(23):7081-95.
155. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & development.* 2000;14(1):34-44.
156. Fels DR, Koumenis C. HIF-1 α and p53: the ODD couple? *Trends in biochemical sciences.* 2005;30(8):426-9.
157. Joshi S, Singh AR, Durden DL. MDM2 regulates hypoxic hypoxia-inducible factor 1 α stability in an E3 ligase, proteasome, and PTEN-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-dependent manner. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(33):22785-97.
158. Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells.* 2020;9(11).
159. Horak P, Crawford Andrew R, Vadysirisack Douangson D, Nash Zachary M, DeYoung MP, Sgroi D, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(10):4675-80.
160. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Molecular cell.* 2010;40(4):509-20.
161. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(50):38944-50.
162. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell cycle (Georgetown, Tex).* 2013;12(23):3689-701.
163. Hubbi Maimon E, Gilkes Daniele M, Hu H, Kshitiz n, Ahmed I, Semenza Gregg L. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(32):E3325-E34.
164. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 17):2976-86.
165. Kourti M, Ikonou G, Giakoumakis N-N, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cell Signal.* 2015;27(6):1129-40.
166. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *The Biochemical journal.* 2004;383(Pt. 3):429-37.
167. Mottet D, Ruys SPD, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *International Journal of Cancer.* 2005;117(5):764-74.
168. Guerra B, Rasmussen TD, Schnitzler A, Jensen HH, Boldyreff BS, Miyata Y, et al. Protein kinase CK2 inhibition is associated with the destabilization of HIF-1 α in human cancer cells. *Cancer letters.* 2015;356(2 Pt B):751-61.

169. Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, et al. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death & Differentiation*. 2005;12(6):668-77.
170. Arevalo M-A, Rodríguez-Tébar A. Activation of Casein Kinase II and Inhibition of Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 Phosphatase by Nerve Growth Factor/p75NTR Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and Stimulate Axonal Growth. *Molecular Biology of the Cell*. 2006;17(8):3369-77.
171. Bullen John W, Tchernyshyov I, Holewinski Ronald J, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Science Signaling*. 2016;9(430):ra56-ra.
172. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current opinion in cell biology*. 1996;8(2):205-15.
173. Zhang J, Liu Q, Fang Z, Hu X, Huang F, Tang L, et al. Hypoxia induces the proliferation of endothelial progenitor cells via upregulation of Apelin/APLNR/MAPK signaling. *Mol Med Rep*. 2016;13(2):1801-6.
174. Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):32631-7.
175. Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene*. 2001;20(52):7624-34.
176. Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(1):74-8.
177. Karagiota A, Kourti M, Simos G, Mylonis I. HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(4):809-25.
178. Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Molecular oncology*. 2021;15(12):3468-89.
179. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*. 2018;17(1):58.
180. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15(5):463-9.
181. Chakraborty AA. Coalescing lessons from oxygen sensing, tumor metabolism, and epigenetics to target VHL loss in kidney cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2020;67:34-42.
182. Du W, Zhang L, Brett-Morris A, Aguila B, Kerner J, Hoppel CL, et al. HIF drives lipid deposition and cancer in ccRCC via repression of fatty acid metabolism. *Nature Communications*. 2017;8(1):1769.
183. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell*. 2005;7(1):77-85.

184. Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA, Bokoch GM. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol Biol Cell*. 2008;19(7):2984-94.
185. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(2):281-90.
186. Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JKR, Cullis ER, Whitley G, et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *British Journal of Cancer*. 2011;104(1):83-90.
187. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(14):9030-7.
188. Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle*. 2004;3(2):164-7.
189. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*. 2013;13(1):89.
190. Ippolito L, Morandi A, Giannoni E, Chiarugi P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends in biochemical sciences*. 2019;44(2):153-66.
191. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
192. Chen Y, Jr., Mahieu NG, Huang X, Singh M, Crawford PA, Johnson SL, et al. Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nat Chem Biol*. 2016;12(11):937-43.
193. Lee HJ, Ryu JM, Jung YH, Oh SY, Lee S-J, Han HJ. Novel Pathway for Hypoxia-Induced Proliferation and Migration in Human Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HIF-1 α , FASN, and mTORC1. *Stem Cells*. 2015;33(7):2182-95.
194. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Molecular Cancer*. 2010;9(1):191.
195. Wang D, Berglund AE, Kenchappa RS, MacAulay RJ, Mulé JJ, Etame AB. BIRC3 is a biomarker of mesenchymal habitat of glioblastoma, and a mediator of survival adaptation in hypoxia-driven glioblastoma habitats. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9350.
196. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(9):3664-71.
197. Guo K, Searfoss G, Krolkowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell death and differentiation*. 2001;8(4):367-76.
198. Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced Nucleophosmin Protects Cell Death through Inhibition of p53 *. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(40):41275-9.
199. Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, Wong CC, Wei H, Pitcairn S, et al. Collagen Prolyl Hydroxylases Are Essential for Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research*. 2013;73(11):3285-96.

200. Ji F, Wang Y, Qiu L, Li S, Zhu J, Liang Z, et al. Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *International journal of oncology*. 2013;42(5):1578-88.
201. Barnhart BC, Simon MC. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):261-71.
202. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, Li W. Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells (Review). *Mol Med Rep*. 2021;23(1):17.
203. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.
204. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016;539(7627):112-7.
205. Deeks ED. Belzutifan: First Approval. *Drugs*. 2021;81(16):1921-7.
206. Ma Z, Xiang X, Li S, Xie P, Gong Q, Goh BC, et al. Targeting hypoxia-inducible factor-1, for cancer treatment: Recent advances in developing small-molecule inhibitors from natural compounds. *Semin Cancer Biol*. 2022;80:379-90.
207. Mylonis I, Chachami G, Simos G. Specific Inhibition of HIF Activity: Can Peptides Lead the Way? *Cancers*. 2021;13(3):410.
208. Wang Y, Thompson JD, Chan WK. A cell-penetrating peptide suppresses the hypoxia inducible factor-1 function by binding to the helix-loop-helix domain of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Chemico-Biological Interactions*. 2013;203(2):401-11.
209. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*. 1978;275(5679):416-20.
210. Huang N, Negi S, Szebeni A, Olson MO. Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(7):5496-502.
211. Philpott A, Leno GH. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*. 1992;69(5):759-67.
212. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu Tapas K. Human Histone Chaperone Nucleophosmin Enhances Acetylation-Dependent Chromatin Transcription. *Mol Cell Biol*. 2005;25(17):7534-45.
213. McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2003;125(5):625-33.
214. Kang Y-J, Olson MOJ, Busch H. Phosphorylation of Acid-soluble Proteins in Isolated Nucleoli of Novikoff Hepatoma Ascites Cells: EFFECTS OF DIVALENT CATIONS. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(17):5580-5.
215. Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(19):3974-9.
216. Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *Journal of biochemistry*. 2008;143(4):441-8.
217. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*. 2016;17(1):19.

218. Falini B, Sciabolacci S, Falini L, Brunetti L, Martelli MP. Diagnostic and therapeutic pitfalls in NPM1-mutated AML: notes from the field. *Leukemia*. 2021;35(11):3113-26.
219. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biological and clinical features. *Blood*. 2006;109(3):874-85.
220. Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausió J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2007;29(1):49-59.
221. Lee HH, Kim HS, Kang JY, Lee BI, Ha JY, Yoon HJ, et al. Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins*. 2007;69(3):672-8.
222. Lindström MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochemistry research international*. 2011;2011:195209.
223. Banerjee PR, Mitrea DM, Kriwacki RW, Deniz AA. Asymmetric Modulation of Protein Order-Disorder Transitions by Phosphorylation and Partner Binding. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2016;55(5):1675-9.
224. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nature Cell Biology*. 2005;7(8):823-30.
225. Dutta S, Akey IV, Dingwall C, Hartman KL, Laue T, Nolte RT, et al. The Crystal Structure of Nucleoplasmin-Core: Implications for Histone Binding and Nucleosome Assembly. *Molecular cell*. 2001;8(4):841-53.
226. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Letters*. 2001;506(3):272-6.
227. Cela I, Di Matteo A, Federici L. Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14):4885.
228. Hingorani K, Szebeni A, Olson MOJ. Mapping the Functional Domains of Nucleolar Protein B23. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(32):24451-7.
229. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(34):23326-32.
230. Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(19):4508-15.
231. Vascotto C, Fantini D, Romanello M, Cesaratto L, Deganuto M, Leonardi A, et al. APE1/Ref-1 Interacts with NPM1 within Nucleoli and Plays a Role in the rRNA Quality Control Process. *Mol Cell Biol*. 2009;29(7):1834-54.
232. Federici L, Arcovito A, Scaglione GL, Scaloni F, Lo Sterzo C, Di Matteo A, et al. Nucleophosmin C-terminal leukemia-associated domain interacts with G-rich quadruplex forming DNA. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(48):37138-49.
233. Gallo A, Lo Sterzo C, Mori M, Di Matteo A, Bertini I, Banci L, et al. Structure of nucleophosmin DNA-binding domain and analysis of its complex with a G-quadruplex sequence from the c-MYC promoter. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(32):26539-48.

234. Xu Y, Fang F, Dhar SK, St Clair WH, Kasarskis EJ, St Clair DK. The role of a single-stranded nucleotide loop in transcriptional regulation of the human *sod2* gene. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(22):15981-94.
235. Chiarella S, De Cola A, Scaglione GL, Carletti E, Graziano V, Barcaroli D, et al. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):3228-39.
236. Mitrea DM, Cika JA, Stanley CB, Nourse A, Onuchic PL, Banerjee PR, et al. Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation. *Nature Communications*. 2018;9(1):842.
237. Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2015;6(2):225-42.
238. Meder VS, Boeglin M, de Murcia G, Schreiber V. PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 1):211-22.
239. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(10):610-21.
240. Holmberg Olausson K, Nistér M, Lindström MS. Loss of nucleolar histone chaperone NPM1 triggers rearrangement of heterochromatin and synergizes with a deficiency in DNA methyltransferase DNMT3A to drive ribosomal DNA transcription. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(50):34601-19.
241. Haindl M, Harasim T, Eick D, Muller S. The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO reports*. 2008;9(3):273-9.
242. Lindström MS. Elucidation of Motifs in Ribosomal Protein S9 That Mediate Its Nucleolar Localization and Binding to NPM1/Nucleophosmin. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e52476.
243. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan P-K, et al. Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication. *Cell*. 2000;103(1):127-40.
244. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(24):21529-37.
245. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*. 2005;7(8):823-30.
246. Negi SS, Olson MO. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 17):3676-85.
247. Du W, Zhou Y, Pike S, Pang Q. NPM phosphorylation stimulates Cdk1, overrides G2/M checkpoint and increases leukemic blasts in mice. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):302-10.
248. Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/Nucleophosmin Serine 4 Phosphorylation Mediates Mitotic Functions of Polo-like Kinase 1 *. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(34):35726-34.

249. Wu MH, Chang JH, Yung BY. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*. 2002;23(1):93-100.
250. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 2002;4(7):529-33.
251. Kodiha M, Bański P, Stochaj U. Computer-based fluorescence quantification: a novel approach to study nucleolar biology. *BMC cell biology*. 2011;12:25.
252. Matthews DA. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *Journal of virology*. 2001;75(2):1031-8.
253. Yang K, Wang M, Zhao Y, Sun X, Yang Y, Li X, et al. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nature Communications*. 2016;7(1):13599.
254. Chan PK, Bloom DA, Hoang TT. The N-terminal half of NPM dissociates from nucleoli of HeLa cells after anticancer drug treatments. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264(1):305-9.
255. Yogev O, Saadon K, Anzi S, Inoue K, Shaulian E. DNA Damage–Dependent Translocation of B23 and p19ARF Is Regulated by the Jun N-Terminal Kinase Pathway. *Cancer Research*. 2008;68(5):1398-406.
256. Lin CY, Tan BC-M, Liu H, Shih C-J, Chien K-Y, Lin C-L, et al. Dephosphorylation of Nucleophosmin by PP1 β Facilitates pRB Binding and Consequent E2F1-dependent DNA Repair. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(24):4409-17.
257. Feroz W, Sheikh AMA. Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2020;21(1):49.
258. Mitrea DM, Kriwacki RW. On the relationship status for Arf and NPM1 - it's complicated. *The FEBS journal*. 2018;285(5):828-31.
259. Luchinat E, Chiarella S, Franceschini M, Di Matteo A, Brunori M, Banci L, et al. Identification of a novel nucleophosmin-interaction motif in the tumor suppressor p14arf. *The FEBS journal*. 2018;285(5):832-47.
260. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier April A, Allamargot C, Quelle Frederick W, et al. Nucleophosmin (B23) Targets ARF to Nucleoli and Inhibits Its Function. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1258-71.
261. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell*. 1998;92(6):725-34.
262. Russo LC, Ferruzo PYM, Forti FL. Nucleophosmin Protein Dephosphorylation by DUSP3 Is a Fine-Tuning Regulator of p53 Signaling to Maintain Genomic Stability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.
263. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T. Recruitment of Phosphorylated NPM1 to Sites of DNA Damage through RNF8-Dependent Ubiquitin Conjugates. *Cancer Research*. 2010;70(17):6746-56.
264. Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature genetics*. 2004;36(8):900-5.

265. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326(5950):289-93.
266. Serizay J, Ahringer J. Genome organization at different scales: nature, formation and function. *Current opinion in cell biology*. 2018;52:145-53.
267. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK. Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol*. 2009;29(18):5115-27.
268. Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Molecular cell*. 2004;13(2):291-8.
269. Kim S, Yu N-K, Kaang B-K. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015;47(6):e166-e.
270. Wang AJ, Han Y, Jia N, Chen P, Minden MD. NPM1c impedes CTCF functions through cytoplasmic mislocalization in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(5):1278-90.
271. Léotoing L, Meunier L, Manin M, Mauduit C, Decaussin M, Verrijdt G, et al. Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. *Oncogene*. 2008;27(20):2858-67.
272. Abe M, Lin J, Nagata K, Okuwaki M. Selective regulation of type II interferon-inducible genes by NPM1/nucleophosmin. *FEBS Letters*. 2018;592(2):244-55.
273. Lin J, Kato M, Nagata K, Okuwaki M. Efficient DNA binding of NF- κ B requires the chaperone-like function of NPM1. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(7):3707-23.
274. Qin G, Wang X, Ye S, Li Y, Chen M, Wang S, et al. NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer. *Nature Communications*. 2020;11(1):1669.
275. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(7):493-505.
276. Brodská B, Otevřelová P, Šálek C, Fuchs O, Gašová Z, Kuželová K. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2823.
277. Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996;87(3):882-6.
278. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807.
279. Werner MT, Zhao C, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase: the ultimate oncogene and therapeutic target. *Blood*. 2017;129(7):823-31.
280. Yoneda-Kato N, Fukuhara S, Kato J. Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome-associated NPM-MLF1 chimeric protein. *Oncogene*. 1999;18(25):3716-24.
281. Roberta La S, Gianluca B, Sofie D, Valentina P, Danika Di G, Valentina G, et al. Deletions of the long arm of chromosome 5 define subgroups of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(8):951-8.

282. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, et al. Delocalization and Destabilization of the Arf Tumor Suppressor by the Leukemia-Associated NPM Mutant. *Cancer Research*. 2006;66(6):3044-50.
283. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 γ . *Journal of Cell Biology*. 2008;182(1):19-26.
284. Swaney EM, Chattopadhyay A, Abecassis I, Rush EA, Redner RL. The leukemic oncoprotein NPM1-RARA inhibits TP53 activity. *Leukemia & lymphoma*. 2016;57(8):1933-7.
285. Drexler HG, Gignac SM, von Wasielewski R, Werner M, Dirks WG. Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia*. 2000;14(9):1533-59.
286. Velusamy T, Kiel MJ, Sahasrabudhe AA, Rolland D, Dixon CA, Bailey NG, et al. A novel recurrent NPM1-TYK2 gene fusion in cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2014;124(25):3768-71.
287. Bouroumeau A, Bussot L, Hamaidia S, Garcia-Sandoval A, Bergan-Dahl A, Betton-Fraisse P, et al. CYCLON and NPM1 Cooperate within an Oncogenic Network Predictive of R-CHOP Response in DLBCL. *Cancers*. 2021;13(23):5900.
288. Zeng D, Xiao Y, Zhu J, Peng C, Liang W, Lin H. Knockdown of nucleophosmin 1 suppresses proliferation of triple-negative breast cancer cells through activating CDH1/Skp2/p27kip1 pathway. *Cancer management and research*. 2019;11:143-56.
289. Wang H, Yuan G, Zhao B, Zhao Y, Qiu Y. High expression of B23 is associated with tumorigenesis and poor prognosis in bladder urothelial carcinoma. *Mol Med Rep*. 2017;15(2):743-9.
290. Liu Y, Zhang F, Zhang X-f, Qi L-s, Yang L, Guo H, et al. Expression of Nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *Journal of Biomedical Science*. 2012;19(1):53.
291. Sekhar KR, Benamar M, Venkateswaran A, Sasi S, Penthala NR, Crooks PA, et al. Targeting Nucleophosmin 1 Represents a Rational Strategy for Radiation Sensitization. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2014;89(5):1106-14.
292. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer biology & therapy*. 2005;4(9):918-23.
293. Liu X, Liu D, Qian D, Dai J, An Y, Jiang S, et al. Nucleophosmin (NPM1/B23) interacts with activating transcription factor 5 (ATF5) protein and promotes proteasome- and caspase-dependent ATF5 degradation in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(23):19599-609.
294. Li Z, Boone D, Hann Stephen R. Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(48):18794-9.
295. Sekhar KR, Reddy YT, Reddy PN, Crooks PA, Venkateswaran A, McDonald WH, et al. The novel chemical entity YTR107 inhibits recruitment of nucleophosmin to sites of DNA damage, suppressing repair of DNA double-strand breaks and enhancing radiosensitization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(20):6490-9.

296. Traver G, Sekhar KR, Crooks PA, Keeney DS, Freeman ML. Targeting NPM1 in irradiated cells inhibits NPM1 binding to RAD51, RAD51 foci formation and radiosensitizes NSCLC. *Cancer letters*. 2021;500:220-7.
297. Hisaoka M, Nagata K, Okuwaki M. Intrinsically disordered regions of nucleophosmin/B23 regulate its RNA binding activity through their inter- and intra-molecular association. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(2):1180-95.
298. Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Therapy*. 2000;7(6):493-8.
299. Rosman GJ, Miller AD. Improved method for plasmid shipment. *BioTechniques*. 1990;8(5):509.
300. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W556-w60.
301. Whitlock NA, Agarwal N, Ma J-X, Crosson CE. Hsp27 Upregulation by HIF-1 Signaling Offers Protection against Retinal Ischemia in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(3):1092-8.
302. Braliou GG, Verga Falzacappa MV, Chachami G, Casanovas G, Muckenthaler MU, Simos G. 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression. *Journal of Hepatology*. 2008;48(5):801-10.
303. Orso F, Corà D, Ubezio B, Provero P, Caselle M, Taverna D. Identification of functional TFAP2A and SP1 binding sites in new TFAP2A-modulated genes. *BMC Genomics*. 2010;11(1):355.
304. Fallah J, Rini BI. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Current Oncology Reports*. 2019;21(1):6.
305. Huang N, Negi S, Szebeni A, Olson MOJ. Protein NPM3 Interacts with the Multifunctional Nucleolar Protein B23/Nucleophosmin and Inhibits Ribosome Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(7):5496-502.
306. Gadad SS, Shandilya J, Kishore AH, Kundu TK. NPM3, a Member of the Nucleophosmin/Nucleoplasmin Family, Enhances Activator-Dependent Transcription. *Biochemistry*. 2010;49(7):1355-7.
307. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, et al. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(11):4861-78.
308. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
309. Cho WK, Spille JH, Hecht M, Lee C, Li C, Grube V, et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science*. 2018;361(6400):412-5.
310. Smythies JA, Sun M, Masson N, Salama R, Simpson PD, Murray E, et al. Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1 α and HIF-2 α transcription factors in chromatin. *EMBO Rep*. 2019;20(1):e46401.

311. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide Association of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA Binding with Expression Profiling of Hypoxia-inducible Transcripts*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(25):16767-75.
312. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2 — Is one more important than the other? *Vascular Pharmacology*. 2012;56(5):245-51.
313. Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert opinion on drug discovery*. 2019;14(7):667-82.
314. Yoo W, Noh KH, Ahn JH, Yu JH, Seo JA, Kim SG, et al. HIF-1 α Expression as a Protective Strategy of HepG2 Cells Against Fatty Acid-Induced Toxicity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014;115(6):1147-58.
315. Holmberg Olausson K, Elsir T, Moazemi Goudarzi K, Nistér M, Lindström MS. NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. *Scientific Reports*. 2015;5(1):16495.
316. Jun JC, Rathore A, Younas H, Gilkes D, Polotsky VY. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Current sleep medicine reports*. 2017;3(1):1-10.
317. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2020;21(10):607-32.

ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1

Kreon Koukoulas¹, Antonis Giakountis^{2,3}, Angeliki Karagiota¹, Martina Samiotaki³, George Panayotou³, George Simos^{1,4} and Ilias Mylonis¹ 

¹ Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Biopolis, Greece

² Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Biopolis, Greece

³ Institute for Bio-innovation, BSRC 'Alexander Fleming', Vari, Greece

⁴ Gerald Bronfman Department of Oncology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

Keywords

cancer; HIF; hypoxia; NPM1; nucleophosmin

Correspondence

G. Simos and I. Mylonis, Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, 41500 Biopolis, Greece

Tel: +30 2410 685723 or +30 2410 685578

E-mail: simos@med.uth.gr or mylonis@med.uth.gr

(Received 12 March 2021, revised 13 July 2021, accepted 12 August 2021, available online 9 September 2021)

doi:10.1002/1878-0261.13080

The hypoxia-inducible factor HIF-1 is essential for oxygen homeostasis. Despite its well-understood oxygen-dependent expression, regulation of its transcriptional activity remains unclear. We show that phosphorylation by extracellular signal-regulated kinases1/2 (ERK1/2), in addition to promoting HIF-1 α nuclear accumulation, also enhances its interaction with chromatin and stimulates direct binding to nucleophosmin (NPM1), a histone chaperone and chromatin remodeler. NPM1 is required for phosphorylation-dependent recruitment of HIF-1 to hypoxia response elements, its interaction with acetylated histones, and high expression of HIF-1 target genes under hypoxia. Transcriptome analysis revealed a significant number of hypoxia-related genes commonly regulated by NPM1 and HIF-1. These NPM1/HIF-1 α co-upregulated genes are enriched in three different cancer types, and their expression correlates with hypoxic tumor status and worse patient prognosis. In concert, silencing of NPM1 expression or disruption of its association with HIF-1 α inhibits metabolic adaptation of cancer cells and triggers apoptotic death upon hypoxia. We suggest that ERK-mediated phosphorylation of HIF-1 α regulates its physical interaction with NPM1, which is essential for the productive association of HIF-1 with hypoxia target genes and their optimal transcriptional activation, required for survival under low oxygen or tumor growth.

1. Introduction

Cells exposed to hypoxia undergo a series of changes that allow for their metabolic adaptation and survival. In cancer cells, these changes facilitate tumor progression, metastasis, and resistance to drugs [1]. Adaptation to hypoxia at the transcriptional level is

accomplished through activation of the heterodimeric Hypoxia-inducible factors (HIFs) [2]. They consist of a stably expressed HIF- β subunit or aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and an oxygen-regulated HIF- α subunit. In oxygenated cells, HIF- α is modified by oxygen-sensing prolyl-hydroxylases (PHDs), which leads to association with the von

Abbreviations

ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; DLBC, lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases1/2; ETD, ERK targeted domain; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; GBM, glioblastoma multiforme; HIF, hypoxia-inducible factor; HRE, hypoxia response elements; LLPS, liquid-liquid phase separation; NES, nuclear export signal; NPM1, nucleophosmin; THYM, thymoma.

Hippel–Lindau protein (pVHL) and proteasomal degradation [3]. In addition, asparagine hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α (FIH) regulates HIF activity by inhibiting HIF- α in association with CBP/p300 [4]. Under hypoxia, hydroxylation is impaired, HIF- α escapes degradation and translocates into the nucleus where it binds to ARNT and hypoxia response elements (HREs), thereby inducing expression of target genes. HIF- α is often overexpressed in human cancers as a result of local hypoxic microenvironment or oncogenic transformation and is associated with poor prognosis. HIF-1 α is expressed in most cells while expression of HIF-2 α is tissue and cell-type specific. HIF-1 and HIF-2 have distinct as well as common targets [5]. HIFs are also implicated in obesity, nonalcoholic fatty liver disease, pulmonary hypertension, atherosclerosis, and other pathologies [2]. However, despite the undeniable importance of HIFs and the wealth of data for their oxygen-dependent activation, there is, relatively, little information on events taking place downstream of HIF- α stabilization and, especially the interaction between HIFs and chromatin or the transcriptional apparatus.

Hypoxia-inducible factor-1 α , in particular, is affected by oxygen-independent post-translational mechanisms, including phosphorylation or/and interaction with other proteins [6,7]. We have previously reported that CK1 δ phosphorylates HIF-1 α on Ser247 and inhibits its association with ARNT and HIF-1 activity, whereas phosphorylation of HIF-1 α by extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) on Ser641/643 (inside a domain termed ERK Targeted Domain; ETD) stimulates HIF-1 activity [8,9]. ETD phosphorylation by ERK1/2 masks an atypical nuclear export signal (NES) and, thereby, promotes nuclear HIF-1 α accumulation and HIF-1 activity, while absence of this phosphorylation leads to translocation of HIF-1 α onto the mitochondria, where it forms a complex with antiapoptotic function [9,10]. Interestingly, HIF-1 α -derived cell permeable TAT-ETD-FLAG peptides that harbor the phosphorylation sites or a phosphomimetic mutation, when introduced into Huh7, HeLa, or HepG2 cells, could impair endogenous HIF-1 transcriptional activity and cell survival under hypoxia [11].

Driven by the observation that the phosphorylated form of HIF-1 α ETD limits its nuclear mobility, suggesting stronger association with chromatin, we sought to identify its nuclear interacting partners. This quest led to the identification of NPM1 and the demonstration of the significance of the ETD/NPM1 interaction for the cellular adaptation to low oxygen conditions and its regulation.

2. Methods

2.1. Plasmids and protein expression

Plasmids encoding GST-tagged NPM1 forms B23.1, B23.2, Δ C, Δ N, and CR were a generous gift from M. Okuwaki (Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Japan) [12,13]. All other plasmids have been previously described [8,9,11]. Recombinant proteins GST-HIF-1 α (348–826) GST-WT, GST-SA, GST-SE and GST-ETD GST-WT, GST-SA, GST-SE were expressed and purified as previously described [9]. To bacterially express the different GST-NPM1 forms, plasmids encoding for GST-NPM1 B23.1, GST-B23.2, GST- Δ C, GST- Δ N, and GST-CR were transformed into the BL21 (RIL) strain of *Escherichia coli*. Transformed bacteria were grown in LB Broth at 37 °C until OD600 reached 0.5 followed by addition of 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 22 °C for 2 h to induce protein expression. To purify GST-tagged proteins, bacteria were lysed by sonication (Vibra-Cell, Sonics and Materials, Newtown, CT, USA) in a buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.6), 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 0.1 mM AEBSEF. The lysates were incubated with Glutathione (GSH)-agarose (MACHEREY-NAGEL, Dueren, Germany) under rotation for 1 h at 4 °C, and bound proteins were eluted by 10 mM reduced glutathione in 25 mM Tris-HCl (pH 8.5). When required, GST-tagged proteins were processed with His-TEV as previously described [11] to remove the GST moiety. All protein constructs used in this study are schematically shown in Fig. S1.

2.2. Cell culture, transfections, and reporter gene assays

Human HeLa (CVCL_0058) or (CVCL_R965; acquired from ATCC, Manassas, VA, USA), and Huh7 (CVCL_0336) cells (a kind gift from M. Muckenthaler, University of Heidelberg; originally purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources), regularly tested for mycoplasma, were cultured in DMEM (Biosera, Nuaille, France) containing heat-inactivated 10% FBS and 100 U·mL⁻¹ penicillin-streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany) in a CO₂ humidified incubator at 37°C or (for hypoxia) in an INVIVO2 200 hypoxia workstation (Baker Ruskinn, Sanford, ME, USA) at 1% O₂. Huh7 cells were used in fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assays due to their superior nuclear fluorescent signals and in ChIP experiments because of their previously well-characterized *LPIN1* and *AGPAT2* promoters. HeLa

cells were used in all other experiments due to their higher proliferation rates. Results were consistent for both cell lines. To inactivate the ERK1/2 pathway, cells were treated for 16 h with 5 or 10 μ M U0126 (as indicated; MEK inhibitor; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) or were serum-deprived. Cells were transiently transfected with 10 μ g plasmid DNA or 20 nM siRNAs using the JetPRIME[®] Polyplus reagent (Polyplus, Strasbourg, France) or VIROMER[®]BLUE (BioNTech, Mainz, Germany). Details of siRNAs are shown in Table S1. Reporter gene assays were carried out as previously described [9].

2.3. *In vitro* binding assays and immunoprecipitation

In vitro binding assays using as baits GST-tagged ETD, HIF-1 α (348–826), NPM1, and their mutant forms and as prey HeLa protein extracts or purified proteins, as well as IP of HIF-1 α , NPM1, and GFP- or Flag-tagged proteins using the antibodies shown in Table S2, were performed as previously described [10].

2.4. Western blotting and immunofluorescence microscopy

Protein analysis by immunoblotting, detection by immunofluorescence microscopy, and visualization/quantification of results were carried out as previously described [9] using the antibodies presented at Table S2. Lipid droplet staining was performed using Nile Red (0.1 mg in PBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 15 min before mounting on slides [14].

2.5. Live cell imaging and fluorescence recovery after photobleaching

Analysis of Huh7 cells expressing GFP or GFP-HIF-1 α phosphorylation mutants by live cell imaging and FRAP were performed as previously described [8]. Quantitative analysis was performed using easyFRAP [15].

2.6. Trypsinization, LC-MS/MS, and data analysis

In-gel tryptic digestion of proteins, LC-MS/MS, and data analysis was performed according to standard procedures [16] and as described in detail previously [10].

2.7. Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation experiments of Huh7 cells were performed as previously described [14] using antibodies shown in Table S2. In sequential ChIP

(ChIP-re-ChIP) experiments, first chromatin immunoprecipitates (IP) were eluted with 1 \times TE buffer containing 2% SDS and 15 mM DTT, the eluates were diluted 10-fold in IP buffer, and they were then processed for the second IP step as for the first. Amplification of the –2916 to –2686 region of the *hLPIN1* promoter or the different HRE regions of the *AGPAT2* promoter (Table S3), subsequent analysis, and quantification was performed as previously described [14,17].

Amplification of the promoter regions of *HSPB1*, *CASP9*, and *HAMP* (Table S3), analysis, and quantification were performed as previously described [18–20].

2.8. RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA isolation was performed by using the NucleoZOL reagent (MACHEREY-NAGEL, Germany), and cDNAs were synthesized by M-MuLV Reverse Transcriptase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) or the High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR was carried out in a Light-Cycler[®] 96 System (Roche, Basel, Switzerland), using the KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Primers for amplification of cDNAs are shown in Table S3.

2.9. Quant-seq analysis

For Quant-seq, poly-A isolated RNA was sequenced with an Ion Proton[™] System. Read mapping was performed tophat2 with default settings. Unmapped reads were re-mapped with Bowtie2 against the hg19 genome with the very-sensitive flag and merged with the initial mappings. Statistical analysis was performed with DESeq through the Bioconductor package metaseqR [21]. Differentially expressed genes presented a binomial test *P*-value < 0.05 and fold change (for each contrast) > 0.58 or < –0.58 in log₂ scale. Volcano plots and heatmaps were performed in R (The R Foundation, Indianapolis, IN, USA). Venn diagrams were performed with Venny, gene ontology with geneCodis [22] and statistical analysis of gene overlaps with hypergeometric tests in R.

2.10. Cell death, annexin V, and TUNEL assays

Cell death was determined by the LDH cytotoxicity detection kit (Takara-Clontech, Mountain View, CA, USA). Phosphatidylserine translocation and DNA fragmentation were detected by using the ‘CF555 Annexin V and PI Apoptosis Assay’ Kit (Biotium, Fremont, CA, USA) and ‘In situ Apoptosis Detection’ Kit (Takara-Clontech,

Mountain View, CA, USA), respectively. Images were taken on a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope equipped with AxioCam MRm sensor and 20 \times objective.

2.11. Datasets, gene expression, and survival analysis

Transcriptome data and clinicopathological information were analyzed by the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) online platform [23] utilizing The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) datasets: <http://gepia2.cancer-pku.cn/#dataset>. Analysis included gene expression profiling of tumor and paired normal tissues, gene boxplot expression analysis ($P < 0.05$ deemed significant), single or multigene Kaplan–Meier curves and survival maps using Mantel–Cox test, and correlation analysis between genes or gene signatures by using Spearman test, all performed as described by [23]. To create a hypoxia gene signature, the Gene Set Enrichment Analysis library containing 200 hypoxia-upregulated genes (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/HALL_MARK_HYPOXIA), was used. Following, we performed network analysis using STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) in order to identify genes with the strongest functional correlation with HIF-1 pathway [24].

2.12. Image analysis and statistical analysis

Fluorescence and colocalization quantification was performed using plugins of the IMAGEJ public domain software (v.1.51g, NIH, Bethesda, MD, USA) as previously described [10].

Statistical variance between two groups of values was calculated using the PRISM software (GraphPad; version 5.04) and applying Student's *t*-test (two-tailed) or by one-way analysis of variance (ANOVA) within multiple groups; $P < 0.05$ was deemed statistically significant (as indicated).

3. Results

3.1. HIF-1 α phosphorylation by ERK1/2 stimulates HIF-1 α binding to chromatin components

3.1.1. ERK-mediated phosphorylation decreases the intranuclear mobility of HIF-1 α

To test whether phosphorylation by ERKs may influence retention of HIF-1 α inside the nucleus, FRAP

experiments were performed in Huh7 cells transiently expressing wild-type (WT) GFP-HIF-1 α or mutant forms in the absence or presence of kaempferol that inactivates ERK [25]. The mutant forms, shown schematically in Fig. S1, included SE, carrying a phosphomimetic mutation (Ser641 to Glu; previously shown to be nuclear); SA with mutations that abolish phosphorylation (Ser641/643 to Ala; previously shown to reside predominantly outside the nucleus); IA with mutations that destroy the NES (Ile637/639 to Ala; previously shown to persistently reside inside the nucleus even in the absence of ERK phosphorylation); and IA/SA with mutations that destroy both the NES and the ERK phosphoacceptor sites (Ile637/639 to Ala and Ser641/643 to Ala; previously shown to be nuclear, although it lacks phosphorylation). No FRAP results could be obtained for the phospho-deficient SA form as the nuclear fluorescence signal was too low (Fig. S2). The resulting FRAP recovery curves (Fig. 1A) and quantitative analysis using easyFRAP [15] for the other GFP-HIF-1 α forms and GFP-NLS (used as a freely diffusible nuclear control protein; Table S4) gave the following results. As expected, GFP-NLS exhibited fast and full recovery of fluorescence, the highest diffusion coefficient (D_{eff}), and mobile fraction (f_{mob}) and the lowest half-maximal recovery time ($t_{1/2}$). WT GFP-HIF-1 α and the mutant IA form, both able to be reversibly phosphorylated by ERKs, showed similar recovery curves and D_{eff} , f_{mob} , and $t_{1/2}$ values (with insignificant differences, $P > 0.05$), suggesting that disruption of the NES restricts HIF-1 α inside the nucleus but does not affect its intranuclear mobility. In contrast to the WT and IA forms, both kaempferol treatment of cells expressing the WT form (WT + Kae) and mutation of the ERK sites in the IA/SA form resulted in faster fluorescence recovery, significantly higher D_{eff} and lower $t_{1/2}$ compared to WT ($P < 0.05$ for WT+Kae and $P < 0.001$ for IA/SA), suggesting that inhibition of phosphorylation reduces the affinity of HIF-1 α for immobile nuclear elements. This was reinforced by the phosphomimetic SE form, which exhibited the exact reverse: slower and decreased fluorescence recovery, remarkably lower D_{eff} and f_{mob} , and much higher $t_{1/2}$ compared to the WT form ($P < 0.001$), suggesting that irreversible phosphorylation of the ERK site renders a significant fraction of HIF-1 α virtually immobile inside the nucleus by strong tethering to chromatin or nuclear matrix.

3.1.2. A phosphomimetic mutation decreases the intranuclear mobility of HIF-1 α ETD

The FRAP results with the full-length HIF-1 α SE form were largely confirmed by using Huh7 cells

expressing the 43-amino acid long ETD (amino acids 616–658) as an independent GFP-fusion peptide in its WT or mutant forms (Fig. 1B, Fig. S3). Specifically, the phosphomimetic mutation in ETD (ETD-SE) caused lower mobility compared to the other ETD forms ($P < 0.05$), which exhibited similar diffusion kinetics (Table S4). These results suggested that ETD mediates phosphorylation-dependent tethering of HIF-1 α onto nuclear/chromatin structures. As the ETD lies away and is distinct from the DNA binding, heterodimerization, and transactivation domains, its tethering properties could only be explained by specific and strong interaction of its phosphorylated form with certain, as yet unknown, nuclear components.

3.2. HIF-1 α carrying a phosphomimetic mutation binds directly to the carboxy-terminal domain of NPM1

3.2.1. Identification of NPM1 as an interacting protein of HIF-1 α ETD

In order to identify phosphorylation-dependent HIF-1 α ETD interactions that could explain its affinity for chromatin/nuclear structures, different forms of GST-tagged ETD peptides that had been expressed in *E. coli*, purified, and immobilized on GSH-agarose beads were used as baits in pull-down assays with total HeLa cell protein extracts. After elution of bound proteins by GSH, a protein with an apparent molecular mass 36 kDa could be detected to bind specifically to the phosphomimetic GST-ETD-SE form but not to the phospho-deficient GST-ETD-SA form or the WT GST-ETD form, which as being recombinant should be in the nonphosphorylated form (Fig. S4A). To facilitate identification of the 36 kDa protein by mass spectroscopy, the experiment was repeated with elution of the bound proteins by TEV-mediated cleavage of the GST moiety of the immobilized baits, which revealed again the presence of the 36 kDa protein in specific association with ETD-SE (Fig. 1C; left). Subsequent mass spectrometry analysis of the 36 kDa band, identified it as nucleophosmin (NPM1, B23; Table S5). Its identity was further confirmed by immunoblotting analysis using an anti-NPM1 antibody (Fig. 1C; right), which also revealed weak binding of NPM1 to WT ETD.

Nucleophosmin is a widely expressed, mostly nucleolar, protein involved in diverse nuclear functions [26,27]. Interestingly, NPM1 expression can be stimulated under hypoxia by HIF-1 [28], and like HIF-1 α , NPM1 is often overexpressed in solid tumors [29].

NPM1 consists of a N-terminal oligomerization (core) domain, an acidic domain harboring ribonuclease and histone chaperone activity and a basic C-terminal domain containing an aromatic stretch responsible for nucleic acid binding, especially G-rich DNA, nucleolar localization, and ATP binding (Fig. 1D). NPM1 isoform B23.1 is the most abundant form, while B23.2 is a common splicing variant that lacks the C-terminal aromatic stretch [30].

3.2.2. The C-terminal domain of NPM1 is required for direct binding to HIF-1 α ETD *in vitro*

To verify the interaction between HIF-1 α ETD and NPM1, pull-down assays with HeLa cell extracts were repeated using as baits a larger recombinant *E. coli* expressed and purified GST-tagged part of HIF-1 α comprising amino acids 348–826, in WT or mutant forms (Figs S1 and S4B). The results shown in Fig. 1E confirmed the stronger binding of GST-HIF-1 α (348–826) to native HeLa NPM1 in the presence of the phosphomimetic mutation (SE) as compared to the WT or SA mutant. To further test whether the identified interaction of the ETD region of HIF-1 α with NPM1 was direct and not mediated by another, as yet unknown, protein, recombinant *E. coli* expressed and purified GST-tagged NPM1 splice variants B23.1 and B23.2 [12,13] (Fig. S4C) were immobilized on GSH-agarose beads and used as baits in pull-down assays with either hypoxic HeLa cell extracts (expressing endogenous native HIF-1 α) or recombinant *E. coli* expressed and purified HIF-1 α (348–826)SE (Fig. S4B). As shown in Fig. 1F,G, both native HeLa HIF-1 α and purified recombinant HIF-1 α (348–826)SE bound only to the B23.1 and not to the B23.2 form of recombinant NPM1, suggesting that the C-terminal aromatic domain of NPM1 is necessary for the formation of the NPM1/HIF-1 α complex. To confirm this, additional recombinant *E. coli* expressed and purified GST-tagged NPM1 truncation mutants (Fig. 1D, Fig. S4C; [12]) were tested for binding to the TAT-ETD(SE)-FLAG peptide [11], which, due to its small size (Fig. S4B), could be expressed in *E. coli* and purified in a more stable and abundant form than HIF-1 α (348–826)SE. As shown in Fig. 1H, TAT-ETD(SE)-FLAG is readily associated with the GST-B23.1 NPM1 variant and GST-NPM1(CR) but not with the GST-B23.2 variant or GST-NPM1(Δ C). Only weak binding of TAT-ETD(SE)-FLAG to GST-NPM1(Δ N) was detected, probably because of conformational issues with the construct.

Taken together, the results of the *in vitro* binding assays showing specific association between

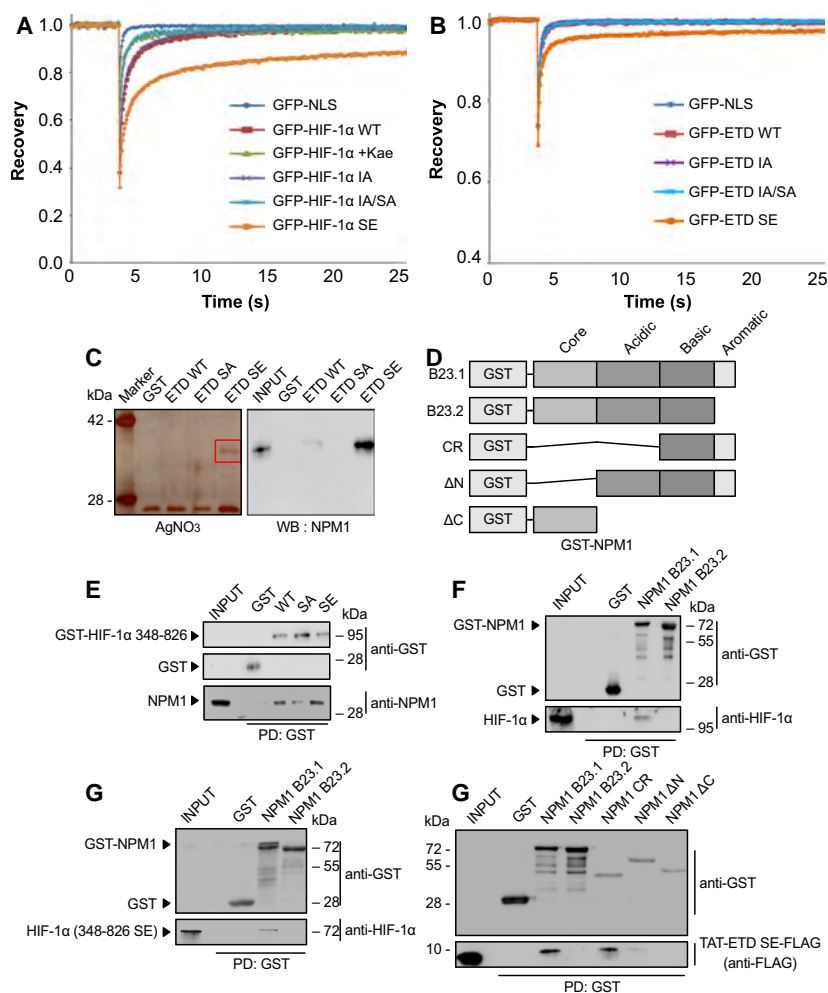


Fig. 1. Identification of NPM1 as a phosphorylation-dependent and direct interaction partner of HIF-1 α . (A,B) Phosphorylation of HIF-1 α by ERK increases its affinity for intranuclear immobile elements. Huh7 cells overexpressing the indicated full-length GFP-tagged (A) HIF-1 α or (B) HIF-1 α ETD forms were grown under normoxia and analyzed with FRAP 24 h post-transfection. When needed, cells were treated with 50 μ M of kaempferol for 4 h as specified (WT+kae), in order to inhibit ERK activation. Curves represent the mean corrected fluorescence intensities over time. Curves represent the mean of two independent experiments (number of analyzed cells (*n*) are given in Table S4; \pm SD for each curve is shown in Figs S2 and S3. (C) Analysis of HeLa cell proteins bound to different recombinant, purified, and immobilized on GSH-agarose mutant forms of the GST-HIF-1 α (ETD) (as indicated) after their elution by TEV-mediated cleavage of the GST moiety. Left panel: Analysis by SDS/PAGE/AgNO₃ staining (red square specifies gel section analyzed by mass spectrometry). Right panel: Analysis by western blotting (WB) with an anti-NPM1 antibody. Images are representative of three independent experiments (see also Fig. S4A). (D) Schematic representation of domain structure of full-length GST-tagged NPM1 isoforms (B23.1 or B23.2) or their truncation forms CR, Δ N, and Δ C used in the following *in vitro* binding assays. (E) Soluble HeLa protein extracts (INPUT) were mixed with GSH-agarose beads carrying GST or different mutant forms of GST-HIF-1 α (348–826) (as indicated), and bound proteins (PD: Pull-Down) were analyzed by immunoblotting using antibodies against GST or NPM1 proteins. (F–H) GSH-agarose beads carrying GST alone or different bacterially expressed and purified forms/domains of GST-NPM1 were mixed with soluble protein extracts from hypoxic HeLa cells (F; INPUT) or bacterially expressed and purified phosphomimetic mutant HIF-1 α (348–826)SE (G; INPUT) or bacterially expressed and purified phosphomimetic TAT-ETD-SE-FLAG peptide (H; INPUT) and bound proteins (PD: Pull-Down) were analyzed by immunoblotting using antibodies against GST, HIF-1 α , and Flag (as indicated). Panels C, E, F, G, H show single blot areas that correspond to the indicated molecular weight marker and were cut after blotting for analysis with different antibodies; images in E, F, G, H are representative of two independent experiments.

recombinant *E. coli* expressed and purified protein constructs of HIF-1 α and NPM1 as well as between recombinant HIF-1 α or NPM1 constructs and

endogenous native HeLa NPM1 or HIF-1 α , respectively, are compatible with direct binding of HIF-1 α to NPM1 mediated by the phosphorylated form of

ETD and the C-terminal aromatic domain of NPM1.

3.3. NPM1 association with HIF-1 α is regulated by ERK1/2 and facilitates HIF-1 transcriptional activity

3.3.1. Phosphorylation-dependent physical association between HIF-1 α and NPM1 in cells under hypoxia

It was then tested whether the interaction between HIF-1 α and NPM1 also occurs inside living cells under the control of the ERK1/2 pathway using immunoprecipitation (IP) experiments. Endogenous NPM1 was associated with HIF-1 α in HeLa cells grown under hypoxic conditions (Fig. 2A). Importantly, their association was reduced after ERK1/2 pathway inactivation by either using the U0126 MEK-selective inhibitor or withdrawing the serum from the growth medium of the cells. To corroborate that the requirement of ERK1/2 activation for the HIF-1 α /NPM1 association reflects the need for modification of the HIF-1 α ERK sites, mutant forms of GFP-HIF-1 α were immunoprecipitated from overexpressing HeLa cells using an anti-GFP antibody. NPM1 was readily detectable within IPs of WT HIF-1 α , while its association with the phosphodeficient HIF-1 α IA/SA mutant was much weaker (Fig. 2B). In contrast, association of NPM1 with the phosphomimetic HIF-1 α SE mutant was significantly stronger.

3.3.2. Phosphorylation-dependent colocalization of HIF-1 α and NPM1 in nuclei of cells under hypoxia

To substantiate the above, both endogenous HIF-1 α and NPM1 were localized in hypoxic HeLa cells by immunofluorescence microscopy. As shown in Fig. 2C, there is substantial colocalization of the two proteins inside the cell nucleus and especially at the nucleolar periphery. This colocalization is specific as it was largely abolished upon inhibition of the ERK1/2 pathway, concomitant with the translocation of a significant HIF-1 α fraction outside the nucleus. It is worth mentioning that NPM1 localization was not affected by either hypoxic treatment or inhibition of ERK1/2 activation and remained nuclear with enrichment at the nucleolar periphery under all conditions (Compare Fig. 2C with Fig. S5).

Taken together, the IP and microscopic data from HeLa cells are in full agreement with the *in vitro* binding data and show that HIF-1 α association with

NPM1 at specific intranuclear sites is under the control of ETD phosphorylation by ERK1/2.

3.3.3. NPM1 associates with the HIF-1 α /ARNT heterodimer and increases its transcriptional activity

The question addressed next was if and how association with NPM1 affects the function of HIF-1 α . In order for HIF-1 α to exert its transactivation activity, it must form a DNA-binding heterodimer with ARNT. Initially, and in accordance with HIF-1 α immunoprecipitations, HIF-1 α could also be coimmunoprecipitated with NPM1 from hypoxic HeLa cells but not in the presence of the MEK inhibitor (Fig. 2D, left). This experiment also established that NPM1 does not detectably associate with the second HIF- α isoform, HIF-2 α , as it could be expected by the fact that the amino acid sequence of HIF-1 α ETD is not conserved in HIF-2 α (Fig. 2D, right). Furthermore, the presence of ARNT in the NPM1 IP implied that HIF-1 α might preferentially bind to NPM1 after its association with ARNT (Fig. 2D, left). To further investigate how the formation of HIF-1 heterodimer may influence the HIF-1 α /NPM1 association, HeLa cells were transfected with GFP-tagged HIF-1 α forms carrying mutations that abolish or mimic phosphorylation by CK1 δ (Fig. S1), that either strengthen or weaken HIF-1 α interaction with ARNT, respectively [8]. Subsequent immunoprecipitation with an anti-GFP antibody (Fig. 2E) revealed that the GFP-HIF-1 α S247A mutant form that interacts stronger with ARNT also exhibits higher affinity for NPM1 compared to the GFP-HIF-1 α S247D mutant that largely loses its association with both ARNT and NPM1. These results suggest that HIF-1 α binds to NPM1 while also in a complex with ARNT and makes likely that the association between NPM1 and HIF-1 plays a role in HIF-1-mediated transcription of hypoxia target genes.

Indeed, silencing of NPM1 expression in HeLa cells grown under hypoxia (Fig. 3A; insets) significantly lowered HIF-1 transcriptional activity using a reporter gene assay (Fig. 3A; graph). Inhibition of HIF-1 activity was also confirmed by showing that depletion of NPM1 in hypoxic HeLa cells also greatly reduced the expression of two specific HIF-1 target genes, *PH4A1* ([31]; Fig. 3B) and *LPIN1* ([14]; Fig. 3C). In addition to *LPIN1* mRNA levels, Lipin1 protein levels were also reduced upon NPM1 silencing under hypoxia (Fig. S6A). Therefore, the phosphorylation-dependent association between HIF-1 α ETD and NPM1 has important functional significance since NPM1 is essential for optimal transcriptional activity of HIF-1 in HeLa cells.

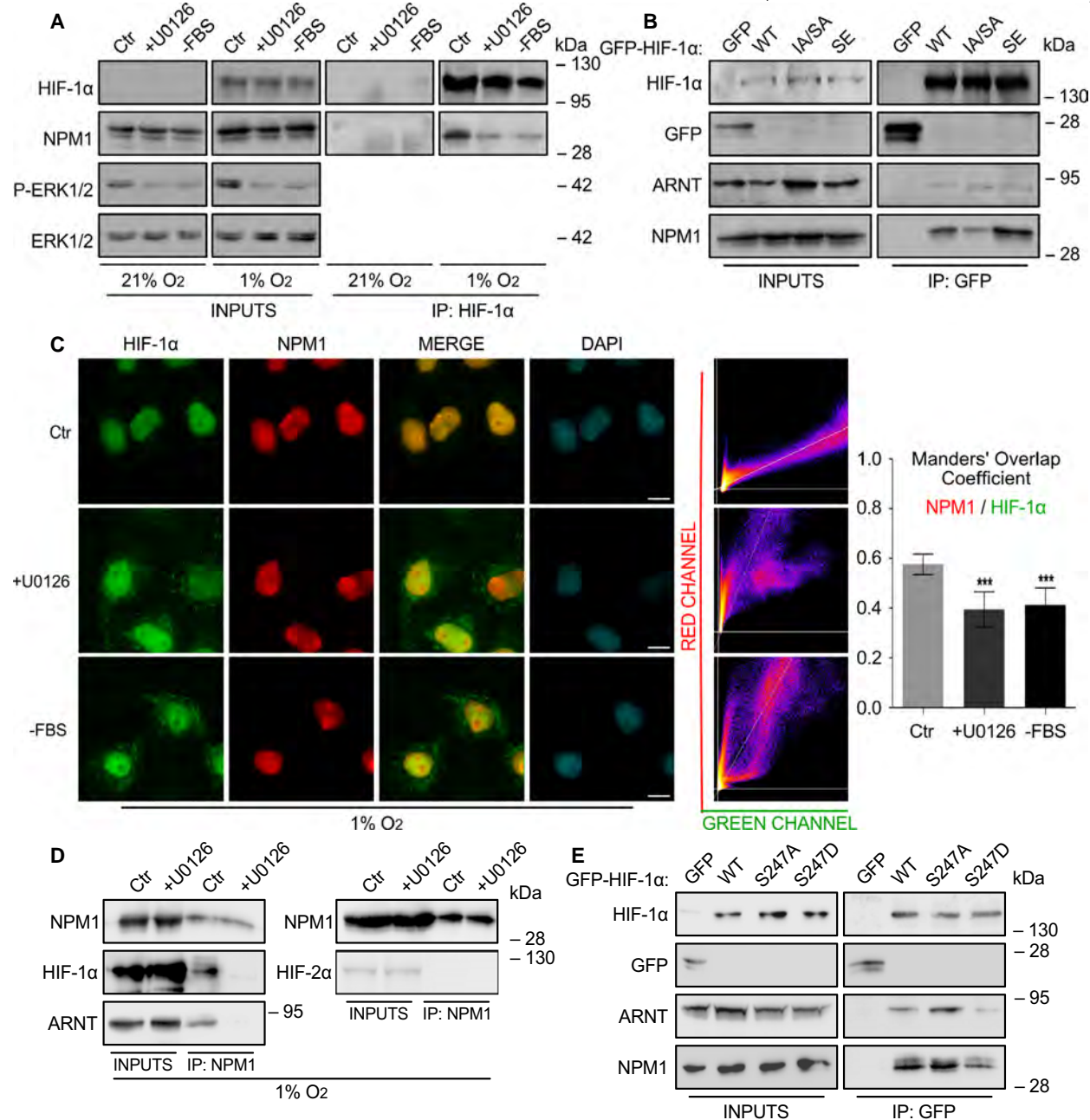


Fig. 2. The association of HIF-1 α with NPM1 inside HeLa cells is regulated by ERK1/2. (A) Soluble proteins (INPUTS) or anti-HIF-1 α IP of HeLa cells grown at 21% or 1% O₂ for 16 h, untreated (Ctrl) or treated with 5 μ M U0126 (+U0126) or deprived of serum (-FBS) were analyzed by immunoblotting using antibodies against HIF-1 α , NPM1, phospho-ERK1/2 and ERK1/2 as indicated. (B) Soluble extracts (INPUTS) or anti-GFP IP of HeLa cells transiently expressing GFP or GFP-tagged full-length HIF-1 α WT, IA/SA, SE forms were analyzed at 20 h post-transfection by immunoblotting using antibodies against HIF-1 α , GFP, ARNT, and NPM1 as indicated. (C) Immunofluorescence microscopy analysis of cells grown at 1% O₂ and treated as in (A) using antibodies against HIF-1 α (Green) or NPM1 (Red). Nuclei were stained with DAPI (Cyan; Scale bars: 10 μ m). Middle panels are scatterplots of pixel intensities of HIF-1 α and NPM1 signals. Graph shows the Manders' overlap coefficient as measured in nuclei-restricted fluorescence in 35 cells from two independent experiments in each condition \pm SEM (***) $P < 0.001$; Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's *t*-test. (D) Soluble proteins (INPUTS) or anti-NPM1 IP of HeLa cells incubated at 1% O₂ for 16 h and treated (+U0126) or not (Ctrl) with 5 μ M U0126 were analyzed by SDS/PAGE and western blotting using antibodies against NPM1, HIF-1 α , and ARNT as indicated. (E) Soluble extracts (INPUTS) or anti-GFP IP of HeLa cells transiently expressing GFP or GFP-tagged full-length HIF-1 α WT, S247A, S247D forms were analyzed at 20 h post-transfection by immunoblotting using antibodies against HIF-1 α , GFP, ARNT, and NPM1 as indicated. Certain panels in A, B, D, E show single blot areas that correspond to the indicated molecular weight marker and were cut after blotting for analysis with different antibodies; images in A, B, D, E are representative of three (A) or two (B, D, E) independent experiments.

3.4. NPM1 associates with HRE-containing chromatin and enables stable binding of phosphorylated HIF-1

3.4.1. NPM1 specifically occupies HIF-1-binding sites on chromatin

In order to gain insight into the mechanism through which NPM1 stimulates HIF-1 transcriptional activity, we analyzed two gene promoters (*LPIN1* and *AGPAT2*) that we previously characterized as specific HIF-1 targets in Huh7 cells [14,17]. *LPIN1* and *AGPAT2* promoters contain 8 and 6 predicted HRE-like sequences, respectively, but only one of them was shown to be functional both in terms of driving HIF-1-dependent transcription and associating physically with HIF-1 α (shown schematically in Fig. S6B). We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) with anti-NPM1 antibodies followed by re-ChIP of the NPM1-associated chromatin with anti-HIF-1 α antibodies (i.e., ChIP-re-ChIP) in Huh7 cells grown either at normoxia or hypoxia and treated with or without U0126. The results of the first ChIP (anti-NPM1) revealed that the functional HREs of the *LPIN1* and *AGPAT2* promoters that constitute HIF-1 binding sites are enriched in the NPM1 ChIPs, irrespective of oxygen levels and ERK activation status, while DNA stretches containing the nonfunctional *AGPAT2* HRE-like sequences (HRE1–3 and 5–6) were not found associated with NPM1 (Fig. 3D, Fig. S6C), suggesting that NPM1 is constitutively linked to two hypoxia-inducible promoters and only to their functional ‘true’ HREs that serve as HIF-1 binding sites. Analysis of the re-ChIP (anti-HIF-1 α) results showed that HIF-1 α co-occupies with NPM1 the functional *LPIN1* or *AGPAT2* HREs only under hypoxia and only in the presence of active ERK1/2 (Fig. 3E, Fig. S6D), suggesting that phosphorylation of HIF-1 α by ERK1/2 enables binding to NPM1, which in turn promotes stable HIF-1/HRE association and efficient gene activation.

To further verify the specificity of the interaction between NPM1 and chromatin containing HIF-1 binding sites, we tested its association with four additional promoter areas (shown schematically in Fig. S7A) in Huh7 cells: the *HSPB1* gene promoter area containing two HRE sequences previously shown to serve as HIF-1 binding sites (as positive control; [20]), an *HSPB1* gene promoter area lacking HRE-like sequences (as negative control), the *HAMP* gene promoter area containing two HRE-like sequences which, however, do not constitute true HIF-1 binding sites (as negative control; [18]), and an area of the promoter of *CASP9*, which neither

contains HRE-like sequences nor is a known target of HIF-1 (as negative control, [19]). The ChIP results from Huh7 cells with anti-NPM1 antibodies showed association of NPM1 with the positive control promoter area (*HSPB1* HRE; Fig. S7B, top left panel) but no detectable binding to the three promoter areas used as negative controls (Fig. S7B, left panel HPSPneg; and S7C). Analysis of re-ChIP with anti-HIF-1 α antibodies confirmed that the HRE-containing *HSPB1* gene promoter area, used as positive control for binding to NPM1, does indeed constitute a true HIF-1 binding site under hypoxic and ERK1/2-activating conditions (Fig. S7B, right panel), and is co-occupied by both NPM1 and HIF-1 just like the *LPIN1* and *AGPAT2* promoter areas analyzed above. Finally, the ChIP-re-ChIP experiment was repeated in the reverse order in Huh7 cells, that is, first ChIP with anti-HIF-1 α antibodies followed by re-ChIP of the HIF-1 α -associated chromatin with anti-NPM1 antibodies. The results showed that the HIF-1-binding sites of the *LPIN1* and *AGPAT2* promoters were also enriched in the NPM1 re-ChIPs from the samples only containing HIF-1-associated chromatin (Fig. S7D). Therefore, all our ChIP results are consistent with specific association of NPM1 with active hypoxia-targeted promoters and simultaneous occupation of HIF-1 binding chromatin sites by both NPM1 and phosphorylated HIF-1.

3.4.2. NPM1 is required for stable binding of HIF-1 onto HRE-containing chromatin

Taking the results above (Fig. 3D,E) together with the requirement of NPM1 for HIF-1 transcriptional activity (Fig. 3A–C), it can be suggested that phosphorylation of HIF-1 α by ERK1/2 enables its binding of NPM1, which in turn stabilizes HIF-1 association with its target HRE and leads to efficient gene activation. This is indeed supported by ChIP experiments showing that binding of HIF-1 α to the *LPIN1* or *AGPAT2* functional true HREs was greatly inhibited when NPM1 expression was silenced in Huh7 cells (Fig. 3F, Fig. S6E). It should be noted here that this ChIP experiment was performed after 8 h incubation under hypoxia, a time point at which downregulation of NPM1 expression does not detectably affect cellular fitness, which starts decreasing by onset of apoptosis after at least 24 h of hypoxic treatment (see below; Fig. 5). Furthermore, NPM1 silencing in HeLa cells also resulted in reduced association of HIF-1 α with acetylated histone 4 (H4), a marker of active ‘open chromatin’ (Fig. S6F). Therefore, strong interaction of HIF-1 with HRE-containing active promoters requires the phosphorylation-dependent association of HIF-1 α

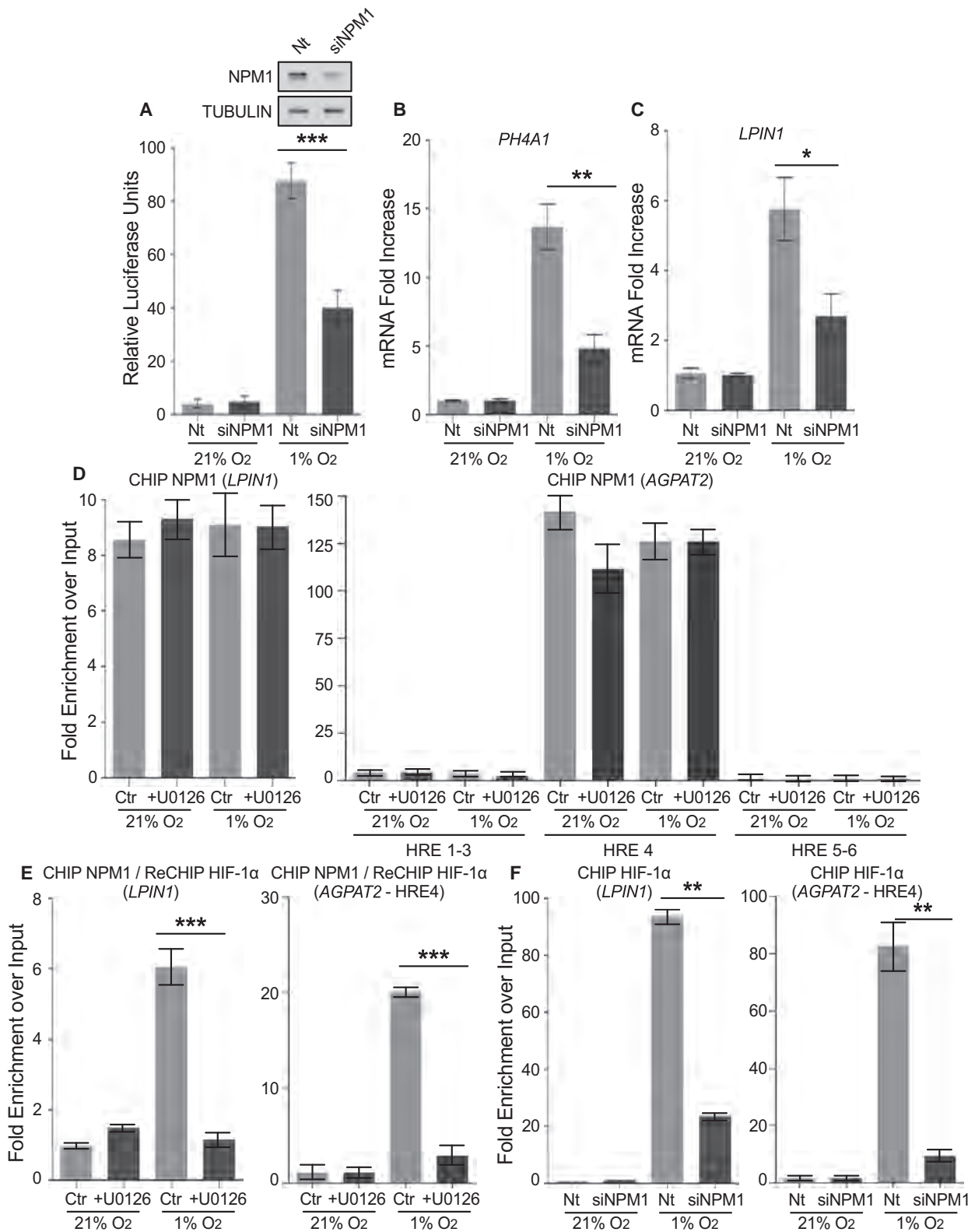


Fig. 3. NPM1 is essential for HIF-1 transcriptional activity and stable binding to HRE. (A) Transcriptional activity of HIF-1 in HeLa cells, cotransfected with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) and the pGL3–5HRE-VEGF and pCI-Renilla reporter plasmids and grown at 21% or 1% O₂ for 16 h. Values were determined as ratio of firefly luciferase activity over renilla activity and represent the mean of two independent experiments performed in quadruplets \pm SEM (*** P < 0.001). Immunoblots shown as inset demonstrate NPM1 levels without (Nt) or after NPM1 silencing (siNPM1). Tubulin was used as loading control. (B, C) mRNA levels of HIF-1 target genes *P4HA1-1* (B) or *LPIN1* (C) as determined by RT-PCR in HeLa cells treated with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) and grown at 21% or 1% O₂ for 16 h. Results are shown as fold increase in relation to respective normoxic conditions and represent the mean of two independent experiments performed in triplicates \pm SD (n = 6; * P < 0.05, ** P < 0.01). (D, E) RT-PCR analysis of sequential chromatin immunoprecipitation (ChIP-re-ChIP) using first anti-NPM1 (ChIP; D) and then anti-HIF-1 α antibodies (re-ChIP; E) from Huh7 cells grown at 21% or 1% O₂ for 24 h with or without 10 μ M U0126 (as indicated). Left panels in (D) and (E) show analysis using primers for the area of the *LPIN1* promoter containing a known HIF-1 binding site (for details see also Fig. S6B). Right panels in (D) and (E) show analysis using primers for the areas of the *AGPAT2* promoter containing a known HIF-1 binding site (HRE4) or nonfunctional HRE-like sequences (HRE1–3, HRE5–6; for details see also Fig. S6B). (F) RT-PCR analysis of ChIP with anti-HIF-1 α antibodies from Huh7 cells treated with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) for 24 h and incubated at 21% or 1% O₂ for 8 h. Left panel: analysis using primers for the HIF-1 binding site in the *LPIN1* promoter. Right panel: analysis using primers for the HIF-1 binding site (HRE4) in the *AGPAT2* promoter. Results represent the mean of two independent experiments analyzed in triplicates \pm SD (unpaired t -test; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

with the constitutively expressed and chromatin-bound NPM1. In fact, as NPM1 expression has been previously shown to be induced by HIF-1 and hypoxia [28], a finding in agreement with our data (see Fig. S6A,F), our results also suggest the operation of an ERK-controlled positive feed-forward mechanism, based on amplification of HIF-1 activity following upregulation of NPM1 expression by HIF-1 itself.

3.5. NPM1 is required for the cellular transcriptional response to hypoxia

To address the above hypothesis, we performed sequencing of RNA extracted from HeLa cells subjected or not to NPM1 silencing, both under normoxia or hypoxia, or HIF-1 α silencing under hypoxia. In cells treated with control siRNAs (Nt), hypoxia heavily affected gene expression, with 1068 genes exhibiting altered mRNA levels (487 downregulated, 581 upregulated) when compared to normoxia (Fig. S8A). These genes are mostly involved in transcriptional regulation, response to hypoxia or drugs and control of apoptosis, angiogenesis, cell cycle, and metabolism (Fig. S8B). Knocking-down NPM1 in normoxic cells resulted in the differential expression of a limited number of genes, 114 in total (68 down-, 46 upregulated), which are mainly implicated in functions related to the immune response (Fig. 4A left panel; Fig. S8C,D) a subset of which (33 genes) were also regulated by HIF-1 (Fig. S8C,E). In contrast, when NPM1 silencing was performed in hypoxic cells (Fig. 4A, right panel), it had a profound effect on gene expression with 761 deregulated genes (320 down-, 441 upregulated), 123 of which were common with the ones affected by the hypoxic shift (Fig. 4B). A similar, strong, effect on differential gene expression was also observed when HIF-1 α was silenced under hypoxia with 844 deregulated genes (561 down-,

283 upregulated; Fig. 4A, middle panel), 257 of which were common with the ones affected by hypoxia (as compared to normoxia; Fig. 4B). Analysis of those results revealed a significant number of genes commonly regulated by HIF-1 α and NPM1 (130 genes in total, out of which 36 also deregulated during the hypoxic shift; Fig. 4B). These common genes were involved in processes known to rely on HIF-1 and hypoxia-mediated reprogramming, such as cell adhesion, migration and ECM organization, redox and apoptosis control, metabolism, and angiogenesis (Fig. S8F). From the 67 genes that were upregulated by hypoxia and repressed by both NPM1 and HIF-1 α knockdown (Fig. S9), marker genes were selected as typical examples of NPM1/HIF-1 α -dependent cellular functions (*ALDOC*: metabolism, *BIRC3*: apoptosis, *TGFBI*: angiogenesis and ECM organization, *FA2H*: oxidation-reduction), for validation of the RNA-sequencing results with RT-PCR. Indeed, expression of *ALDOC*, *BIRC3*, *TGFBI*, and *FA2H* was decreased when either HIF-1 α or NPM1 were silenced under hypoxia (Fig. 4C). These data support the notion that NPM1, by stabilizing the interaction between HIF-1 and HRE-containing chromatin, supports the general transcriptional response to hypoxia, at least in cells (such as most cancer cells) in which ERK1/2 have been activated.

3.6. NPM1 and its association with HIF-1 are necessary for cancer cell adaptation and survival under hypoxia

3.6.1. NPM1 is required for HIF-1-dependent reprogramming of lipid metabolism under hypoxia

To validate the functional significance of our findings for the ability of cells to survive and proliferate

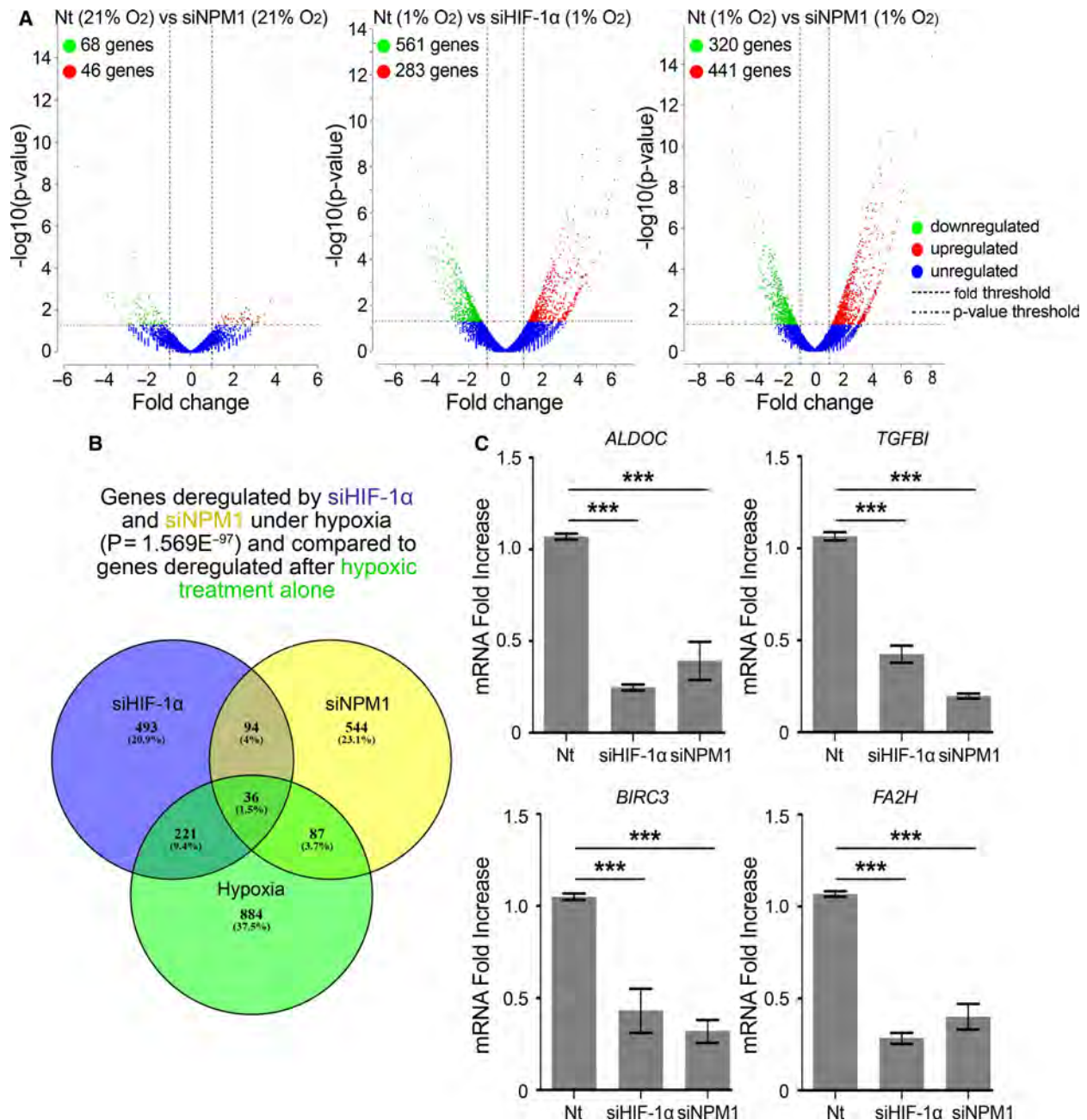


Fig. 4. HIF-1 α and NPM1 coregulate a significant number of genes under hypoxia. HeLa cells treated with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) for 24 h and incubated at 21% or 1% O₂ for 24 h were then processed for 3' mRNA sequencing. Values represent the mean of two independent experiments. (A) Volcano plots of genes showing significantly different expression levels after NPM1 (siNPM1) or HIF-1 α (siHIF-1 α) silencing compared to control (Nt) in cells under normoxia (21% O₂) or hypoxia (1% O₂). Normalized enrichment score from Gene Set Enrichment Analysis is shown. Statistical analysis was performed with DESeq through the Bioconductor package metaseqR [21]; P -value < 0.05. (B) Venn diagram representing the number of genes significantly deregulated after HIF-1 α (Magenta) or NPM1 (Yellow) silencing under hypoxia in comparison to genes deregulated after hypoxic treatment alone (Green). (C) *ALDOC*, *TGFBI*, *BIRC3*, and *FA2H* expression levels were determined by RT-PCR as indicated. Results are shown as fold decrease in relation to the respective control conditions (Nt) and represent the mean of two independent experiments performed in quadruplet \pm SD ($n = 8$; *** $P < 0.001$; Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's t -test).

under mild hypoxic conditions (1% O₂), we tested various cellular functions known to depend on HIF-1. We have previously shown that cancer cells respond to hypoxia by accumulating triacylglycerol in lipid droplets [8,14]. In agreement with our transcriptional data (Fig. 3A–C), silencing of NPM1 significantly decreased lipid droplet accumulation under hypoxia in HeLa cells, whereas there was no effect under normoxia (Fig. 5A), suggesting that NPM1 expression is important for metabolic adaptation to hypoxia.

3.6.2. Depletion of NPM1 induces cell death by apoptosis under hypoxia

In addition to inhibition of metabolic reprogramming, silencing of NPM1 also increased cell death rate only under hypoxia (Fig. 5B) and stimulated apoptosis as evidenced by activation and cleavage of caspase 3 (Fig. 5C), loss of membrane asymmetry (Annexin V staining; Fig. 5D, Fig. S10A) and fragmentation of DNA (TUNEL assay; Fig. 5E, Fig. S10B) in HeLa cells. In all these processes, the effects of NPM1 silencing were visible or exacerbated only after incubation for 24 h or more under hypoxia. Therefore, lack of NPM1 has little effect on survival/proliferation of cells grown under normoxic conditions, but becomes deleterious under low oxygen conditions, due to suboptimal activity of HIF-1 and curtailed adaptive transcriptional response.

3.6.3. Apoptosis-inducing cell-penetrating ETD-based peptides disrupt the HIF-1 α /NPM1 complex

A question remaining is whether NPM1 depletion does not only affect HIF-1-dependent processes but also has unspecified negative effects unrelated to HIF-1. In a recent study [11], we could show that inclusion of cell-penetrating peptides, comprising the ETD region of HIF-1 α in various mutant forms, in the culture medium of three different types of cancer cells could drastically reduce HIF-1 activity (without affecting HIF-2) and inhibit proliferation as well as migratory and colony formation abilities of the cells and trigger apoptotic death only under hypoxic conditions. In view of the results reported herein, we tested whether the same peptides could affect the HIF-1 α /NPM1 association. Introduction of these TAT-ETD-FLAG peptides into hypoxic Huh7 cells followed by their IP showed that peptides that contain either sites for ERK1/2 phosphorylation (WT, IA) or a phosphomimetic mutation (SE), bound efficiently to endogenous NPM1, while the phospho-deficient SA form displayed no

interaction (Fig. 5F; upper panels), starkly reproducing the *in vitro* binding data shown in Fig. 1. Under the same conditions, IP of HIF-1 α showed that HIF-1 α /NPM1 association could be disrupted by the NPM1-binding ETD peptides (Fig. 5F; lower panels). These results strongly suggest that it is not just the presence of NPM1 but rather its ability to interact with ERK1/2-modified HIF-1 α that supports the transcriptional function of HIF-1 and cancer cell adaptation to hypoxia.

3.7. Expression of NPM1 and NPM1/HIF-1 co-upregulated genes is increased in human cancers and correlates with hypoxic tumor status and bad patient prognosis

3.7.1. Expression of NPM1 correlates with HIF-1 and is a bad prognostic factor in different cancer types

In order to examine whether the phosphorylation-dependent interaction between HIF-1 α and NPM1 may play a role in human patient tumor growth, we analyzed *NPM1* expression as well as our RNA-seq datasets in the context of the publicly available gene expression data from TCGA and GTEx using the GEPIA2 web-based platform [23]. NPM1, much like HIF-1, expression has been long known to be increased in certain human tumors [29]. Indeed, the data mining process with GEPIA2 for analysis of *NPM1* mRNA levels in 33 different human cancer types (Table S6) revealed that *NPM1* expression is significantly higher in 11 types of human tumors in comparison to paired normal tissues (Fig. S11A,B). In these 11 cancer types, *NPM1* expression is positively correlated with expression of *HIF1A* (Fig. 6A) but not with *EPAS1* (Fig. 6B) which encodes HIF-2 α , in line with our data showing that NPM1 interacts only with the HIF-1 α isoform (Fig. 2D). Interestingly, high *NPM1* expression is associated with negative prognostic outcome in the combined cohort of patients with these 11 cancer types (Fig. 6C, left panel) and with higher risk in seven of them when analyzed individually (Fig. 6C, right panel).

3.7.2. Expression of HIF-1/NPM1 co-upregulated genes correlates with a hypoxic signature and poor patient prognosis in three different cancer types

To then test the relationship between NPM1 and HIF-1 α in the high NPM1 cancer types, we analyzed the expression of the 67 genes commonly upregulated by NPM1 and HIF-1 α under hypoxia (Fig. S9). The

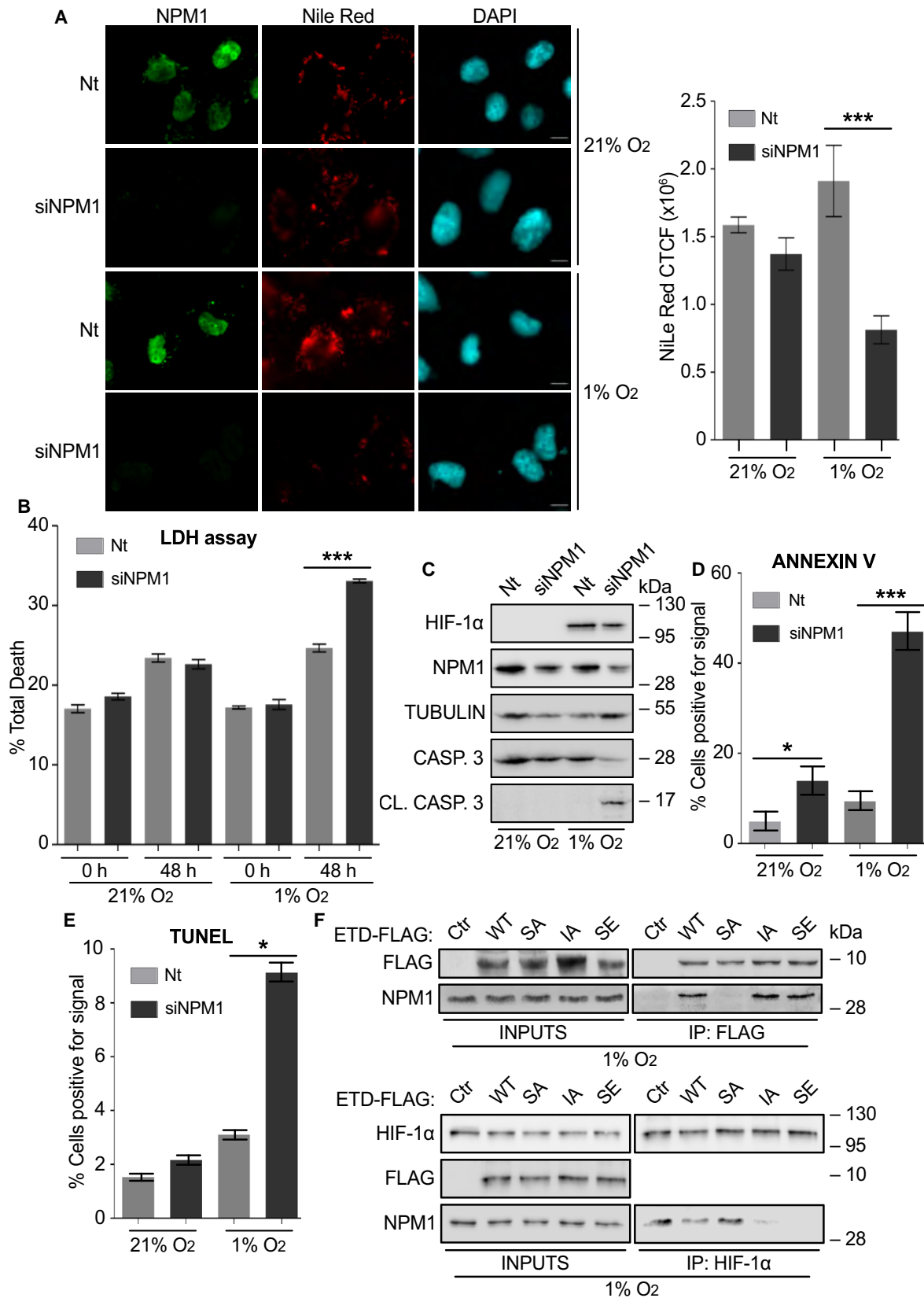


Fig. 5. The NPM1/HIF-1 α interaction is essential for HIF-1-mediated metabolic adaptation and survival of cancer cell under hypoxia. (A) Left: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells treated with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) for 24 h, incubated at 21% or 1% O₂ for 24 h and then processed for detection of NPM1 (green) and lipid droplets (red). Nuclei are stained with DAPI (cyan; Scale bars: 10 μ m). Right: Graph analysis of Nile Red fluorescent signal quantified with ImageJ software. Values represent corrected total cell fluorescence (CTCF) and are mean \pm SEM of measurements of 35 individual cells per condition (Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's *t*-test, ****P* < 0.001). (B) Cell death analysis in HeLa cells transfected with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) and, 24 h post-transfection, incubated at 21% or 1% O₂ for 48 h. Results are the mean of two independent experiments performed in quadruplets \pm SEM (Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's *t*-test, ****P* < 0.001). (C) Immunoblotting analysis of lysates of HeLa cells transfected with control (Nt) or NPM1 siRNA (siNPM1) and incubated at 21% or 1% O₂ for 24 h using antibodies against HIF-1 α , NPM1, tubulin, uncleaved (inactive) caspase 3 and cleaved (active) caspase 3 as indicated. Certain panels show single blot areas that correspond to the indicated molecular weight marker and were cut after blotting for analysis with different antibodies. (D) Quantification of Annexin V staining as detected by fluorescence microscopy of HeLa cells treated as in (C). Values are given as % ratio of Annexin V-positive cells in relation to the total number of cells per condition \pm SEM (*n* = 150 cells; Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05; ****P* < 0.001). (E) Quantification of TUNEL fluorescent signal in HeLa cells treated as in (C). Values are given as % ratio of fluorescence positive cells in relation to the total number cells \pm SEM (*n* = 250 cells; Statistical variance between two groups of values was calculated by two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05). (F) Immunoblotting of soluble extracts (INPUTS) and anti-FLAG (upper panels) or anti-HIF-1 α (lower panels) IP of Huh7 cells grown at 1% O₂ and treated with ~380 nm of the indicated TAT-ETD-FLAG forms for 5 h, using antibodies against Flag, HIF-1 α , and NPM1 as indicated. Panels show single blot areas that correspond to the indicated molecular weight marker and were cut after blotting for analysis with different antibodies; images are representative of two independent experiments.

67 NPM1/HIF-1 α -dependent gene signature was highly expressed in three cancer types with elevated NPM1 expression, namely lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma (DLBC), glioblastoma multiforme (GBM), and thymoma (THYM; Fig. S11C). To analyze the expression of known hypoxia target genes, we created a hypoxia gene signature, which comprised a subset of 23 genes with the strongest functional correlation with HIF-1 (Fig. S12A; Table S7). Based on the expression of this hypoxic gene signature, five out of the 11 cancer types with high NPM1 could be characterized as 'hypoxic' (Fig. S12B). Moreover, three of the 'hypoxic' cancer types were the same as the ones exhibiting significantly high expression levels of the 67 NPM1/HIF-1 α -dependent gene signature (namely, DLBC, GBM, and THYM; Fig. S11C). Additionally, in these three cancer types not only *NPM1* (Fig. 6D) and *HIF1A* (Fig. 6E) expression but also the expression of the hypoxic gene signature (Fig. 6F) positively correlated with the expression of the 67 genes commonly upregulated by HIF-1 α and NPM1. Remarkably, both the 67 NPM1/HIF-1 α -dependent gene signature gene and the hypoxic gene signatures were associated with poor prognostic outcome in the cohort of patients with DLBC, GBM, or THYM cancer types (Fig. 6G,H). These cancer patient data support the notion that the NPM1/HIF-1 α interaction also occurs in solid tumors and it is highly involved in the response of cancer cells to the hypoxic tumor microenvironment, which in turn can facilitate tumor growth and resistance to therapy.

4. Discussion

4.1. NPM1, a novel isoform-specific HIF-1 interacting partner, is essential for the transcriptional response and cellular adaptation to hypoxia

Intrigued by the fact that phosphorylation of the HIF-1 α ETD by ERK1/2 limits the intranuclear mobility of HIF-1 α in living cells, we used an unbiased proteomic approach to screen for ETD-interacting nuclear proteins. This led to the identification of NPM1 as a direct binding partner of HIF-1 α both *in vitro* and inside cancer cells. Our functional data suggest that the HIF-1 α /NPM1 interaction forms the basis of a regulatory mechanism that connects the status of ERK activation (and of, correspondingly, cellular proliferation) with the level of HIF-1 transcriptional activity and the ability of cells to respond and adapt to hypoxia (Fig. 7). Furthermore, they shine further light on the means by which HIF-1 selects, associates with, and activates hypoxia target gene promoters and how these may differ from the corresponding HIF-2-dependent processes. These hypotheses are supported by our experimental results showing that (a) direct binding of NPM1 to the HIF-1 α ETD (residues 616–658) is strengthened when ETD can be phosphorylated by ERK or contains a phosphomimetic mutation at the ERK sites; (b) NPM1 interacts with both the HIF-1 α /ARNT heterodimer and HRE-containing chromatin but shows no association with HIF-2 α ; (c)

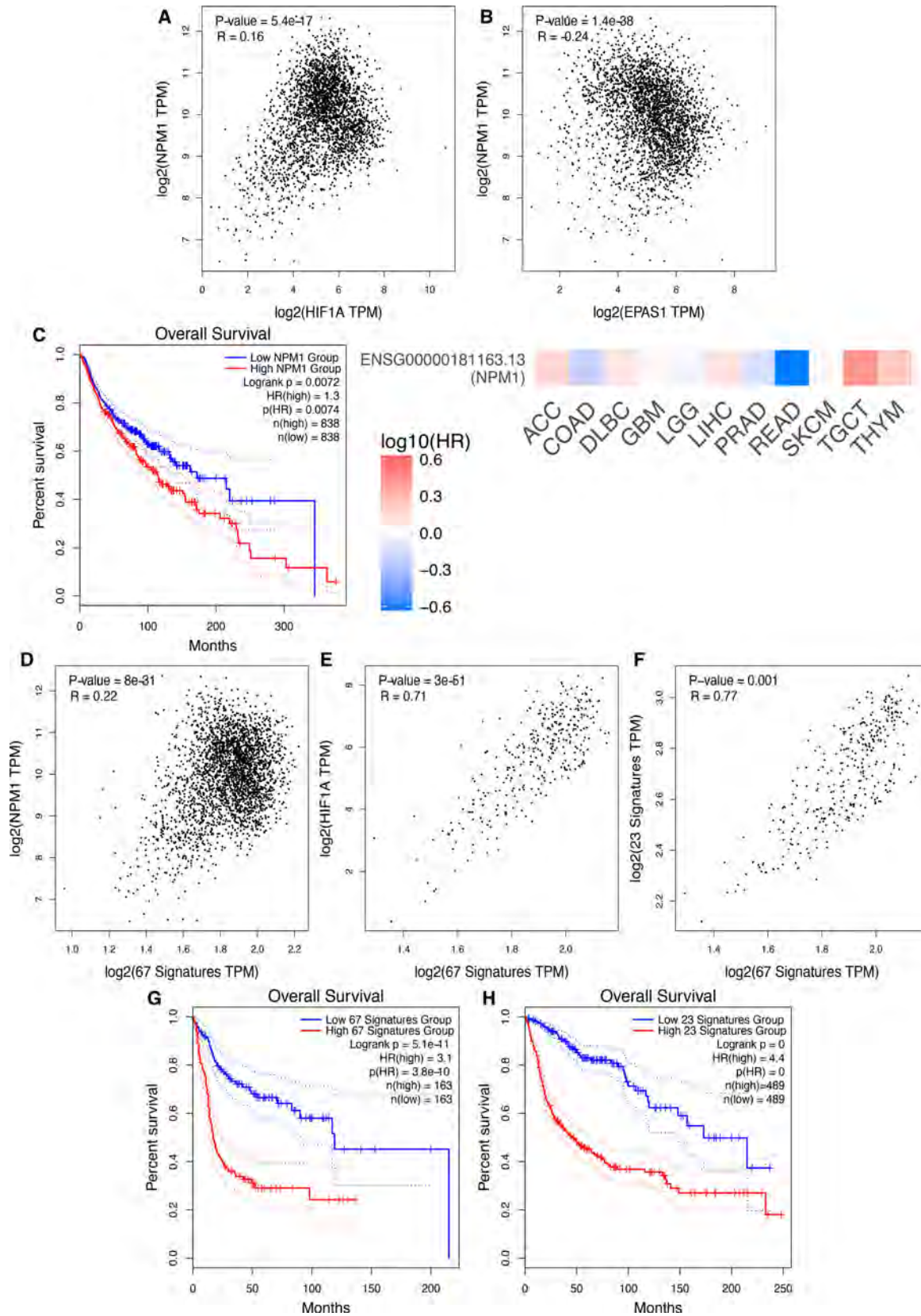


Fig. 6. Expression of *NPM1* and NPM1/HIF-1 co-upregulated genes in human cancers correlated with hypoxic status and patient prognosis. (A, B) Correlation between the expression of *NPM1* and the expression of either *HIF1A* (A) or *EPAS1* (B) in the combined samples of the 11 cancer types shown in Fig. S11B. (C) Left: Kaplan–Meier overall survival curves for patients corresponding to the 11 human cancer types shown in Fig. S11B and assigned to high (Red) or low (Blue) *NPM1* expression in their tumor samples. Right: Heatmap showing the prognostic impact of *NPM1* expression in each of the 11 cancer types as indicated. Hazard ratios (HR; Color key) are in logarithmic scale (\log_{10}); Red and blue squares signify higher and lower risks, respectively. (D–F) Correlation between the expression *NPM1* (D) or *HIF1A* (E) or a hypoxia 23-gene signature (F) and the signature of the 67 genes commonly upregulated by HIF-1 and NPM1 under hypoxia in HeLa cells (this study) in the combined samples of three human cancer types (DLBC, GBM and THYM). (G, H) Kaplan–Meier overall survival curves for patients corresponding to three human cancer types (DLBC, GBM and THYM) and assigned to high (Red) or low (Blue) expression of the 67 genes upregulated by both HIF-1 and NPM1 in HeLa cells (this study) (G) or expression a 23-hypoxia gene signature (H). Spearman correlation analysis in A, B, D, E, F and overall survival analysis in C, G, H were analyzed by GEPIA2 visualization and evaluation platform as reported in [23]. Continuous red/blue lines in C, G, H represent mean values whereas dotted lines are indicative of variation.

depletion of NPM1 or inhibition of its interaction with HIF-1 α destabilizes the association of HIF-1 with functional HREs or components of active chromatin and reduces drastically its transcriptional activity; (d) a significantly large number of genes are commonly regulated by HIF-1 and NPM1 under hypoxia; and (e) analysis of publicly available cancer patient data reveals a strong association between hypoxia, NPM1, and the HIF-1/NPM1 co-dependent gene expression and exposes their correlation with bad patient prognosis.

NPM1, the interaction partner of HIF-1 α identified in the present study, is an abundant phosphoprotein containing independent but partially overlapping functional domains which may facilitate interactions with chromatin components, transcription factors, or nucleic acids [32,33]. Moreover, NPM1 is a histone chaperone, a function that depends on its phosphorylation, p300-mediated acetylation, and oligomerization status, and association of NPM1 with components of the transcription machinery has been suggested to enhance chromatin transcription [34,35]. Our results now demonstrate that the transcriptional response to hypoxia requires the presence of NPM1 and its direct interaction with HIF-1 α , which involves the C-terminal 37 amino acid aromatic stretch of NPM1 present only in the major B23.1 splicing variant. Interestingly, the same C-terminal stretch was recently found to be essential for NPM1 binding to the *PD-L1* gene promoter and for increased expression of *PD-L1* in triple-negative breast cancer [36]. Moreover, mutations in this area are responsible for the cytoplasmic mislocalization and malfunction of NPM1 during Acute Myelogenous Leukemia [37], showing that this small C-terminal domain of NPM1 mediates important interactions. The NPM1 C-terminal basic region has also been shown to interact with the NF- κ B p65 subunit and enhance its DNA binding [38]. Unlike the large number of hypoxia-related genes affected by

depletion of NPM1 under hypoxia, the small number of genes deregulated by NPM1 silencing under normoxia was mainly involved in the immune response. This is in agreement with the involvement of NPM1 in NF- κ B activation and may point to an additional connection between inflammation- and hypoxia-induced transcriptional responses. Given that in response to various types of stress, NPM1 has also

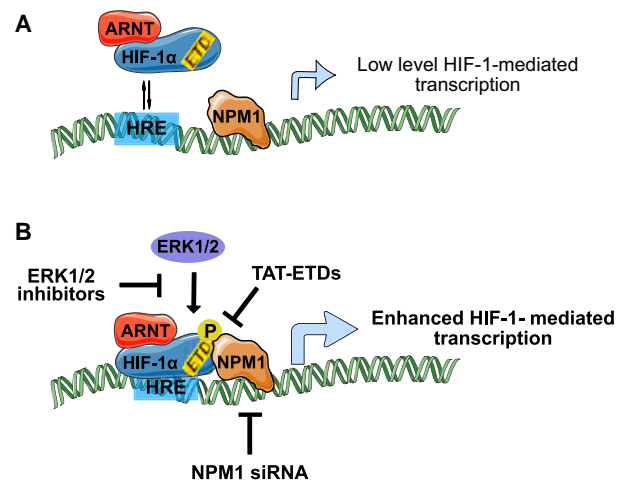


Fig. 7. A model for the role of the HIF-1/NPM1 complex during hypoxia. NPM1 marks and may organize hypoxia-inducible promoters. (A) In the absence of ERK-mediated phosphorylation (e.g., in quiescent cells), HIF-1 α binding to NPM1 is weak resulting in unstable association of HIF-1 with a neighboring HRE and basal levels of transcriptional activity. (B) In cells with elevated ERK1/2 activity (e.g., in rapidly proliferating and growing cells, such as cancer cells), HIF-1 α is directly phosphorylated by ERK1/2 at the ETD, which can then bind strongly to NPM1 and mediate stable association of HIF-1 with a neighboring HRE resulting in maximal activation of transcription. Depletion of NPM1 (e.g., by silencing) or inhibition of HIF-1 α phosphorylation (e.g., by mutation of the ERK sites or ERK inhibitors) or disruption of HIF-1 α /NPM1 association (e.g., by cell-penetrating ETD peptides) inhibits HIF-1-mediated transcription and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia.

been shown to translocate from the nucleolus to the nucleoplasm, where it can associate with and affect stress-related transcription factors [39], it can also be speculated that NPM1 marks promoter regions of genes that need to be rapidly activated in response to external stimuli such as oxygen concentration or pro-inflammatory agents. NPM1 has demonstrated ability to undergo homotypic and heterotypic liquid–liquid phase separation (LLPS), which may be critical for its nucleolar function [27,40]. As phase separation condensates may also be involved in RNA Pol II-mediated transcription [41], LLPS may also play a role in the involvement of NPM1 in the regulation of mRNA synthesis. Our data have shown that the interaction with HIF1 α requires the very C-terminal aromatic and globular domain of NPM1 and not its intrinsically disordered acidic and basic regions that mediate LLPS, making the possibility that the NPM1/HIF-1 α interaction occurs in the context of LLPS very unlikely. However, the LLPS forming properties of NPM1 may be important for concentrating other essential transcription coactivators at open and rapidly activated gene promoters, such as those regulated by hypoxia. Indeed, it has been shown that most HIF-1 target genes reside in open chromatin loci with bound but paused RNA polymerase II (RNAPII) and display basal transcriptional activity even under normoxia [42–44]. Under hypoxia, elongation by RNAPII is triggered when HIF-1 recruits the CDK-8-Mediator and super elongation (SEC) complexes [43]. Additional transcriptional coactivators of HIF-1 target genes include the histone acetyltransferases CBP/p300 [45], the binding of which to HIF-1 α also involves STAT3 [46], the chromatin-remodeling SWI/SNF complex [47–49], and the pyruvate kinase isoform PKM2, which, like NPM1, is a HIF-1 target gene [50]. However, chromatin modification/remodeling and transcription elongation in response to hypoxia need to be preceded by stable binding of HIF-1 to the HREs via its N-terminal DNA-binding domains. We propose that this is secured by NPM1, by preoccupying functional HRE-containing promoters already under normoxia and providing additional stabilizing anchorage via binding to the ETD of HIF-1 α , after its hypoxia-triggered induction and subsequent nuclear import and heterodimerization with ARNT. Furthermore, the HIF-1 α /NPM1 interaction can serve more purposes: it provides an additional level of regulation by the signaling pathways leading to ERK activation, it establishes a positive feed-forward mechanism by HIF-1-mediated stimulation of NPM1 expression and it facilitates transcriptional activation by the histone chaperone and chromatin-remodeling abilities of NPM1. The

HIF-1 α /NPM1 interaction, mediated by a domain not conserved between HIF- α isoforms, may also be one of the elements that differentiates gene targets between HIF-1 and HIF-2. It is well established that while both HIFs recognize the same core HRE-motif they can affect the transcription of distinct set of genes [51]. Furthermore, several studies have shown that HIF-2 is prone to bind to DNA elements distal from the transcription start sites, while HIF-1 is more often found bound to promoter regions proximal to transcription start sites [51–53]. Given that NPM1 associates with transcriptionally active RNAPII and shows nucleosome disassembly activity at transcription start sites [34,35], its preference for HIF-1 α may act as a marker for favored HIF-1 binding to HREs proximal to transcription start sites.

4.2. The NPM1/HIF-1 α association provides an ERK-controlled switch that can be targeted in cancer cells

The control of the HIF-1 α /NPM1 interaction by ERK-dependent phosphorylation of HIF-1 α extends the role played by the ERK pathway both in normal and cancer cells. ERK pathway activation involves not only stimuli such as growth factors, mitogens, and cytokines but also environmental conditions like hypoxia. Its activation is also correlated with carcinogenesis since it is required for high proliferation rates, cell growth, cell survival, and evasion of apoptosis [54]. Active ERKs could therefore also lead to a more tumor-promoting phenotype via the HIF-1/NPM1 axis in the hypoxic microenvironment of solid tumors. This is in line with the pro-tumorigenic roles attributed individually to both NPM1 and HIF-1. As already mentioned, NPM1 expression is increased in various cancer types and it has been associated with progression to more advanced stages of disease. Its oncogenic potential is manifested through both increased proliferation and inhibition of apoptosis [29]. In our cell culture experiments, depletion of NPM1 had an insignificant or very mild effect on cell death and apoptosis under normoxia but apoptosis was dramatically stimulated when NPM1 depletion was combined with hypoxia. This agrees with the previously suggested indirect antiapoptotic role of NPM1 [29] and, taking into account our data, it may also be proposed that NPM1 protects from apoptosis by increasing, through HIF-1, the expression of antiapoptotic genes, such as BIRC3 which was tested in our study. Support for this idea also comes from our RNA-seq results and our analysis of cancer patient data. The former revealed a significant number of genes that depend on

both HIF-1 and NPM1 for expression under hypoxia and negatively regulate apoptosis. The latter demonstrated the elevated expression of NPM1 in several different human cancer types, its association with bad prognosis, and its correlation with *HIF1A* but not *EPAS1* (encoding HIF-2 α) expression in full support of our *in vitro* cell data. Furthermore, a signature of the 67 genes found from our analysis to be commonly upregulated by HIF-1 and NPM1 was significantly higher in at least three different human tumor types (DLBC, GBM, THYM) and correlated with an independent hypoxic signature and negative prognostic outcome.

The demonstration of the interaction between HIF-1, an established target for anticancer strategies [2], and NPM1, also associated with carcinogenesis, raises the interesting possibility that targeting this interaction could serve as an efficient means to curtail HIF-1 activity and decrease cancer cell survival in hypoxic tumors. The fact that the cell permeable TAT-ETD-FLAG peptides, which, as we have previously shown, specifically inhibit HIF-1 activity and trigger apoptosis in different cancer cell lines [11], efficiently disrupt the HIF-1 α /NPM1 association provides proof-of-principle that remains to be tested as a therapeutic intervention *in vivo*.

5. Conclusion

We have shown that ERK-mediated phosphorylation of HIF-1 α controls its association with chromatin through its physical interaction with NPM1, a histone chaperone, and chromatin remodeler. This interaction allows HIF-1 to select and stably bind to HRE-containing promoters, making NPM1 an essential coactivator of hypoxia target genes, a role also supported by analysis of cancer patient data. Depletion of NPM1 or disruption of its association with HIF-1 α selectively curtails the ability of cancer cells to survive under low oxygen. Targeting the HIF-1 α /NPM1 interaction in hypoxic tumors may therefore form the basis of a novel anticancer strategy.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. M. Okuwaki (Faculty of Medicine, University of Tsukuba) for his generous gift of plasmids, the Advanced Light Microscopy Facility of University of Patras and Bioimaging-GR, UPatras Node and Prof. Z. Lygerou (School of Medicine, University of Patras) for access to imaging facilities and P. Hatzis, V. Harokopos and M. Reczko (B.S.R.C. 'Alexander Fleming' Genomics

facility) for the Quant-seq analysis. We would also like to thank Prof. A. E. Koromilas (Dept. of Oncology, Faculty of Medicine, McGill University, Canada) and Prof. E. Paraskeva (Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Greece) for their useful comments and suggestions on the manuscript. A.G. thanks Fondation Santé, HFRI and GSRT for their financial support. This work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (H.F.R.I.) under the 'First Call for H.F.R.I. Research Projects to support Faculty members and Researchers and the procurement of high-cost research equipment grant' (Project Number: HFRI-FM17-2132 to IM).

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data accessibility

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [55] and will be accessible after publication through GEO Series accession number GSE158890 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE158890>).

Requests for materials should be addressed to GS and IM.

Author contributions

KK, AK: performed experiments, AG: transcriptomic analysis, MS and GP: mass spectrometry, GS and IM: design, supervision, funding, and paper writing.

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/1878-0261.13080>.

References

- 1 Chan DA & Giaccia AJ (2007) Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 333–339.
- 2 Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 207–214.
- 3 Ivan M & Kaelin WG Jr (2017) The EGLN-HIF O(2)-sensing system: multiple inputs and feedbacks. *Mol Cell* **66**, 772–779.
- 4 Mahon PC, Hirota K & Semenza GL (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL

- to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**, 2675–2686.
- 5 Keith B, Johnson RS & Simon MC (2011) HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* **12**, 9–22.
 - 6 Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T & Sée V (2020) The role of hypoxia-inducible factor post-translational modifications in regulating its localisation, stability, and activity. *Int J Mol Sci* **22**, 268.
 - 7 Semenza GL (2017) A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp Cell Res* **356**, 128–135.
 - 8 Kourti M, Ikonou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniouoglou S, Lygerou Z, Simos G & Mylonis I (2015) CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cell Signal* **27**, 1129–1140.
 - 9 Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E & Simos G (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem* **283**, 27620–27627.
 - 10 Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G & Simos G (2017) Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci* **130**, 466–479.
 - 11 Karagiota A, Kourti M, Simos G & Mylonis I (2019) HIF-1 α -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cell Mol Life Sci* **76**, 809–825.
 - 12 Hisaoka M, Nagata K & Okuwaki M (2014) Intrinsically disordered regions of nucleophosmin/B23 regulate its RNA binding activity through their inter- and intra-molecular association. *Nucleic Acids Res* **42**, 1180–1195.
 - 13 Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M & Nagata K (2001) Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* **506**, 272–276.
 - 14 Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniouoglou S & Simos G (2012) Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci* **125**, 3485–3493.
 - 15 Rapsomaniki MA, Kotsantis P, Symeonidou IE, Giakoumakis NN, Taraviras S & Lygerou Z (2012) easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics* **28**, 1800–1801.
 - 16 Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV & Mann M (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856–2860.
 - 17 Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G & Paraskeva E (2018) Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1863**, 1142–1152.
 - 18 Braliou GG, Verga Falzacappa MV, Chachami G, Casanovas G, Muckenthaler MU & Simos G (2008) 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression. *J Hepatol* **48**, 801–810.
 - 19 Orso F, Cora D, Ubezio B, Provero P, Caselle M & Taverna D (2010) Identification of functional TFAP2A and SP1 binding sites in new TFAP2A-modulated genes. *BMC Genom* **11**, 355.
 - 20 Whitlock NA, Agarwal N, Ma JX & Crosson CE (2005) Hsp27 upregulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 1092–1098.
 - 21 Moulos P & Hatzis P (2015) Systematic integration of RNA-Seq statistical algorithms for accurate detection of differential gene expression patterns. *Nucleic Acids Res* **43**, e25.
 - 22 Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R & Pascual-Montano A (2012) GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* **40**, W478–W483.
 - 23 Tang Z, Kang B, Li C, Chen T & Zhang Z (2019) GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res* **47**, W556–W560.
 - 24 Lin W, Wu S, Chen X, Ye Y, Weng Y, Pan Y, Chen Z, Chen L, Qiu X & Qiu S (2020) Characterization of hypoxia signature to evaluate the tumor immune microenvironment and predict prognosis in glioma groups. *Front Oncol* **10**, 796.
 - 25 Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A & Simos G (2010) The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **398**, 74–78.
 - 26 Cela I, Di Matteo A & Federici L (2020) Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. *Int J Mol Sci* **21**, 4885.
 - 27 Lopez DJ, Rodriguez JA & Banuelos S (2020) Nucleophosmin, a multifunctional nucleolar organizer with a role in DNA repair. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1868**, 140532.
 - 28 Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC & Pang Q (2004) Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* **279**, 41275–41279.
 - 29 Grisendi S, Mecucci C, Falini B & Pandolfi PP (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 493–505.
 - 30 Wang D, Baumann A, Szebeni A & Olson MO (1994) The nucleic acid binding activity of nucleolar protein

- B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem* **269**, 30994–30998.
- 31 Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D & Semenza GL (2013) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* **288**, 10819–10829.
- 32 Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ & Richard DJ (2016) Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol* **17**, 016–0073.
- 33 Hingorani K, Szebeni A & Olson MO (2000) Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* **275**, 24451–24457.
- 34 Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS & Kundu TK (2009) Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol* **29**, 5115–5127.
- 35 Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK & Kundu TK (2005) Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* **25**, 7534–7545.
- 36 Qin G, Wang X, Ye S, Li Y, Chen M, Wang S, Qin T, Zhang C, Li Y, Long Q *et al.* (2020) NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* **11**, 020–15364.
- 37 Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A *et al.* (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* **352**, 254–266.
- 38 Lin J, Kato M, Nagata K & Okuwaki M (2017) Efficient DNA binding of NF- κ B requires the chaperone-like function of NPM1. *Nucleic Acids Res* **45**, 3707–3723.
- 39 Yang K, Wang M, Zhao Y, Sun X, Yang Y, Li X, Zhou A, Chu H, Zhou H, Xu J *et al.* (2016) A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nat Commun* **7**, 13599.
- 40 Mitrea DM, Cika JA, Stanley CB, Nourse A, Onuchic PL, Banerjee PR, Phillips AH, Park CG, Deniz AA & Kriwacki RW (2018) Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation. *Nat Commun* **9**, 842.
- 41 Cho WK, Spille JH, Hecht M, Lee C, Li C, Grube V & Cisse II (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* **361**, 412–415.
- 42 Choudhry H, Schodel J, Oikonomopoulos S, Camps C, Grampp S, Harris AL, Ratcliffe PJ, Ragoussis J & Mole DR (2014) Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2. *EMBO Rep* **15**, 70–76.
- 43 Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B, Long HW, Daniels DL, Hahn WC, Dowell RD *et al.* (2013) HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* **153**, 1327–1339.
- 44 Xia X & Kung AL (2009) Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol* **10**, 2009–2010.
- 45 Ruas JL, Poellinger L & Pereira T (2005) Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* **118**, 301–311.
- 46 Pawlus MR, Wang L & Hu CJ (2014) STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene* **33**, 1670–1679.
- 47 Kenneth NS, Mudie S, van Uden P & Rocha S (2009) SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem* **284**, 4123–4131.
- 48 Sena JA, Wang L & Hu CJ (2013) BRG1 and BRM chromatin-remodeling complexes regulate the hypoxia response by acting as coactivators for a subset of hypoxia-inducible transcription factor target genes. *Mol Cell Biol* **33**, 3849–3863.
- 49 Wang F, Zhang R, Beischlag TV, Muchardt C, Yaniv M & Hankinson O (2004) Roles of Brahma and Brahma/SWI2-related gene 1 in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *J Biol Chem* **279**, 46733–46741.
- 50 Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A & Semenza GL (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **145**, 732–744.
- 51 Smythies JA, Sun M, Masson N, Salama R, Simpson PD, Murray E, Neumann V, Cockman ME, Choudhry H, Ratcliffe PJ *et al.* (2019) Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1 α and HIF-2 α transcription factors in chromatin. *EMBO Rep* **20**, e46401.
- 52 Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J & Ratcliffe PJ (2009) Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* **284**, 16767–16775.
- 53 Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Mole DR (2011) High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq. *Blood* **117**, e207–e217.
- 54 Lavoie H, Gagnon J & Therrien M (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 607–632.

55 Edgar R, Domrachev M & Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* **30**, 207–210.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. Schematic representation of HIF-1 α forms used in this study.

Fig. S2. HIF-1 α phosphorylation by ERK1/2 stimulates HIF-1 α binding to chromatin components.

Fig. S3. HIF-1 α phosphorylation by ERK1/2 stimulates HIF-1 α binding to chromatin components.

Fig. S4. SDS/PAGE analysis of recombinant HIF-1 α and NPM1 forms used in this study.

Fig. S5. NPM1 immunofluorescence under normoxic conditions.

Fig. S6. NPM1 is essential for HIF-1 transcriptional activity and stable binding to HRE and components of open chromatin.

Fig. S7. NPM1 occupies functional HRE sequences.

Fig. S8. HIF-1 α and NPM1 co-regulate a significant number of genes under hypoxia.

Fig. S9. The 67 genes co-upregulated by NPM1 and HIF-1 α under hypoxia.

Fig. S10. Annexin V and TUNEL staining in HeLa cells.

Fig. S11. Expression of NPM1 and a 67 gene-signature co-upregulated by NPM1 and HIF-1 α in various cancer types.

Fig. S12. STRING analysis of GSEA dataset and expression of a 23-gene hypoxic signature in various cancer types.

Table S1. List of non-target and specific siRNAs used in this study.

Table S2. List of antibodies and working dilutions used in this study.

Table S3. List of DNA primers for RT-PCR and CHIP analysis used in this study.

Table S4. Measured parameter estimates of FRAP experiments.

Table S5. Peptide identification details from mass spectrometry.

Table S6. Tumor type abbreviations.

Table S7. The 23-gene hypoxia signature after STRING analysis from GSEA original dataset.