



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα TFAP2A με
δομικές επικράτειες του HIF-1α»**

Λακάκη Ελευθερία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Επιβλέπουσα
- Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία.

Λάρισα, Οκτώβριος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

“Study of the interaction of transcription factor TFAP2A with HIF-1 α protein domains”

By Eleftheria Lakaki

Advisory Thesis Committee:

- Chachami Georgia, Assistant Professor of Cellular Biochemistry, Supervisor
- Simos Georgios, Professor of Biochemistry
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry.

Larissa, October 2023

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Υποξία	9
1.1.1 Hypoxia Inducible Factors, HIFs	10
1.1.2 Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τους παράγοντες HIF.....	16
1.2 TFAP2A (Transcription Factor AP-2 Alpha)	19
1.2.1 Οικογένεια παραγόντων TFAP2	20
1.2.2 Χαρακτηριστικά του TFAP2A	21
1.2.3 Ρόλοι στην φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία.....	23
1.2.4 TFAP2A και καρκίνος.....	24
1.2.5 TFAP2A και υποξία	25
2. ΣΚΟΠΟΣ	27
3. ΥΛΙΚΑ	28
3.1 Πλασμιδιακοί φορείς	28
3.1.1 pcDNA3.1-HA	28
3.1.2 pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt	28
3.1.3 pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut.....	28
3.1.4 pCDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut	28
3.1.5 pGEX HIF-1α wt 1-347.....	29
3.1.6 pGEX HIF-1α wt 348-826.....	29
3.1.7 pGEX HIF-1α wt 575-826.....	29
3.1.8 CMV flag-HIF-1α 1-347	29
3.1.9 pEGF HIF-1α 348-826	30
3.2 Βακτηριακά στελέχη	30
3.2.1 TOP10 <i>E. coli</i>	30
3.2.2 BL21 RIL <i>E. coli</i>	30
3.3 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες	30
3.3.1 Υγρό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani broth)	30
3.3.2 Στερεό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani broth).....	30
3.4 Καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	31

3.5 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών σειρών	31
3.5.1 DMEM -/-.....	31
3.5.2 DMEM +FBS/+PS	31
3.5.3 DMEM +5% FBS/+PS	31
3.6. Αντιβιοτικά	31
3.6.1 Αμπικιλίνη.....	31
3.6.2 Χλωραμφαινικόλη.....	31
3.6.3 Πενικιλίνη	31
3.6.4 Στρεπτομυκίνη.....	32
3.7 Αντισώματα	32
3.8 Χημικά.....	33
3.9. Διαλύματα	33
3.9.1 Διαλύματα για δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E. Coli	33
3.9.2 Διαλύματα κυτταροκαλλιέργειών	33
3.9.3 Διαλύματα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	34
3.9.4 Διαλύματα in vitro συγκατακρήμνισης	34
3.9.5 Διαλύματα SDS Ηλεκτροφόρησης.....	34
3.9.6 Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western	35
3.9.7 Διαλύματα υπερέκφρασης πλασμιδιακού φορέα σε BL21 RIL βακτήρια	35
3.9.8 Διαλύματα λύσης BL21 RIL βακτηρίων και καθαρισμού πρωτεΐνης.....	35
3.10 Αντιδραστήρια.....	36
3.11 Σφαιρίδια	36
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
4.1 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας.....	37
4.1.1 Δημιουργία χημειοδεκτικών βακτηρίων E. Coli	37
4.1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων E. coli με θερμικό σοκ με πλασμιδιακούς φορείς.....	38
4.1.3 Υπερέκφραση πλασμιδιακού φορέα σε βακτηριακά κύτταρα BL21 RIL	39
4.1.4 Λύση των βακτηριακών κυττάρων BL21 RIL και απομόνωση καθαρής υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης	40
4.2 Κυτταροκαλλιέργειες HeLa κυττάρων.....	41
4.2.1 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών σειρών – Κατεργασία κυττάρων με θρυψίνη.....	41
4.2.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακό DNA με το αντιδραστήριο PEI.....	41
4.3 Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών.....	42
4.3.1 Κατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων	42
4.3.2 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	45

4.3.3 Χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue	47
4.3.4 Ηλεκτρομεταφορά και Ανοσοαποτύπωση κατά Western	47
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
5.1 Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων μορφών του HIF-1α από βακτήρια	50
5.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 1-347	50
5.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 348-826	52
5.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 575-826	54
5.2 In vitro συγκατακρήμνιση των επικρατειών του HIF-1α με τον TFAP2A	56
5.2.1 Συγκατακρήμνιση του GST-HIF-1α 575-826 με μορφές του TFAP2A.....	58
5.2.2 Συγκατακρήμνιση του GST-HIF-1α 1-347 με μορφές του TFAP2A.....	59
5.3 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	65
5.3.1 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A και ανίχνευση σύνδεσης του τμήματος HIF-1α 348-826	66
5.3.2 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A και ανίχνευση σύνδεσης του τμήματος HIF-1α 1-347	68
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
7. ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74
Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα	83

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Κυτταρικής Βιοχημείας κυρία Χαχάμη Γεωργία, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χαχάμη Γεωργία, για την υπόδειξη του θέματος και την εμπιστοσύνη που έδειξε στις ικανότητές μου. Η καθοδήγησή της ήταν ανεκτίμητη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής: τον Καθηγητή κ. Σίμο Γεώργιο, που με καλωσόρισε στο Εργαστήριο Βιοχημείας, και τον Καθηγητή κ. Μπόγδανο Δημήτριο, που μου έδωσε την δυνατότητα να συμμετέχω στο ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, και προπάντως τις υποψήφιες διδάκτορες Κάνουρα Αμαλία, Φιλιποπούλου Χρύσα και Δισερή Αικατερίνη, για την καθοδήγηση και την αμέριστη υπομονή που μου έδειξαν αυτούς τους μήνες.

Τέλος, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» μου απευθύνεται στην οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη και αγάπη τους. Δίχως την ενθάρρυνσή τους δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποξία είναι μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή διαθεσιμότητα οξυγόνου και εκδηλώνεται σε πολλαπλά επίπεδα - από μεμονωμένα κύτταρα και ιστούς έως ολόκληρους οργανισμούς. Σε αυτές τις συνθήκες, τίθεται σε λειτουργία το μονοπάτι απόκρισης στην υποξία, με κύριους ρυθμιστές τους παράγοντες HIF. Πρόσφατη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοχημείας (*Chachami et al., 2019b*), αποκάλυψε μία σειρά μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων το πρότυπο σουμοϋλίωσης αλλάζει στην υποξία. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, ξεχώρισε ο TFAP2A, ο οποίος έχει συσχετισθεί με διάφορους τύπους καρκίνου. Διαπιστώθηκε ότι ο TFAP2A συνδέεται με τον HIF-1α και τον HIF-2α ανεξάρτητα από την σουμοϋλίωσή του και ότι η αποσουμοϋλίωσή του ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Επιπλέον, αδημοσίευτα δεδομένα από το Εργαστήριο Βιοχημείας δείχνουν ότι ο TFAP2A συνδέεται σε περιοχές DNA που βρίσκονται εντός ή πλησίον στοιχείων HRE.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της μελέτης της αλληλεπίδρασης του TFAP2A με τον HIF-1α και μελετά την αλληλεπίδραση του TFAP2A με δομικές επικράτειες του HIF-1α. Συγκεκριμένα, οι πρωτεϊνικές επικράτειες του HIF-1α 1-347, 348-826 και 575-826 υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή για να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης για την εύρεση της επικράτειας που συνδέεται με τον TFAP2A. Στα πειράματα αυτά ανιχνεύθηκε άμεση σύνδεση μεταξύ του TFAP2A και του αμινοτελικού άκρου (1-347) του HIF-1α. Για την επιβεβαίωση αυτού του ευρήματος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ώστε να ελεγχθεί αυτή η σύνδεση υπό συνθήκες που μιμούνται εκείνες εντός ενός καρκινικού όγκου. Επιβεβαιώθηκε η σύνδεση με την πρωτεϊνική περιοχή 1-347 του HIF-1α, ενώ δεν παρατηρήθηκε τέτοια σύνδεση με το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α, 348-826, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι ο TFAP2A συνδέεται με την επικράτεια 1-347 του HIF-1α, ενδεχομένως στις δομικές περιοχές PAS A και PAS B. Η διελεύκανση του μηχανισμού και του ρόλου της αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων ενδέχεται να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση κρίσιμων διεργασιών στο πλαίσιο της οδού απόκρισης στην υποξία και στον καρκίνο.

Λέξεις-κλειδιά: HIF, TFAP2A, Σουμοϋλίωση, Υποξία

ABSTRACT

Hypoxia is a condition characterised by insufficient oxygen availability and occurs at multiple levels - from individual cells and tissues to organisms. Under these conditions, the hypoxia-response pathway is set in motion, with HIF factors as its master regulators. A recent publication of Biochemistry Laboratory (*Chachami et al., 2019b*), revealed several transcription factors whose SUMOylation pattern is altered in hypoxia. Among these factors, TFAP2A, which has been associated with several types of cancer, stood out. TFAP2A was found to bind to HIF-1 α and HIF-2 α independently of its SUMOylation and that its deSUMOylation enhances the transcriptional activity of HIF-1 α . In addition, unpublished data from the Biochemistry Laboratory show that TFAP2A binds to DNA regions located within or near HRE elements.

This thesis was conducted in the context of studying the interaction of TFAP2A with HIF-1 α and investigates the interaction of TFAP2A with structural domains of HIF-1 α . Specifically, the protein domains of HIF-1 α 1-347, 348-826 and 575-826 were overexpressed and isolated in pure form to be used for in vitro co-precipitation experiments to find the TFAP2A-binding domain. In these experiments, direct binding between TFAP2A and the amino terminal (1-347) of HIF-1 α was detected. To confirm this finding, immunoprecipitation experiments were performed to test this interaction under conditions mimicking those within a tumor. Binding to the 1-347 protein region of HIF-1 α was confirmed, whereas no such binding to the carboxyl terminus of HIF-1 α 348-826 was observed, both in vitro and in vivo experiments.

The results of the present study reveal that TFAP2A binds to the 1-347 domain of HIF-1 α , possibly in the PAS A and PAS B structural domains. Elucidating the mechanism and role of the interaction between these two transcription factors may contribute significantly to understanding critical processes within the hypoxia-response pathway and cancer.

Keywords: HIF, TFAP2A, SUMOylation, Hypoxia

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

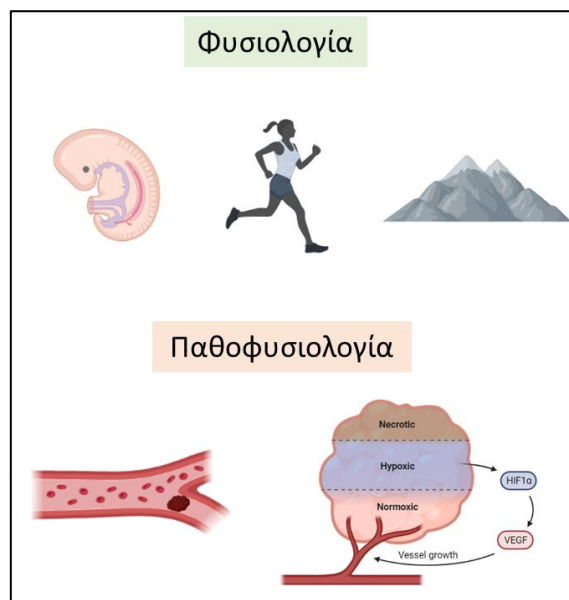
1.1 Υποξία

Η επιβίωση των περισσότερων ζωντανών οργανισμών εξαρτάται από το μοριακό οξυγόνο (O_2), το οποίο αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τις βασικές λειτουργίες τους. Το οξυγόνο παράγεται μέσω της φωτοσύνθεσης από φυτικούς οργανισμούς, φύκη και ορισμένα βακτήρια [1] και στη συνέχεια χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ATP μέσω αντιδράσεων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [2]. Το πλεονάζον μοριακό οξυγόνο απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα, όπου το αξιοποιούν με παρόμοιο τρόπο και οι μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί [3].

Το μοριακό οξυγόνο είναι απαραίτητο για τους ανώτερους αερόβιους οργανισμούς, επειδή παρουσία του η επεξεργασία της γλυκόζης είναι 18 φορές πιο κερδοφόρα σε σύγκριση με την απουσία του, επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματικότερη παραγωγή ATP. Αυτή η στρατηγική παραγωγής ενέργειας παρείχε στους οργανισμούς αυτούς ανταγωνιστικό πλεονέκτημα και τους επέτρεψε να ευδοκιμήσουν σε ποικίλα ενδιαιτήματα [4].

Η κατάσταση όπου η απαίτηση σε οξυγόνο υπερβαίνει την παροχή του ονομάζεται υποξία και μπορεί να επηρεάσει κύτταρα, ιστούς ή και ολόκληρους οργανισμούς [3]. Στον άνθρωπο, η υποξία είναι γνωστό ότι εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως είναι η έντονη σωματική άσκηση, η παραμονή σε υψηλό υψόμετρο και η εμβρυογένεση, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι οι ισχαιμίες και ο καρκίνος (Εικόνα 1) [5]. Μάλιστα, το υποξικό περιβάλλον θεωρείται απαραίτητο για την ανάπτυξη κακοήθους όγκου [6].

Ειδικότερα, ο ραγδαίος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, σε συνδυασμό με την άτακτη ανάπτυξή τους, οδηγεί συχνά σε περιοχές εντός του όγκου που δεν οξυγονώνονται επαρκώς λόγω της περιορισμένης πρόσβασής τους σε αιμοφόρα αγγεία [7]. Αυτή η έλλειψη οξυγόνου πυροδοτεί διάφορες βιολογικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της αγγειογένεσης [8]. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το υποξικό περιβάλλον που δημιουργείται συνδέεται στενά με την μετάσταση και τον αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας στους καρκινοπαθείς [9].



Εικόνα 1. Ο μηχανισμός απόκρισης στην υποξία συμμετέχει σε φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού όπως είναι η εμβρυογένεση, η έντονη σωματική άσκηση και το μεγάλο υψόμετρο αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι οι ισχαιμίες και ο καρκίνος. (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

Για να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν ενόψει των διακυμάνσεων των επιπέδων οξυγόνου, οι O_2 -εξαρτώμενοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ομοιοστατικούς μηχανισμούς απόκρισης [4]. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται, οι μηχανισμοί αυτοί τίθενται σε λειτουργία και περιλαμβάνουν διαδικασίες όπως η έκκριση ερυθροποιητίνης, η αγγειογένεση και μεταβολικές προσαρμογές. Αυτές οι αποκρίσεις ρυθμίζονται κατά κύριο λόγο μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων-στόχων από τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors), ενορχηστρώνοντας μια συντονισμένη απόκριση κατά των μειωμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου [4].

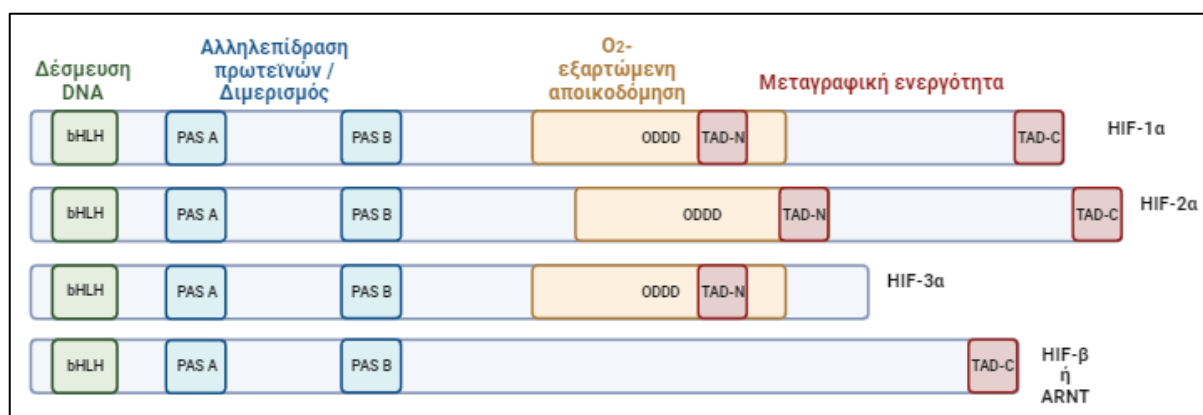
1.1.1 Hypoxia Inducible Factors, HIFs

1.1.1.1 Δομή

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο υπομονάδες: μια O_2 -εξαρτώμενη α υπομονάδα (HIF-1α, HIF-2α ή HIF-3α) και την ιδιόσυστατα εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-β, επίσης γνωστή ως ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [3]. Οι παράγοντες HIF ανήκουν στην υπερικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων bHLH (basic helix-loop-helix), η οποία είναι μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων [3]. Τα μέλη της οικογένειας bHLH μοιράζονται ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό,

την περιοχή bHLH, που τους επιτρέπει να συνδέονται με το DNA. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν συνήθως την ευελιξία να σχηματίζουν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή και είναι ευρέως κατανομημένοι στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς [10].

Όλες οι υπομονάδες του HIF (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α και HIF-β) μοιράζονται κοινές δομικές περιοχές (Εικόνα 2). Στην περίπτωση της υπομονάδας HIF-1α, η οποία έχει μελετηθεί εκτενέστερα, η περιοχή bHLH βρίσκεται στα 17-70 αμινοξέα και διευκολύνει τη σύνδεση του DNA με τα αμινοξέα 21-30 [10]. Ακολουθεί η περιοχή διμερισμού που περιλαμβάνει τις δομικές περιοχές PAS A (85-158 αα) και PAS B (228-298 αα) [11]. Οι εν λόγω περιοχές PAS (Per-Arnt-Sim) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, ιδίως στον διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες [12]. Ακολουθεί η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την O₂-εξαρτώμενη αποικοδόμηση του HIF-1α, γνωστή ως ODDD (Oxygen-Dependent Degradation Domain), η οποία βρίσκεται στα αμινοξέα 401-603. Εντός και πλησίον αυτής της περιοχής βρίσκονται περιοχές υδροξυλίωσης που αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη pVHL (380-417 και 556-572 αα), καθώς και η περιοχή N-TAD (531-575 αα). Επιπλέον, υπάρχει μία ακόμη περιοχή TAD (Trans-Activation Domain) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α και εκτείνεται στα αμινοξέα 786-826, η οποία αναφέρεται ως C-TAD. Οι δομικές περιοχές TAD είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Τέλος, υπάρχει το σήμα πυρηνικής εισόδου NLS (Nuclear Localization Signal) στα αμινοξέα 718-721 [11].



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών των υπομονάδων του παράγοντα HIF: 1α, 2α 3α και β. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Όσον αφορά στη δομή των υπόλοιπων υπομονάδων, η υπομονάδα HIF-2α παρουσιάζει ελάχιστες δομικές αποκλίσεις σε σύγκριση με τον HIF-1α [11, 13]. Είναι αξιοσημείωτο, ωστόσο, ότι ο ARNT στερείται περιοχών που σχετίζονται με την εξαρτώμενη από το O₂ αποικοδόμηση και

την περιοχή N-TAD [14]. Παρ' όλα αυτά έχει παρόμοιο μέγεθος με τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α (περίπου 789-870 αα). Από την άλλη πλευρά, η υπομονάδα HIF-3α είναι σημαντικά μικρότερη σε μέγεθος (669 αμινοξέα) από τις άλλες και, δεν περιλαμβάνει την περιοχή C-TAD [15]. Επιπλέον, η περιοχή NLS βρίσκεται σε διαφορετική θέση, συγκεκριμένα στα αμινοξέα 77-100. Επίσης, φέρει τη δομική περιοχή NES (Nuclear Export Signal) στα αμινοξέα 230-274 [15], η οποία λειτουργεί ως σήμα εξόδου από τον πυρήνα, σε αντίθεση με την HIF-1α υπομονάδα που φέρει την αντίστοιχη περιοχή κοντά στα αμινοξέα 641-643 [11].

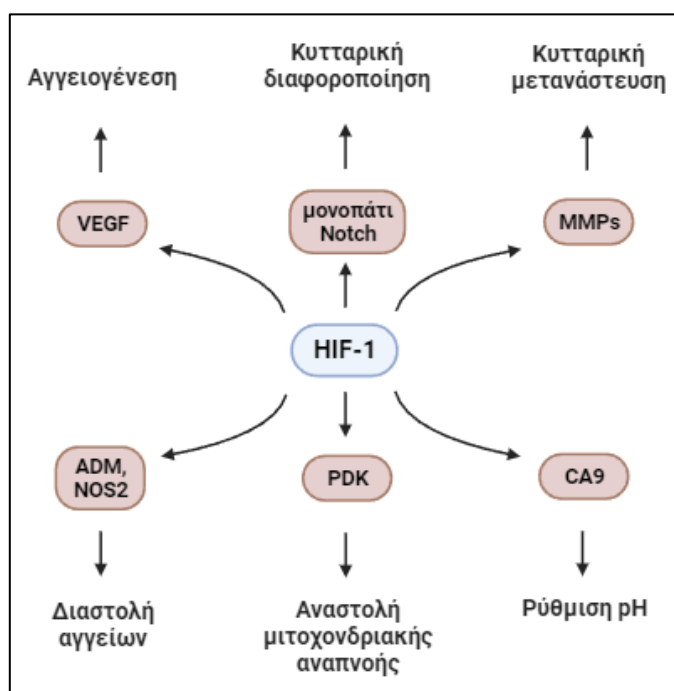
1.1.1.2 Γονίδια-Στόχοι

Παρόλο που οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF έχουν παρόμοια δομή (βλ. Ενότητα 1.1.1.1), οι ρόλοι και η φυσιολογική σημασία τους διαφέρουν κυρίως λόγω διαφοροποίησης των γονιδίων-στόχων τους. Ο παράγοντας HIF-1 συνδέεται κυρίως με την επιβίωση των κυττάρων σε υποξικό περιβάλλον [16]. Αντίθετα, ο HIF-2 συνδέεται κυρίως με τη επαγωγή της ερυθροποίησης [17], δηλαδή την παραγωγή νέων ερυθρών αιμοσφαιρίων, και την προσαρμογή σε συνθήκες μεγάλου υψομέτρου [18]. Από την άλλη πλευρά, ο ρόλος του HIF-3 είναι λιγότερο καλά προσδιορισμένος. Έχει προταθεί ότι ο HIF-3 μπορεί να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής των παραγόντων HIF-1α και HIF-2α, εμποδίζοντάς τους να εισέλθουν στον πυρήνα [18]. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί και λειτουργίες του HIF-3 εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας.

Η ανακάλυψη των παραγόντων HIF προέκυψε από το ρόλο τους ως μεταγραφικοί ρυθμιστές του γονιδίου *EPO* που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης ερυθροποιητίνης [19]. Έκτοτε διαπιστώθηκε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF, μέσω της περιοχής bHLH, προσδένονται σε μοτίβα DNA, γνωστά ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE (Hypoxia Response Elements, 5'-RCGTG-3' (R: πουρίνη)) [20]. Η πρόσδεση αυτή εκκινεί έναν καταρράκτη αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση, που περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα γονιδίων-στόχων.

Ενδεικτικά, σε αυτά περιλαμβάνονται το γονίδιο της ερυθροποιητίνης, το οποίο επάγει την ερυθροποίηση, το γονίδιο του παράγοντα VEGF [19], το οποίο επάγει την αγγειογένεση, δηλαδή τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, το γονίδιο της οξυγενάσης της αίμης HO-1 [21], υπεύθυνο για την αποικοδόμηση της αίμης, και το γονίδιο του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-1 [22], το οποίο διευκολύνει την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα. Συνολικά, οι παράγοντες HIF δρουν ως κρίσιμοι μεσολαβητές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, ενορχηστρώνοντας την έκφραση ενός ευρέος φάσματος γονιδίων που συμμετέχουν σε βιολογικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, η αγγειογένεση,

η κυτταρική διαφοροποίηση, η ρύθμιση του pH, η διαστολή των αγγείων και η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής (Εικόνα 3) [23].



Εικόνα 3. Γονίδια-στόχοι του HIF-1 που εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες. Ο παράγοντας HIF-1α έχει ρυθμιστικό ρόλο για τα επίπεδα του παράγοντα VEGF και κατ'επέξταση την αγγειογένεση [19], για το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ρυθμίζοντας την κυτταρική διαφοροποίηση [24], για τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP ρυθμίζοντας την κυτταρική μετανάστευση [25], για τα επίπεδα της αδρενομεδουλίνης και της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου 2 ρυθμίζοντας την διαστολή των αγγείων [26], για τα επίπεδα της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK) που αναστέλει την μιτοχονδριακή αναπνοή [27] και για τα επίπεδα της καρβονικής ανυδράσης 9 (CA9) ρυθμίζοντας το pH [28]. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Εκτός από τους φυσιολογικούς τους ρόλους όμως οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF έχουν συσχετισθεί και με διάφορες ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραγόντων HIF είναι αυξημένα σε ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις και φαίνεται να δρουν προστατευτικά [29]. Στην ισχαιμία του μυοκαρδίου, ο HIF-1α βελτιώνει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και μειώνει το κυτταρικό οξειδωτικό στρες, κι έτσι έχει προταθεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος [30, 31]. Αντίστοιχα, καλοί θεραπευτικοί στόχοι κρίνονται και ο HIF-2α και ο ARNT, καθώς έχουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και στην διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλιακού φραγμού στην περίπτωση ισχαιμικού επεισοδίου [32].

Επιπλέον, οι HIF έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αναιμίας σε άτομα με χρόνια νεφρική νόσο ρυθμίζοντας την έκφραση της ερυθροποιητίνης. Έτσι, έχει προταθεί η δυνητική χρήση αναστολέων της υδροξυλάσης PHD ως θεραπευτική προσέγγιση για αυτούς τους ασθενείς [33].

Σε νευρολογικές ασθένειες, όπως είναι το Alzheimer (AD, Alzheimer's Disease), ο HIF-1α φαίνεται να έχει διττό ρόλο [34]. Από τη μία πλευρά, συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου αυξάνοντας την παραγωγή βήτα-αμυλοειδών και προάγοντας τη νευροφλεγμονή [35]. Από την άλλη πλευρά, έχει προστατευτικές δράσεις στις τοξικές επιπτώσεις των βήτα-αμυλοειδών, αναστέλλοντας την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους που βρίσκεται στον εγκέφαλο, και προωθώντας την ενεργοποίηση των μικρογλοίων [36]. Επίσης, στη νόσο του Parkinson, ο HIF-1α έχει συσχετισθεί με διάφορες γονιδιακές μεταλλάξεις που αφορούν την νόσο, όπως των γονιδίων *PARK1*, *PARK8*, *PARK9* [37] κ.α.

Σημαντικότατος είναι και ο ρόλος τους στον καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-2α έχει συσχετισθεί με το νεφροκυτταρικό καρκίνο ccRCC (clear cell renal cell carcinoma), όπου η σταθεροποίηση του HIF-2α οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της δυνητικά ογκογόνου κυκλίνης D1 [38]. Επίσης, ο HIF-1α έχει συχνά αυξημένα επίπεδα σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου, προωθώντας την αγγειογένεση, τη μετάσταση και την αντίσταση στη θεραπεία, καθιστώντας τον βασικό παράγοντα στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού [39, 40]. Επιπλέον, τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α εμπλέκονται σε μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με την αυξημένη επιθετικότητα συμπαγών όγκων σε υποξικές συνθήκες [41]. Ο HIF-1α συμμετέχει κυρίως σε μεταβολικές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων (φαινόμενο Warburg), όταν το οξυγόνο είναι περιορισμένο [42]. Αντίθετα, ο HIF-2α έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης υπό συνθήκες «ψευδοϋποξίας», όπως όταν δεν λειτουργεί η pVHL στον τύπο νεφροκυτταρικού καρκίνου ccRCC [43]. Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι η ταυτόχρονη στόχευση των HIF-1α και HIF-2α μπορεί να προσφέρει μεγαλύτερα θεραπευτικά οφέλη σε σύγκριση με την επιλεκτική αναστολή μόνο του ενός [41].

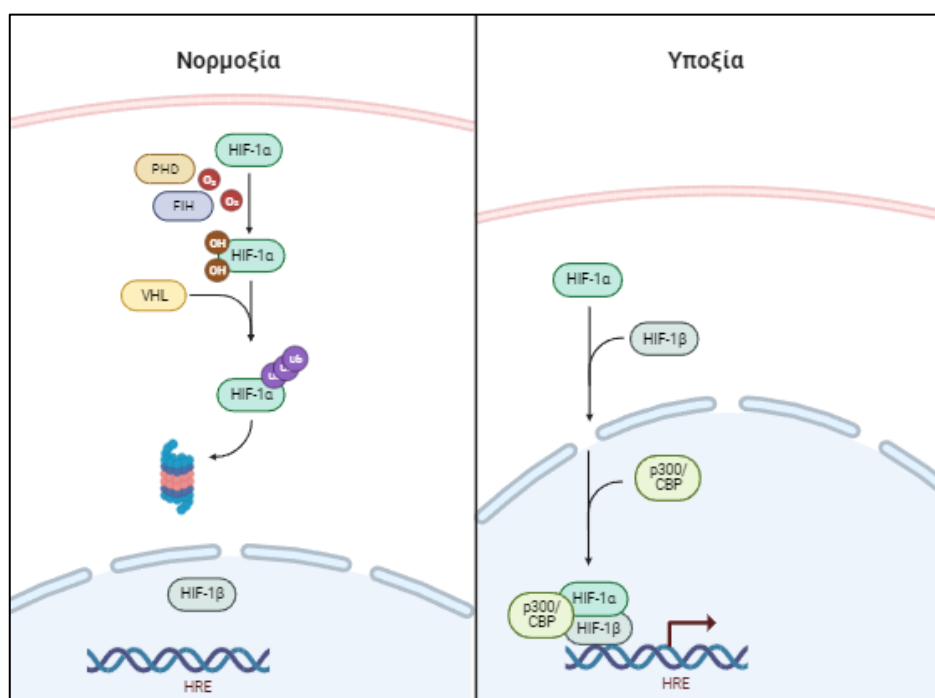
1.1.1.3 Ρύθμιση των HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF υπόκεινται σε περίπλοκη ρύθμιση, με τα επίπεδα οξυγόνου να έχουν κεντρικό ρόλο. Υπό φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, δύο κατηγορίες υδροξυλασών, PHD και FIH, δραστηριοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ως υποστρώμα για τις ενζυμικές τους δράσεις. Αυτές οι υδροξυλιώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και πρωτεόλυση αλλά και την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF [44].

Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια των υδροξυλασών PHD1-3 στοχεύει δύο κατάλοιπα προλίνης (Pro-402 και Pro-564) εντός της δομικής περιοχής αποικοδόμησης που εξαρτάται από το οξυγόνο (ODDD). Αφού υδροξυλιωθούν, τα κατάλοιπα αυτά χρησιμεύουν ως σήμα αναγνώρισης για την πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (pVHL), υπομονάδα του συμπλόκου VCB-Cul2 με δραστηριότητα E3 λιγάσης. Κατά συνέπεια, η pVHL μέσω του συμπλόκου της E3 λιγάσης ουβικιτινώνει την υπομονάδα HIF-α, στοχεύοντάς την για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Αυτή η ταχεία διαδικασία αποικοδόμησης οδηγεί σε πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής για την υπομονάδα HIF-α, καθιστώντας την μη ανιχνεύσιμη σε ιστούς με φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου [44, 45].

Ταυτόχρονα, ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn-803) στην υπομονάδα HIF-α υδροξυλιώνεται με οξυγονοεξαρτώμενο τρόπο από την υδροξυλάση FIH. Αυτή η υδροξυλίωση εμποδίζει τη σύνδεση των συνενεργοποιητών p300/CBP με τον HIF, παρεμποδίζοντας την έναρξη της μεταγραφικής του δραστηριότητας [46].

Ωστόσο, όταν τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται, οι PHD1-3 και FIH χάνουν την ικανότητά τους να υδροξυλιώνουν την υπομονάδα HIF-α. Αυτό οδηγεί στη σταθεροποίηση και τη μετατόπισή της τελευταίας στον πυρήνα του κυττάρου, διαδικασία που επιτελείται μέσω σύνδεσης ιμφορτινών στην περιοχή NLS. Στον πυρήνα, ο HIF-α σχηματίζει ετεροδιμερές με την υπομονάδα HIF-β (ή ARNT), η οποία εκφράζεται ιδιόσυστατα [47]. Το πλέον ενεργό ετεροδιμερές συνδέεται στο DNA καθώς και με τους συνενεργοποιητές p300 και CBP (Εικόνα 4) [48], οι οποίοι είναι αμφότεροι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs) [49], καθοριστικής σημασίας για την έναρξη της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF (βλ. Ενότητα 1.1.2.1).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία από το οξυγόνο σε συνθήκες νορμοξίας (αριστερά) και υποξίας (δεξιά). (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα επίπεδα και η δραστηριότητα του HIF ρυθμίζονται επίσης από μηχανισμούς ανεξάρτητους από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και σηματοδοτικών μονοπατιών. Ενδεικτικά, η φωσφορυλίωση στη Ser-247 του HIF-1α μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 παρεμποδίζοντας τον διμερισμό του HIF-1α με τον HIF-1β [50, 51]. Επιπλέον, η σουμοϋλίωση από τη SUMO1 και η ακετυλίωση του HIF-1α τον προστατεύουν από την ουβικιτινίωση από την pVHL και την επακόλουθη αποικοδόμησή της, σταθεροποιώντας τα επίπεδά της [52, 53]. Όσον αφορά τα σηματοδοτικά μονοπάτια, η ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PI3K) ρυθμίζει τη μετάφραση του HIF-1α μέσω της σηματοδοτικής οδού που περιλαμβάνει την πρωτεϊνική κινάση B (PKB ή Akt) και την κινάση mTOR, η οποία μέσω φωσφορυλίωσης διαταράσσει την αναστολή της μετάφρασης, ενισχύοντας τελικά τη μετάφραση του HIF-1α [54]. Επίσης, το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK και η απώλεια του p53 οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα του HIF-1α [55, 56].

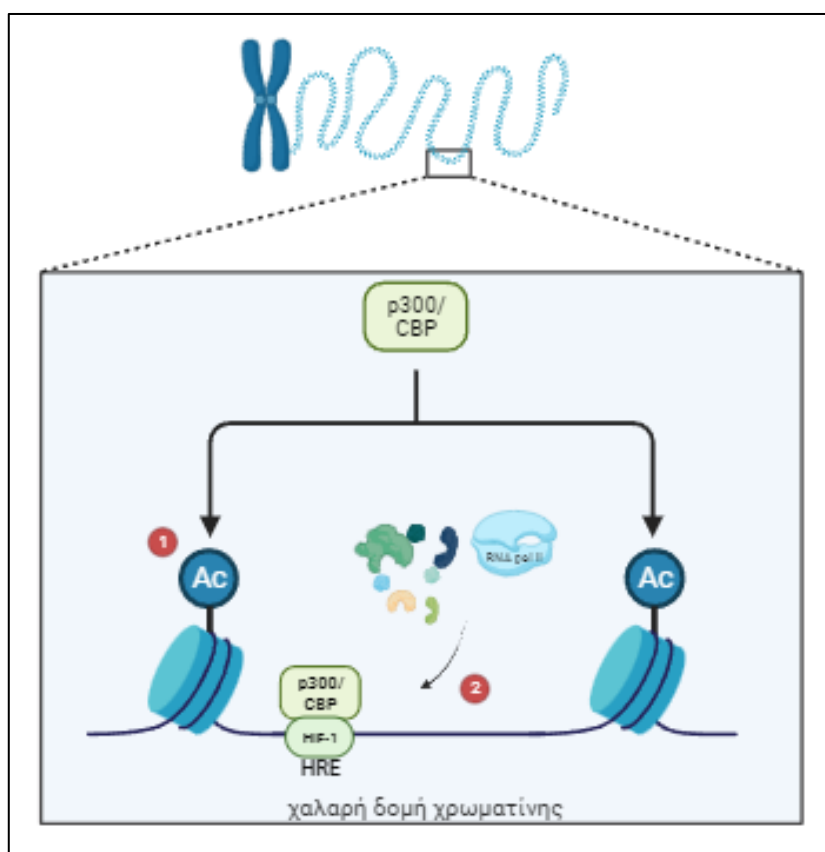
Όσον αφορά τον HIF-1α και τον HIF-2α, έχουν παρατηρηθεί διαφοροποιήσεις στα επίπεδά τους, οι οποίες πιθανότατα ελέγχονται από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω. Ειδικότερα, η HIF-1α υπομονάδα είναι ενεργή άμεσα σε συνθήκες οξείας υποξίας (1-2% O₂), και ανιχνεύεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς που μελετήθηκαν. Αντίθετα, ο HIF-2α φαίνεται να συσσωρεύεται σταδιακά σε ηπιότερες υποξικές συνθήκες (< 5% O₂) [29, 57], συχνά με ιστοειδικό τρόπο, όπως σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και στα μακροφάγα [41].

1.1.2 Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τους παράγοντες HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF προκειμένου να δράσουν απαιτούν αλληλεπιδράσεις με ένα πλήθος πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων συνενεργοποιητών και άλλων ρυθμιστικών μορίων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (βλ. Ενότητα 1.1.1.2), ο μεγάλος αριθμός των γονιδίων-στόχων του HIF εξυπηρετεί ποικίλους σκοπούς και η διαφορική έκφρασή τους σε επίπεδο ιστού καθορίζεται, εν μέρει, από την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων και συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Παρακάτω, παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες-συνενεργοποιητές μεταγραφής που αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο του HIF.

1.1.2.1 p300/CBP

Η σύνδεση με τους συνενεργοποιητές p300 (E1A-binding protein p300) και CBP (CREB-binding protein) αποτελεί βασική αλληλεπίδραση για τη μεταγραφική δραστηριότητα των παραγόντων HIF. Έχει διαπιστωθεί ότι οι p300/CBP αλληλεπιδρούν με τη δομική περιοχή C-TAD (βλ. Ενότητα 1.1.1.1) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α [58]. Αυτοί οι συνενεργοποιητές εξυπηρετούν δυο σκοπούς που συμβάλλουν στην αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Πρώτον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, διαθέτουν λειτουργία ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT) [49] (βλ. Ενότητα 1.1.1.3), οδηγώντας στη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης κοντά στα ρυθμιστικά στοιχεία του εκάστοτε γονιδίου-στόχου του HIF. Έτσι, διευκολύνεται η προσέλκυση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής. Δεύτερον, οι p300/CBP διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην προσέλκυση του μεταγραφικού συμπλόκου, στο οποίο περιλαμβάνεται η πολυμεράση II του RNA. Επίσης, οι συνενεργοποιητές p300/CBP οδηγούν στην στρατολόγηση πρόσθετων συνενεργοποιητών όπως οι SRC-1, TIF-2 και Ref-1 (Εικόνα 5) [59].



Εικόνα 5. Απεικόνιση του διττού ρόλου των p300/CBP στα στοιχεία HRE. 1) Ακετυλίωση των ιστονών πλησίον στοιχείων HRE με στόχο την χαλάρωση της δομής της χρωματίνης. 2) Στρατολόγηση του μεταγραφικού συμπλόκου και άλλων παραγόντων. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

1.1.2.2 NPM1

Ευρήματα από το Εργαστήριο Βιοχημείας (Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση από την κινάση ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2) έχει σημαντική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1. Ειδικότερα, η κινάση ERK1/2 φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser-641 και Ser-643), που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση του HIF-1α στον πυρήνα [60].

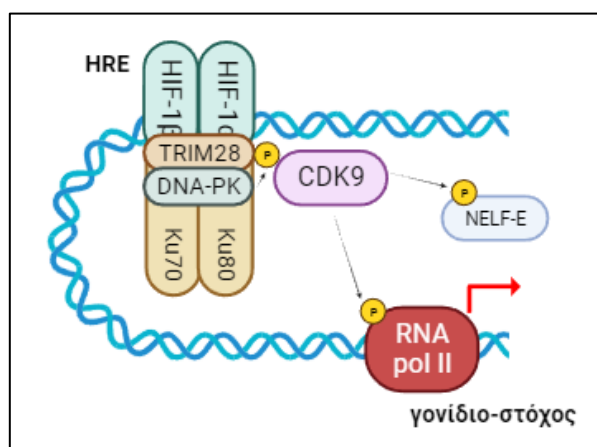
Επιπλέον, η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με τη χρωματίνη και να δημιουργεί άμεση σύνδεση μεταξύ του HIF-1α και της νουκλεοφосμίνης 1 (NPM1) [62]. Η NPM1 εκτελεί ρόλο μοριακού συνοδού ιστονών, λειτουργώντας ως ρυθμιστής της δομής της χρωματίνης. Πρόσφατα ευρήματα [61] έδειξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με την υποξία βρίσκονται υπό τον έλεγχο τόσο της NPM1 όσο και του HIF. Η άμεση αλληλεπίδραση της NPM1 με τον HIF-1α διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του HIF-1 που είναι απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η απουσία της NPM1 ή η αναστολή της αλληλεπίδρασης NPM1-HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των μεταβολικών προσαρμογών που είναι κρίσιμες για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την έναρξη της απόπτωσης [60].

1.1.2.3 TRIM28

Πρόσφατα ευρήματα έριξαν φως σε μια ακόμα ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα TRIM28 (Tripartite Motif Containing 28) και του HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) κοντά σε περιοχές HRE (βλ. Ενότητα 1.1.1.2), αποκαλύπτοντας μια θετική επίδραση στη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-1 [62]. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στη στρατολόγηση της κινάσης DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) και των ρυθμιστικών υπομονάδων της Ku70 και Ku80, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του TRIM28 σε ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο σερίνης (Ser-824). Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί στην στρατολόγηση της κινάσης CDK9 (Cyclin-dependent kinase 9), γνωστή για τον κρίσιμο ρόλο που έχει στην ρύθμιση της πολυμεράσης II του RNA [63].

Ειδικότερα, η πολυμεράση II του RNA φαίνεται ότι συνδέεται στο DNA και εκκινεί την μεταγραφή γονιδίων-στόχων του HIF, ακόμα και απουσία του τελευταίου, αλλά σταματά έπειτα από μερικά νουκλεοτίδια. Παρουσία του HIF-1 και του TRIM28, και κατά επέκταση της CDK9, η τελευταία φωσφορυλιώνει τόσο την καρβοξυτελική ουρά της μεγάλης υπομονάδας της

πολυμεράσης II του RNA όσο και τον αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής NELF-E, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πολυμεράσης II του RNA και την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF (Εικόνα 6) [63].



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου που δημιουργείται μέσω της αλληλεπίδρασης του HIF-1 με τον παράγοντα TRIM28 για την εκκίνηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του HIF-1. (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

Ακόμη ένας παρόμοιος μηχανισμός έχει προταθεί, σύμφωνα με τον οποίο ο HIF-1α στρατολογεί την CDK8, στοιχείο του συμπλέγματος Mediator (Mediator Complex), ώστε να εκκινήσει η διαδικασία επιμήκυνσης από την πολυμεράση II του RNA για τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-1 [64].

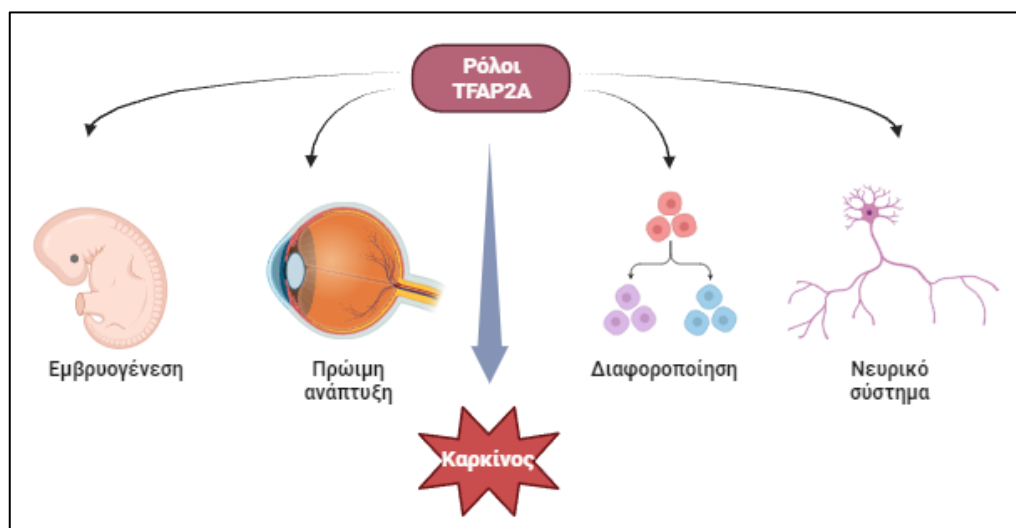
Τα παραπάνω παραδείγματα υπογραμμίζουν την μεγάλη σημασία των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων HIF με άλλες πρωτεΐνες για την αποτελεσματική ρύθμιση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία.

1.2 TFAP2A (Transcription Factor AP-2 Alpha)

Πρόσφατη δημοσίευση της ερευνητικής μας ομάδας [65], αποκάλυψε ένα σύνολο μεταγραφικών παραγόντων των οποίων η σουμοϋλίωση επηρεάζεται στην υποξία. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2A (Transcription Factor AP-2 Alpha) ξεχωρίζει διότι φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με τους παράγοντες HIF-1α και HIF-2α. Επιπρόσθετα, η σουμοϋλίωση του επηρεάζει αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, γεγονός που δείχνει πως εμπλέκεται άμεσα στη μεταγραφική ρύθμιση του HIF [65]. Καθώς η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των HIF-1α και TFAP2A αποτελεί μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η δομή και ο ρόλος του TFAP2A περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

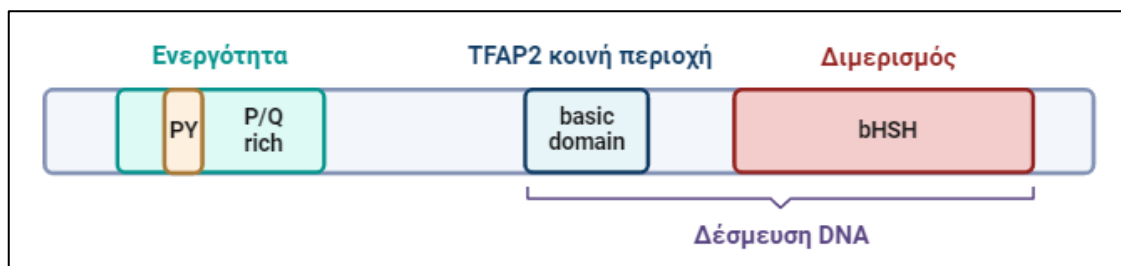
1.2.1 Οικογένεια παραγόντων TFAP2

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων TFAP2 (Transcription Factor Activating Protein 2) έχει κεντρικό ρόλο σε κρίσιμες βιολογικές διεργασίες, όπως η εμβρυογένεση, η πρόιμη ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η ρύθμιση του μονοαμινεργικού συστήματος των νευροδιαβιβαστών (Εικόνα 7) [66-68]. Επιπλέον, οι παράγοντες αυτοί έχουν συνδεθεί στενά με την καρκινογένεση [69-71].



Εικόνα 7. Οι ρόλοι του TFAP2A στην φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία. (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

Η οικογένεια περιλαμβάνει πέντε διακριτά μέλη, τα οποία είναι ο TFAP2A, ο TFAP2B, ο TFAP2C, ο TFAP2D και ο TFAP2E [66]. Όλα τα μέλη διαθέτουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου ενός μοτίβου πλούσιου στα αμινοξέα προλίνη και γλουταμίνη (P/Q-rich) που είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφική τους ενεργότητα, μιας συντηρημένης δομικής περιοχής, που ονομάζεται "basic domain", η οποία διευκολύνει τη δέσμευσή τους στο DNA, και μιας περιοχής HSH (helix-span-helix) που σχετίζεται τόσο με τη δέσμευση στο DNA όσο και με τον σχηματισμό διμερών (Εικόνα 8). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο TFAP2D παρουσιάζει κάποια απόκλιση στη αλληλουχία αυτών των δομικών περιοχών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, κυρίως όσον αφορά την περιοχή P/Q-rich αλλά και την ικανότητα του TFAP2D να συνδέεται σε μοτίβα DNA που είναι γνωστό ότι αποτελούν σημεία σύνδεσης για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας [66].



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της δομής των παραγόντων TFAP2. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζεται η περιοχή P/Q rich, η βασική δομή των TFAP2 παραγόντων και η δομή bHSH. (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

Οι παράγοντες TFAP2 αλληλεπιδρούν με cis-ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων-στόχων τους, με προτίμηση σε περιοχές που είναι πλούσιες στα νουκλεοτίδια γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C). Ένα ευρέως αναγνωρισμένο μοτίβο πρόσδεσης είναι η παλινδρομική αλληλουχία 5'-GCCN(3)GGC-3' [72].

Από πλευράς λειτουργικότητας, ορισμένα μέλη της οικογένειας TFAP2 έχουν σχετιζόμενους ρόλους, ενώ άλλα παρουσιάζουν διακριτές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, οι TFAP2A, TFAP2B και TFAP2C εμπλέκονται κυρίως στην πρώιμη ανάπτυξη των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας [73], στο περιφερικό νευρικό σύστημα [74], στα μεσεγχυματικά κύτταρα των ιστών του προσώπου και των άκρων, σε διάφορα επιθήλια και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς [75]. Αντίθετα, ο TFAP2D σχετίζεται κυρίως με την ανάπτυξη της καρδιάς, του αμφιβληστροειδούς και του κεντρικού νευρικού συστήματος [76], ενώ ο TFAP2E εντοπίζεται κυρίως στον οσφρητικό λοβό του εγκεφάλου [66].

1.2.2 Χαρακτηριστικά του TFAP2A

Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα TFAP2A βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 6 και αποτελείται από 11 εξόνια [67]. Η πρωτεΐνη που εκφράζεται περιλαμβάνει 437 αμινοξέα και μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα ή σχηματίζοντας ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τα παραλόγα της ίδιας οικογένειας [77]. Ο TFAP2A προσδένεται στην αλληλουχία 5'-GCCN(3)GGC-3' στο DNA, μπορεί να αλληλεπιδρά με ενισχυτές διαφόρων γονιδίων, με αποτέλεσμα την προώθηση ή την αναστολή της έκφρασής τους [77].

Αξιοσημείωτα παραδείγματα γονιδίων-στόχων του TFAP2A περιλαμβάνουν την ανασταλτική επίδρασή του στην μεταγραφή του γονιδίου *VEGFA* αλλά και τον ρόλο του στην προώθηση της έκφρασης του VEGF μέσω της ρύθμισης του BMP4 (bone morphogenetic protein 4) και του HSPG2 (heparan sulfate proteoglycan 2), ρυθμίζοντας έτσι την αγγειογένεση [78]. Ο TFAP2A

έχει επίσης θετικό ρυθμιστικό ρόλο για τους μεταγραφικούς ρυθμιστές BRF1 (B-related factor 1) και GTF3C2 (general transcription factor 3C2), που αποτελούν υπομονάδες της πολυμεράσης III του RNA [79]. Ταυτόχρονα, μειώνει έμμεσα την έκφραση του p53 (tumor protein 53) αυξάνοντας τα επίπεδα του MDM2 (mouse double minute 2), ενός γνωστού αρνητικού ρυθμιστή του p53 [79]. Επιπλέον, ο TFAP2A ενισχύει την έκφραση κι άλλων γονιδίων-στόχων του, όπως ο MUC4 (mucin 4), ο p27 ή CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) και ο p21 ή CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1^A) [66].

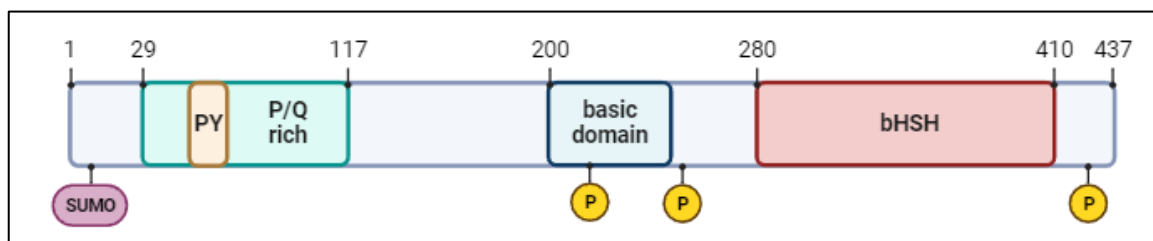
Στην περίπτωση του τελευταίου, έχειδειχθεί ότι η μέγιστη έκφραση του CDKN1A απαιτεί την ταυτόχρονη πρόσδεση του TFAP2A και του p53 σε διαφορετικές θέσεις στον υποκινητή του γονιδίου. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση του TFAP2A με τον αποπτωτικό παράγοντα p53 επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητά του [80]. Στο πλαίσιο των αλληλεπιδράσεων του TFAP2A στη μεταγραφική ρύθμιση, ο παράγοντας PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) έχει αναγνωριστεί επίσης ως πιθανός συνενεργοποιητής του TFAP2A σε κύτταρα PA-1, που χαρακτηρίζονται για την επιθηλιακή μορφολογία τους [81]. Επίσης, η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών Ku70 και Ku80 με τον TFAP2A συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης του ERBB2 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού [82]. Επιπλέον, οι παράγοντες CITED2 και CITED4 (Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domains), γνωστοί για την αλληλεπίδρασή τους με τον HIF-1α, φαίνεται να ενισχύουν τη μεταγραφική δραστηριότητα όλων των ισομορφών της οικογένειας TFAP2 [83]. Παρουσία του CITED2, οι παράγοντες p300/CBP, κύριοι συνενεργοποιητές των HIF (βλ. Ενότητα 1.1.2.1), ασκούν επίσης θετική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του TFAP2A [84].

Τα παραδείγματα που αναφέρθηκαν δείχνουν ότι ο TFAP2A ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με ρυθμιστικές περιοχές τους ή μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες, οδηγώντας τελικά σε μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης.

Επιπρόσθετα, ο TFAP2A υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη μεταγραφική του δραστηριότητα, με τη σουμοϋλίωση στη λυσίνη 10 (Lys-10) να οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η σουμοϋλίωση του TFAP2A στον καρκίνο του μαστού έχει διττό ρόλο. Από τη μία πλευρά, επηρεάζει αρνητικά την έκφραση γονιδίων των αυλικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, τα οποία σχετίζονται με έναν λιγότερο επιθετικό φαινότυπο καρκίνου. Από την άλλη πλευρά, έχει θετική επίδραση για την έκβαση της ασθένειας, αναστέλλοντας γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSC), γνωστών για τα επιθετικά τους

χαρακτηριστικά. Έτσι, η σουμοϋλίωση του TFAP2A συμβάλλει τόσο στην καταστολή των λιγότερο επιθετικών χαρακτηριστικών του καρκίνου όσο και στη μείωση των πληθυσμών των CSC, αναδεικνύοντας τη δυνατότητά του ως στόχου για θεραπευτικές παρεμβάσεις που αποσκοπούν στον μετριασμό της επιθετικότητας της νόσου [85, 86].

Επίσης, η φωσφορυλίωση του TFAP2A στη σερίνη 219 (Ser-219) και στη σερίνη 429 (Ser-429) φαίνεται να ενισχύει την μεταγραφική του ενεργότητα, μέσω ενίσχυσης της σύνδεσης του TFAP2A με το DNA και μέσω της σταθεροποίησης του TFAP2A, αντίστοιχα [87, 88]. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 258 (Ser-258) ενισχύει την σύνδεση του TFAP2A στον υποκινητή του γονιδίου *ABCA1*, καταστέλλοντας όμως την μεταγραφή του [89] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της δομής του TFAP2A. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται οι εξής μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις: η σουμοϋλίωση στην θέση Lys-10 και οι φωσφορυλιώσεις στις θέσεις Ser-219, Ser-258 και Ser-429. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

1.2.3 Ρόλοι στην φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία

Ο TFAP2A αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης, συμμετέχοντας σε διάφορες κρίσιμες διεργασίες. Η συμμετοχή του επεκτείνεται στην ανάπτυξη βασικών δομών όπως το μάτι, και κυρίως στην πρώιμη μορφογένεση του φακού, καθώς και το αυτί [90], το πρόσωπο, το τοίχωμα του σώματος, τα άκρα και ο νευρικός σωλήνας [91]. Επιπλέον, ο TFAP2A παρουσιάζει υψηλά επίπεδα δραστηριότητας στα προμεταναστευτικά και μεταναστευτικά κύτταρα των ανθρώπινων κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (hNCC), ενός εμβρυϊκού πληθυσμού που έχει βασικό ρόλο στην κρανιοπροσωπική ανάπτυξη [92].

Είναι ενδιαφέρον ότι οι λειτουργίες του δεν περιορίζονται μόνο στην κρανιοπροσωπική ανάπτυξη, όπως αποδεικνύεται από πειράματα που διεξήχθησαν σε ψάρια ζέβρα, όπου έχει βασικό ρόλο στην πρώιμη ανάπτυξη των νεφρών [93].

Αυτές οι πολύπλευρες λειτουργίες υπογραμμίζουν τη σημασία του TFAP2A στην ενορχήστρωση ποικίλων αναπτυξιακών διεργασιών σε όλο το φάσμα της πρώιμης εμβρυογένεσης.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TFAP2A* (ιδίως ελλείψεις) ευθύνονται για την εμφάνιση του συνδρόμου BOF (Branchio-Oculo-Facial Syndrome), ενώ η απορρύθμιση του *TFAP2A* συνδέεται στενά με διάφορους τύπους καρκίνου [68].

Μεταλλάξεις εντός του γονιδίου *TFAP2A* ή η διαγραφή ολόκληρου του γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση του συνδρόμου BOF. Το σύνδρομο BOF είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά [68]. Η διάγνωση βασίζεται σε αυτά και επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση ετερόζυγης παθογόνου μεταλλαγής στο γονίδιο *TFAP2A*.

Επιπλέον, η μη φυσιολογική έκφραση του *TFAP2A* έχει συσχετιστεί με άλλες συγγενείς παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου ανοφθαλμίας-μικροφθαλμίας [94], υπογραμμίζοντας τη σημασία του στη φυσιολογική ανάπτυξη. Η κατανόηση της γενετικής βάσης του συνδρόμου BOF και των συναφών καταστάσεων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις πολύπλοκες διαδικασίες της εμβρυογένεσης και το ρόλο του *TFAP2A* στη διασφάλιση της ορθής εκτέλεσής τους.

1.2.4 *TFAP2A* και καρκίνος

Ο *TFAP2A* επηρεάζει επίσης σημαντικά τις διαδικασίες της καρκινογένεσης. Τα επίπεδα έκφρασής του μπορούν είτε να ευνοήσουν είτε να καταστείλουν τέτοιες διαδικασίες, ανάλογα με τον τύπο καρκίνου [67].

Ογκοκατασταλτικές ιδιότητες παρουσιάζει σε ορισμένες κακοήθειες, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όπου ο *TFAP2A* έχει συνδεθεί με μείωση της διεισδυτικής ικανότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [95]. Στο αδеноκαρκίνωμα στομάχου και στον καρκίνο του μαστού, η μειωμένη έκφραση του *TFAP2A* σχετίζεται με προχωρημένη νόσο και κακή πρόγνωση [96, 97].

Αντίθετα, σε κύτταρα νευροβλαστώματος αυξημένου κινδύνου, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του *TFAP2A* εντοπίζονται αυξημένα, υποδεικνύοντας ογκογόνο δράση [98]. Επιπλέον, ο *TFAP2A* συμβάλλει στα πρώιμα στάδια της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) σε ορισμένους καρκίνους, όπως ο καρκίνος του μαστού [99]. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, ότι στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα ο *TFAP2A* έχει ογκογόνο δράση και έχει συνδεθεί με τον HIF-1α, όπως περιγράφεται παρακάτω [100] (βλ. Ενότητα 1.2.5).

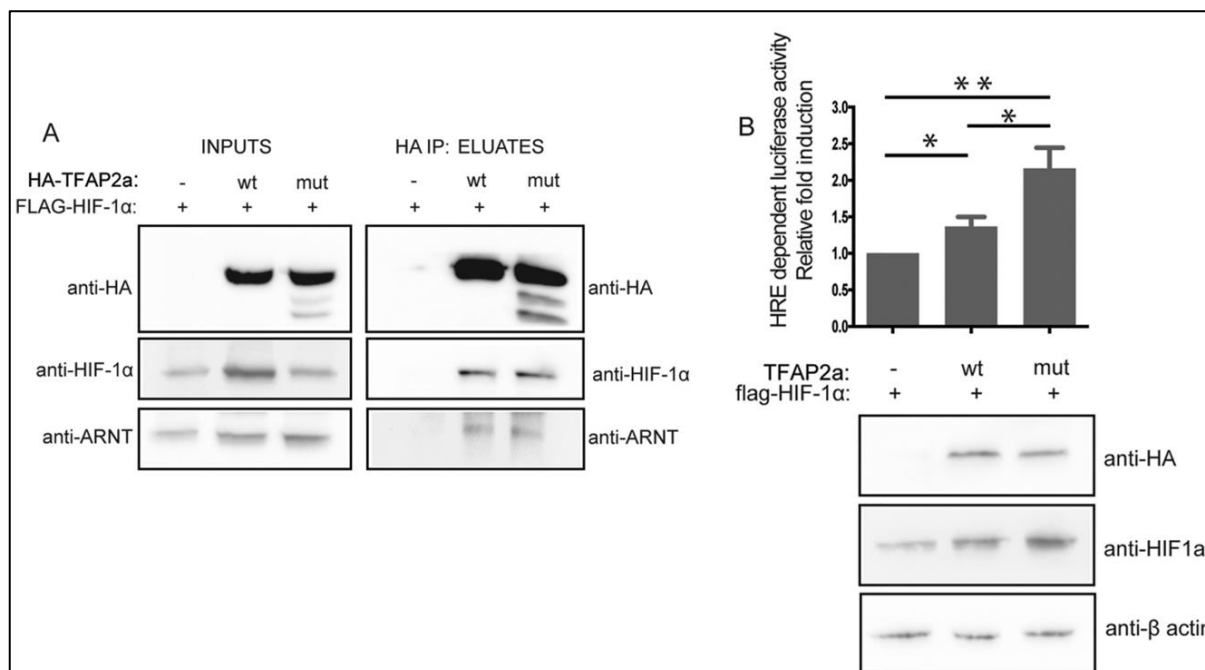
Η κατανόηση των πολύπλευρων λειτουργιών του *TFAP2A* προσφέρει πληροφορίες για την εξέλιξη του καρκίνου και πιθανές θεραπευτικές στρατηγικές.

1.2.5 TFAP2A και υποξία

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (βλ. Ενότητα 1.2.2), έχουν παρατηρηθεί αλληλεπιδράσεις του TFAP2A με παράγοντες που συνδέονται στενά με το μονοπάτι απόκρισης στην υποξία. Συγκεκριμένα, η ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του TFAP2A φαίνεται να επηρεάζεται θετικά από τον παράγοντα CITED2, ο οποίος αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, και από τους p300/CBP, απαραίτητους συνενεργοποιητές της μεταγραφικής λειτουργίας των παραγόντων HIF. Επίσης, διαπιστωμένη είναι η αλληλεπίδραση του TFAP2A με τις πρωτεΐνες Ku, οι οποίες συμμετέχουν στο σύμπλοκο του HIF-1 με τον παράγοντα TRIM28 για την εκκίνηση της μεταγραφής. Λαμβάνοντας αυτά τα στοιχεία υπόψιν, καθίσταται προφανές ότι υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δράσεων των HIF και του TFAP2A, φαινόμενο που τεκμηριώνεται και από τα ακόλουθα ερευνητικά ευρήματα:

Στο μελάνωμα, η ταυτόχρονη παρουσία των TFAP2A και HIF-2α συνδέεται με μειωμένη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι μαζί αποτελούν έναν πιθανό προγνωστικό δείκτη για τους ασθενείς [101]. Στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, ο TFAP2A παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα και συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του HIF-1α. Τα αυξημένα επίπεδα του TFAP2A σχετίζονται επίσης με προχωρημένο στάδιο της ασθένειας, με αυξημένη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων και με κακή πρόγνωση των ασθενών. Ο TFAP2A όχι μόνο αλληλεπιδρά με τον HIF-1α αλλά επηρεάζει επίσης το μεσολαβούμενο από τον HIF-1α μονοπάτι σηματοδότησης VEGF/PEDF. Η απενεργοποίηση του TFAP2A αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου στοχεύοντας αυτό το μονοπάτι και, κατ' επέκταση εμμέσως αναστέλλοντας την αγγειογένεση, καθιστώντας τον δυνητικό προγνωστικό βιοδείκτη και θεραπευτικό στόχο για το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα [100].

Επιπλέον, πρόσφατη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοχημείας [65] έδειξε ότι το πρότυπο σουμοϋλίωσης του TFAP2A αλλάζει σε απόκριση στην υποξία. Υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου παρατηρείται μείωση της σουμοϋλίωσης του TFAP2A. Η αποσουμοϋλίωση του σε συνθήκες υποξίας φαίνεται να επηρεάζει θετικά τη δραστηριότητα του HIF-1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σουμοϋλίωση του TFAP2A πιθανόν να λειτουργεί ως κρίσιμος ρυθμιστικός διακόπτης που επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 10B). Επιπλέον, ο ρόλος του TFAP2A επεκτείνεται πέρα από τη σουμοϋλίωση, καθώς αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και με τον HIF-2α, ανεξάρτητα από την σουμοϋλίωσή του (Εικόνα 10^A). Ακόμα, αδημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας μας δείχνουν πως ο TFAP2A συνδέεται και επηρεάζει ένα πλήθος γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση στην υποξία μαζί με τον HIF-1.



Εικόνα 10. Ο TFAP2A συνδέεται με τον HIF-1α και τον ARNT, με τρόπο ανεξάρτητο από την σουμοϋλίωσή του, ενώ η αποσουμοϋλίωσή του αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Α) Απεικόνιση αποτελεσμάτων πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της πρωτεΐνης TFAP2A και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο HA, τον HIF-1α και τον ARNT. Β) Απεικόνιση αποτελεσμάτων πειραμάτων μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο HA, τον HIF-1α και την βήτα-ακτίνη [65].

Συνοψίζοντας, οι αλληλεπιδράσεις αυτές κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικές για την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία δίνοντας έμφαση στο ρόλο του TFAP2A ως δυνητικού βιοδείκτη και θεραπευτικού στόχου σε διάφορους τύπους καρκίνου.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο TFAP2A είναι ένας γενικός μεταγραφικός παράγοντας με πολλαπλούς ρόλους στην πρόιμη ανάπτυξη του εμβρύου καθώς και σε διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος. Προηγούμενη δουλειά του Εργαστηρίου Βιοχημείας (*Chachami et al., 2019b*) απέδειξε ότι η αλληλεπίδραση του TFAP2A με τον HIF-1α έχει μεγάλη σημασία για την μεταγραφική δράση του HIF-1 και κατ'επέκταση για την ενορχήστρωση του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του TFAP2A με δομικές επικράτειες του HIF-1α, προκειμένου να βρεθεί η ακριβής περιοχή αλληλεπίδρασης.

Πρώτο βήμα της εργασίας αποτελεί η απομόνωση πρωτεϊνικών επικρατειών του HIF-1α για χρήση τους σε πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης. Ειδικότερα, οι χμαιοικές πρωτεΐνες των διάφορων επικρατειών του HIF-1α θα υπερεκφραστούν σε βακτήρια BL21 RIL και θα απομονωθούν σε καθαρή μορφή μέσω του επίτοπου τους GST. Στα επακόλουθα πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης, οι καθαρές πρωτεϊνικές επικράτειες θα καθηλωθούν σε σφαιρίδια και θα μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις τους με μορφές TFAP2A που θα είναι υπερεκφρασμένες σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa.

Για την περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης του TFAP2A με δομικές επικράτειες του HIF-1α, θα ακολουθηθεί ειδικό πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες υπερεκφρασμένου σε HeLa κύτταρα TFAP2A με τις επικράτειες 1-347 και 348-826 του HIF-1α.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία στόχος μας είναι να προσδιορίσουμε την ακριβή θέση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τον TFAP2A, ώστε να διευκυνθεί η σημασία και ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης των δυο παραγόντων στις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα είδη καρκίνου.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1 Πλασμιδιακοί φορείς

3.1.1 pcDNA3.1-HA

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-HA περιέχει την κωδική αλληλουχία του επιτόπου HA (YPYDVPDYA από την πρωτεΐνη Human influenza hemagglutinin) υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (Cytomegalovirus) και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από θηλαστικά. Ο επίτοπος HA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, χωρίς να επηρεάζει την δραστηριότητά της. Ο φορέας pcDNA3.1-HA περιέχει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της καθηγήτριας F. Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Γερμανία).

3.1.2 pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt περιέχει την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης TFAP2A με τον επίτοπο HA στο αμινοτελικό της άκρο, υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (Cytomegalovirus). Η κωδική αλληλουχία του TFAP2A παραχωρήθηκε με την μορφή του πλασμιδίου pcDNA3-TFAP2A wt από το εργαστήριο του S.Bhattacharya (University of Oxford) και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pcDNA3.1-HA από την Μπασαγιάννη Αγγελική στα πλαίσια της μεταπτυχιακής της εργασίας (Α. Μπασαγιάννη Μεταπτυχιακή εργασία 2015, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.3 pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut περιέχει την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης TFAP2A που φέρει την σημειακή μετάλλαξη K10R, χάνοντας έτσι την ικανότητα σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης. Δημιουργήθηκε μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με μήτρα τον φορέα pcDNA3-TFAP2A wt από την καθηγήτρια Χαχάμη Γεωργία (Chachami et al., 2019, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.4 pcDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut περιέχει την κωδική αλληλουχία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TFAP2A mut (K10R), στην οποία έχει ενσωματωθεί η κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης SUMO2 στο αμινοτελικό άκρο της, ώστε να ομοιάζει την πλήρως σουμοϋλιωμένη μορφή της TFAP2A. Επιπλέον η SUMO2 εμφανίζει διπλή μετάλλαξη στα τελευταία 2 αμινοξέα (GG σε AA) ώστε να μην αναγνωρίζεται από ενδογενείς SUMO ισοπεπτιδάσες και να μην αποκόπτεται. Ο φορέας δημιουργήθηκε από την καθηγήτρια Χαχάμη Γεωργία και την κ. Κανούρα Αμαλία στα πλαίσια της μεταπτυχιακής της εργασίας (Α. Κανούρα

Μεταπτυχιακή εργασία 2020, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.5 pGEX HIF-1α wt 1-347

Η αλληλουχία του γονιδίου HIF-1α που κωδικοποιεί για τα πρώτα 347 αμινοξέα της πρωτεΐνης του HIF-1α (1-347) έχει εισαχθεί σε φορέα pGEX και φέρει επίτοπο GST στο αμινο-τελικό του άκρο. Η έκφραση πραγματοποιείται υπό τον έλεγχο του υποκινητή tac, ο οποίος επάγεται από το IPTG (βλέπε Ενότητα 8.5). Ο φορέας pGEX περιέχει επίσης το γονίδιο lacI, το προϊόν του οποίου είναι μια κατασταλτική πρωτεΐνη που συνδέεται με την περιοχή χειριστή lacO του υποκινητή tac, εμποδίζοντας την έκφραση μέχρι την επαγωγή από IPTG. Περιέχει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικίνη. Παραχωρήθηκε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Ηλία Μυλωνή (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.6 pGEX HIF-1α wt 348-826

Η αλληλουχία του γονιδίου HIF-1α που κωδικοποιεί για τα τελευταία 479 αμινοξέα της πρωτεΐνης του HIF-1α (348-826) έχει εισαχθεί σε φορέα pGEX και φέρει επίτοπο GST στο αμινο-τελικό του άκρο. Η έκφρασή του ελέγχεται από το επαγόμενο από IPTG σύστημα που περιγράφεται παραπάνω (βλέπε Ενότητα 1.5). Παραχωρήθηκε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Ηλία Μυλωνή (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.7 pGEX HIF-1α wt 575-826

Η αλληλουχία του γονιδίου HIF-1α που κωδικοποιεί για τα τελευταία 251 αμινοξέα της πρωτεΐνης του HIF-1α (575-826) έχει εισαχθεί σε φορέα pGEX και φέρει επίτοπο GST στο αμινο-τελικό του άκρο. Η έκφρασή του ελέγχεται από το επαγόμενο από IPTG σύστημα που περιγράφεται παραπάνω (βλέπε Ενότητα 1.5). Παραχωρήθηκε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Ηλία Μυλωνή (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας).

3.1.8 CMV flag-HIF-1α 1-347

Η αλληλουχία του γονιδίου HIF-1α που κωδικοποιεί για τα πρώτα 347 αμινοξέα της πρωτεΐνης του HIF-1α (1-347) έχει εισαχθεί σε φορέα pCMV2 με επίτοπο FLAG υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (Cytomegalovirus) και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από θηλαστικά. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικίνη. Κατασκευάστηκε και παραχωρήθηκε από την υποψήφια διδάκτωρα Αρσένη Χριστίνα του Εργαστηρίου Βιοχημείας.

3.1.9 pEGF HIF-1α 348-826

Η αλληλουχία του γονιδίου HIF-1α που κωδικοποιεί για τα τελευταία 479 αμινοξέα της πρωτεΐνης του HIF-1α (348-826) έχει εισαχθεί σε φορέα pEGFP-C1 με επίτοπο GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV (Cytomegalovirus) και χρησιμοποιείται για υπερέκφραση σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από θηλαστικά. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην канаμυκίνη. Κατασκευάστηκε από τον κύριο Μυλωνή Ηλία (Mylonis et al., 2006).

3.2 Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του είδους *Escherichia coli*, τα οποία είναι δεκτικά για μετασχηματισμό με πλασμιδιακό φορέα.

3.2.1 TOP10 *E. coli*

Τα TOP10 *E. coli* βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό και την απομόνωση πλασμιδίων μετασχηματισμού. Τα βακτήρια έχουν ανθεκτικότητα σε στρεπτομυκίνη.

3.2.2 BL21 RIL *E. coli*

Τα BL21 RIL *E. coli* βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό πλασμιδίων και την υπερέκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Τα βακτήρια περιέχουν επιπλέον αντίγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν τα tRNA (*arg*, *ile*, και *leu*) που περιορίζουν συνήθως τη μετάφραση ετερόλογων πρωτεϊνών και έχουν ανθεκτικότητα σε χλωραφαινικόλη.

3.3 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακές καλλιέργειες

3.3.1 Υγρό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani broth)

Περιέχει: 10gr Pepton from casein, 5gr Bacto Yeast Extract, 5gr Sodium Chloride και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 500ml. Ακολουθεί αποστείρωση και σε ορισμένες περιπτώσεις προσθήκη 500μL του κατάλληλου αντιβιοτικού.

3.3.2 Στερεό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani broth)

Το στερεό θρεπτικό μέσο LB περιέχει τα ίδια συστατικά με το υγρό θρεπτικό μέσο (Ενότητα 3.1) με 20gr άγαρ. Μετά την αποστείρωση και ψύξη του θρεπτικού μέσου στους 40°C προστίθενται 500μL κατάλληλου αντιβιοτικού και ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία petri.

3.4 Καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι η σειρά HeLa (Henrietta Lacks) και προέρχεται από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας.

3.5 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών σειρών

3.5.1 DMEM -/-

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι το DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), το οποίο προέρχεται από την εταιρία Gibco και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε D-γλυκόζη (4500 mg/L), πυροσταφυλικό νάτριο και L-γλουταμίνη.

3.5.2 DMEM +FBS/+PS

Το θρεπτικό μέσο DMEM ++ έχει την σύσταση που περιγράφεται παραπάνω (βλ. Ενότητα 3.5.1), όπου προστίθενται επιπλέον 10% απενεργοποιημένος βόειος εμβρυικός ορός FBS και 1000U/l από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

3.5.3 DMEM +5% FBS/+PS

Το θρεπτικό μέσο DMEM +5% FBS/+PS χρησιμοποιήθηκε στην διαδικασία της διαμόλυνσης καρκινικών κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς (βλ. Ενότητα 4.2.2). Στην κύρια σύσταση του θρεπτικού μέσου DMEM -/- (βλ. Ενότητα 3.5.1) έχει προστεθεί 5% απενεργοποιημένος βόειος εμβρυικός ορός FBS και 1000U/l από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

3.6. Αντιβιοτικά

3.6.1 Αμπικιλίνη

Η αμπικιλίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1000U/ml και προέρχεται από την εταιρία Biosera.

3.6.2 Χλωραμφαινικόλη

Η χλωραμφαινικόλη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1000U/ml και προέρχεται από την εταιρία Biosera.

3.6.3 Πενικιλίνη

Η πενικιλίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1000U/ml και προέρχεται από την εταιρία Biosera.

3.6.4 Στρεπτομυκίνη

Η στρεπτομυκίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1000U/ml και προέρχεται από την εταιρία Biosera.

3.7 Αντισώματα

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Χρήση ως	Προέλευση
Anti-ARNT1	Ποντίκι	1:500	μονοκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	BD Biosciences
Anti-beta actin	Ποντίκι	1:5000	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Cell Signalling Biotechnology
Anti-FLAG	Ποντίκι	1:1000	μονοκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Sigma-Aldrich
Anti-GFP	Κουνέλι	1:1000	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GST	Κουνέλι	1:10000	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Εργαστήριο Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Γερμανία)
Anti-HA	Κουνέλι	1:1000, 1:2500	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Cell Signalling Biotechnology
Anti-HIF-1α	Κουνέλι	1:1000	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Lyberopoulou et al, 2017
Anti-HIF-1α	Ποντίκι	1:1000	μονοκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	BD Biosciences
Anti-TFAP2A	Κουνέλι	1:1000	πολυκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Proteintech
Anti-tubulin	Ποντίκι	1:10000	μονοκλωνικό	Πρωτογενές αντίσωμα	Cell Signalling Biotechnology

Anti-IgG κουνελιού συζευγμένο με HRP	Κουνέλι	1:5000	-	Δευτερογενές αντίσωμα	Cell Signalling Biotechnology
Anti-IgG ποντικού συζευγμένο με HRP	Ποντικός	1:5000	-	Δευτερογενές αντίσωμα	Cell Signalling Biotechnology

Πίνακας 1. Περιγράφονται με την σειρά: το όνομα του αντισώματος, ο οργανισμός από τον οποίο προήλθε, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε, ο τύπος του αντισώματος και η προέλευσή του.

3.8 Χημικά

Για όσα χημικά διαλύματα δεν αναφέρεται η προέλευση τους, προέρχονται από τις εταιρίες Sigma-Aldrich και AppliChem.

3.9. Διαλύματα

3.9.1 Διαλύματα για δημιουργία δεκτικών βακτηρίων E. Coli

3.9.1.1 Θρεπτικό μέσο TYM

Το θρεπτικό μέσο TYM περιέχει 2% peptone, 0,5% Yeast Extract, 0,1M NaCl και 10mM MgSO₄. Αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.9.1.2 Διάλυμα TFB-I (Transformation Buffer I)

Το διάλυμα TFB-I περιέχει 30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη και έχει pH 7. Φιλτράρεται με ειδικό φίλτρο 0,45μM πριν την χρήση και αποθηκεύεται στους 4°C.

3.9.1.3 Διάλυμα TFB-II (Transformation Buffer II)

Το διάλυμα TFB-II περιέχει 10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM KCl και 20% γλυκερόλη. Φιλτράρεται με ειδικό φίλτρο 0,45μM πριν την χρήση και αποθηκεύεται στους 4°C.

3.9.2 Διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών

3.9.2.1 Βόειος εμβρυϊκός ορός

Ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα ορού για την *in vitro* κυτταροκαλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων. Περιέχει αυξητικούς παράγοντες, απαραίτητους για την ανάπτυξη των κυττάρων.

3.9.2.2 Διάλυμα θρυψίνης 0,2%

Το διάλυμα θρυψίνης χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων για την αποκόλληση και τον διαχωρισμό των προσκολλημένων κυττάρων από τις επιφάνειες του πιάτου καλλιέργειας, επιτυγχάνοντας την ανακαλλιέργεια των αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων (βλ. Ενότητα 4.2.1).

3.9.2.3 Διάλυμα PBS 10x

Το διάλυμα PBS περιέχει NaCl (1,37M), KCl (26mM), Na₂HPO₄/2H₂O (112mM), KH₂HPO₄ (18mM) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 500ml. Το PBS αραιώνεται 1:10 με ddH₂O και χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων ως ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση της οσμωτικότητας, της σταθερότητας του pH και την παροχή βασικών ιόντων για τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των κυττάρων.

3.9.3 Διαλύματα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

- Διάλυμα λύσης 150mM NaCl, 50mM Hepes-NaOH pH 7,6, 1% v/v Triton X-100, 2mM MgCl₂
- Υδατικό διάλυμα 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- DTT 100mM
- Αναστολείς πρωτεασών-PI mix G
- SDS Laemmli Loading buffer απουσία DTT (τελική συγκέντρωση στο 1X): 50mM Tris pH: 6,8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη
- Αντιδραστήριο Bradford: αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης

3.9.4 Διαλύματα in vitro συγκατακρήμνισης

- Διάλυμα λύσης: 25mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ και 1%v/v Triton X-100
- SDS Laemmli Loading buffer απουσία DTT (τελική συγκέντρωση στο 1X)
- DTT 100mM
- Αναστολείς πρωτεασών-PI mix G

3.9.5 Διαλύματα SDS Ηλεκτροφόρησης

- SDS Laemmli Loading buffer (τελική συγκέντρωση 1X): 50mM Tris pH: 6,8, 2% SDS, 0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη, 100mM DTT

- Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού: 0,375 Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης: 0,125 Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,3
- Διάλυμα χρωστικής Coomassie: 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% CH₃COOH και 50% αιθανόλη
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 10% οξικό οξύ και 10% αιθανόλη σε H₂O

3.9.6 Διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς: 125 mM Tris-Borate (pH 8,5), 0,2% SDS, 0,5 mM DTT
- Διάλυμα χρωστικής Ponceau S: 49,5mL H₂O, 0,5mL οξικό οξύ και 0,25gr Ponceau
- Διάλυμα γάλακτος κορεσμού: 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε διάλυμα 1x PBS – 0.1% Tween
- Διαλύματα αντισωμάτων
 - ο Διάλυμα γάλακτος κορεσμού
 - ο Διάλυμα PBS 1x
- Εμφανιστικό μέσα
 - ο Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore)
 - ο Διάλυμα λουμινόλης: 2,2 mgr λουμινόλης σε 10mL Tris 0,1M pH 8,5, p-κουμαρικό οξύ 0,112 mgr σε 100μL DMSO και 30μL H₂O₂ 3%

3.9.7 Διαλύματα υπερέκφρασης πλασμιδιακού φορέα σε BL21 RIL βακτήρια

- Διάλυμα IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 1M: 0,2383gr σε 1mL ddH₂O. Το IPTG αποτελεί ένα συνθετικό ανάλογο της λακτόζης και χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια, όταν τα γονίδιά τους ρυθμίζονται από το επαγόμενο από λακτόζη σύστημα.
- Διάλυμα PBS 1x με AEBSF 0,1mM

3.9.8 Διαλύματα λύσης BL21 RIL βακτηρίων και καθαρισμού πρωτεΐνης

- Διάλυμα λύσης: 20mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% v/v Triton X-100, 1mM
- DTT 100mM

- Αναστολείς πρωτεασών-PI mix G
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 10 mM σε 25 mM Tris-HCl pH 8,5

3.10 Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο πολυαιθυλενοϊμίνης για διαμόλυνση κυττάρων HeLa: PEI (1μg/μl) της εταιρείας ABM Inc
- Αντιδραστήρια για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια μεσαίας και μικρής κλίμακας: kit “NucleoSpin® plasmid” της εταιρείας Macherey-Nagel

3.11 Σφαιρίδια

- HA-protein σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με αντίσωμα ενάντι του επιτόπου HA της εταιρείας Sigma Aldrich
- Σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με γλουταθειόνη της εταιρείας Macherey-Nagel

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

4.1.1 Δημιουργία χημειοδεκτικών βακτηρίων *E. Coli*

Κατά την προετοιμασία δεκτικών βακτηρίων *E. coli*, δημιουργούνται συνθήκες όπου η πιθανότητα πρόσληψης ξένου DNA (στην προκειμένη πλασμιδιακού DNA) από τα βακτηριακά κύτταρα είναι αρκετά υψηλή. Αυτό επιτυγχάνεται με την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των βακτηρίων. Για την αποτελεσματική δημιουργία δεκτικών βακτηρίων, σημαντικοί είναι τρεις παράγοντες. Πρώτον, τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή στην φάση κατά την οποία παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός και υπάρχουν άφθονα θρεπτικά υλικά στο περιβάλλον των κυττάρων, βήμα που επιτυγχάνεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Δεύτερον, τα βακτηριακά κύτταρα της εκθετικής φάσης πρέπει να σταματήσουν την ανάπτυξή τους και να δημιουργηθούν συνθήκες αστιτίας, γεγονός που καθιστά τα κύτταρα πιο δεκτικά. Αυτό συμβαίνει με την παραμονή των κυττάρων στον πάγο για μεγάλο χρονικό διάστημα, απουσία θρεπτικού υλικού. Τέλος, είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθούν διαλύματα που περιέχουν ιόντα Ca (Ca^{2+}), καθώς εξουδετερώνουν τα αρνητικά φορτία της βακτηριακής μεμβράνης και των μορίων DNA, προωθώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ τους κατά τον μετέπειτα μετασχηματισμό (βλ. Ενότητα 4.1.2). Επιπροσθέτως, η χαμηλή θερμοκρασία και τα ιόντα Ca αυξάνουν την ρευστότητα και την διαπερατότητα της βακτηριακής μεμβράνης.

Αρχικά, δημιουργείται υγρή καλλιέργεια από μεμονωμένη βακτηριακή αποικία σε 5mL υγρού θρεπτικού μέσου TYM (βλ. Ενότητα 3.9.1.1) παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, η οποία επωάζεται ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Την επομένη, γίνεται αραιώση 1:100 της αρχικής καλλιέργειας σε 3mL θρεπτικού μέσου TYM παρουσία αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση της νέας καλλιέργειας για 2-3 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Με το πέρας της επώασης γίνεται ξανά αραιώση της καλλιέργειας 1:200 και δημιουργείται μία νέα υγρή καλλιέργεια των 50mL θρεπτικού μέσου TYM χωρίς αντιβιοτικό, η οποία επωάζεται πάλι στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι να φτάσει η οπτική πυκνότητα $\text{OD}_{600} = 0,35-0,4$. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3000rpm για 7 λεπτά στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος που περιέχει τα κύτταρα σε 25mL του διαλύματος TFB-I (βλ. Ενότητα 3.9.1.2). Τα κύτταρα παραμένουν στο διάλυμα TFB-I για 10 λεπτά στον πάγο. Στην συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 25mL του διαλύματος TFB-II (βλ. Ενότητα 3.9.1.3) και τα κύτταρα παραμένουν στο διάλυμα αυτό για 1 ώρα στον πάγο. Μετά το

πέρας της επώασης το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται σε σωληνάκια τύπου Eppendorf ανά 100μL και αποθηκεύονται για περαιτέρω χρήση στους -80°C.

4.1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E. coli* με θερμικό σοκ με πλασμιδιακούς φορείς

Η απότομη αύξηση της θερμοκρασίας ή αλλιώς θερμικό σοκ είναι μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εισαγωγής πλασμιδιακού φορέα σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα. Καθώς το θερμικό σοκ είναι σύντομο, δημιουργείται διαφορά της θερμοκρασίας έξω από τα βακτηριακά κύτταρα με την ενδοκυττάρια θερμοκρασία, με την τελευταία να μην έχει προλάβει να αυξηθεί αρκετά και να είναι χαμηλότερη. Από αυτήν την διαφορά θερμοκρασίας προκύπτει διαφορά πίεσης, λόγω της οποίας σχηματίζονται οπές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Μέσω αυτών των οπών εισάγεται ο πλασμιδιακός φορέας στα βακτήρια.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, 0,5-1μL του πλασμιδιακού φορέα προστίθενται σε 25μL χημειοδεκτικών κυττάρων *E. coli* (βλ. Ενότητα 4.1.1) και το μείγμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα και τα κύτταρα τοποθετούνται πάλι στον πάγο για 2 λεπτά. Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται σε 1mL υγρού θρεπτικού μέσου LB (βλ. Ενότητα 3.3.1) χωρίς αντιβιοτικό για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 4000rpm για 5 λεπτά, απομακρύνονται 800μL από το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται στα εναπομείναντα 200μL του θρεπτικού υλικού. Το μείγμα αυτό επιστρώνεται σε πιάτο με στερεό θρεπτικό υλικό LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού.

Απομόνωση μικρής και μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες

Για την απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων από βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, τα βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν την κωδική αλληλουχία του πλασμιδίου μετά από μετασχηματισμό πολλαπλασιάζονται ολονύκτια σε υγρή καλλιέργεια παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Την επόμενη μέρα (μετά από 16 ώρες) γίνεται συλλογή των βακτηρίων με φυγοκέντρηση και επαναιώρηση στο ρυθμιστικό διάλυμα A1 (Resuspension Buffer). Ακολουθεί λύση των κυττάρων με χρήση του διαλύματος A2 (Lysis Buffer) που περιέχει SDS, για την αποδιάταξη μεμβρανών και πρωτεϊνών, και NaOH, το οποίο σπάει τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις του DNA, κι έτσι από τα δίκλωνα μόρια DNA προκύπτουν μονόκλωνα μόρια. Για τον επανασχηματισμό των δίκλωνων μορίων του πλασμιδιακού DNA, προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης A3 (Neutralization Buffer), το οποίο μειώνει την αλκαλικότητα μέσω χαμηλού pH. Με αυτόν τον τρόπο το πλασμιδιακό DNA επανασχηματίζεται, ενώ το γενωμικό DNA δεν το

καταφέρει λόγω του μεγάλου του μεγέθους. Στην συνέχεια, το δίκλωνο πλασμιδιακό DNA εκλούεται με το διάλυμα AE (Elution Buffer), κατακρημνίζεται με χρήση κρύας ισοπροπανόλης και αιθανόλης 70% και επαναιωρείται σε ddH₂O.

Για την απομόνωση και τον διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA και το NucleoSpin Plasmid, Midi kit for plasmid DNA και σύμφωνα με το πρωτόκολλο Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli* του παρασκευαστή.

4.1.3 Υπερέκφραση πλασμιδιακού φορέα σε βακτηριακά κύτταρα BL21 RIL

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος φέρουν το επαγόμενο από λακτόζη σύστημα. Στο σύστημα αυτό, απουσία λακτόζης, το οπερόνιο της λακτόζης λειτουργεί κατασταλτικά για την έκφραση του γονιδίου-στόχου. Η καταστολή αυτή πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης της πρωτεΐνης καταστολέα LacI στην περιοχή χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, εμποδίζοντας έτσι την RNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Ωστόσο, όταν το IPTG, που ομοιάζει δομικά με τη λακτόζη, προστίθεται στη βακτηριακή καλλιέργεια, δρα ως επαγωγέας της μεταγραφής καθώς διακόπτει την κατασταλτική δράση του οπερονίου της λακτόζης. Προσδένεται στην πρωτεΐνη του καταστολέα LacI, προκαλώντας μια αλλαγή διαμόρφωσης που οδηγεί στην αποκόλληση του καταστολέα από την περιοχή του χειριστή. Κατά συνέπεια, η RNA πολυμεράση αποκτά πρόσβαση στον υποκινητή, επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου.

Για την υπερέκφραση των τμημάτων του παράγοντα HIF-1α, πλασμίδια από όπου εκφράζουν τα πρωτεϊνικά τμήματα 1-347, 348-826 και 575-826 σε σύντηξη με τον επίτοπο GST (βλ. Ενότητες 3.1.5-3.1.7) μετασχημάτισαν (βλ. Ενότητα 4.1.2) κύτταρα BL21 RIL (βλ. Ενότητα 3.2.2). Αρχικά δημιουργείται υγρή καλλιέργεια των παραπάνω κυττάρων σε 50mL θρεπτικού μέσου LB παρουσία αμικικιλίνης (1:1000) και χλωραμφενικόλης (1:1000), η οποία επωάζεται ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Την επομένη, γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας, ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία νέας καλλιέργειας του ενός λίτρου που θα έχει αρχικό OD₆₀₀ = 0,1. Η νέα καλλιέργεια βρίσκεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία των προαναφερθέντων αντιβιοτικών και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει 0,4-0,6. Στο σημείο αυτό συλλέγεται δείγμα (- IPTG), για μετέπειτα ανάλυση με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα IPTG (τελική συγκέντρωση 0,2 mM, βλ. Ενότητα 3.9.7) στην καλλιέργεια, η οποία επωάζεται στους 25°C για 2,5 ώρες υπό ανάδευση. Με το πέρας της επώασης, γίνεται συλλογή δείγματος (+ IPTG) και η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 4.000rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρείται

σε ddH₂O και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 4.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Γίνεται έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα PBS 1x με AEBSF 0,1Mm (βλ. Ενότητα 3.9.7), φυγοκέντρωση και το ίζημα που περιέχει τα βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύεται στους -20°C.

4.1.4 Λύση των βακτηριακών κυττάρων BL21 RIL και απομόνωση καθαρής υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης

Για την λύση των βακτηριακών κυττάρων μετά από πειράματα υπερέκφρασης πλασμιδιακού φορέα (βλ. Ενότητα 4.1.3), τα κύτταρα ξεπαγώνουν γρήγορα και επαναιωρούνται σε διάλυμα λύσης (βλ. Ενότητα 3.9.8). Για το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-1α 1-347 δημιουργήθηκε 1 λίτρο αρχικής υγρής καλλιέργειας βακτηρίων BL21 RIL και χρησιμοποιήθηκαν 20mL από το διάλυμα λύσης, ενώ για τα πρωτεϊνικά τμήματα GST-HIF-1α 348-826 και GST-HIF-1α 575-826 400mL αρχικής καλλιέργειας και 8mL από το διάλυμα λύσης.

Ακολουθούν πέντε κύκλοι κατεργασίας με υπερήχους, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως μία αξιόπιστη μέθοδος κυτταρικής διάσπασης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 11.000rpm στους 4°C για 30 λεπτά για τον διαχωρισμό του υπερκείμενου, που περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες, και του ιζήματος που περιέχει άσπαστα κύτταρα και τις μη διαλυτές πρωτεΐνες. Και από τις 2 φάσεις συλλέγεται δείγμα για ανάλυση με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για την απομόνωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος έγινε χρήση σφαιριδίων αгарόζης συζευγμένα με γλουταθειόνη (βλ. Ενότητα 3.11) για την δέσμευση και απομόνωση των πρωτεϊνικών τμημάτων GST-HIF-1α 1-347, GST-HIF-1α 348-826 και GST-HIF-1α 575-826 (βλ. Ενότητες 3.1.5-3.1.7), μέσω της σύνδεσης του επιτόπου GST με την γλουταθειόνη GSH. Πιο συγκεκριμένα, 200μL σφαιριδίων εξισορροπούνται με το διάλυμα λύσης και επωάζονται με 20mL του υπερκείμενου που προέκυψε μετά την λύση ενός λίτρου βακτηρίων για μία ώρα στους 4°C υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς, ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση. Ακολουθεί φυγοκέντρωση και συλλογή του υπερκείμενου (Flow through), από το οποίο επίσης φυλάσσεται δείγμα για ανάλυση. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 8mL των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης. Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκλούσεις των 500μL με την προσθήκη διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (βλ. Ενότητα 3.9.8). Από τα εκλούσματα συλλέγονται δείγματα για περαιτέρω ανάλυση και ποσοτικοποίηση της καθαρής πρωτεΐνης με την μέθοδο του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού και της χρώσης με Coomassie Brilliant Blue (βλ. Ενότητα 4.3.2).

4.2 Κυτταροκαλλιέργειες HeLa κυττάρων

Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων HeLa πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θαλάμους κάθετης νηματικής ροής και με αποστειρωμένα υλικά. Η επώαση των κυττάρων έγινε σε υγρανόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂.

4.2.1 Καλλιέργεια μονόστοιβων καρκινικών σειρών – Κατεργασία κυττάρων με θρυψίνη

Κύτταρα HeLa ξεπαγώνουν ταχέως σε υδατόλουτρο στους 37°C, φυγοκεντρούνται για να απομακρυνθεί το DMSO και επωάζονται σε θρεπτικό μέσο DMEM +/+ (βλ. Ενότητα 3.5.3) στους 37°C, έως ότου να καταληφθεί η επιφάνεια του πιάτου από την μονόστοιβη καλλιέργεια σε ποσοστό 90-100%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων HeLa ξεκινά με 10% επικάλυψη στο τρυβλίο και γίνεται ανά 48 ώρες περίπου. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε επόμενο πιάτο, χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης (βλ. Ενότητα 3.9.2.2).

Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και πραγματοποιείται πλύση με PBS 1x. Προστίθεται 1mL διαλύματος θρυψίνης (βλ. Ενότητα 3.9.2.2) για πιάτο καλλιέργειας 10cm και επώαση στους 37°C για 5-10 λεπτά. Με το πέρας της επώασης, προστίθεται 4ml θρεπτικό μέσο DMEM+/, ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης παρουσία του βόειου ορού. Στην συνέχεια, η επιθυμητή ποσότητα των επαναιωρημένων κυττάρων (συνήθως 1/10) μεταφέρεται σε πιάτο με νέο DMEM+/+ για να ξεκινήσει η νέα καλλιέργεια.

4.2.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακό DNA με το αντιδραστήριο PEI

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η ενδοκυτταρική μεταφορά των επιθυμητών πλασμιδιακών φορέων σε κύτταρα HeLa, που ονομάζεται διαμόλυνση, πραγματοποιήθηκε με χρήση αντιδραστηρίου PEI (βλ. Ενότητα 3.10), ένα μη λιπιδικό πολυμερές με θετικό φορτίο. Λόγω του φορτίου αυτού σχηματίζονται θετικά φορτισμένα συμπλέγματα του πολυμερούς με το προηγουμένως αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA, διευκολύνοντας έτσι την προσέγγισή του στην μεμβράνη των κυττάρων κι άρα την είσοδό του μέσα σε αυτά, μέσω ενδοκυττάρωσης.

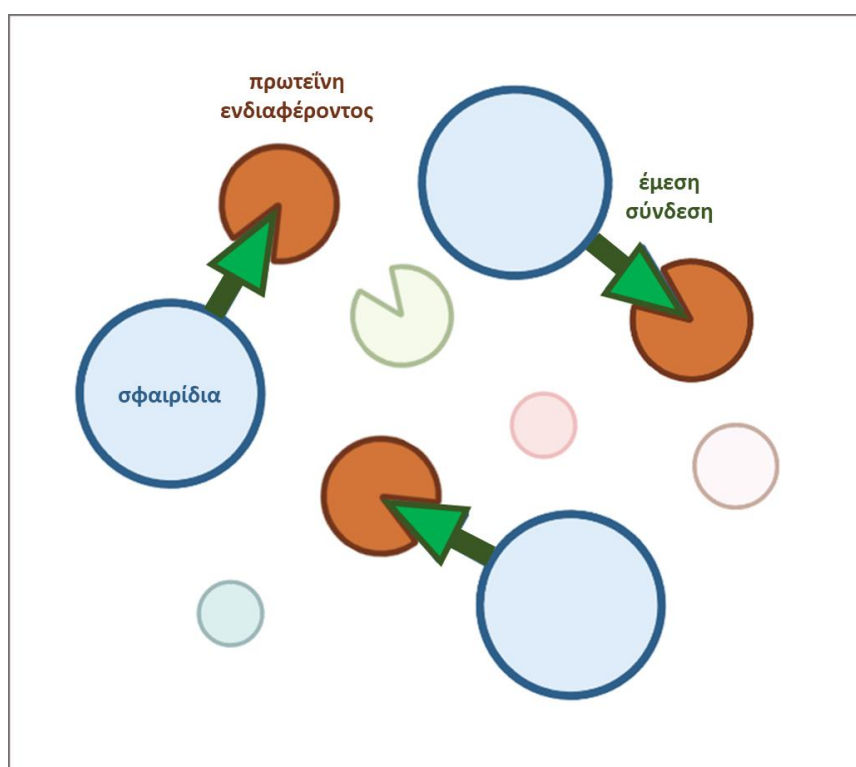
Αρχικά, σε 1,5mL διάλυματος θρεπτικού μέσου DMEM-/- (βλ. Ενότητα 3.5.1) με 15μg πλασμιδιακού φορέα ή δύο πλασμιδιακών φορέων συνολικά, προστίθενται 30μL του αντιδραστηρίου PEI (αναλογία pcDNA:PEI 1:2) και ακολουθεί επώαση 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα θετικά φορτισμένα συμπλέγματα. Με το πέρας της επώασης, προστίθενται 4,5mL ποσότητα θρεπτικού μέσου DMEM +5% FBS/+PS (βλ. Ενότητα 3.5.3). Όλο το μείγμα των 6ml μεταφέρεται σε πιάτο 10cm με κύτταρα HeLa σε ποσοστό επικάλυψης 60-80%, αφού πρώτα έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό τους υλικό και έχει γίνει πλύση

με PBS 1x. Τα κύτταρα επωάζονται με το μίγμα της διαμόλυνσης για 4 ώρες. Το διαλυμα αφαιρείται και προστίθεται νέο διαλυμα DMEM+/+ και η επώαση συνεχίζεται για 20 ώρες.

4.3 Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών

4.3.1 Κατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων

Κατά τις μεθόδους κατακρήμνισης, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος απομονώνεται από ένα μείγμα πρωτεϊνών, μέσω της έμμεσης δέσμευσης της πρωτεΐνης σε σφαιρίδια σεφαρόζης (Εικόνα 11). Λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους των σφαιριδίων, η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της έμμεσης δέσμευσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με τα σφαιρίδια σεφαρόζης. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι μέθοδοι αυτές πραγματοποιήθηκαν σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν μη ισχυρά απορρυπαντικά, ώστε να μην γίνει πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απομονωθούν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα TFAP2A-HIF-1α. Τα δείγματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. Ενότητα 4.3.4). Ακολούθησαν 2 τεχνικές κατακρήμνισης πρωτεϊνών: η συγκατακρήμνιση βακτηριακών πρωτεϊνών σε σφαιρίδια γλουταθειόνης (pull down) και η ανοσοκατακρήμνιση υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Κατά την μέθοδο της συγκατακρήμνισης, χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με γλουταθειόνη (βλ. Ενότητα 3.11), ώστε να συνδεθούν σε αυτά τα απομονωμένα τμήματα του HIF-1α (βλ. Ενότητες 4.1.3 και 4.1.4) μέσω του επιτόπου GST και μαζί τους να συγκατακρημνιστούν τυχόν μορφές του TFAP2A από κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa.

Προετοιμασία εκχυλισμάτων κυττάρων που υπερεκφράζουν τις μορφές HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt, pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut και pCDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut σύμφωνα με τη μέθοδο διαμόλυνσης που περιγράφεται παραπάνω (βλ. Ενότητα 4.2.2) για 24ώρες. Την επόμενη μέρα της επιμόλυνσης απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο DMEM από την καλλιέργεια, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με αποστειρωμένο PBS 1x και προστίθενται 150μL διαλύματος λύσης σε πιάτο 10cm. Ακολουθεί απόξεση των κυττάρων, συλλογή τους και τα κυτταρικά λύματα μένουν στον πάγο για 30 λεπτά ώστε να λυθούν όλα τα κύτταρα και να αποδιαταχθούν τυχόν συσσωματώματα. Στην συνέχεια φυγοκεντρούνται για να απομονωθεί το υπερκείμενο, όπου περιέχεται το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων. Από αυτό συλλέγεται δείγμα (input) για μετέπειτα ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την πιστοποίηση της έκφρασης των HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut και δείγμα 5μL, για τον υπολογισμό με μέτρηση κατά Bradford των συνολικών μικρογραμμαρίων των πρωτεϊνών στο δείγμα. Τα δείγματα που περιέχουν το υπόλοιπο υπερκείμενο με το μείγμα πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται αμέσως για πειράματα συνκατακρήμνισης (pull down) ή αποθηκεύονται στους -80°C, έπειτα από γρήγορη ψύξη με υγρό άζωτο για μετέπειτα χρήση.

Συγκατακρήμνιση: Αρχικά εξισορροπούνται 10μL από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης για κάθε αντίδραση με το διάλυμα λύσης (βλ. Ενότητα 3.9.4). Ακολουθεί γρήγορη απόψυξη των καθαρών πρωτεϊνικών τμημάτων GST-HIF-1α, τα οποία έχουν προκύψει από πειράματα υπερέκφρασης και καθαρισμού σε BL21 RIL βακτήρια (βλ. Ενότητες 4.1.3 και 4.1.4), και ανάμειξή τους περίπου 7-10μgr καθαρής πρωτεΐνης, ανά συνθήκη, με τα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια επώάζονται μαζί με τα τμήματα GST-HIF-1α για μία ώρα στους 4°C υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς, ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση. Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με το διάλυμα λύσης και προσθήκη 150-200μL των κυτταρικών λυμάτων HeLa (συγκέντρωση πρωτεϊνών περίπου 15-20μgr/μL) με τις υπερεκφρασμένες μορφές του TFAP2A και ολονύκτια επώαση στους 4°C υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς, ώστε να πραγματοποιηθεί η τυχόν σύνδεση των ανασυνδυασμένων τμημάτων του HIF-1α με τις υπερεκφρασμένες μορφές του TFAP2A. Με το πέρας της επώασης, τα σφαιρίδια

ξεπλένονται τρεις φορές με το διάλυμα λύσης και ακολουθεί η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με την προσθήκη 50μL διαλύματος SDS 2x και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες απομονώνονται μέσω φυγοκέντρωσης και συλλογής του υπερκλειμένου, στο οποίο προστίθεται DTT. Τα δείγματα στην συνέχεια βράζουν για 5 λεπτά στους 65°C και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Κατά την μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος απομονώνεται με χρήση ειδικού για αυτήν αντισώματος, το οποίο είναι δεσμευμένο με σφαιρίδια σεφαρόζης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (βλ. Ενότητα 3.11), ώστε να δεσμευτούν μέσω αυτού οι διαθέσιμες μορφές του TFAP2A και το τμήμα του HIF-1α που αλληλεπιδρά μαζί τους.

Προετοιμασία κυτταρικών λυμάτων

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt, pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut, pCDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut και CMV flag-HIF-1α 1-347 ή pEGF HIF-1α 348-826 σύμφωνα με τη μέθοδο της διαμόλυνσης που περιγράφεται παραπάνω (βλ. Ενότητα 4.2.2) για 24ώρες. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγραφηκε παραπάνω.

Την ημέρα της ανοσοκατακρήμνισης 10μL σφαιριδίων που περιέχουν συζευγμένο αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (HA-σφαιρίδια) για κάθε αντίδραση εξισορροπούνται σε διάλυμα λύσης (βλ. Ενότητα 3.9.3). Στη συνέχεια προστίθεται το πρωτεϊνικό περιεχόμενο (περίπου 700μL με συγκέντρωση πρωτεϊνών 15-20μg/μL) και το μείγμα επώάζεται για 3 ώρες υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C, ώστε να δεσμευτούν τα σύμπλοκα του HA-TFAP2A μέσω του HA επιτόπου τους με τα HA-σφαιρίδια. Ακολουθούν 3 πλύσεις με το διάλυμα λύσης και τα σφαιρίδια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρωση. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα εκλούνται από τα σφαιρίδια με προσθήκη 50μL 2x SDS, επώαση στους 37°C ή σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση, όπου γίνεται συλλογή του υπερκλειμένου. Τέλος, προστίθεται DTT, τα δείγματα βράζουν στους 65°C για 5 λεπτά και αποθηκεύονται στους -20°C, ώστε να αναλυθούν στην συνέχεια με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

4.3.2 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Με σκοπό να αναλυθούν πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν από πειράματα καθαρισμού και κατακρήμνισης πρωτεϊνών, στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες ή αλλιώς SDS-PAGE. Κατά την μέθοδο αυτήν, οι πρωτεΐνες του κάθε δείγματος διαχωρίζονται μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους.

Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός μόνο βάσει του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών, στο δείγμα προς ανάλυση προστίθεται διάλυμα που περιέχει SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, και DTT για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, το DTT διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς, αποδιοργανώνοντας έτσι την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου αποτελείται από δύο τμήματα. Το πρώτο τμήμα ονομάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (Πίνακας), βρίσκεται προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αποτελεί τα $\frac{3}{4}$ του συνολικού πηκτώματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιούνται πηκτώματα διαχωρισμού με συγκέντρωση 10% και 12% πολυακρυλαμίδιου, συγκέντρωση η οποία επιλέχθηκε με γνώμονα το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προς ανάλυση. Το δεύτερο τμήμα, το οποίο βρίσκεται προς τον αρνητικό πόλο της συσκευής, είναι το πήκτωμα επιστοίβαξης (Πίνακας) και αποτελεί το $\frac{1}{4}$ του ολικού πηκτώματος. Οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων στο πήκτωμα επιστοίβαξης σχηματίζονται με χρήση ειδικής χτένας από την συσκευή ηλεκτροφόρησης της Biorad.

Πήκτωμα επιστοίβαξης	
Διάλυμα	Ποσότητα (μL)
Διάλυμα επιστοίβαξης 4x → 1x	1mL
Πολυακρυλαμίδιο, 30% v/w → 3,375% v/w	0,45mL
APS, 0,04% v/v → $2,5 \cdot 10^{-3}$ % v/v	25μL
TEMED, 0,1% v/v → $3,125 \cdot 10^{-4}$ % v/v	12,5μL
H ₂ O	2,5mL

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβαξης.

Πήκτωμα διαχωρισμού 10%	
Διάλυμα	Ποσότητα (μL)
Διάλυμα διαχωρισμού 4x → 1x	1,25mL
Πολυακρυλαμίδιο, 30% v/w → 7,5% v/w	1,25mL
APS, 0,04% v/v → $1,6 \cdot 10^{-4}$ % v/v	20μL
TEMED, 0,1% v/v → $2 \cdot 10^{-4}$ % v/v	10μL
H ₂ O	2,5mL

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού με περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο 10%.

Πήκτωμα διαχωρισμού 12%	
Διάλυμα	Ποσότητα (μL)
Διάλυμα διαχωρισμού 4x → 1x	1,25mL
Πολυακρυλαμίδιο, 3 % v/w → 9% v/w	1,5mL
APS, 0,04% v/v → $1,6 \cdot 10^{-4}$ % v/v	20μL
TEMED, 0,1% v/v → $2 \cdot 10^{-4}$ % v/v	10μL
H ₂ O	2,25mL

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού με περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο 12%.

Έπειτα από την προετοιμασία και την εισαγωγή 10-20mg των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις εισαγωγής του πηκτώματος επιστοιβαξης, το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλύπτεται με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running Buffer), για να πραγματοποιηθεί ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός υπό σταθερή τάση για περίπου 1 ώρα. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι πρωτεΐνες που είναι αρνητικά φορτισμένες έλκονται προς τον θετικό πόλο της συσκευής λόγω του ηλεκτρικού πεδίου. Το πήκτωμα επιστοιβαξης εξασφαλίζει ότι όλες οι πρωτεΐνες στοιβάζονται ομοιόμορφα στο ίδιο σημείο εκκίνησης και άρα ένα πρότυπο περιβάλλον διαχωρισμού. Καθώς αυτές οι πρωτεΐνες προχωρούν στο πήκτωμα διαχωρισμού, υφίστανται διαχωρισμό με βάση το μοριακό τους βάρος, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να αντιμετωπίζουν

μεγαλύτερη αντίσταση και να κινούνται πιο αργά μέσα στο πήκτωμα, οδηγώντας σε διακριτές ζώνες.

4.3.3 Χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται με αμινοξέα των πρωτεϊνών και να τους προσδίδει μπλε χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική προσδένεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων περιοχών του μορίου της χρωστικής και των αρνητικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων των πρωτεϊνών.

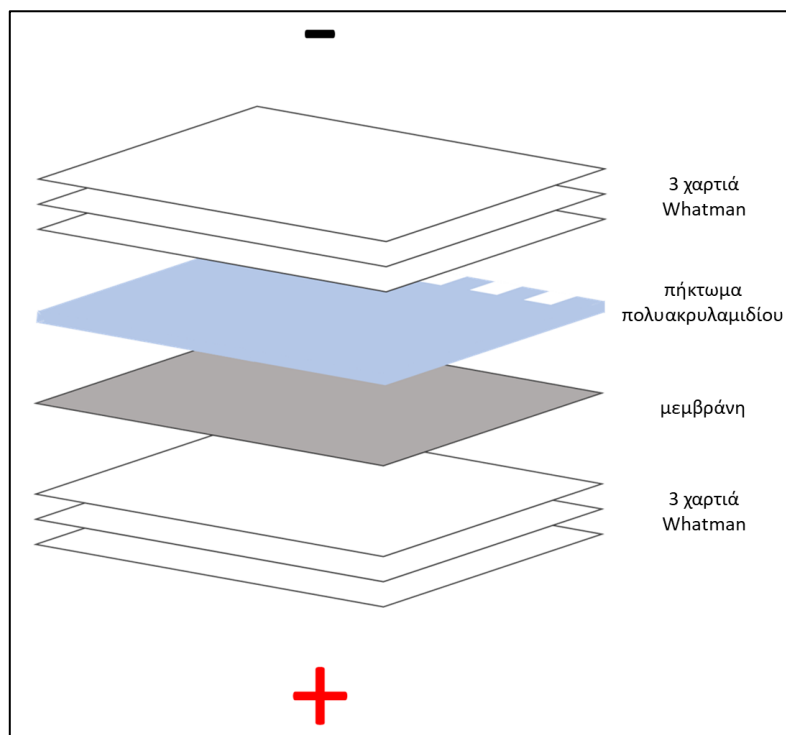
Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε ποικίλες εργαστηριακές τεχνικές, όπως είναι η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα που προέκυψε από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό (SDS Page, βλ. Ενότητα 4.3.2). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την χρώση και οπτικοποίηση πρωτεϊνών που προέκυψαν από πειράματα υπερέκφρασης και καθαρισμού και στην συνέχεια διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα καλύπτεται με το διάλυμα της χρωστικής (βλ. Ενότητα 3.9.5) και επωάζεται υπό ήπια ανάδευση για περίπου μία ώρα. Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις δεκάλεπτες πλύσεις του πηκτώματος με διάλυμα αποχρωματισμού (βλ. Ενότητα 3.9.5) για την καλύτερη διάκριση των ζωνών των πρωτεϊνών και ακολουθεί ολονύκτια ανάδευση του πηκτώματος σε dH₂O. Την επομένη, οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μπορούν να αξιολογηθούν και να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση κατάλληλων μαρτύρων.

4.3.4 Ηλεκτρομεταφορά και Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Με την μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς και ανοσοαποτύπωσης κατά Western, οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό (βλ. Ενότητα 4.3.2), μεταφέρονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε ειδική μεμβράνη (πχ νιτροκυτταρίνης). Η μεμβράνη αυτή, στην συνέχεια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x (Transfer Buffer-βλ. Ενότητα 3.9.6). Ακολουθεί η επιστοίβαξη των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτρομεταφορά για την ομοιόμορφη εφαρμογή του ρεύματος με την εξής σειρά: 3 χαρτιά Whatman, ειδική μεμβράνη ηλεκτρομεταφοράς, πήκτωμα, 3 χαρτιά Whatman, και όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται την συσκευή *peqlab® Semi-Dry Blotter* (VWR) στα 80mA ανά πήκτωμα για 75 λεπτά.

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα γάλακτος κορεσμού (βλ. Ενότητα 3.9.6), ώστε να καλυφθούν μη ειδικές θέσεις δέσμευσης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος (πχ. καζεΐνη), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα γάλακτος και προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, δηλαδή το ειδικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα γάλακτος (βλ. Ενότητα 3.9.6) ή σε PBS tween. Η μεμβράνη παραμένει στο διάλυμα του πρώτου αντισώματος για ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται τρεις δεκάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με PBS tween, επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό του πρώτου και είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση του χρένου HRP (horse radish peroxidase), για μία ώρα, και μετά την επώαση άλλες τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με PBS-tween. Η οπτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος γίνεται με την προσθήκη διαλύματος λουμινόλης, η οποία παρουσία H_2O_2 και του ενζύμου HRP

διασπάται σε μόριο με κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας απελευθερώνοντας φωτόνια. Στην παρούσα εργασία, η ανίχνευση του σήματος αυτού έγινε με το μηχάνημα Imager Uvitec Cambridge.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενα δεδομένα της ερευνητικής ομάδας της κ. Χαχάμη (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής Λάρισας) έχουν δείξει πως ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2A σχετίζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα υποξίας HIF-1α. Συγκεκριμένα δείχθηκε πως ο TFAP2A αλληλεπιδρά φυσικά τόσο με τον HIF-1α όσο και με τον HIF-2α. Επιπλέον ο TFAP2A χάνει τη σουμουλίωση του στην υποξία και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (Chachami et al, Mol Cell Prot (2019)).

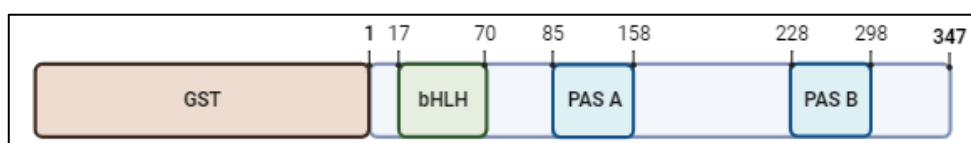
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση των δομικών περιοχών αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τον TFAP2A. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις: στην πρώτη προσέγγιση διεξήχθησαν πειράματα in vitro συγκατακρήμνισης τμημάτων της πρωτεΐνης HIF-1α, τα οποία απομονώθηκαν από βακτήρια BL21 RIL, για την ανίχνευση σύνδεσής τους με τον TFAP2A από κυτταρικά εκχυλίσματα. Κατά την δεύτερη προσέγγιση, διεξήχθησαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A καθώς και επικρατειών του HIF-1α, με σκοπό την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων.

5.1 Υπερέκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων μορφών του HIF-1α από βακτήρια

Για την διεξαγωγή των in vitro πειραμάτων συγκατακρήμνισης (βλ. Ενότητα 5.2), απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο καθαρισμός επαρκούς ποσότητας των πρωτεϊνικών επικρατειών του HIF-1α 1-347, 348-826 και 575-826. Πρώτο βήμα, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η υπερέκφραση των προαναφερθέντων τμημάτων από κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς σε βακτήρια BL21 RIL (βλ. Ενότητα 3.2.2) καθώς και η απομόνωσή τους σε καθαρή μορφή.

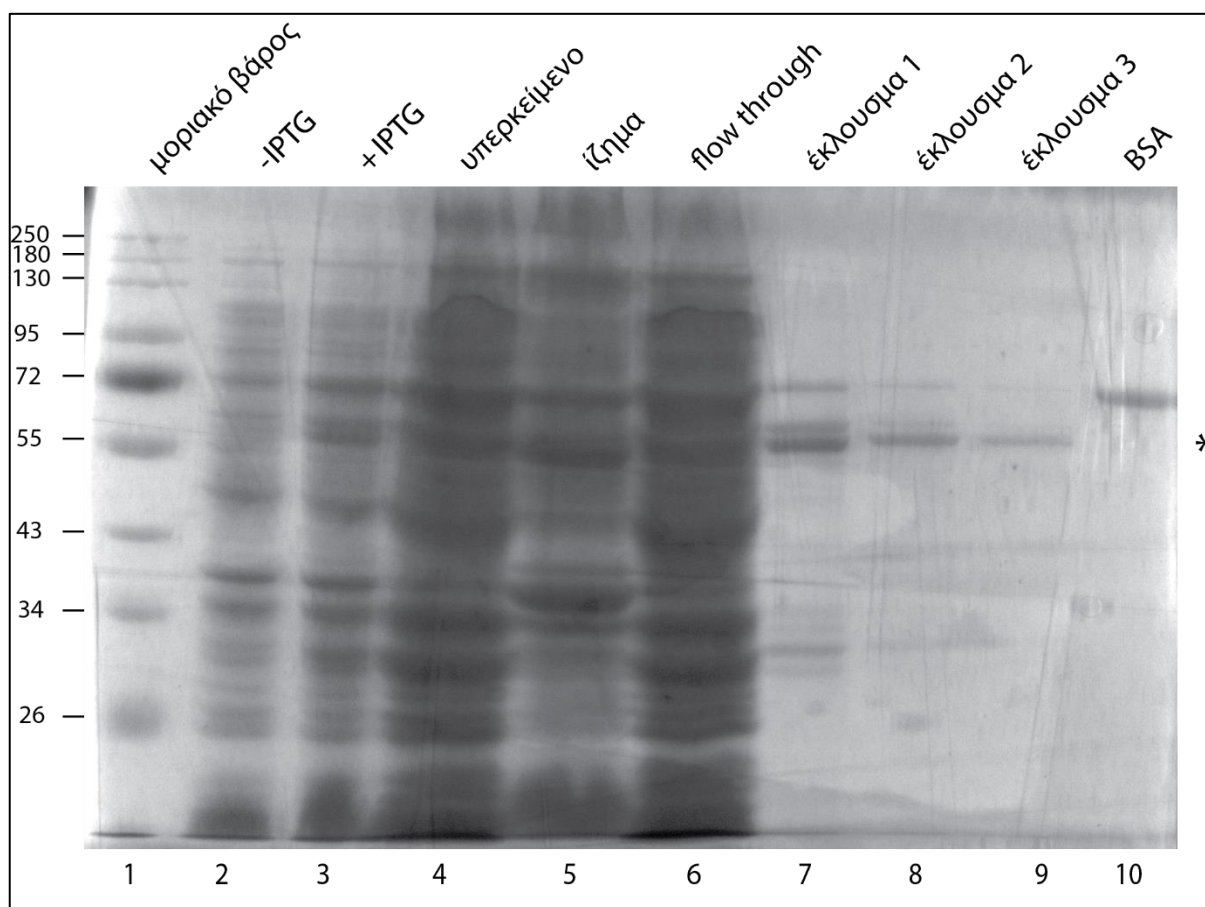
5.1.1 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 1-347

Η επικράτεια 1-347 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α (Εικόνα 13) περιέχει την δομική περιοχή για την δέσμευση του παράγοντα στο DNA (bHLH), καθώς επίσης και τις περιοχές PAS A και PAS B που είναι υπεύθυνες για τον διμερισμό των υπομονάδων HIF αλλά και για αλληλεπιδράσεις του με άλλες πρωτεΐνες (βλ. Ενότητα 1.1.1.1). Το τμήμα αυτό φέρει επίσης στο αμινοτελικό του άκρο τον επίτοπο GST, απαραίτητο για τον καθαρισμό και την ανίχνευση της έκφρασής του. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της χημεικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 είναι 64kDa.



Εικόνα 13. Απεικόνιση της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 με τις δομικές της επικράτειες. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Για την υπερέκφραση της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 χρησιμοποιήθηκε αρχική υγρή καλλιέργεια BL21 RIL βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pGEX-HIF-1α wt 1-347 (βλ. Ενότητα 3.1.5) του ενός λίτρου. Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης με IPTG, συλλογή και λύση των κυττάρων και απομόνωση του GST-HIF-1α 1-347 μέσω σφαιριδίων γλουταθειόνης (βλ. Ενότητες 4.1.3 και 4.1.4). Λήφθηκαν δείγματα από όλα τα στάδια της διαδικασίας και η ανάλυση έγινε με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (βλ. Ενότητες 4.3.2 και 4.3.3), η οποία φαίνεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14. Ανάλυση δειγμάτων με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS-Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue που προέκυψαν από υπερέκφραση και καθαρισμό του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σημαίνονται με το αστερίσκο.

Συγκρίνοντας το δείγμα -IPTG με το +IPTG (διαδρομή 2 με διαδρομή 3) παρατηρείται μία ζώνη περίπου στα 60-65kDa μόνο στη διαδρομή 3 (αστερίσκος) που μαρτυρά την επαγωγή της έκφρασης της χμαιοτικής πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μοριακό της βάρος (64kDa). Από την

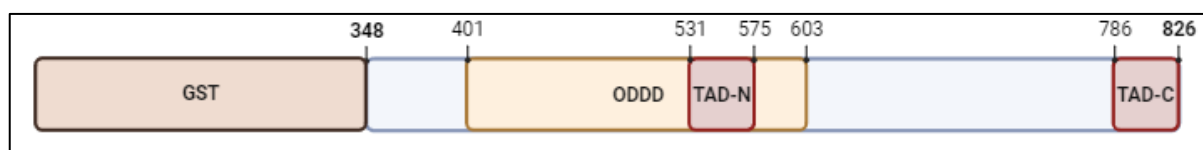
ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των κυττάρων (διαδρομές 4 και 5) φαίνεται πως η πρωτεΐνη είναι κυρίως διαλυτή αλλά υπάρχει και σημαντικό μέρος της στο αδιάλυτο ίζημα. Ανάλυση του αδέσμευτου στα σφαιρίδια δείγματος (διαδρομή 6) έδειξε πως σημαντική ποσότητα της πρωτεΐνης δεν δεσμεύτηκε σε αυτά. Παρόλα αυτά τα δείγματα των τριών εκλούσεων (διαδρομές 7-9) από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης έδειξαν πως η πρωτεΐνη δεσμεύτηκε και εκλούστηκε αποτελεσματικά και κατά τις τρεις εκλούσεις.

Κατά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε δείγμα που περιείχε 1μgr της πρωτεΐνης BSA (διαδρομή 10), βάσει της ζώνης της οποίας υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 που βρισκόταν σε κάθε έκλουσμα. Στο 1^ο έκλουσμα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε ότι ήταν 0,03μgr/μL και η συνολική ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης 15μgr, στο 2^ο έκλουσμα 0,015μgr/μL και 7,5μgr καθαρής πρωτεΐνης και στο 3^ο έκλουσμα 0,005μgr/μL και 2,5μgr καθαρής πρωτεΐνης.

Συνολικά, από 1 λίτρο αρχικής υγρής καλλιέργειας βακτηρίων BL21 RIL απομονώθηκαν 25μgr καθαρής χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347.

5.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 348-826

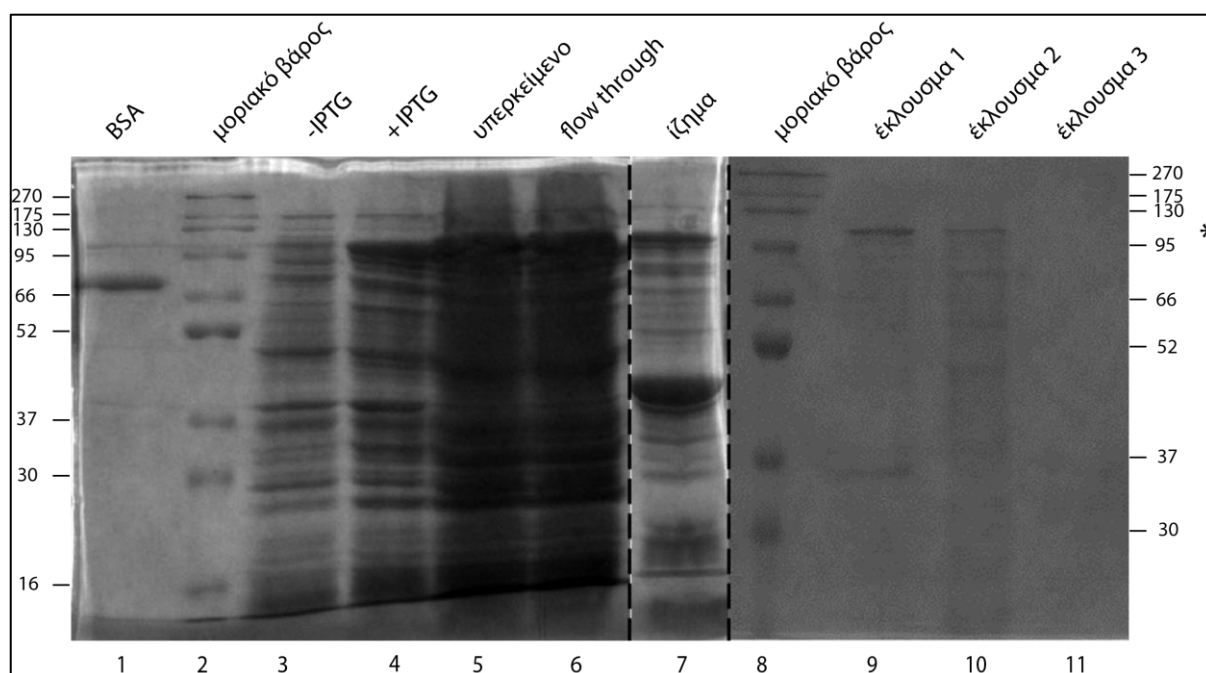
Όπως περιγράφεται και παραπάνω (βλ. Ενότητα 1.1.1.1), η επικράτεια 348-826 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α περιέχει την δομική περιοχή ODDD, που είναι υπεύθυνη για την O₂-εξαρτώμενη αποικοδόμηση της α υπομονάδας του HIF, και τις περιοχές TAD-N και TAD-C, που σχετίζονται με την μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Η χιμαιρική πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε κατά τις πειραματικές διαδικασίες φέρει, επίσης, στο αμινοτελικό της άκρο τον επίτοπο GST (Εικόνα 15), απαραίτητο για τον καθαρισμό και την ανίχνευση της πρωτεΐνης, και έχει συνολικό μοριακό βάρος 78,6kDa.



Εικόνα 15. Απεικόνιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826 με τις δομικές της επικράτειες. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Για την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826 χρησιμοποιήθηκε αρχική υγρή καλλιέργεια BL21 RIL βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pGEX-HIF-1α wt 348-826 (βλ. Ενότητα 3.1.6) των 400mL. Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης με IPTG, συλλογή και λύση των κυττάρων και απομόνωση του GST-HIF-1α 348-826 μέσω σφαιριδίων γλουταθειόνης (βλ. Ενότητες 4.1.3 και 4.1.4). Έγινε λήψη δειγμάτων από όλα τα στάδια της

διαδικασίας και η ανάλυση έγινε με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (βλ. Ενότητες 4.3.2 και 4.3.3), η οποία φαίνεται στην Εικόνα 16.



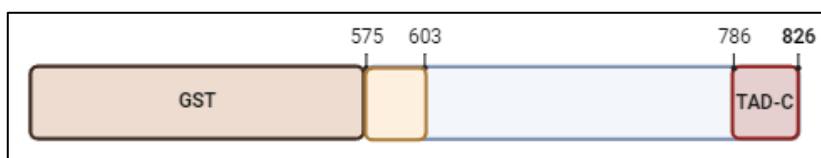
Εικόνα 16. Ανάλυση δειγμάτων που προέκυψαν από υπερέκφραση και καθαρισμό του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 348-826 με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σημαίνονται με αστερίσκο.

Καθώς δεν εμφανίζεται το αναμενόμενο μοτίβο ζωνών στο αναμενόμενο για το παρόν πρωτεϊνικό τμήμα μοριακό βάρος των 78,6kDa, υποθέσαμε ότι οι ζώνες της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος είναι αυτές που βρίσκονται στα περίπου 110kDa (σήμανση με αστερίσκο, Εικόνα 16). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται σε δύο γεγονότα. Πρώτον, η ζώνη στο δείγμα +IPTG είναι σημαντικά πιο έντονη από την αντίστοιχη ζώνη στο δείγμα -IPTG (διαδρομή 3 και 4, αντίστοιχα), δείχνοντας την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης έπειτα από την προσθήκη του διαλύματος IPTG και δηλώνοντας την επαγωγή της υπερέκφρασης της χημικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826, όπως αναμενόταν από την πειραματική διαδικασία. Δεύτερον, στο ίδιο μοριακό βάρος εμφανίζονται ζώνες στα δείγματα του 1^{ου} και του 2^{ου} εκλούσματος (διαδρομές 9 και 10) αρκετά ευδιάκριτα, σε κατά τα άλλα καθαρά δείγματα, οι οποίες υπολογίστηκε σε σύγκριση με την ζώνη της BSA (1μgr) ότι έχουν συγκέντρωση περίπου 0,01μgr/μL, και άρα 5μgr καθαρής πρωτεΐνης, και 0,005μgr/μL και 2,5 καθαρής πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Στο δείγμα του 3^{ου} εκλούσματος (διαδρομή 11) δεν εμφανίζεται κάποια ζώνη και θεωρήθηκε ότι δεν εκλούστηκε σημαντική ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Ανάλυση του διαλυτού κλάσματος των κυττάρων (διαδρομή 5) έδειξε ότι σημαντική ποσότητα της χμαιοτικής πρωτεΐνης εντοπίζεται στην διαλυμένη της μορφή, ενώ από την ανάλυση του αδιάλυτου κλάσματος των κυττάρων (διαδρομή 7) φαίνεται ότι κάποια ποσότητα της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο αδιάλυτο ίζημα και κατά συνέπεια δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Επιπροσθέτως, φάνηκε ότι μερική ποσότητα της πρωτεΐνης δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια συζευγμένα με γλουταθειόνη (βλ. Ενότητα 3.11), καθώς κατά την ανάλυση του αδέσμευτου στα σφαιρίδια δείγματος (διαδρομή 6) εντοπίζεται έντονη ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος. Συμπερασματικά, απομονώθηκαν συνολικά 7,5μgr καθαρής χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826 από αρχική υγρή καλλιέργεια βακτηρίων BL21 RIL των 400mL.

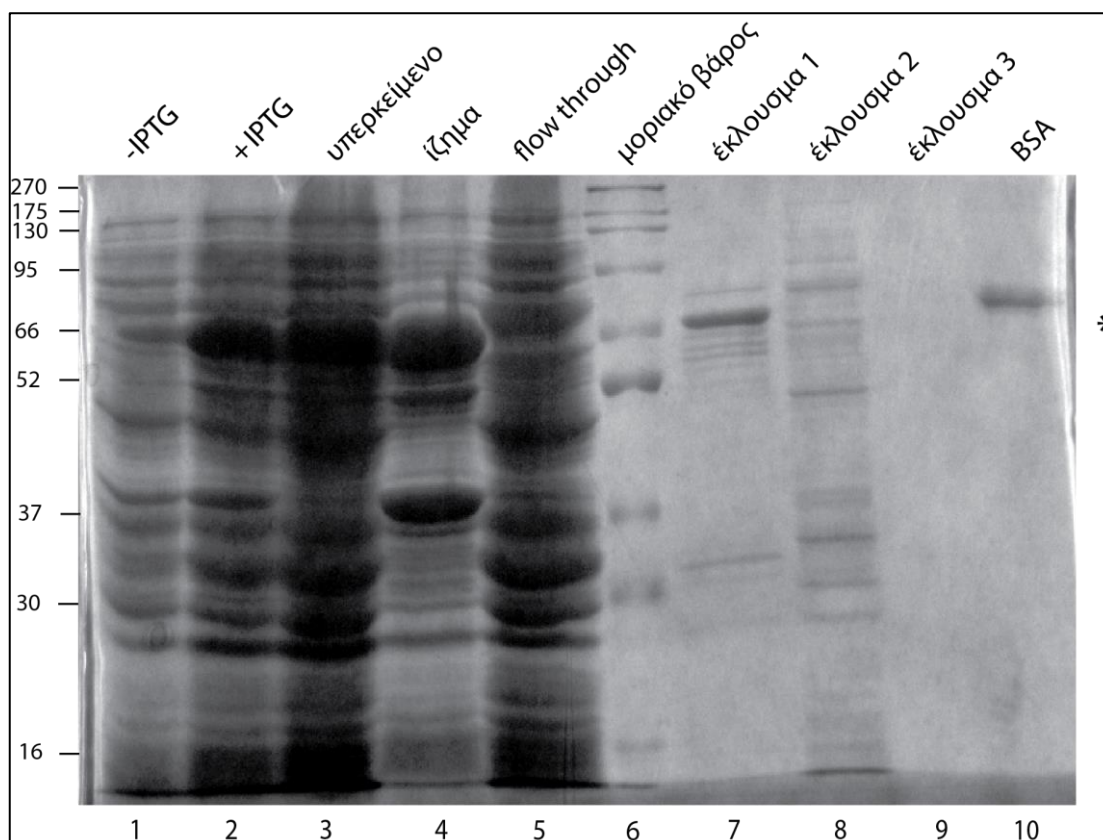
5.1.3 Υπερέκφραση και καθαρισμός του GST-HIF-1α 575-826

Η επικράτεια 575-826 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α περιέχει μέρος της δομικής περιοχής TAD-N και ολόκληρη την δομική περιοχή TAD-C, που σχετίζονται με την μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Μαζί με τον επίτοπο GST στο αμινοτελικό του άκρο, το τμήμα αυτό αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 53,6kDa (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Απεικόνιση της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 348-826 με τις δομικές της επικράτειες. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

Για την υπερέκφραση της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 575-826 χρησιμοποιήθηκε αρχική υγρή καλλιέργεια BL21 RIL βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pGEX-HIF-1α wt 575-826 (βλ. Ενότητα 3.1.7) των 400mL. Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης με IPTG, συλλογή και λύση των κυττάρων και απομόνωση του GST-HIF-1α 575-826 μέσω σφαιριδίων γλουταθειόνης (βλ. Ενότητες 4.1.3 και 4.1.4). Λήφθηκαν δείγματα από όλα τα στάδια της διαδικασίας και η ανάλυση έγινε με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (βλ. Ενότητες 4.3.2 και 4.3.3), η οποία φαίνεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18. Ανάλυση δειγμάτων που προέκυψαν από υπερέκφραση και καθαρισμό του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 575-826 με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σημαίνονται με αστερίσκο.

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση (βλ. Ενότητα 5.1.2), μία έντονη ζώνη εμφανίζεται σε μεγαλύτερο από το αναμενόμενο μοριακό βάρος (αστερίσκος, Εικόνα 18) στο δείγμα +IPTG (διαδρομή 2), ενώ στο δείγμα -IPTG (διαδρομή 1) φαίνεται σημαντικά πιο αχνή, μαρτυρώντας ότι είναι η ζώνη της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 575-826. Η πρωτεΐνη εμφανίζεται έντονα στο δείγμα του διαλυτού κλάσματος (διαδρομή 3), αλλά και στο δείγμα του αδιάλυτου κλάσματος (διαδρομή 4), δηλώνοντας την απώλεια κάποιας ποσότητας της πρωτεΐνης σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, όμως, φάνηκε ότι η περισσότερη ποσότητα της πρωτεΐνης δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια συζευγμένα με γλουταθειόνη (βλ. Ενότητα 3.11), καθώς η αντίστοιχη ζώνη στο δείγμα του αδέσμευτου στα σφαιρίδια δείγματος (διαδρομή 5) απουσιάζει. Κατά την έκλυση της πρωτεΐνης, η επιθυμητή ζώνη εμφανίζεται μόνο στο 1^ο έκλουσμα (διαδρομή 7), ενώ η δεύτερη έκλυση φάνηκε να μην ήταν επιτυχημένη καθώς το δείγμα του 2^{ου} εκλούσματος (διαδρομή 8) περιέχει πολλές άσχετες πρωτεΐνες. Το 3^ο έκλουσμα (διαδρομή 9) επίσης φάνηκε να περιέχει ελάχιστη έως καθόλου ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Ο υπολογισμός της ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης στο 1^ο έκλουσμα έγινε σε σύγκριση με την ζώνη της BSA (διαδρομή 10), που ήταν γνωστό ότι περιείχε 1μgr. Σύμφωνα με αυτό, η συγκέντρωση υπολογίστηκε ότι ήταν 0,04μgr/μL και η ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης 20μgr.

Άρα, για τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 575-826 χρησιμοποιήθηκαν 400mL αρχικής υγρής καλλιέργειας βακτηρίων BL21 RIL και προέκυψαν, συνολικά, 20μgr καθαρής πρωτεΐνης.

Συνολικά, από τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 προέκυψαν 25μgr καθαρής πρωτεΐνης με χρήση 1 λίτρου αρχικής υγρής καλλιέργειας βακτηρίων BL21 RIL και από τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 575-826 προέκυψαν 20μgr καθαρής πρωτεΐνης με χρήση 400mL αρχικής καλλιέργειας. Οι ποσότητες αυτών των δύο πρωτεϊνών επαρκούν για την μετέπειτα χρήση τους σε πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης, ενώ γίνεται ξεκάθαρο ότι η απόδοση της πειραματικής διαδικασίας για την πρωτεΐνη GST-HIF-1α 575-826 είναι σημαντικά υψηλότερη. Όσον αφορά την χιμαιρική πρωτεΐνη GST-HIF-1α 348-826, καθαρίστηκαν 7,5μgr πρωτεΐνης από αρχική υγρή καλλιέργεια των 400mL, ποσότητα που δεν ήταν αρκετή για την διεξαγωγή πειράματος *in vitro* συγκατακρήμνισης κι έτσι η επικράτεια 348-826 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α δεν χρησιμοποιήθηκε με αυτήν την πειραματική προσέγγιση.

5.2 *In vitro* συγκατακρήμνιση των επικρατειών του HIF-1α με τον TFAP2A

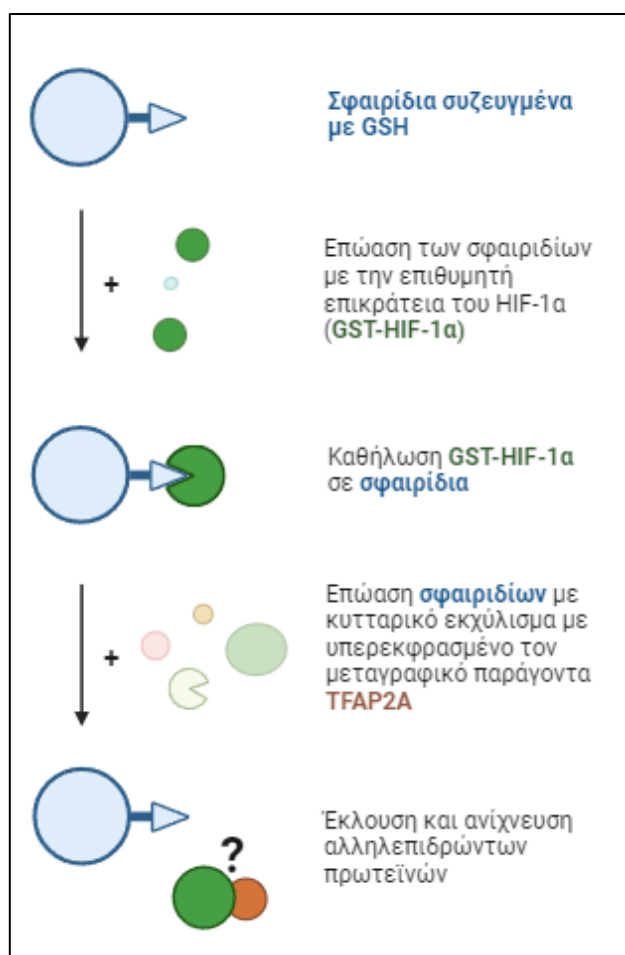
Για την μελέτη της ικανότητας σύνδεσης των πρωτεϊνικών επικρατειών GST-HIF-1α 1-347, GST-HIF-1α 348-826 και GST-HIF-1α 575-826 που απομονώθηκαν από βακτήρια BL21 RIL (βλ. Ενότητα 5.1) με τον μεταγραφικό παράγοντα TFAP2A, πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης.

Για τα πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με γλουταθειόνη. Σαν «δολώματα» χρησιμοποιήθηκαν οι απομονωμένες πρωτεΐνες GST-HIF-1α 1-347 και GST-HIF-1α 575-826. Το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-1α 348-826 δεν ελέγχθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία με την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διότι, δεν απομονώθηκε επαρκής ποσότητα πρωτεΐνης από τα βακτήρια BL21 RIL (βλ. Ενότητα 5.1.2).

Ως «λείες» χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa τα οποία υπερεκφράζουν τις μορφές HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut. Η μορφή HA-TFAP2A K10R mut φέρει την σημειακή μετάλλαξη K10R, χάνοντας έτσι την ικανότητα σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης, ενώ στην μορφή SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, εκτός της σημειακής μετάλλαξης, έχει ενσωματωθεί η κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης SUMO2 στο αμινοτελικό άκρο της, ώστε να ομοιάζει την πλήρως σουμοϋλιωμένη μορφή του TFAP2A. Τα

πλασμίδια, με τα οποία έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa, ώστε να υπερεκφραστούν οι προαναφερθείσες μορφές του TFAP2A, χρησιμοποιήθηκαν με τη λογική να ανιχνευθούν και πιθανές μεταβολές στην πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων που επηρεάζονται από την σουμοϋλίωση του TFAP2A, καθώς έχει ήδηδειχθεί ότι η αποσουμοϋλίωση του αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Chachami et al, Mol Cell Prot (2019)).

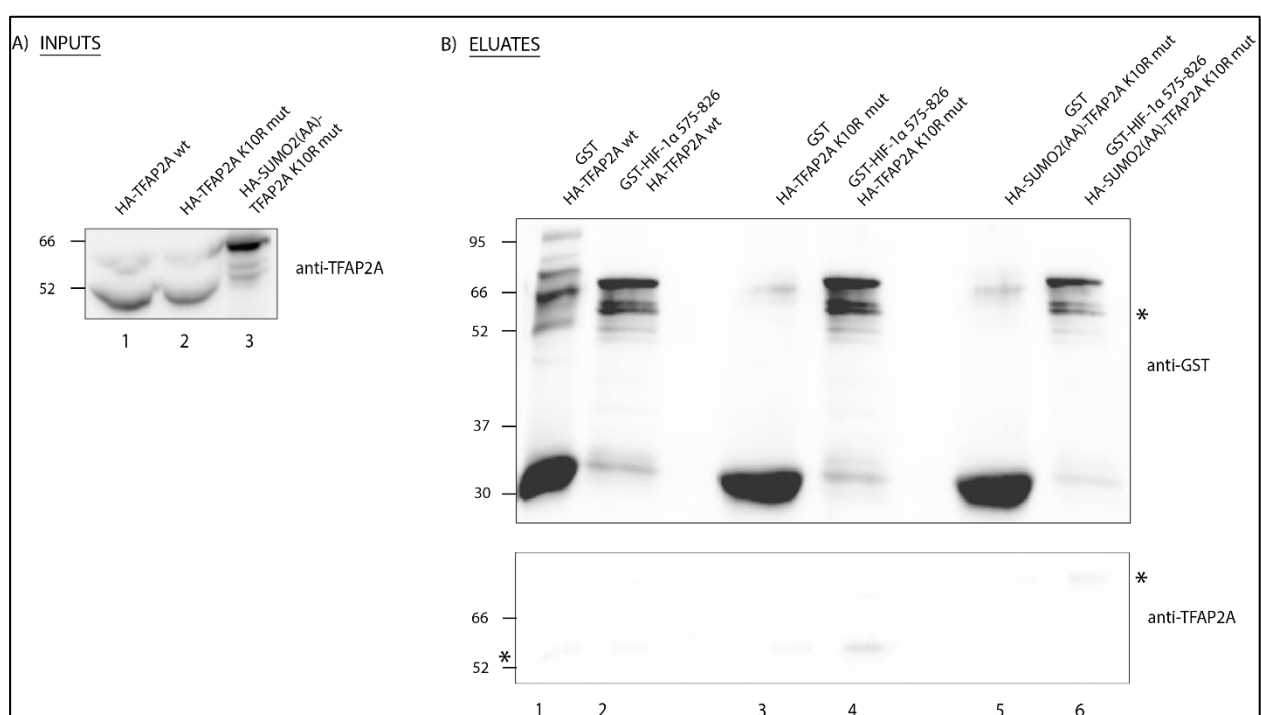
Αρχικά, έγινε διαμόλυνση κυττάρων της σειράς HeLa με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt, pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut και pcDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut. Στην συνέχεια, τα διαμολυσμένα κύτταρα που περιείχαν τις υπερεκφρασμένες μορφές HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut λύθηκαν με ειδικό διάλυμα λύσης (βλ. Ενότητα 4.3.1) και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της in vitro συγκατακρήμνισης (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της in vitro συγκατακρήμνισης με χρήση σφαιριδίων συζευγμένων με γλουταθειόνη για την καθήλωση των χημεικικών πρωτεϊνών GST-HIF-1α με σκοπό την ανίχνευση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. (Δημιουργήθηκε με το biorender.com)

5.2.1 Συγκατακρήμνιση του GST-HIF-1α 575-826 με μορφές του TFAP2A

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της υπομονάδας HIF-1α με τον μεταγραφικό παράγοντα TFAP2A, 10μgr του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 575-826 καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια και ακολούθησε επώαση με τα κυτταρικά εκχυλίσματα (περίπου 500μgr πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά συνθήκη) HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut και έκλουση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών. Τόσο τα κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUTS) όσο και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Πείραμα in vitro συγκατακρήμνισης του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 575-826 για την ανίχνευση σύνδεσης των μορφών HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut. A) Ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS), όπου σημαίνονται με βελάκι οι μορφές HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut και με δίκαιση (#) η μορφή HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, και B) ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα (φαίνονται δεξιά). Με κόκκινο αστερίσκο σημαίνονται οι ζώνες των χημικών πρωτεϊνών του HIF με επίτοπο GST (B, πάνω) και με μαύρο αστερίσκο οι μορφές του TFAP2A (B, κάτω). Τα MB φαίνονται στα αριστερά.

Η ανάλυση των δειγμάτων INPUTS (Εικόνα 20Α) έδειξε ότι στα κυτταρικά εκχυλίσματα υπερεκφράστηκαν σε περίπου ίση ποσότητα οι πρωτεΐνες HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut (διαδρομές 1 και 2), ενώ παρατηρείται μερική αποικοδόμηση. Η μορφή SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερα επίπεδα (διαδρομή 3), γεγονός που δείχνει πως η προσθήκη SUMO στο αμινοτελικό άκρο σταθεροποιεί την πρωτεΐνη.

Η ανάλυση των εκλουσμάτων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST έδειξε (κόκκινος αστερίσκος, Εικόνα 20Β) ότι το τμήμα GST-HIF-1α 575-826 καθηλώθηκε, κατακρημνίστηκε επιτυχώς μαζί με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης και ανιχνεύθηκε σε μοριακό βάρος των 66kDa (διαδρομές 2, 4 και 6, σήμανση με κόκκινο αστερίσκο). Αντίστοιχα, στις συνθήκες όπου προστέθηκε μόνο η πρωτεΐνη GST, ως συνθήκη μάρτυρας, εμφανίστηκαν οι αντίστοιχες ζώνες σε μοριακό βάρος 26kDa (διαδρομές 1, 3 και 5). Καθώς η GST είναι πολύ πιο σταθερή καθλώνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα.

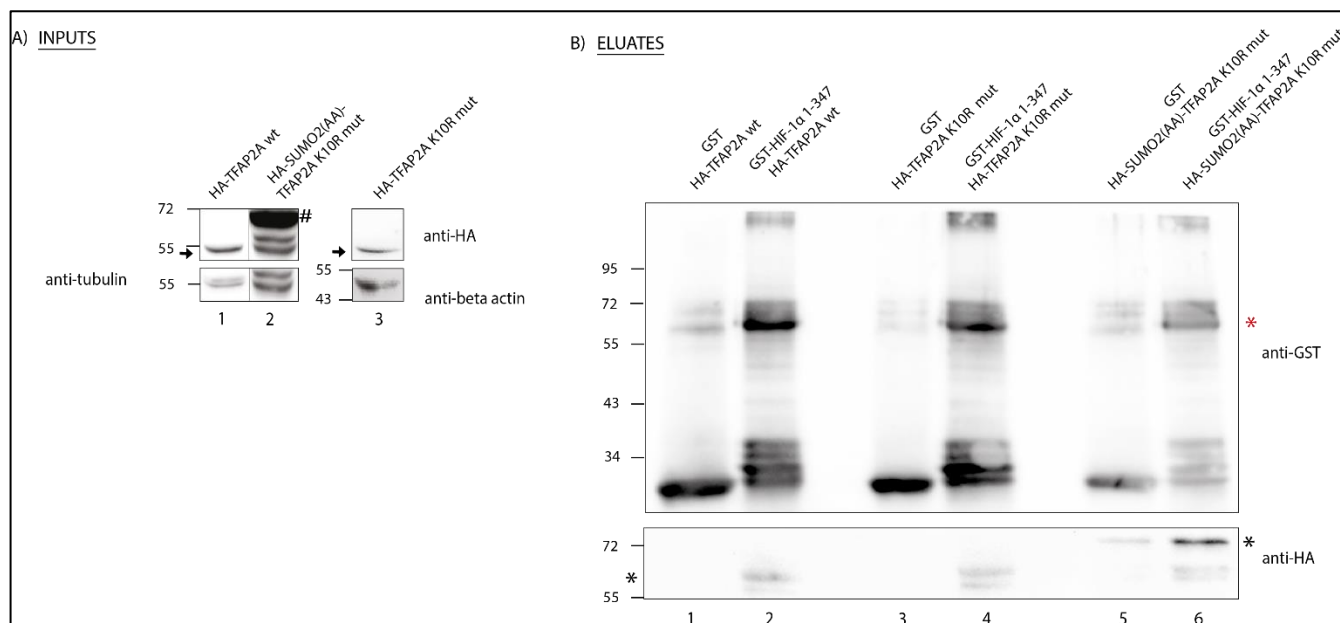
Για να ελεγχθεί αν συγκατακρημνίστηκαν οι μορφές του TFAP2A χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ασθενική σύνδεση του TFAP2A που εμφανίστηκαν μόνο έπειτα από υπερέκθεση (αστερίσκοι, Εικόνα 20Β), τόσο παρουσία όσο και απουσία των χημεικτών πρωτεϊνών HIF.

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι, ο TFAP2A (τόσο η σουμοϋλιωμένη όσο και η μη σουμοϋλιωμένη μορφή), συνδεεται ασθενικά και μη ειδικά με τον GST-HIF-1α 575-826. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης πραγματοποιήθηκαν στην συνέχεια πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (βλ. Ενότητα 5.3.1).

5.2.2 Συγκατακρήμνιση του GST-HIF-1α 1-347 με μορφές του TFAP2A

Για τον έλεγχο σύνδεσης του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347 με τον μεταγραφικό παράγοντα TFAP2A πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα που περιείχαν υπερεκφρασμένες και οι τρεις μορφές του TFAP2A (HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut (περίπου 1500μgr πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά αντίδραση) και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut (580μgr πρωτεϊνικού περιεχομένου), καθώς επίσης και η χημεική πρωτεΐνη GST-HIF-1α 1-347 (5μgr σε κάθε αντίδραση). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα INPUTS) και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Πείραμα *in vitro* συγκατακρήμνισης του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347 για την ανίχνευση σύνδεσης των μορφών HA-TFAP2A wt, HA-TFAP2A K10R mut και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut. A) Ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS), όπου σημαίνονται με βελάκια οι μορφές HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut και με δίαυση (#) η μορφή HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, και B) ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα. Με κόκκινο αστερίσκο σημαίνονται οι ζώνες των χιμαιρικών πρωτεϊνών του HIF με επίτοπο GST (B, πάνω) και με μαύρο αστερίσκο οι μορφές του TFAP2A (B, κάτω). Η τουμπουλίνη και η βήτα-ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ισοφορτώματος. Τα μοριακά βάρη φαίνονται αριστερά.

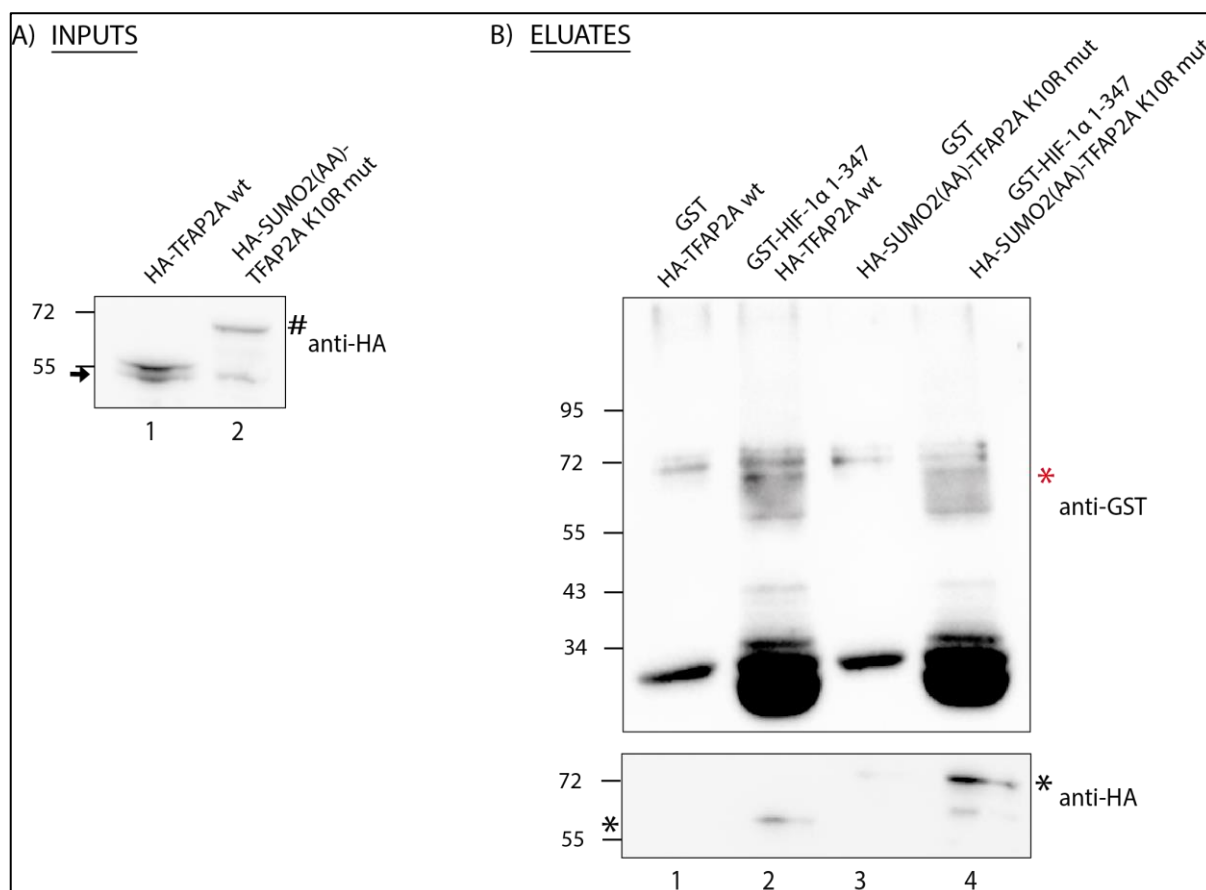
Στα δείγματα INPUTS (Εικόνα 21A), οι πρωτεΐνες HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut ανιχνεύονται με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) σε παρόμοιο επίπεδο (διαδρομές 1 και 3), δηλώνοντας ότι οι δύο μορφές υπερεκφράστηκαν σε παρόμοια βαθμό. Επίσης, φάνηκε ότι η SUMO-μιμητική μορφή SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut έχει εκφραστεί σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό (διαδρομή 2), γεγονός που παρατηρείται συχνά με χρήση του συγκεκριμένου πλασμιδιακού φορέα, όπως αναφέρεται και παραπάνω.

Τα εκλούσματα (Εικόνα 21B) που αναλύθηκαν με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST (anti-GST) δείχνουν την παρουσία της πρωτεΐνης GST, ως μάρτυρας, η οποία ανιχνεύεται σε μοριακό βάρος περίπου 26kDa (διαδρομές 1, 3 και 5). Στα δείγματα που προστέθηκε το τμήμα GST-HIF-1α 1-347 (διαδρομές 2, 4 και 6), αυτό φαίνεται να ανιχνεύεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος

των 64kDa (αστερίσκος, Εικόνα 21B), δηλώνοντας πως καθηλώθηκε και κατακρημνίστηκε επιτυχώς.

Με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) έγινε η ανίχνευση των μορφών του TFAP2A που πιθανώς συγκατακρημνίστηκαν έπειτα από σύνδεσή τους με το τμήμα GST-HIF-1α 1-347. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 21B (αστερίσκος), μία έντονη ζώνη ανιχνεύεται στο δείγμα της διαδρομής 6 σε μοριακό βάρος 72kDa, που αντιστοιχεί στον SUMO-μιμητικό TFAP2A, δηλώνοντας ότι συγκατακρημνίστηκε μαζί με τον GST-HIF-1α 1-347. Επίσης, ανιχνεύονται πιο αχνές ζώνες περίπου στα 55kDa στα δείγματα των διαδρομών 2 και 4, που έχουν σημειωθεί με αστερίσκο (Εικόνα 21B). Η απουσία των προαναφερθέντων ζωνών στα δείγματα-μάρτυρες (διαδρομές 1, 3 και 5) δηλώνει ότι η πειραματική διαδικασία εκτελέστηκε σωστά και ότι η μορφή HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut και, πιθανόν, οι μορφές HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut συνδέονται ειδικά με τον HIF-1α στα πρώτα 347 αμινοξέα του.

Για την επαλήθευση της σύνδεσης του HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut και την επιβεβαίωση της σύνδεσης των HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut, το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε ξανά με χρήση των μορφών HA-TFAP2A wt και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut (1800μgr και 950μgr πρωτεϊνικού περιεχομένου σε κάθε αντίδραση, αντίστοιχα). Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 7μgr της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α σε κάθε αντίδραση (Εικόνα 22).



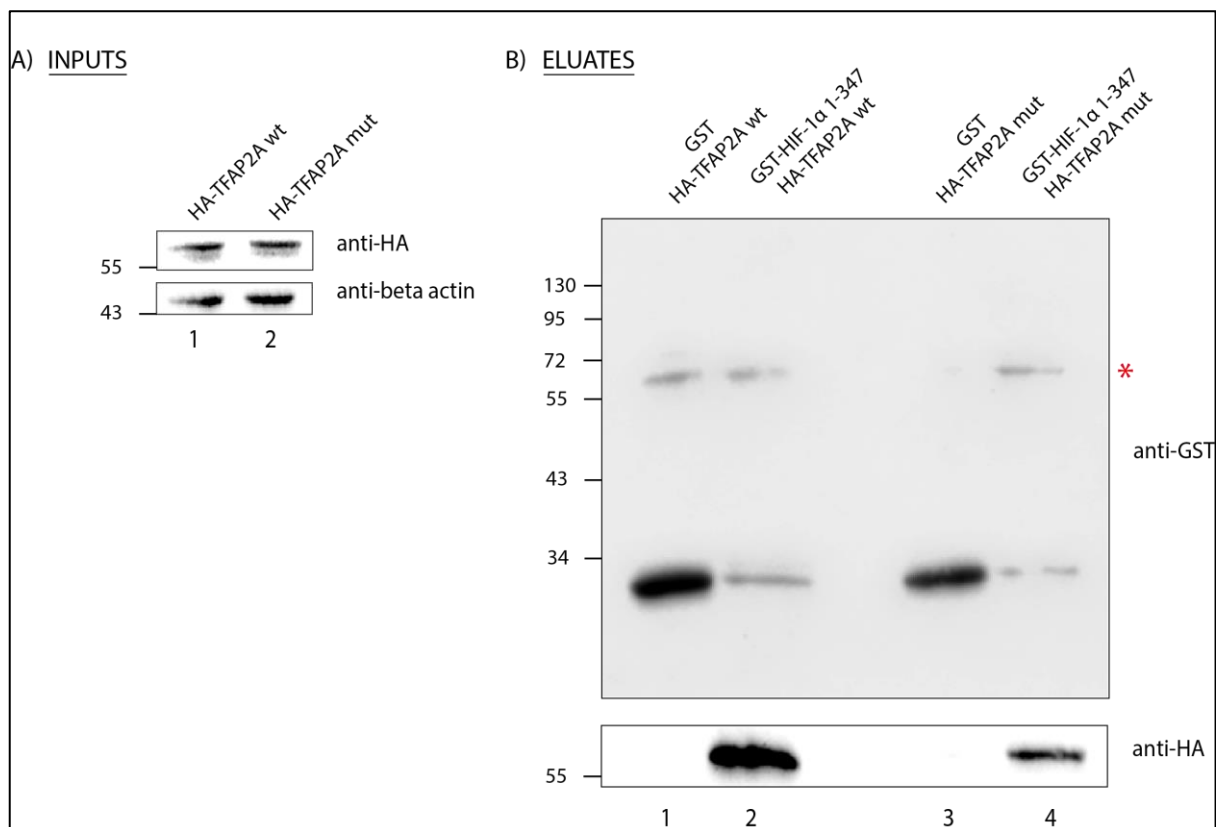
Εικόνα 22. Πείραμα *in vitro* συγκατακρήμνισης του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347 για την ανίχνευση σύνδεσης των μορφών HA-TFAP2A wt και HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut. A) Ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS), όπου σημαίνεται με βελάκι η μορφή HA-TFAP2A wt και με δίαυση (#) η μορφή HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, και B) ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα. Με κόκκινο αστερίσκο σημαίνονται οι ζώνες των χιμαιρικών πρωτεϊνών του HIF με επίτοπο GST (B, πάνω) και με μαύρο αστερίσκο οι μορφές του TFAP2A (B, κάτω). Τα μοριακά βάρη φαίνονται αριστερά.

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, οι μορφές του TFAP2A ανιχνεύονται σε επαρκή ποσότητα στα δείγματα INPUTS με αντίσωμα ενάντι του επιτόπου HA (anti-HA) (Εικόνα 22Α). Αυτήν την φορά χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα των κυτταρικών εκχυλισμάτων με υπερεκφρασμένη την μορφή HA-TFAP2A wt σε σύγκριση με την ποσότητα της μορφής HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, καθώς, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η τελευταία τείνει να εκφράζεται περισσότερο. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στα επίπεδα των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα INPUTS (διαδρομές 1 και 2).

Κατά την ανάλυση των εκλουσμάτων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST (anti-GST) ανιχνεύτηκε μεγάλη ποσότητα της πρωτεΐνης GST (26kDa), τόσο στα δείγματα που περιείχαν μόνο την πρωτεΐνη GST (διαδρομές 1 και 3), όπως αναμενόταν, όσο και στα δείγματα που περιείχαν το πρωτεϊνικό τμήμα GST-HIF-1α 1-347 (διαδρομές 2 και 4). Αυτό δείχνει ότι κάποια ποσότητα του τμήματος GST-HIF-1α 1-347 πρωτεολύθηκε κατά την πειραματική διαδικασία. Παρ'όλα αυτά, ανιχνεύτηκαν και ζώνες στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των 64kDa (αστερίσκος, Εικόνα 22B), δηλώνοντας έτσι την παρουσία ολόκληρης της χιμαιρικής πρωτεΐνης στα σωστά δείγματα (διαδρομές 2 και 4).

Με χρήση του αντισώματος έναντι του επιτόπου HA φάνηκε ότι συγκατακρημνίστηκε μαζί με το τμήμα GST-HIF-1α 1-347, τόσο η μορφή HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut (διαδρομή 4) όσο και η μορφή HA-TFAP2A wt (διαδρομή 2), η οποία ανιχνεύθηκε σε σημαντικά χαμηλότερο βαθμό, παρ'όλο που χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα κατά την πειραματική διαδικασία. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την δέσμευση του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347 με την SUMO-μιμητική μορφή του TFAP2A και με την αγρίου τύπου μορφή.

Για την καλύτερη μελέτη και τεκμηρίωση της σύνδεσης του τμήματος GST-HIF-1α 1-347 με τις μορφές HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut, διεξήχθη ένα τελευταίο πείραμα *in vitro* συγκατακρήμνισης στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιώντας κυτταρικά εκχυλίσματα (περίπου 650μgr πρωτεϊνικού περιεχομένου ανά αντίδραση) που περιείχαν υπερεκφρασμένες αυτές τις δύο μορφές. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 5μgr της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α σε κάθε αντίδραση (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Πείραμα *in vitro* συγκατακρήμνισης του πρωτεϊνικού τμήματος GST-HIF-1α 1-347 για την ανίχνευση σύνδεσης των μορφών HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut. A) Ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και B) των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα (φαίνονται δεξιά). Τα μοριακά βάρη φαίνονται στα αριστερά. Με αστερίσκο σημαίνονται οι ζώνες των χιμαιρικών πρωτεϊνών του HIF με επίτοπο GST. Η βήτα-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφορτώματος.

Τα δείγματα INPUTS (Εικόνα 23A) που αναλύθηκαν με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) έδειξαν ότι στα κυτταρικά εκχυλίσματα υπερεκφράστηκαν σε παρόμοια ποσότητα οι πρωτεΐνες HA-TFAP2A wt (διαδρομή 1) και HA-TFAP2A K10R mut (διαδρομή 2).

Στα εκλούσματα (Εικόνα 23B), με αντίσωμα έναντι του επιτόπου GST (anti-GST) ανιχνεύθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες σε μοριακό βάρος 64 kDa (αστερίσκος) που δηλώνουν την παρουσία της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347 στις σωστές συνθήκες (διαδρομές 2 και 4) χωρίς έντονη πρωτεόλυση αυτή τη φορά. Όμως, μία παρόμοια ζώνη ανιχνεύθηκε και στην συνθήκη-μάρτυρα (διαδρομή 1), όπου αναμενόταν να εμφανιστεί μόνο η ζώνη της GST σε μοριακό βάρος 26kDa, δείχνοντας ότι η διαδρομή 1 πιθανόν να είχε επιμολυνθεί με την πρωτεΐνη GST-HIF-1α 1-347 από τη διαδρομή 2 κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων με SDS-PAGE.

Παρ'όλα αυτά, ανάλυση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) έδειξε ότι υπάρχουν ευδιάκριτες οι ζώνες των HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut στα εκλούσματα της συγκατακρήμνισης (Εικόνα 23B), στα αναμενόμενα δείγματα (διαδρομές 2 και 4) και στο αναμενόμενο μοριακό βάρος κοντά στα 50kDa, επιβεβαιώνοντας την σύνδεση του GST-HIF-1α 1-347 με αυτές τις μορφές.

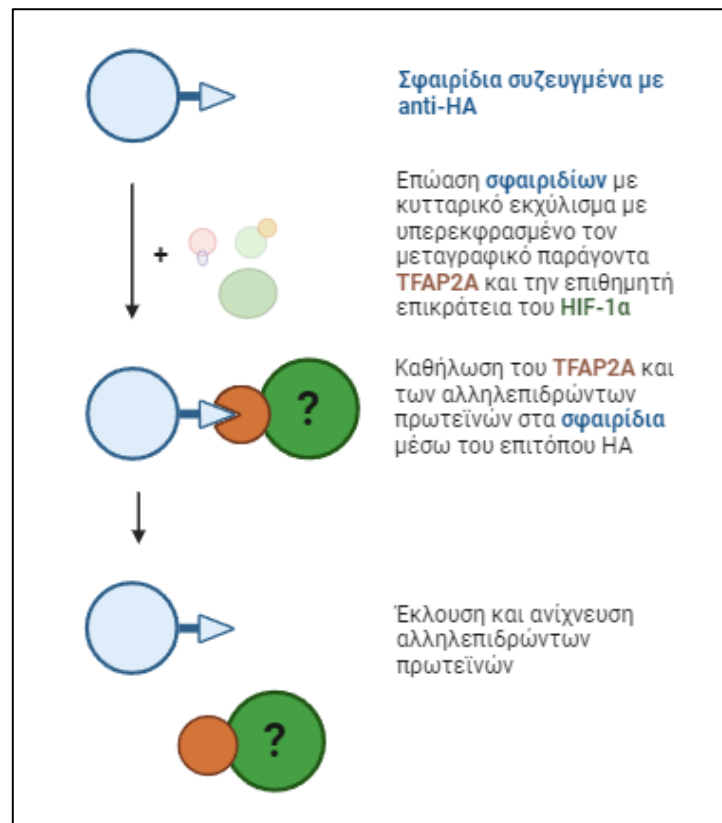
Συμπερασματικά, τα τρία πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης που διεξήχθησαν με χρήση του τμήματος GST-HIF-1α 1-347 έδειξαν ότι ο TFAP2A συνδέεται με τα αμινοξέα 1-347 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, ενώ φαίνεται πως δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μορφών HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10P mut. Η SUMO-μιμητική μορφή του TFAP2A συνδέεται λίγο πιο δυνατά πιθανώς λόγω και μεγαλύτερης υπερέκφρασης του στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν στην συνέχεια πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

5.3 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης υπερέκφρασμένων μορφών του TFAP2A σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των περιοχών αλληλεπίδρασης της υπομονάδας HIF-1α με τον μεταγραφικό παράγοντα TFAP2A, έγινε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA3.1-HA-TFAP2A wt, pcDNA3.1-HA-TFAP2A K10R mut και pcDNA3.1 HA-SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut για την υπερέκφραση των μορφών του TFAP2A, ταυτόχρονα με τους φορείς CMV flag-HIF-1α 1-347 ή pEGFP HIF-1α 348-826 (βλ. Ενότητα 3.1.8) για την υπερέκφραση των επικρατειών του HIF-1α.

Οι μορφές HA-TFAP2A K10R mut, που φέρει την σημειακή μετάλλαξη K10R για την απώλεια της ικανότητας σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης, και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, που ομοιάζει την πλήρως σουμοϋλιωμένη μορφή της TFAP2A, χρησιμοποιήθηκαν για την τυχόν ανίχνευση μεταβολών στην πιθανή αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον TFAP2A, σχετιζόμενων με την σουμοϋλίωση του τελευταίου. Ως Αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-HA για την υπερέκφραση της κωδικής αλληλουχίας του επιτόπου HA.

Μετά την συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων ακολούθησε η πειραματική διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες με χρήση σφαιριδίων αγαρόζης συζευγμένα με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (βλ. Ενότητα 3.11) για την κατακρήμνιση των μορφών του TFAP2A («δόλωμα») και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μαζί τους («λείες») (Εικόνα 24). Τα δείγματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

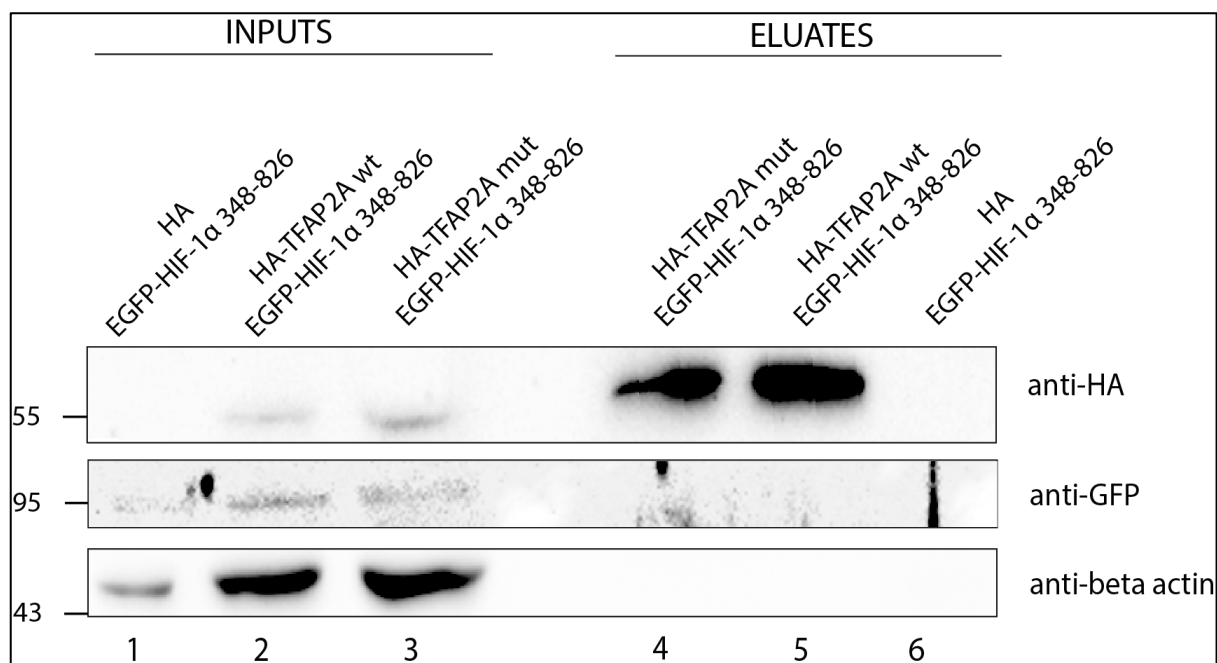


Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της ανοσοκατακρήμνισης με χρήση σφαιριδίων συζευγμένων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) για την καθήλωση του μεταγραφικού παράγοντα TFAP2A με σκοπό την ανίχνευση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. (Δημιουργήθηκε με το *biorender.com*)

5.3.1 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A και ανίχνευση σύνδεσης του τμήματος HIF-1α 348-826

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το φορέα pEFF-HIF-1α 348-826 για την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης που περιέχει τα αμινοξέα 348-826 του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και τον επίτοπο EGFP στο αμινοτελικό του άκρο καθώς και με τις μορφές HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut.

Ακολούθησε επώαση 400μL εκχυλισμάτων με σφαιρίδια συζευγμένα με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA και έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών. Τόσο τα κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUTS) όσο και τα εκλούσματα (ELUATES) αναλύθηκαν με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό SDS Page και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των μορφών HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut για την ανίχνευση σύνδεσης του EGFP-HIF-1α 348-826. Δεξιά φαίνεται η ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και αριστερά η ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα (φαίνονται δεξιά). Τα μοριακά βάρη φαίνονται στα αριστερά. Η βήτα-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφορτώματος.

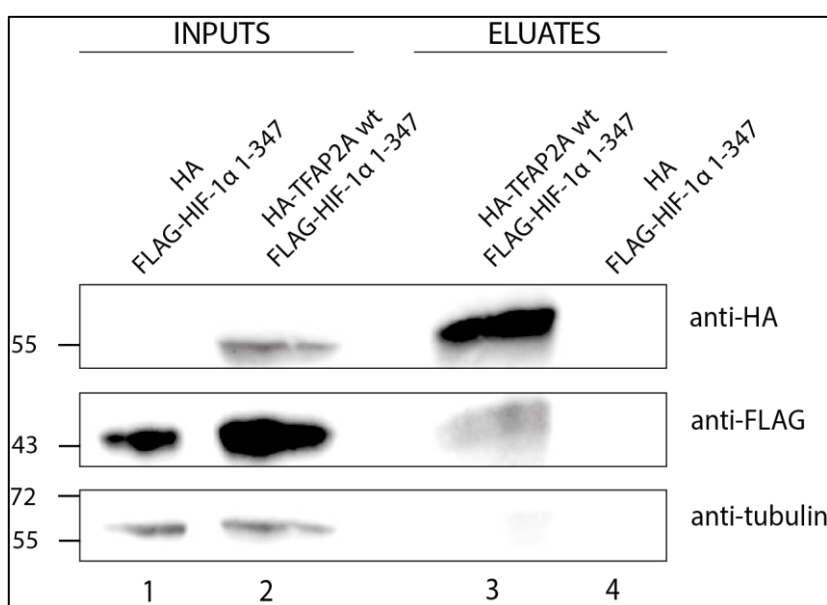
Στα δείγματα INPUTS με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut υπερεκφράστηκαν σε παρόμοιο επίπεδο στα κύτταρα HeLa (διαδρομές 2 και 3). Στα δείγματα ELUATES εμφανίζονται έντονες οι ζώνες σε μοριακό βάρος περίπου 55kDa, δείχνοντας ότι οι πρωτεΐνες HA-TFAP2A wt και HA-TFAP2A K10R mut καθελώθηκαν στα σφαιρίδια αгарόζης και κατακρημνίστηκαν επιτυχώς (διαδρομές 4 και 5). Οι αντίστοιχες ζώνες απουσιάζουν από τις συνθήκες μάρτυρα (διαδρομές 1 και 6), επιβεβαιώνοντας ότι οι ζώνες είναι ειδικές για τις μορφές του TFAP2A.

Η ανάλυση με χρήση αντισώματος έναντι του επιτόπου GFP (anti-GFP) για την ανίχνευση της χημεικής πρωτεΐνης EGFP-HIF-1α 348-826 έδειξε ότι η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε επιτυχώς στα κύτταρα HeLa (δείγματα INPUTS) σε όλες τις συνθήκες (διαδρομές 1, 2 και 3) και εμφανίζεται σε μοριακό βάρος λίγο μικρότερο από 95kDa, ενώ η απουσία αντίστοιχων ζωνών στα εκλούσματα (δείγματα ELUATES, διαδρομές 4, 5 και 6) δείχνει ότι δεν κατακρημνίστηκε και άρα δεν συνδέθηκε με καμία από τις μορφές του TFAP2A.

5.3.2 Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης υπερεκφρασμένων μορφών του TFAP2A και ανίχνευση σύνδεσης του τμήματος HIF-1α 1-347

Στο παρόν πείραμα, χρησιμοποιήθηκε μόνο η μορφή HA-TFAP2A wt και μία συνθήκη μάρτυρας με τον φορέα pcDNA3.1-HA (βλ. Ενότητα 3.1.1). Για την έκφραση της επικράτειας 1-347 του HIF-1α χρησιμοποιήθηκε ο φορέας CMV-HIF-1α 1-347, ο οποίος φέρει αλληλουχία για τον επίτοπο FLAG στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α και το μοριακό του βάρος αναμένεται στα 40kDa. Ο φορέας αυτός επιλέχθηκε καθώς σε αυτόν υπήρχε διαθέσιμη κλωνοποιημένη η επιθυμητή επικράτεια 1-347 του HIF-1α.

Στην συνέχεια έγινε συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων που περιείχαν τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες και ακολούθησε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες με χρήση σφαιριδίων αгарόζης συζευγμένων με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA, με σκοπό την καθήλωση και απομόνωση του HA-TFAP2A wt και την πιθανή κατακρήμνιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-1α 1-347, που θα μαρτυρούσε την αλληλεπίδρασή τους.



Εικόνα 26. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες της πρωτεΐνης HA-TFAP2A wt για την ανίχνευση σύνδεσης του CMV-HIF-1α 1-347. Δεξιά φαίνεται η ανάλυση των εκχυλισμάτων (INPUTS) και αριστερά η ανάλυση των εκλουσμάτων (ELUATES) με ανοσοαποτύπωση με τα κατάλληλα αντισώματα (φαίνονται δεξιά). Τα μοριακά βάρη φαίνονται στα αριστερά. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφορτώματος.

Η ανάλυση των δειγμάτων INPUTS με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (anti-HA) δείχνει ότι η πρωτεΐνη HA-TFAP2A wt έχει υπερεκφραστεί στα κύτταρα HeLa (διαδρομή 2). Από την ανάλυση

των δειγμάτων ELUATES (διαδρομή 3) φαίνεται ότι η πρωτεΐνη έχει καθηλωθεί στα σφαιρίδια αгарόζης και κατακρημνίστηκε επιτυχώς. Η απουσία αντίστοιχων ζωνών στην συνθήκη μάρτυρα δείχνει ότι οι ζώνες είναι ειδικές (διαδρομές 1 και 4).

Όσον αφορά την ανάλυση της χημεικής πρωτεΐνης FLAG-HIF-1α 1-347, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG (anti-FLAG). Στα δείγματα INPUTS (διαδρομές 1 και 2) φαίνεται ότι υπερεκφράστηκε και στις δύο συνθήκες, όπως αναμενόταν, δηλώνοντας την παρουσία του στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Στα δείγματα των εκλουσμάτων (ELUATES), το τμήμα 1-347 του HIF-1α δεν εμφανίζεται στην συνθήκη του μάρτυρα (διαδρομή 4), ενώ στην συνθήκη που κατακρημνίστηκε ο TFAP2A wt (διαδρομή 3) εμφανίζεται μία αχνή ζώνη στο αναμενόμενο για αυτό το τμήμα μοριακό βάρος (περίπου 40kDa), άρα συνδέθηκε με τον TFAP2A σε *in vivo* συνθήκες.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν την σύνδεση με τον TFAP2A που παρατηρείται σε πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης του αντίστοιχου πρωτεϊνικού τμήματος του HIF-1α 1-347 (βλ. Ενότητα 5.2.2), αλλά και την απουσία σύνδεσης των τμημάτων του HIF-1α 348-826 και 575-826, μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι ο TFAP2A συνδέεται με αμινοξέα 1-347 στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α και, πιθανόν, με τις περιοχές PAS A και PAS B, που είναι υπεύθυνες για τον διμερισμό αλλά και για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του μεταγραφικού παράγοντα HIF.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υποξία είναι το φαινόμενο που χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή παροχή οξυγόνου σε σχέση με τη ζήτηση. Μπορεί να εκδηλωθεί σε διάφορα επίπεδα, όπως σε επίπεδο κυττάρου, ιστού ή οργανισμού. Ως απάντηση στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου, οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα σύνολο προσαρμοστικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης και της αυξημένης πρόσληψης γλυκόζης. Αυτές οι προσαρμοστικές αποκρίσεις ρυθμίζονται μέσω μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση, με κεντρικό ρυθμιστή την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων HIF (Hypoxia-Inducible Factor).

Έχει αποδειχθεί πως οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των παραγόντων HIF και άλλων σχετιζόμενων μορίων. Μια τέτοια τροποποίηση είναι η σουμοϋλίωση, δηλαδή η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών SUMO σε πρωτεΐνες-στόχους. Πρόσφατη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοχημείας [65] αποκάλυψε ένα σύνολο πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα δεν επηρεάζονται από την υποξία, αλλά παρουσιάζουν μεταβολές στα επίπεδα σουμοϋλίωσής τους. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2A ξεχωρίζει λόγω της διαπιστωμένης συσχέτισής του με την καρκινογένεση και λόγω της γνωστής αλληλεπίδρασής του με τους παράγοντες HIF.

Ο TFAP2A, κύριος ρυθμιστής διαφόρων διαδικασιών της εμβρυογένεσης, όπως η κρανιοπροσωπική ανάπτυξη, η ανάπτυξη των νεφρών και η νευρική λειτουργία, έχει συνδεθεί στενά με τον καρκίνο. Ο ρόλος του στον καρκίνο είναι πολύπλοκος, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις δρα ως ογκογονίδιο, ενώ σε άλλες λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας. Ανεξάρτητα από την λειτουργία του κάθε φορά, ο TFAP2A φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση συνολικά, και σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως το μελάνωμα και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, ο TFAP2A συσχετίζεται με τους HIF-1 και HIF-2. Συγκεκριμένα στο μελάνωμα, έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α αλληλεπιδρά με τον TFAP2A και ότι η ταυτόχρονη παρουσία αυτών των παραγόντων οδηγεί σε μειωμένη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων, καθιστώντας αυτήν την αλληλεπίδραση δυνητικό βιοδείκτη ή θεραπευτικό στόχο. Επιπλέον, δουλειά του Εργαστηρίου Βιοχημείας [65] αποκάλυψε ότι ο TFAP2A συνδέεται με τους HIF-1α και HIF-2α ανεξάρτητα από τη σουμοϋλίωσή του και ότι η αποσουμοϋλίωσή του οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

Αδημοσίευτα ευρήματα από το Εργαστήριο Βιοχημείας (*Kanoura et al, in preparation*) δείχνουν ότι ο TFAP2A δεσμεύεται σε περιοχές του DNA όπου υπάρχουν επίσης στοιχεία HRE (στοιχεία απόκρισης στην υποξία), υπογραμμίζοντας περαιτέρω την αξία της σχέσης TFAP2A-HIF. Στο πλαίσιο της εξέτασης αυτής της αλληλεπίδρασης, εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να προσδιοριστεί η συγκεκριμένη επικράτεια του HIF-1α που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον TFAP2A. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την μελέτη της άμεσης πρόσδεσης του TFAP2A στις επικράτειες του HIF-1α μέσω πειραμάτων *in vitro* συγκατακρήμνισης. Οι πρωτεϊνικές επικράτειες του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα είχαν προηγουμένως υπερεκφραστεί και καθαριστεί από βακτήρια BL21 RIL. Στη δεύτερη προσέγγιση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να εξεταστεί αυτή η αλληλεπίδραση σε ζωντανά κύτταρα, δηλαδή ομοιάζοντας τις πραγματικές συνθήκες ενός όγκου. Για το σκοπό αυτό, οι μορφές του TFAP2A και οι επικράτειες HIF-1α υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa και τα εκχυλίσματα από αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Για την διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων *in vitro* συγκατακρήμνισης, αρχικά έπρεπε να απομονωθούν επαρκείς ποσότητες από τις πρωτεϊνικές επικράτειες 1-347, 348-826 και 575-826 του HIF-1α. Αυτές οι πρωτεΐνες έφεραν επίσης τον επίτοπο GST στο αμινοτελικό τους άκρο. Η επικράτεια 1-347 περιέχει τις περιοχές PAS A και PAS B, υπεύθυνες για τον διμερισμό του HIF και για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Οι επικράτειες 348-826 και 575-826 περιέχουν τις περιοχές TAD-N και TAD-C, που σχετίζονται με τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Αυτές οι επικράτειες επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό της δομικής περιοχής που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον TFAP2A, καθώς και οι δύο τύποι δομικών περιοχών (PAS και TAD) είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Από τα πειράματα υπερέκφρασης και καθαρισμού απομονώθηκε επιτυχώς επαρκής ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης για τις επικράτειες HIF-1α 1-347 και 575-826.

Επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της ικανότητας πρόσδεσης αυτών των επικρατειών με μορφές του TFAP2A, οι οποίες ήταν οι TFAP2A wt, TFAP2A K10R mut, που στερείται την ικανότητα σουμοϋλίωσης, και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R mut, που ομοιάζει την πλήρως σουμοϋλιωμένη μορφή. Αυτές οι μορφές χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την ταυτόχρονη μελέτη πιθανών μεταβολών στην σύνδεση του TFAP2A με τον HIF-1α, που επηρεάζεται από την σουμοϋλίωση του πρώτου. Όταν ελέγχθηκε η επικράτεια HIF-1α 575-826, που περιέχει την περιοχή TAD-C, ανιχνεύθηκε μία ασθενής σύνδεση, η οποία θεωρήθηκε ότι δεν ήταν ειδική διότι παρατηρήθηκε και σε συνθήκες αρνητικού μάρτυρα. Επίσης, η ασθενική αυτή σύνδεση φάνηκε να μην επηρεάζεται από την σουμοϋλίωση του TFAP2A. Για τον έλεγχο της ικανότητας σύνδεσης της πρωτεϊνικής επικράτειας HIF-1α 1-347 με τον TFAP2A, η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ειδική σύνδεση όλων των μορφών του TFAP2A με την επικράτεια HIF-1α 1-347, ενώ το σήμα που ανιχνεύθηκε για την SUMO-μιμητική μορφή του TFAP2A

παρατηρήθηκε ότι ήταν σημαντικά πιο έντονο. Από αυτά τα πειράματα δεν έγινε ξεκάθαρο εάν η ισχυρότερη σύνδεση που παρατηρήθηκε ήταν λόγω της σουμοϋλίωσης του TFAP2A ή λόγω της μεγαλύτερης έκφρασης που έχει παρατηρηθεί γενικώς για την συγκεκριμένη μορφή στο εργαστήριο. Το σίγουρο σύμπερασμα όμως είναι ότι η υπεύθυνη επικράτεια για την άμεση σύνδεση του HIF-1α με τον TFAP2A είναι η HIF-1α 1-347.

Για να επιβεβαιωθεί ότι αυτή η σύνδεση πραγματοποιείται και σε πραγματικές συνθήκες στο εσωτερικό καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με χρήση εκχυλισμάτων από καρκινικά κύτταρα HeLa. Σε αυτά προηγουμένως είχε γίνει υπερέκφραση των μορφών TFAP2A wt, TFAP2A K10R mut και SUMO2(AA)-TFAP2A K10R, και των επικρατειών HIF-1α 1-347 και HIF-1α 348-826. Τα αποτελέσματα για την επικράτεια HIF-1α 348-826 δείχνουν πως οι μορφές του TFAP2A αδυνατούν να συνδεθούν με την επικράτεια του HIF-1α. Αντίθετα εντοπίστηκε σύνδεση του HIF-1α 1-347 με τον TFAP2A wt, επιβεβαιώνοντας τα πειράματα συγκατακρήμνισης.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία δείχθηκε με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις ότι η επικράτεια του HIF-1α που είναι υπεύθυνη για την σύνδεσή του με τον TFAP2A είναι η HIF-1α 1-347. Η σύνδεση αυτή πιθανόν να συμβαίνει μέσω των περιοχών PAS A και PAS B που βρίσκονται σε αυτήν την επικράτεια. Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν αυτή η σύνδεση συμβαίνει στην ίδια περιοχή και για τους παράγοντες HIF-2α και ARNT, που επίσης προσδένονται με τον TFAP2A και έχουν παρόμοια δομή με τον HIF-1α. Επιπλέον, η σύνδεση αυτή πιθανά να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα των παραγόντων ή μπορεί επίσης να ανταγωνίζεται άλλες πρωτεΐνες σύνδεσης, όπως μεταγραφικούς ρυθμιστές.

Μελλοντικά, θα ήταν χρήσιμο να εντοπιστεί η περιοχή του TFAP2A που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή του με τον HIF-1α, ώστε να διευκρινιστεί ο πλήρης μηχανισμός σύνδεσής τους. Επιπλέον, η εξέταση του κατά πόσον το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης επηρεάζεται από την σουμοϋλίωση του TFAP2A, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ιδιαίτερα καθώς έχει βρεθεί πως η αποσουμοϋλίωση του TFAP2A επηρεάζει θετικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με άγνωστο όμως μηχανισμό. Ακόμη, οι παραπάνω έρευνες θα μπορούσαν να διεξαχθούν και για την περίπτωση του HIF-2α, ο οποίος έχει επίσης συσχετισθεί με τον TFAP2A στον καρκίνο. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι δομικές περιοχές των α υπομονάδων του HIF είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες, πιθανόν ο HIF-2α να προσδένεται με την ίδια περιοχή (PAS A και PAS B) στον TFAP2A και ίσως να ανταγωνίζεται τον HIF-1α για την σύνδεση.

Ο καθοριστικός ρόλος του TFAP2A τόσο σε κρίσιμες φυσιολογικές λειτουργίες όσο και στην ανάπτυξη σοβαρών ασθενειών, αλλά και η αναδυόμενη σχέση του με τους παράγοντες HIF, που

είναι γνωστό ότι έχουν κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση, υπογραμμίζουν το επείγον της περαιτέρω διερεύνησής του για τη δυνητική αξιοποίησή του ως βιοδείκτη ή θεραπευτικού στόχου στο μέλλον.

7. ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Catling, D. C. (2014). The great oxidation event transition. In *Elsevier eBooks* (pp. 177–195). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-095975-7.01307-3>
- [2] Deshpande, O. A. (2023, July 31). Biochemistry, oxidative phosphorylation. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553192/>
- [3] Sendoel, A., & Hengartner, M. O. (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*, 29(3), 168–176. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2013>
- [4] Rytönen, K. T. (2018). Oxygen and early animals. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/elife.34756>
- [5] Prabhakar, N. R. (2020). 2019 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Physiology*, 35(2), 81–83. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2020>
- [6] Zhao Y., Xing, C., Deng, Y., Ye, C., & Peng, H. (2024). HIF-1 α signaling: Essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies. *Genes and Diseases*, 11(1), 234–251. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.039>
- [7] Vaupel, P., Mayer, A., & Höckel, M. (2004). Tumor hypoxia and malignant progression. In *Methods in Enzymology* (pp. 335–354). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(04\)81023-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(04)81023-1)
- [8] Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- [9] Vaupel, P. (2009). Prognostic Potential Of The Pretherapeutic Tumor Oxygenation Status. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 241–246). https://doi.org/10.1007/978-0-387-85998-9_36
- [10] Edwards, P. (2001). Combinatorial chemistry. *Drug Discovery Today*, 6(3), 160. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(00\)01647-0](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(00)01647-0)
- [11] UniProt. (n.d.). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q16665/entry>
- [12] Wang, G. L., Jiang, B., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5510–5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- [13] UniProt. (n.d.-b). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q99814/entry>
- [14] UniProt. (n.d.-c). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P27540/entry>
- [15] UniProt. (n.d.-d). https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y2N7/entry#family_and_domains
- [16] Chen, S., & Sang, N. (2015). Hypoxia-Inducible factor-1: a critical player in the survival strategy of stressed cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(2), 267–278. <https://doi.org/10.1002/jcb.25283>
- [17] Rankin, E. B., Biju, M. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Johnson, R. S., Simon, M. C., Keith, B., & Haase, V. H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 1068–1077. <https://doi.org/10.1172/jci30117>

- [18] Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2011). Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23), 3885–3901. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0679-5>
- [19] Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). 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. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), 5447–5454. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447>
- [20] Wenger, R. H., Stiehl, D. P., & Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the Consensus HRE. *Science's STKE*, 2005(306). <https://doi.org/10.1126/stke.3062005re12>
- [21] Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. (1997, February 28). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9038135/>
- [22] Sadlecki, P., Bodnar, M., Grabiec, M., Marszałek, A., Walentowicz, P., Sokup, A., Zegarska, J., & Walentowicz-Sadlecka, M. (2014). The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Glucose Transporter-1, (GLUT-1) and Carbon Anhydrase IX in Endometrial Cancer Patients. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/616850>
- [23] Chun, Y. (n.d.). Papel hipotético del factor 1 inducible por hipoxia en las adaptaciones a la microgravedad. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002019000300012
- [24] Gustafsson, M., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U., & Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental Cell*, 9(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>
- [25] Ito, K., Kitajima, Y., Kai, K., Matsufuji, S., Yamada, K., Egawa, N., Kitagawa, H., Okuyama, K., Tanaka, T., & Noshiro, H. (2021). Matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by HIF-1-dependent and epigenetic mechanisms and serves a tumor-suppressive role in gastric cancer progression. *International Journal of Oncology*, 59(6). <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5282>
- [26] Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W., & Varesio, L. (1995). A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *Journal of Experimental Medicine*, 182(6), 1683–1693. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.1683>
- [27] Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- [28] Van Den Beucken, T., Koritzinsky, M., Niessen, H. E., Dubois, L., Savelkoul, K. G., Mujcic, H., Jutten, B., Kopacek, J., Pastorekova, S., Van Der Kogel, A. J., Lambin, P., Voncken, W., Rouschop, K. M., & Wouters, B. G. (2009). Hypoxia-induced expression of carbonic anhydrase 9 is dependent on the unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24204–24212. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.006510>

- [29] Koh, M. Y., & Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.004>
- [30] Zhu, N., Jiang, L., Li, Y., Zhang, Y., Du, Q., Hao, P., Li, J., Cao, X., & Li, L. (2020). Berberine Protects Against Simulated Ischemia/Reperfusion Injury-Induced H9C2 Cardiomyocytes Apoptosis In Vitro and Myocardial Ischemia/Reperfusion-Induced Apoptosis In Vivo by Regulating the Mitophagy-Mediated HIF-1 α /BNIP3 Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00367>
- [31] Zheng, J., Chen, P., Zhong, J., Yu, C., Chen, H., He, Y., & Chen, C. (2021). HIF-1 α in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Molecular Medicine Reports*, 23(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11991>
- [32] Ullah, K., Ai, L., Humayun, Z., & Wu, R. (2023). Targeting endothelial HIF2A/ARNT expression for ischemic heart disease therapy. *Biology*, 12(7), 995. <https://doi.org/10.3390/biology12070995>
- [33] Haase, V. H. (2021). Hypoxia-inducible factor–prolyl hydroxylase inhibitors in the treatment of anemia of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*, 11(1), 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2020.12.002>
- [34] Wang, Y., Huang, Z., Yuan, M., Feng, J., Cai, R., Zou, Q., Pu, Y., Wang, S., Chen, F., Yi, W., Hui-Ji, Z., & Cai, Z. (2021). Role of hypoxia inducible factor-1A in Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 80(3), 949–961. <https://doi.org/10.3233/jad-201448>
- [35] Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S. A., Liao, F., Xu, H., & Zhang, Y. (2007). Hypoxia-inducible factor 1A (HIF-1A)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and B-Amyloid generation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10873–10880. <https://doi.org/10.1074/jbc.m608856200>
- [36] Ashok, B. S., Ajith, T. A., & Sivanesan, S. (2017). Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer’s disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(3), 327–334. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12717>
- [37] Pinilla, L. L., Ugun-Klusek, A., Rutella, S., & De Girolamo, L. A. (2021). Hypoxia signaling in Parkinson’s disease: There is use in asking “What HIF?” *Biology*, 10(8), 723. <https://doi.org/10.3390/biology10080723>
- [38] Patel, S. A., Hirose, S., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Richardson, E. K., Ge, J., Syafruddin, S. E., Speed, A., Papachristou, E. K., Baker, D., Clarke, D. D., Purvis, S., Wesolowski, L., Dyas, A., Castillon, L., Caraffini, V., Bihary, D., Yong, C., Harrison, D. J., . . . Vanharanta, S. (2022). The renal lineage factor PAX8 controls oncogenic signalling in kidney cancer. *Nature*, 606(7916), 999–1006. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04809-8>
- [39] Briggs, K. J., Koivunen, P., Cao, S., Backus, K. M., Olenchock, B. A., Patel, H., Zhang, Q., Signoretti, S., Gerfen, G. J., Richardson, A., Witkiewicz, A. K., Cravatt, B. F., Clardy, J., & Kaelin, W. G. (2016). Paracrine induction of HIF by glutamate in breast cancer: EGLN1 senses cysteine. *Cell*, 166(1), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.042>

- [40] De Heer, E. C., Jalving, M., & Harris, A. L. (2020). HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), 5074–5087. <https://doi.org/10.1172/jci137552>
- [41] Cowman, S. J., & Koh, M. Y. (2022). Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. *Trends in Cancer*, 8(1), 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.10.004>
- [42] Leone, R. D., & Powell, J. D. (2020). Metabolism of immune cells in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 516–531. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0273-y>
- [43] Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5675–5686. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.13.5675-5686.2005>
- [44] Li, L., Shen, S., Bickler, P. E., Jacobson, M. P., Wu, L. F., & Altschuler, S. J. (2023). Searching for molecular hypoxia sensors among oxygen-dependent enzymes. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.87705>
- [45] Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W. Y., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin, W. G. (2001). HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science*, 292(5516), 464–468. <https://doi.org/10.1126/science.1059817>
- [46] Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2004). Catalytic Properties of the Asparaginyl Hydroxylase (FIH) in the Oxygen Sensing Pathway Are Distinct from Those of Its Prolyl 4-Hydroxylases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9899–9904. <https://doi.org/10.1074/jbc.m312254200>
- [47] Filippopoulou, C., Simos, G., & Chachami, G. (2020). The role of sumoylation in the response to Hypoxia: An overview. *Cells*, 9(11), 2359. <https://doi.org/10.3390/cells9112359>
- [48] Semenza, G. L. (2017). A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Experimental Cell Research*, 356(2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.041>
- [49] Chan, H. M., & La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science*, 114(13), 2363–2373. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2363>
- [50] Xu, D., Yao, Y., Lu, L., Costa, M., & Dai, W. (2010). PLK3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1A. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 38944–38950. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.160325>
- [51] Atta, W., & Azeiz, A. Z. A. (2021). Effect of Modified HIF-1<i>α</i>;<i>α</i>; Linked to Carbonic Anhydrase IX Inhibitor and Glycosylated Cisplatin on Solid Tumors: Short Review. *Journal of Biosciences and Medicines*, 09(08), 59–72. <https://doi.org/10.4236/jbm.2021.98006>
- [52] Bae, S., Jeong, J., Park, J. A., Kim, S., Bae, M., Choi, S., & Kim, K. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.068>

- [53] Ks, S., Jh, P., Heo, J. Y., Jing, K., Han, J., Min, K., Kim, C., Koh, G., Lim, K., Kang, G., Lee, J. U., Yim, Y., Shong, M., Th, K., & Kweon, G. R. (2014). SIRT2 regulates tumour hypoxia response by promoting HIF-1 α hydroxylation. *Oncogene*, 34(11), 1354–1362. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.76>
- [54] Jiang, B., Jiang, G., Zheng, J. Z., Lu, Z., Hunter, T., & Vogt, P. K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *PubMed*, 12(7), 363–369. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11457733>
- [55] Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., & Caro, J. (2003). MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14013–14019. <https://doi.org/10.1074/jbc.m209702200>
- [56] Bae, M. K., Ahn, M. Y., Jeong, J. W., Bae, M. H., Lee, Y. M., Bae, S. K., Park, J., Kim, K., & Kim, K. W. (2002). Jab1 Interacts Directly with HIF-1 α and Regulates Its Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 9–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.c100442200>
- [57] Mengelbier, L. H., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., Gradin, K., Poellinger, L., & Pahlman, S. (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026>
- [58] Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- [59] Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors — Similar but not identical. *Molecules and Cells*, 29(5), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>
- [60] Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., & Simos, G. (2006b). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1A. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.m605058200>
- [61] Koukoulas, K., Giakountis, A., Karagiota, A., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G., & Mylonis, I. (2021c). ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Molecular Oncology*, 15(12), 3468–3489. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13080>
- [62] Wang, Y., Singh, A., Zhao, Y., Du, T., Huang, Y., Wan, X., Mukhopadhyay, D., Wang, Y., Wang, N., & Zhang, P. (2020). TRIM28 regulates sprouting angiogenesis through VEGFR-DLL4-Notch signaling circuit. *The FASEB Journal*, 34(11), 14710–14724. <https://doi.org/10.1096/fj.202000186rrr>
- [63] Yang, Y., Lu, H., Chen, C., Lyu, Y., Cole, R. N., & Semenza, G. L. (2022b). HIF-1 Interacts with TRIM28 and DNA-PK to release paused RNA polymerase II and activate target gene transcription in response to hypoxia. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27944-8>

- [64] Galbraith, M. D., Allen, M. A., Bensard, C., Wang, X., Schwinn, M. K., Qin, B., Long, H. W., Daniels, D. L., Hahn, W. C., Dowell, R. D., & Espinosa, J. M. (2013). HIF1A employs CDK8-Mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell*, 153(6), 1327–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.048>
- [65] Chachami, G., Stankovic-Valentin, N., Karagiota, A., Basagianni, A., Plessmann, U., Urlaub, H., Melchior, F., & Simos, G. (2019c). Hypoxia-induced changes in SUMO conjugation affect transcriptional regulation under low oxygen. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(6), 1197–1209. <https://doi.org/10.1074/mcp.ra119.001401>
- [66] Cheng, J., Ying, L., Zhu, L., Li, X., Kołat, D., Zhao, L., & Xiong, W. (2023). Crucial role of the transcription factors family activator protein 2 in cancer: current clue and views. *Journal of Translational Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04189-1>
- [67] Kołat, D., Kałuzińska, Ż., Bednarek, A. K., & Płuciennik, E. (2019). The biological characteristics of transcription factors AP-2 α and AP-2 γ and their importance in various types of cancers. *Bioscience Reports*, 39(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20181928>
- [68] Lin, A. E. (2018, March 29). Branchiooculofacial syndrome. *GeneReviews® - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55063/>
- [69] Jäger, R., Friedrichs, N., Heim, I., Büttner, R., & Schorle, H. (2005). Dual role of AP-2gamma in ErbB-2-induced mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 90(3), 273–280. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-4815-x>
- [70] Hoei-Hansen, C. E., Nielsen, J., Almstrup, K., Sonne, S. B., Græm, N., Skakkebak, N. E., Leffers, H., & Meyts, E. R. (2004). Transcription Factor AP-2 γ Is a Developmentally Regulated Marker of Testicular Carcinoma In situ and Germ Cell Tumors. *Clinical Cancer Research*, 10(24), 8521–8530. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-1285>
- [71] Beger, M., Butz, K., Denk, C., Williams, T., Hurst, H. C., & Hoppe-Seyler, F. (2001). Expression pattern of AP-2 transcription factors in cervical cancer cells and analysis of their influence on human papillomavirus oncogene transcription. *Journal of Molecular Medicine*, 79(5–6), 314–320. <https://doi.org/10.1007/s001090100211>
- [72] Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., & Buettner, R. (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene*, 260(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00454-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00454-6)
- [73] Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hébert, J. M., Rigby, P., & Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes & Development*, 5(1), 105–119. <https://doi.org/10.1101/gad.5.1.105>
- [74] Hong, S. J., Lardaro, T., Oh, M. S., Huh, Y., Ding, Y., Kang, U. J., Kirfel, J., Buettner, R., & Kim, K. (2008). Regulation of the noradrenaline neurotransmitter phenotype by the transcription factor AP-2B. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16860–16867. <https://doi.org/10.1074/jbc.m709106200>

- [75] Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P., & Dollé, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 54(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00463-7](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00463-7)
- [76] Zhao, F., Lufkin, T., & Gelb, B. D. (2003). Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 δ , during mouse embryogenesis. *Gene Expression Patterns*, 3(2), 213–217. [https://doi.org/10.1016/s1567-133x\(02\)00067-4](https://doi.org/10.1016/s1567-133x(02)00067-4)
- [77] Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *GenomeBiology.com* (London. Print), 6(13), 246. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-246>
- [78] Zhang, L., Lu, J., Liu, R., Hu, M., Zhao, Y., Tan, S., Wang, S., Zhang, B., Nie, W., Dong, Y., Zhong, H., Zhang, W., Zhao, X., & Han, B. (2020). Chromatin accessibility analysis reveals that TFAP2A promotes angiogenesis in acquired resistance to anlotinib in lung cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(10), 1357–1365. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0421-7>
- [79] Wang, J., Chen, Q., Peng, F., Zhao, S., Zhang, C., Song, X., Yu, D., Wu, Z., Du, J., Ni, H., Deng, H., & Deng, W. (2023). Transcription factor AP-2 α activates RNA polymerase III-directed transcription and tumor cell proliferation by controlling expression of c-MYC and p53. *Journal of Biological Chemistry*, 299(3), 102945. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102945>
- [80] Scibetta, A. G., Wong, P., Chan, K. V., Canosa, M., & Hurst, H. C. (2010). Dual association by TFAP2A during activation of the p21cip/CDKN1A promoter. *Cell Cycle*, 9(22), 4525–4532. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13746>
- [81] Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S., & Tainsky, M. A. (1999). PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Research*, 27(3), 866–874. <https://doi.org/10.1093/nar/27.3.866>
- [82] Nolens, G., Pignon, J., Koopmansch, B., Elmoualij, B., Zorzi, W., De Pauw, E., & Winkler, R. (2009). Ku proteins interact with activator protein-2 transcription factors and contribute to ERBB2overexpression in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research*, 11(6). <https://doi.org/10.1186/bcr2450>
- [83] Eloranta, J. J., & Hurst, H. C. (2002). Transcription Factor AP-2 Interacts with the SUMO-conjugating Enzyme UBC9 and Is Sumolated in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30798–30804. <https://doi.org/10.1074/jbc.m202780200>
- [84] Bragança, J., Eloranta, J. J., Bamforth, S. D., Ibbitt, J. C., Hurst, H. C., & Bhattacharya, S. (2003). Physical and Functional Interactions among AP-2 Transcription Factors, p300/CREB-binding Protein, and CITED2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16021–16029. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208144200>
- [85] Bogachek, M. V., De Andrade, J. P., & Weigel, R. J. (2014). Targeting the sumoylation pathway in cancer stem cells. *Molecular and Cellular Oncology*, 1(3), e964624. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.964624>

- [86] Bogachek, M. V., Chen, Y., Kulak, M. V., Woodfield, G. W., Cyr, A. R., Park, J. M., Spanheimer, P. M., Li, Y., Li, T., & Weigel, R. J. (2014). Sumoylation pathway is required to maintain the basal breast cancer subtype. *Cancer Cell*, 25(6), 748–761. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.008>
- [87] Yang, J., Li, P., Wang, F., Liang, W., Ma, H., Chen, Y., Ma, Z., Li, Q., Peng, Q., Zhang, Y., & Wang, S. (2016). Activation of activator protein 2 alpha by aspirin alleviates atherosclerotic plaque growth and instability in vivo. *Oncotarget*, 7(33), 52729–52739. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10400>
- [88] Ren, K., Xian, S., He, F., Zhang, W., Ding, X., Wu, Y., Yang, L., Zhou, J., Gao, X., & Zhang, J. (2011). CK2 phosphorylates AP-2 α and increases its transcriptional activity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 44(7), 490–495. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2011.44.7.490>
- [89] Iwamoto, N., Abe-Dohmae, S., Lu, R., & Yokoyama, S. (2008). Involvement of protein kinase D in phosphorylation and increase of DNA binding of activator protein 2A to downregulate ATP-Binding cassette transporter A1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(12), 2282–2287. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.174714>
- [90] Ahituv, N., Erven, A., Fuchs, H., Keren, G., Ashery-Padan, R., Williams, T., De Angelis, M. H., Avraham, K. B., & Steel, K. P. (2004). An ENU-induced mutation in AP-2 α leads to middle ear and ocular defects in Doarad mice. *Mammalian Genome*, 15(6), 424–432. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2334-z>
- [91] Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R., & Mitchell, P. J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature*, 381(6579), 235–238. <https://doi.org/10.1038/381235a0>
- [92] Rada-Iglesias, A., Prescott, S. L., & Wysocka, J. (2013). Human genetic variation within neural crest enhancers: molecular and phenotypic implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1620), 20120360. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0360>
- [93] Nguyen, T. K., Petrikas, M., Chambers, B. E., & Wingert, R. A. (2023). Principles of Zebrafish Nephron segment Development. *Journal of Developmental Biology*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.3390/jdb11010014>
- [94] Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., & Buettner, R. (2000b). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene*, 260(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00454-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00454-6)
- [95] Chen, G., Wang, Y., Zhao, X., Xie, X., Zhao, J., Deng, T., Chen, Z., Chen, H., Tong, Y., Yang, Z., Ding, X., Guo, P., Yu, H., Wu, L., Zhang, S., Zhu, Q., Li, J., Shan, Y., Yu, F., . . . Xia, J. (2021). A positive feedback loop between Periostin and TGF β 1 induces and maintains the stemness of hepatocellular carcinoma cells via AP-2 α activation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02011-8>
- [96] Wang, W., Lv, L., Pan, K., Zhang, Y., Zhao, J., Chen, J. G., Chen, Y. B., Li, Y. Q., Wang, Q. J., He, J., Chen, S. P., Zhou, Z. W., & Xia, J. C. (2011). Reduced Expression of Transcription Factor AP-

- 2 α Is Associated with Gastric Adenocarcinoma Prognosis. PLOS ONE, 6(9), e24897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024897>
- [97] Reduced nuclear expression of transcription factor AP-2 associates with aggressive breast cancer. (2002, November 1). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12429639/>
- [98] Schulte, J. H., Kirfel, J., Lim, S., Schramm, A., Friedrichs, N., Deubzer, H. E., Witt, O., Eggert, A., & Buettner, R. (2008). Transcription factor AP2alpha (TFAP2a) regulates differentiation and proliferation of neuroblastoma cells. Cancer Letters, 271(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.039>
- [99] Dimitrova, Y., Gruber, A. J., Mittal, N., Ghosh, S., Dimitriadis, B., Mathow, D., Grandy, W. A., Christofori, G., & Zavolan, M. (2017). TFAP2A is a component of the ZEB1/2 network that regulates TGFB1-induced epithelial to mesenchymal transition. Biology Direct, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-017-0180-7>
- [100] Shi, D., Xie, F., Zhang, Y., Tian, Y., Chen, W., Fu, L., Wang, J., Guo, W., Kang, T., Huang, W., & Deng, W. (2014). TFAP2A regulates nasopharyngeal carcinoma growth and survival by targeting HIF-1A signaling pathway. Cancer Prevention Research, 7(2), 266–277. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.capr-13-0271>
- [101] Steunou, A., Ducoux-Petit, M., Lazar, I., Monsarrat, B., Erard, M., Muller, C., Clottes, E., Burlet-Schiltz, O., & Nieto, L. (2013). Identification of the hypoxia-inducible factor 2A nuclear interactome in melanoma cells reveals master proteins involved in melanoma development. Molecular & Cellular Proteomics, 12(3), 736–748. <https://doi.org/10.1074/mcp.m112.020727>

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΛΑΚΑΚΗ του Κωνσταντίνου

Εκπαίδευση

10/2022 – σήμερα (10/2023)	ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
09/2017 – 04/2022	ΠΠΣ Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
09/2010 – 06/2016	Γερμανική Σχολή Θεσσαλονίκης (Γ.Σ.Θ.)

Εμπειρία

11/2022 – σήμερα	Advisor της iGEM Thessaly 2023
01/2022 – 11/2022	Head of Wet Lab της iGEM Thessaly 2022
06/2021 – 08/2021	Βοηθός Εργαστηρίου στα “Raptis Lab” και “Gene Lab” (στα πλαίσια της πρακτικής μου άσκησης για το ΠΠΣ)
07/2015	Πρακτική άσκηση στην κλινική “MediClin Heart Center Lahr στο Baden της Γερμανίας

Γλώσσες

Ελληνικά:	Μητρική Γλώσσα
Αγγλικά:	Επίπεδο C2
Γερμανικά:	Επίπεδο C1-C2

Στοιχεία Επικοινωνίας

elakaki@uth.gr

elakaki98@gmail.com

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων
(Υπηρεσία Βιβλιοθήκης & Πληροφόρησης
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)