

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Κλωνοποίηση του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης από ευκαρυωτικά κύτταρα
και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α »

«Cloning of the hemojuvelin promoter from eukaryotic cells and evaluation of
HIF-2α transcriptional activity »

Κωνσταντίνα Παπαευαγγέλου του Γεωργίου

ΛΑΡΙΣΑ 2025

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής: Λιάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Email: Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων (Υπηρεσία Βιβλιοθήκης &
Τηλέφωνο: Πληροφόρησης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Συνεπιβλέπων καθηγητής : Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος επιτροπής: Μυλωνής Ηλίας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Email: Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων (Υπηρεσία Βιβλιοθήκης & Πληροφόρησης
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)
Τηλέφωνο:

Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	
1.1 Αιμοτζουβελίνη	9
1.2 Υποξία	12
1.3 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	13
1.4 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α.....	13
1.4.1 Δομή HIF-2α	14
1.4.2 Λειτουργία HIF-2α	14
1.5 Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-2α	15
1.6 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-2α	16
1.6.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής	16
1.6.2 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης	17
1.6.3.1 Ρύθμιση μετα-μεταφραστικά μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες ...	17
1.6.3.2 Ρύθμιση μετα-μεταφραστικά μέσω ενζυμικών τροποποιήσεων	18
1.7 Ο ρόλος του HIF-2α στην ομοιοστασία του σιδήρου	19
2. Σκοπός	22
3. Υλικά	
3.1 Εκκινητές	23
3.2 Βακτηριακά στελέχη	23
3.3 Βακτηριακοί φορείς	23
3.4 Ένζυμα	24
3.5 Αντιβιοτικά	25
3.6 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων	26
3.7 Μέσα για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων	27
3.8 Διαλύματα	25
3.8.1 Διαλύματα για PCR	25
3.8.2 Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	25
3.8.3 Διαλύματα για ανάκτηση DNA από πηκτή αгарόζης	26
3.8.4 Διαλύματα για καθαρισμό DNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη	26
3.8.5 Διαλύματα για παρασκευή δεκτικών βακτηρίων TOP10	26
3.8.6 Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδιακού DNA	26

3.8.7 Διαλύματα για Western Blot	27
3.8.8 Διαλύματα για δοκιμασία λουσιφεράσης	27
3.9 Αντιδραστήρια	27
3.10 Κυτταρικές σειρές	27
3.11 Αντισώματα	27
4. Μέθοδοι	
4.1 Ενίσχυση τμήματος του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE με PCR	28
4.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης	29
4.3 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με gel extraction	30
4.4 Παρασκευή δεκτικών βακτηρίων E. Coli TOP10	30
4.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10 με τον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic	31
4.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation)	32
4.7 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα PGL3 basic και του ενθέματος HJV promoter με ένζυμα περιορισμού	32
4.8 Κατακρήμνιση με αιθανόλη του HJV promoter	33
4.9 Αντίδραση λιγάσης	34
4.10 Μετασχηματισμός βακτηρίων με το προϊόν κλωνοποίησης	35
4.11 Απομόνωση DNA από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και δοκιμαστικές πέψεις	36
4.12 Μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10 με το DNA που απομονώθηκε από τις 2 θετικές αποικίες	36
4.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation) με στήλη	36
4.14 Τελική επιβεβαιωτική πέψη του DNA που απομονώθηκε με στήλη	37
4.15 Απόψυξη και ανακαλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7	38
4.16 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με PEI	39
4.17 Δοκιμασία λουσιφεράσης	40
4.18 Western Blot	40
5. Αποτελέσματα	
5.1 Βιοπληροφορική αναζήτηση για το HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης	42
5.2 Ενίσχυση τμήματος του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE με PCR	43
5.3 Εύρεση κλώνων με το σωστό προϊόν κλωνοποίησης	44
5.4 Τελική επιβεβαιωτική πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε με στήλη	47

5.5 Έλεγχος της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου υποκινητή με αλληλούχιση	48
5.6 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με PEI και δοκιμασία λουσιφεράσης	48
5.7 Western Blot	49
6. Συζήτηση	50
7. Βιβλιογραφία	53

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Παναγιώτη Λιάκο, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του και για την συνεχή καθοδήγησή του.

Ευχαριστώ επίσης την τριμελή επιτροπή, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή και τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Δημήτριο Λεωνίδα για την βοήθεια και τη συμβολή τους στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο και για τις πολύτιμες συμβουλές.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου Ευάγγελο Στυμωνιάρη για την προθυμία του να με βοηθήσει καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για την άψογη συνεργασία του.

Θα ήταν παράβλεψη να μην ευχαριστήσω την Μεταδιδάκτορα Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου για την πολύπλευρη βοήθεια και την συμβολή της κατά την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός φιλικού κλίματος στο εργαστήριο.

Περίληψη

Η αιμοτζουβελίνη (HJV), κωδικοποιούμενη από το χρωμόσωμα HFE2, αποτελεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ, στους σκελετικούς μυς και στην καρδιά, και ανήκει στην οικογένεια των μορίων απωθητικής καθοδήγησης (RGM family). Λειτουργεί ως BMP συνυποδοχέας, ενισχύοντας την οδό σηματοδότησης BMP και οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της εψιδίνης, μίας ηπατικής προέλευσης πεπτιδική ορμόνη, η οποία αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστικό παράγοντα της συστημικής ομοιοστασίας του σιδήρου.

Στην ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου, εκτός από την εψιδίνη, εμπλέκονται επιπλέον κρίσιμα μόρια, τα οποία ρυθμίζονται από τον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α. Επίσης γνωστός ως EPAS1, ο HIF-2 αποτελεί έναν διμερή μεταγραφικό ενεργοποιητή, που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την προσαρμογή του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ εψιδίνης και HIF-2α έχει ήδη τεκμηριωθεί, ενώ φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον συντονισμό μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την ομοιοστασία του σιδήρου. Μία υπόθεση είναι ότι συνδετικό κρίκο ανάμεσα στον HIF-2α και στην εψιδίνη αποτελεί η αιμοτζουβελίνη.

Προηγούμενα πειράματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας, τα οποία περιλάμβαναν μεταγραφομική ανάλυση RNAseq δεδομένων από κύτταρα Huh7, ανέδειξαν την αιμοτζουβελίνη ως πιθανό γονίδιο-στόχο του HIF-2α. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, εντοπίστηκε η παρουσία μίας HRE αλληλουχίας στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης και έγινε προσπάθεια διερεύνησης της λειτουργικότητάς της, λόγω της απουσίας διαθέσιμων δεδομένων στη βιβλιογραφία. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση τμήματος της περιοχής του υποκινητή της ανθρώπινης αιμοτζουβελίνης στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic, ο οποίος φέρει ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση. Αφού ελέγχθηκε η ορθή κλωνοποίηση, ακολούθησε παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με το προϊόν κλωνοποίησης, χρησιμοποιώντας το κατιονικό πολυμερές PEI, και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία λουσιφεράσης, έπειτα από καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν διπλασιασμό της δραστηριότητας της λουσιφεράσης σε συνθήκες υποξίας, η οποία αντικατοπτρίζει την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ύπαρξης λειτουργικού HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης, στο οποίο προσδένεται ο HIF-2α και επάγει την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου.

Μελλοντικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αποσιώπηση του HIF-2α μέσω siRNA και επανάληψη του πειράματος σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας, καθώς και υπερέκφραση του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας ώστε να εξεταστεί εκ νέου η δραστηριότητα της λουσιφεράσης και, κατ' επέκταση, η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή. Τα πειράματα αυτά είναι απαραίτητα ώστε να αποδειχθεί η ειδική επαγωγή του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης από τον HIF-2α και να αποκλειστεί πιθανή εμπλοκή του HIF-1α στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου.

Abstract

Hemojuvelin (HJV), encoded by the HFE2 gene, is a membrane protein highly expressed in the liver, skeletal muscle and heart. It is a member of the repulsive guidance molecule family (RGM family) and functions as a BMP co-receptor, thus enhancing the BMP signaling pathway and leading to the activation of hepcidin transcription, a peptide hormone synthesized by the hepatocytes and a key regulator of systemic iron homeostasis.

Besides hepcidin, the regulation of iron homeostasis includes other crucial molecules, which are regulated by the hypoxia-inducible factor HIF-2 α . Also known as EPAS-1, HIF-2 is a dimeric transcriptional activator that regulates the expression of the genes required for the organism's adaptation to hypoxic conditions.

The interaction between hepcidin and HIF-2 α has already been documented and appears to play an important role in the coordination of the molecular mechanisms involved in iron homeostasis. One hypothesis is that the potential link between HIF-2 α and hepcidin is hemojuvelin.

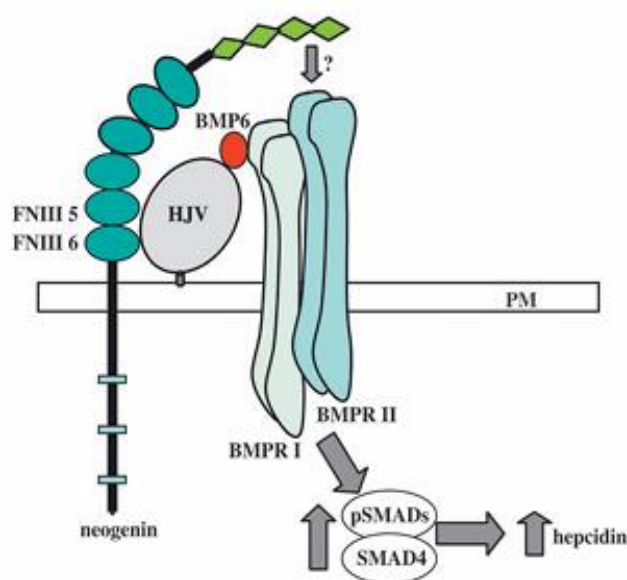
Previous experiments of the Biochemistry Laboratory, which included transcriptomic analysis of RNA-seq data from Huh7 cells, identified hemojuvelin as a likely HIF-2 α target gene. In the present thesis, the presence of an HRE sequence was detected in the hemojuvelin promoter and an effort was made to investigate its functionality, due to lack of available data in the literature. To this end, a fragment of the human hemojuvelin promoter was cloned into the PGL3-basic plasmid vector, which carries luciferase as a reporter gene. After confirming the correct cloning, transient transfection of Huh7 eukaryotic cells was performed, using the cationic polymer PEI, followed by a luciferase assay after cell culture in normoxic and hypoxic condition. Our results showed a two-fold increase of luciferase activity under hypoxia, which reflects the transcriptional activity of the hemojuvelin promoter. This finding is in terms with the hypothesis of a functional HRE in the hemojuvelin promoter, to which HIF-2 α binds and induces gene transcription.

Future experiments should include HIF-2 α silencing by siRNA and repetition of the assay under normoxic and hypoxic conditions, as well as HIF-2 α overexpression under normoxia, in order to reassess the luciferase activity and, consequently, the transcriptional activity of the hemojuvelin promoter. These experiments are necessary to prove the specific induction of the hemojuvelin promoter by HIF-2 α and exclude a possible involvement of HIF-1 α in the regulation of gene expression.

1. Εισαγωγή

1.1 Αιμοτζουβελίνη

Η αιμοτζουβελίνη αποτελεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη μοριακής μάζας 50kDa που κωδικοποιείται από το γονίδιο HFE2, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q21, και αποτελεί μέλος της οικογένειας των μορίων απωθητικής καθοδήγησης (repulsive guidance molecule family ή RGM family). Η σύνδεση με τη μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω μίας άγκυρας πρωτεΐνης γλυκοφωσφατίδυλνοισιτόλης (GPI anchor) και, δομικά, η αιμοτζουβελίνη διαθέτει πολλαπλές πρωτεϊνικές επικράτειες. Αυτές περιλαμβάνουν ένα αμινοτελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο, ένα μοτίβο RGD (arginylglycylaspartic acid motif), ένα μερικό μοτίβο του παράγοντα von Willebrand D και μία καρβοξυτελική αλληλουχία συνδεδεμένη με GPI. Το μοτίβο RGD αποτελεί πιθανό σημείο σύνδεσης της ιντεγκρίνης, ενώ ο παράγοντας von Willebrand είναι μία γλυκοπρωτεΐνη η οποία βοηθά στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία, αλληλεπιδρώντας με τον παράγοντα πήξης VIII. Η έκφραση του γονιδίου HFE2, όπως διαπιστώνεται με ανίχνευση των επιπέδων mRNA της αιμοτζουβελίνης, είναι υψηλή στο ήπαρ, στους σκελετικούς μυς και στην καρδιά [1].

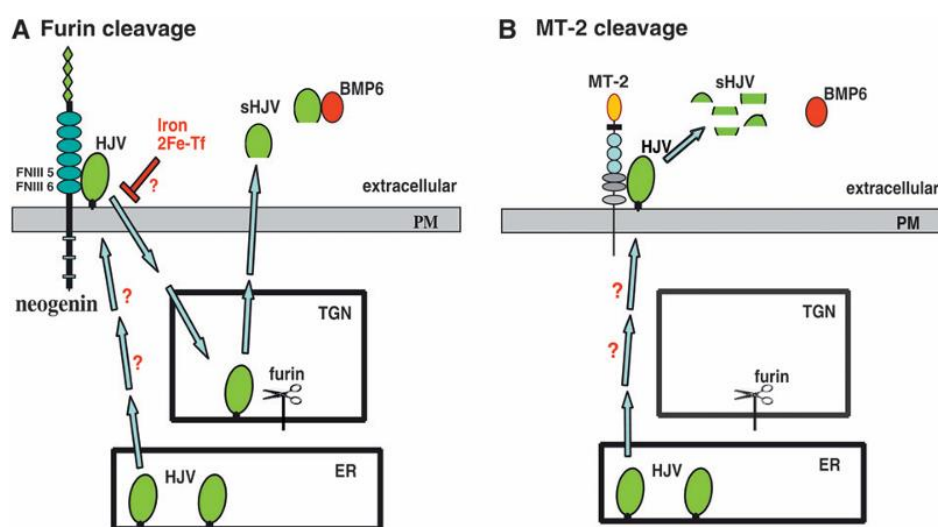


Εικόνα 1. Η πλήρης ενεργοποίηση της έκφρασης της επιδίνης απαιτεί τη συνεργασία των πρωτεϊνών HJV, BMP6 και νεογενίνη.

Στην πλασματική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων, η HJV σχηματίζει σύμπλοκο με τη νεογενίνη, την BMP6 και τους υποδοχείς BMPRI και BMPRII, ενεργοποιώντας την οδό σηματοδότησης BMP για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης της επιδίνης. Η σηματοδότηση BMP περιλαμβάνει τη φωσφορύλωση των πρωτεϊνών Smad1, Smad5 και Smad8 (pSMADs) από τα τετραμερή BMPR, τον σχηματισμό ενός συμπλέγματος pSMAD/SMAD4 και τη μεταφορά του στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου *Hamp*, που κωδικοποιεί την επιδίνη. Σε αυτό το μοριακό σύμπλοκο, ο ρόλος της νεογενίνης είναι υποστηρικτικός, διευκολύνοντας τη σωστή συναρμολόγηση των τετραμερών BMPR όταν είναι παρούσα η HJV. Η HJV λειτουργεί ως BMP συνυποδοχέας, ενισχύοντας τη σηματοδότηση BMP [1].

Πέρα από τη μεμβρανική μορφή της αιμοτζουβελίνης, υπάρχει και η ενδογενής διαλυτή μορφή (sHJV) μοριακής μάζας 40kDa, η οποία είναι ανιχνεύσιμη στον ορό ανθρώπων και τρωκτικών. Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί για της παραγωγή της διαλυτής μορφής είναι η πρωτεολυτική της διάσπαση από την προ-πρωτεϊνική κονβερτάση φουρίνη και την διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης τύπου II (transmembrane protease serine 6 type 2 ή TMPRSS6), επίσης γνωστή και ως ματριπτάση-2 [2]. Έρευνες έχουν προσδιορίσει ότι το

σημείο που πρωτεολύει η κονβερτάση φουρίνη πρόκειται για μία υψηλά συντηρημένη πολυβασική αλληλουχία RNRR στις θέσεις 332-335 της αιμοτζουβελίνης. Η ακριβής υποκυτταρική τοποθεσία που λαμβάνει χώρα η πρωτεολυτική διάσπαση δεν έχει εξακριβωθεί, ωστόσο πιθανολογείται πως συμβαίνει είτε κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι στο ενδοπλασματικό δίκτυο είτε στο τρανς σύμπλεγμα Golgi έπειτα από ενδοκύττωση της μεμβρανικής μορφής της αιμοτζουβελίνης, καθώς εκεί εντοπίζεται κυρίως η φουρίνη. Ένας άλλος μηχανισμός, ο οποίος αναπαρίσταται στο παρακάτω σχήμα, είναι η μεταφορά της νεοσυντιθέμενης αιμοτζουβελίνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με την νεογενίνη, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 1, γεγονός που πυροδοτεί την μεταφορά της στο τρανς σύμπλεγμα Golgi για να κοπεί από την φουρίνη και να απελευθερωθεί άμεσα από το κύτταρο. Εκτός από τη φουρίνη και τη ματριπτάση-2, η αιμοτζουβελίνη υφίσταται επίσης αυτοπρωτεόλυση σε μία αλληλουχία Gly-Asp-Pro-His υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες [1].



Εικόνα 2. Μοντέλα διάσπασης της HJV μέσω δραστηριότητας τύπου φουρίνης και από τη ματριπτάση-2:

(Α) Διάσπαση HJV μέσω φουρίνης:

Η νεοσυντιθέμενη στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) HJV, μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη (PM) χωρίς να υφίσταται επεξεργασία στο σύμπλεγμα Golgi. Μόλις φτάσει στην πλασματική μεμβράνη αλληλεπιδρά με τη νεογενίνη, γεγονός που προκαλεί την ανάστροφη μεταφορά της HJV στο σύμπλεγμα Golgi (TGN) την διάσπασή της από τη φουρίνη και την απελευθέρωση στην κυκλοφορία ως sHJV. Η διαδικασία αυτή αναστέλλεται τόσο από τον μη συνδεδεμένο με τρανσφερρίνη σίδηρο (Iron), όσο και από τρανσφερρίνη κορεσμένη με δύο άτομα σιδήρου (2Fe-Tf). Η sHJV μπορεί να δεσμεύει τη BMP6 και άλλους προσδέτες BMP. Το μονοπάτι αυτό θεωρείται ότι υπάρχει κυρίως στους σκελετικούς μυς.

(Β) Διάσπαση HJV από την ματριπτάση-2 (MT-2):

Η HJV ακολουθεί το ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι όπως και στην περίπτωση (Α). Ωστόσο, όταν φτάσει στην πλασματική μεμβράνη, συνδέεται με την MT-2, η οποία τη διασπά σε τμήματα και την απελευθερώνει στην κυκλοφορία. Σε αυτήν την περίπτωση τα διασπασμένα τμήματα της HJV δεν δεσμεύουν τη BMP6, και το τελικό αποτέλεσμα της δράσης της MT-2 είναι η μείωση της HJV στη μεμβράνη. Το μονοπάτι αυτό παρατηρείται αποκλειστικά στο ήπαρ [1].

Πιο αναλυτικά για τη φουρίνη, έχει δειχθεί ότι επάγεται από τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα 1 (hypoxia-inducible factor 1 ή HIF-1), ο οποίος σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και έλλειψης σιδήρου. Στον υποκινητή της φουρίνης εντοπίζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia-responsive elements), τα οποία αποτελούν σημείο πρόσδεσης για το μεταγραφικό σύμπλοκο του HIF-1, ενώ και τα επίπεδα mRNA της φουρίνης είναι

αξιοσημείωτα αυξημένα σε συνθήκες υποξίας. Όσον αφορά τη ρύθμιση από τα επίπεδα σιδήρου, χηλική δέσμευση του σιδήρου οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1, καθώς το ένζυμο πρόπυλ-υδροξυλάση που στοχεύει την υπομονάδα του HIF-1 για ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα είναι σίδηρο-εξαρτώμενο [3].

Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας RGM, η αιμοτζουβελίνη λειτουργεί ως BMP (bone morphogenetic protein) συνυποδοχέας [2]. Πιο συγκεκριμένα, οι BMPs αποτελούν μία υποοικογένεια κυτταροκινών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF- β (transforming growth factor- β). Η σηματοδότηση BMP είναι αναγκαία για την ανάπτυξη και ως εναρκτήριο γεγονός της σηματοδότησης αποτελεί η σύνδεση των BMP προσδετών στους BMP υποδοχείς BMPR, σχηματίζοντας σύμπλοκο στην κυτταρική επιφάνεια. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί την φωσφορυλίωση των Smad1, Smad5 και Smad8 πρωτεϊνών (Suppression of Mothers against Decapentaplegic) στο κυτταρόπλασμα από τον υποδοχέα. Οι φωσφορυλιωμένες Smad σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκο με την Smad4 και κατόπιν μετατοπίζονται στον πυρήνα προκειμένου να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων [1]. Όλα τα μέλη της οικογένειας RGM μοιράζονται την ικανότητα σύνδεσης με την υποοικογένεια των BMP2/BMP4 και ενισχύουν τη σηματοδότηση των τελευταίων. Διαθέτουν επίσης την ικανότητα να αξιοποιούν τους υποδοχείς τύπου I των BMPs (ALK2, ALK3, ALK6) και να επιτρέπουν τη σηματοδότηση, κατά προτίμηση, μέσω του υποδοχέα τύπου II, ACT1A. Η αιμοτζουβελίνη ωστόσο διαφέρει από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας λόγω της ικανότητας σύνδεσης, κατά προτίμηση, με την υπεροικογένεια BMP5/BMP6/BMP7 σε σύγκριση με τις RGMA και RGMB [2].

Ενώ η μεμβρανική HJV δρα ως συνυποδοχέας ενισχύοντας τη σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου των BMP, η διαλυτή μορφή sHJV φαίνεται να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ίδιας οδού. Ο μηχανισμός δράσης της sHJV πιθανώς συνίσταται στη δέσμευση των προσδετών BMP, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II στην επιφάνεια των κυττάρων και αναστέλλοντας συνεπώς τη μεταβίβαση του σήματος. Πράγματι, η ικανότητα της sHJV να αναστέλλει τη βιολογική δράση των προσδετών BMP συσχετίζεται γενικά με τη συγγένεια σύνδεσης της sHJV στους διάφορους προσδέτες [2].

Όσον αφορά το βιολογικό ρόλο της αιμοτζουβελίνης, αυτή ρυθμίζει της έκφραση της εψιδίνης, ενεργοποιώντας την μεταγραφή της διαμέσου της οδού σηματοδότησης BMP-HJV-SMAD, μέσω των ειδικών στοιχείων απόκρισης στις BMP (BMP responsive elements) που εντοπίζονται στον υποκινητή του γονιδίου της εψιδίνης *Hamp* [2]. Η εψιδίνη πρόκειται για μία ηπατικής προέλευσης πεπτιδική ορμόνη μήκους 25 αμινοξέων, και μοριακού βάρους 2.8 kDa, η οποία στο πλάσμα του αίματος βρίσκεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις μεταξύ 2-20 nM [5]. Αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστικό παράγοντα της συστημικής ομοιοστασίας του σιδήρου, επάγοντας την ουβικιτινίωση και κατ' επέκταση την αποικοδόμηση της μοναδικής γνωστής πρωτεΐνης εξαγωγής σιδήρου από το κύτταρο, της φερροπορτίνης. Μέσω της εν λόγω διαδικασίας μειώνεται η απορρόφηση του διαιτητικού σιδήρου και η απελευθέρωσή του από τα ηπατοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η σύνθεση της εψιδίνης λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και επηρεάζεται τόσο από τα επίπεδα σιδήρου στην κυκλοφορία όσο και από τα αποθέματά του, καθώς και από φλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), ενώ σε μεταγραφικό επίπεδο, η έκφραση της εψιδίνης ελέγχεται από την οδό σηματοδότησης BMP-SMAD, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Πειραματικά δεδομένα από επίμυες έχουν δείξει πως υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ηπατικού mRNA της αιμοτζουβελίνης και των επιπέδων

ηπατικού mRNA της επιδίνης στο ήπαρ, υποδεικνύοντας πως η αιμοτζουβελίνη πράγματι επάγει την έκφραση της επιδίνης μέσω ενίσχυσης της οδού σηματοδότησης BMP [4].

Συνοψίζοντας, η μεμβρανική μορφή της αιμοτζουβελίνης δρα ως BMP συνυποδοχέας, συντελώντας στην ενεργοποίηση της επιδίνης σε συνθήκες αύξησης των επιπέδων διφερρικού σιδήρου. Αντιθέτως, η υποξία άμεσα και η έλλειψη σιδήρου έμμεσα (μέσω σταθεροποίησης του HIF-1) ενεργοποιούν τη φουρίνη προς απελευθέρωση διαλυτής αιμοτζουβελίνης (sHJV), προκειμένου να παρέμβει στην BMP σηματοδότηση και να αναστείλει την ενεργοποίηση της επιδίνης [3].

Μεταλλάξεις, είτε ομόζυγες είτε ετερόζυγες, στο γονίδιο HFE2 αλλά και μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από τις πρωτεϊνικές επικράτειες της αιμοτζουβελίνης διαταράσσουν την φυσιολογική της λειτουργία και δύναται να οδηγήσουν στην εμφάνιση νεανικής αιμοχρωμάτωσης (juvenile hemochromatosis), μία διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπερβολική συσσώρευση σιδήρου στον οργανισμό. Πρόκειται για μία σπάνια, αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο με υψηλή διεισδυτικότητα που επηρεάζει νεαρά άτομα ανεξαρτήτου φύλου και η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές εντός της πρώτης και δεύτερης δεκαετίας της ζωής [1]. Παρά τον κριτικό ρόλο του σιδήρου σε θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική αναπνοή και η μεταφορά οξυγόνου, η περίσσεια του σιδήρου συντελεί στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, ενώσεις τοξικές για τον οργανισμό. Εάν δεν αντιμετωπιστεί η νόσος, η συσσώρευση σιδήρου θα οδηγήσει σε δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων πριν την ηλικία των 30 [2].

Τα έως τώρα πειράματα ανιχνεύουν την αιμοτζουβελίνη με δύο τρόπους, αφενός με Northern blot, προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου [1], και αφετέρου με Western blot, το οποίο ανιχνεύει την πρωτεΐνη της αιμοτζουβελίνης. Η ανάλυση Western blot βασίζεται στην ανίχνευση της HJV ισομορφής αλλά και της διαλυτής μορφής της αιμοτζουβελίνης sHJV με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-RGM [6].

1.2 Υποξία

Η διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου αποτελεί μία από τις πλέον σύνθετες και κρίσιμες προκλήσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς απαιτεί τη σταθερή και ακριβή παροχή οξυγόνου στα περίπου 50 τρισεκατομμύρια κύτταρα του σώματος, προκειμένου να υποστηριχθούν οι μεταβολικές ανάγκες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η παραγωγή ATP καθώς και πλήθος άλλων βιοχημικών αντιδράσεων που απαιτούν την παρουσία οξυγόνου. Η πολυπλοκότητα αυτής της πρόκλησης εντείνεται περεταίρω από το γεγονός ότι το μικροπεριβάλλον κάθε ιστού παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη συγκέντρωση οξυγόνου. Ενδεικτικά, τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών εκτίθενται σε συγκεντρώσεις οξυγόνου της τάξης του 21%, ενώ στον θύμο αδένά του ποντικού η συγκέντρωση οξυγόνου φθάνει μόλις το 1% [10].

Η έλλειψη οξυγόνου (υποξία) αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό στρεσογόνο παράγοντα για τα κύτταρα. Παραδόξως, η υποξία έχει συσχετιστεί με αυξημένη συσσώρευση ελευθέρων ριζών, φαινόμενο που εντείνει το κυτταρικό στρες μέσω της πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών σε βασικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA. Προκειμένου να ανταποκριθούν σε τέτοιες συνθήκες, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μία σειρά προσαρμοστικών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία, ώστε να αντιστοιχίσουν την παροχή οξυγόνου με τις μεταβολικές,

βιοενεργητικές και οξειδοαναγωγικές τους ανάγκες. Τέτοιες αποκρίσεις περιλαμβάνουν την παύση του κυτταρικού κύκλου, τη μείωση της κατανάλωσης ενέργειας καθώς και την έκκριση παραγόντων αγγειογένεσης και επιβίωσης. Ο συντονισμός των παραπάνω διεργασιών επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων κυτταρικών μονοπατιών όπως η απόκριση μη διπλωμένων πρωτεϊνών (unfolded protein response ή UPR), το μονοπάτι mTOR καθώς και η γονιδιακή ρύθμιση μέσω των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων (hypoxia-inducible factors ή HIFs) [11].

1.3 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Σε μοριακό επίπεδο λοιπόν, η διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου ρυθμίζεται κυρίως από τους επαγόμενους από υποξία παράγοντες HIFs, οι οποίοι λειτουργούν ως βασικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου. Οι HIFs αναδιαμορφώνουν το μεταγράφομα κάθε κυττάρου, αυξάνοντας ή μειώνοντας την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων [10], όπως αυτά που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στον μεταβολισμό, στην ερυθροποίηση, στην κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση, την μετανάστευση καθώς και άλλες ιστοειδικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου της φλεγμονής και την ίνωσης [7].

Οι HIFs είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες, αποτελούμενες από μία ευαίσθητη στο οξυγόνο α-υπομονάδα (HIF α) και μία σταθερή β-υπομονάδα (HIF-1 β) [11], επίσης γνωστή ως ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), η οποία εκφράζεται ιδιосύστατα και σταθερά ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνου [10]. Τα θηλαστικά διαθέτουν τρεις ισομορφές του HIF α , εκ των οποίων οι HIF-1 α και HIF-2 α είναι δομικά παρόμοιες και αποτελούν τις πλέον μελετημένες μορφές. Ο HIF-3 α , γνωστός και ως IPAS (inhibitory PAS domain protein), απαντά σε ποικίλες μορφές εναλλακτικού ματίσματος (splice variants), εκ των οποίων ορισμένες ασκούν ανασταλτική δράση στη λειτουργία των HIF-1 α και HIF-2 α μέσω ενός επικρατούς-αρνητικού μηχανισμού (dominant-negative inhibition). Ο HIF-1 α εκφράζεται καθολικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ οι HIF-2 α και HIF-3 α εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση, περιοριζόμενοι σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, τα διάμεσα νεφρικά κύτταρα, τα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα και τα κύτταρα της μυελοειδούς γενεαλογίας.

Οι υπομονάδες του HIF α ετεροδιμερίζονται με την σταθερή HIF-1 β υπομονάδα μέσω των δομικών επικρατειών HLH (helix-loop-helix) και PAS (Per-ARNT-Sim). Τα σχηματιζόμενα ετεροδιμερή HIF αναγνωρίζουν και προσδένονται σε ειδικά στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements ή HREs) του γονιδιώματος, τα οποία είναι παρόμοια με τα μοτίβα enhancer box (E box) και διαθέτουν την συναινετική (consensus) αλληλουχία 5' G/ACGTG 3' [11].

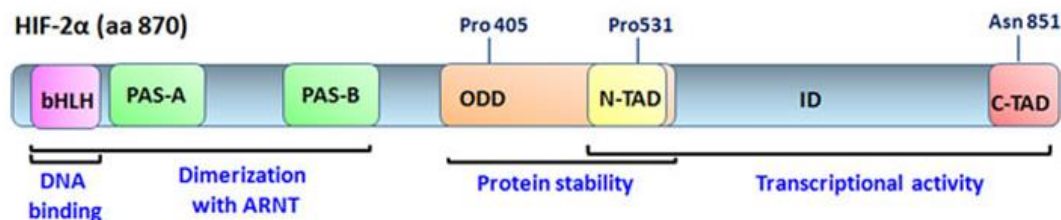
1.4 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2

Ειδικότερα ο HIF-2, επίσης γνωστός ως endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) και δεύτερο μέλος της οικογένειας HIF, πρόκειται για μία διμερή πρωτεΐνη που δρα ως

μεταγραφικός ενεργοποιητής, απαραίτητος για την προσαρμογή του οργανισμού σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας O₂, καθώς και στην εμβρυογένεση και στην εξέλιξη του όγκου [7].

1.4.1 Δομή HIF-2α

Δομικά, ο HIF-2 αποτελείται από δύο διαφορετικές υπομονάδες, μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων basic helix-loop-helix (bHLH) Per-ARNT-Sim (PAS). Στο αμινοτελικό άκρο διαθέτει μοτίβα PAS και bHLH, τα οποία απαιτούνται για τον ετεροδιμερισμό μεταξύ του HIF-2α και του ARNT, ενώ επιπρόσθετα η bHLH επικράτεια του διμερούς HIF-2α/ARNT είναι απαραίτητη για την δέσμευση σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) σε μία αλληλουχία 5' G/ACGTG 3' στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων. Ο HIF-2α διαθέτει επίσης επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής (transcriptional activation domain ή TADs), μία προς το αμινοτελικό (N-TAD) και μία προς το καρβοξυτελικό άκρο (C-TAD), οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές, όπως το σύμπλοκο CBP (CREB-binding protein)/p300. Έτσι, ενώ η N-TAD προσδίδει εξειδίκευση ως προς τα γονίδια-στόχους, η C-TAD του HIF-2α προωθεί την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Μεταξύ των δύο αυτών επικρατειών βρίσκεται η ανασταλτική επικράτεια, η λειτουργία της οποίας χρήζει περεταίρω διερεύνησης, και μία επικράτεια οξυγόνο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (oxygen-dependent degradation domain ή ODDD), υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας. Τέλος, ο HIF-2α διαθέτει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal ή NLS), το N- NLS και το C- NLS [7].



Εικόνα 3. Οι δομικές επικράτειες της πρωτεΐνης HIF-2α.

Οι επικράτειες bHLH και PAS εμπλέκονται στη δέσμευση του DNA και στο σχηματισμό ετεροδιμερούς. Η επικράτεια ODD είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από το οξυγόνο υδροξυλίωση και αποικοδόμηση του HIF-2α και περιέχει δύο κατάλοιπα προλίνης ευαίσθητα στην υδροξυλίωση. Οι επικράτειες N-TAD και C-TAD είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής [7].

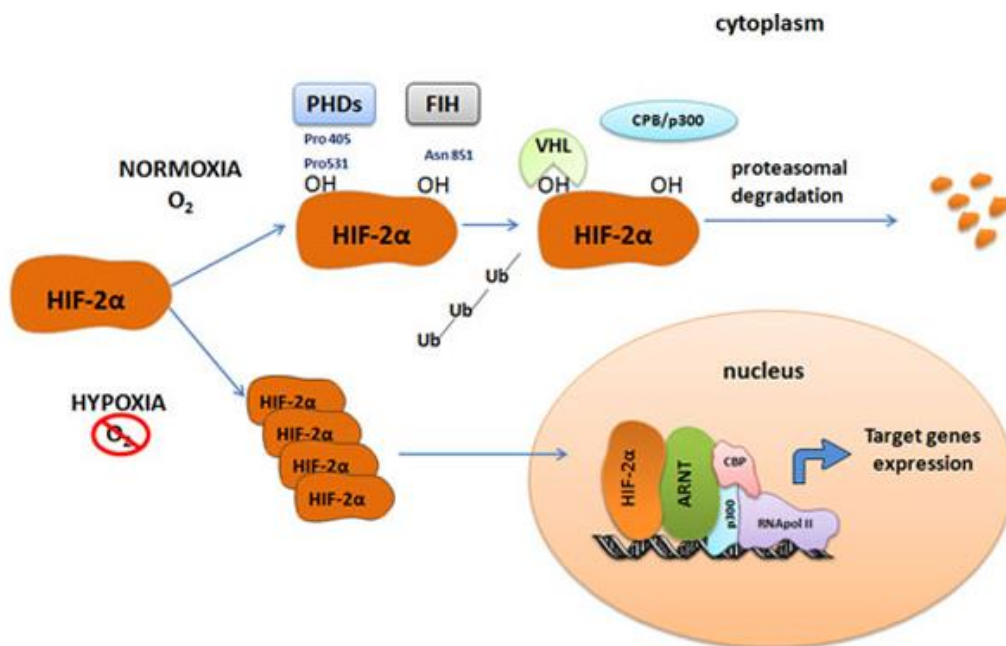
1.4.2 Λειτουργία HIF-2α

Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-2α εντοπίζεται στον πυρήνα υπό τη μορφή κοκκίων που βρίσκονται κοντά στην ενεργό RNA πολυμεράση, γεγονός που του επιτρέπει αποτελεσματικότερη πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Αντιθέτως, ο HIF-1α εμφανίζει ομοιογενή κατανομή εντός του πυρήνα. Η έκφραση του HIF-2α είναι ιστοειδική και περιορίζεται κυρίως στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, πνεύμονες, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο έντερο, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως η ερυθροποίηση, η κυτταρική αυτοανανέωση, ο πολλαπλασιασμός, η

απόπτωση, η κυτταρική εισβολή, η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση, η αγγειογένεση καθώς και η ομοιοστασία του σιδήρου.

1.5 Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-2α

Η ρύθμιση του HIF-2α συντελείται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών που περιλαμβάνουν τόσο οξυγονοεξαρτώμενες όσο και ανεξάρτητες του οξυγόνου διεργασίες [7]. Υπό συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-2α εκφράζεται ιδι�σύστατα και υφίσταται υδροξυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης (Pro405 και Pro531) μέσω ενζύμων της οικογένειας των πρόπυλ-υδροξυλασών (propyl hydroxylase enzyme ή PHDs). Η τροποποίηση αυτή επιτρέπει τη δέσμευσή του με την πρωτεΐνη ογκοκαταστολέα von Hippel-Lindau (VHL), ο οποίος στρατολογεί το σύμπλοκο της E3 ουβικιτίνης-λιγάσης οδηγώντας στην πολυουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-2α στο πρωτεάσωμα. Ο μέσος χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης υπό αυτές τις συνθήκες είναι κατά προσέγγιση 5 λεπτά [7]. Ο δεύτερος κύριος μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α περιλαμβάνει την υδροξυλίωσή του στο κατάλοιπο ασπαραγίνης 847 εντός της C-TAD επικράτειας μέσω του factor-inhibiting HIF (FIH), γεγονός που εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με το σύμπλοκο CBP/p300 και κατ' επέκταση την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Αμφότερες οι υδροξυλάσες (PHDs και FIHs) ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών, οι οποίες εξαρτώνται απαραίτητως από την παρουσία μοριακού οξυγόνου, δισθενούς σιδήρου και α-κετογλουταρικού για τη λειτουργία τους. Σε συνθήκες υποξίας ωστόσο η ενζυμική δραστηριότητα των υδροξυλασών είτε καταστέλλεται είτε αναστέλλεται πλήρως, με αποτέλεσμα την μη υδροξυλίωση του HIF και σταθεροποίησή του. Σε αυτήν την περίπτωση, ο HIF εισέρχεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), το σύμπλοκο HIF-2α/ARNT στη συνέχεια προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia responsive elements/HREs) και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στην προσαρμογή των κυττάρων σε χαμηλό οξυγόνο [7].



Εικόνα 4. Εξαρτώμενη από το O_2 ρύθμιση του HIF-2α

Παρουσία οξυγόνου (νορμοξία), ο HIF-2α υδροξυλιώνεται στις Pro405 και Pro531, οι οποίες βρίσκονται εντός της περιοχής ODDD από τις PHDs. Η υδροξυλίωση οδηγεί στη δέσμευση του συμπλόκου von Hippel-Lindau

(VHL)- E3 λυγάσης, το οποίο ουβικιτινιώνει τον HIF-2α, στοχεύοντάς τον για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης εμποδίζει τη δέσμευση των συνενεργοποιητών CBP/p300 στον HIF-2α.

Σε υποξικές συνθήκες, η υπομονάδα HIF-2α σταθεροποιείται λόγω απουσίας υδροξυλίωσης και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τον ARNT. Το σύμπλοκο HIF-2α/ARNT δεσμεύεται σε HREs και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων [7].

1.6 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-2α

Η ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-2α πραγματοποιείται σε διάφορα βιολογικά επίπεδα, περιλαμβάνοντας τη μεταγραφή, μετάφραση, πρωτεϊνική σταθερότητα και μετα-μεταφραστική τροποποίηση [7].

1.6.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Αν και οι γνώσεις για τη ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής είναι περιορισμένες, έχειδειχθεί πως συντελείται με ποικίλους τρόπους. Στα M2 πολωμένα μακροφάγα, για παράδειγμα, οι κυτοκίνες τύπου Th2 ιντερλευκίνη 4 και ιντερλευκίνη 13, ενεργοποιούν το γονίδιο EPAS1 που κωδικοποιεί τον HIF-2α. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν επίσης έλεγχο της μεταγραφής του HIF-2α μέσω επιγενετικής τροποποίησης, όπως βρέθηκε σε καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 3) δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου EPAS1 και απομεθυλιώνει τις νησίδες CpG γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, ενισχύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή του γονιδίου. Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ρύθμιση της μεταγραφής από το σύστημα PI3K(phosphoinositide 3 kinase)-mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) το οποίο επάγεται από IGF (insulin-like growth factor) αλλά και την αποουβικιτυλάση Cezanne. Αντίθετα, οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) τάξης I και II φαίνεται να καταστέλλουν τη μεταγραφή επιγενετικά [7].

1.6.2 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης

Σε επίπεδο μετάφρασης του mRNA του HIF-2α, το σηματοδοτικό μονοπάτι PTEN/PI3K/AKT ρυθμίζει την έκφραση και σταθερότητα του HIF-2α μεταγράφου μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το mTORC2, ενώ το ίδιο μονοπάτι σε συνθήκες υποξίας σταθεροποιεί τον HIF-2α στα μακροφάγα, οδηγώντας σε προαγωγή του όγκου, αγγειογένεση και μετάσταση. Ένας δεύτερος μηχανισμός μεταφραστικής ρύθμισης βασίζεται στην πρωτεΐνη IRE-BP1 (iron response element binding protein 1), όπου δέσμευσή της σε ένα IRE στην 5' αμετάφραστη περιοχή του HIF-2α προκαλεί αναστολή της μεταγραφής. Χημικές ενώσεις που μιμούνται την υποξία, όπως η διμεθυλοξαλογλυκίνη (dimethyloxaloglycine ή DMOG), η δεσφερριόξαμίνη (desferrioxamine ή DFO) και το μεταβατικό μέταλλο κοβάλτιο σταθεροποιούν τον HIF-2α και κατ' επέκταση την ενεργότητά του και χρησιμοποιούνται πειραματικά in vivo και in vitro για να επάγουν την έκφρασή του. Η βιολογική απόκριση που επιφέρουν ωστόσο τέτοιες ενώσεις, και ειδικά το κοβάλτιο, δεν ταυτίζεται με εκείνη της πραγματικής υποξίας καθώς αυξάνουν την έκφραση του HIF-2α, ωστόσο ενδέχεται να επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα. Προηγούμενες μελέτες με ηπατικής προέλευσης καρκινικά κύτταρα Huh7 έχουν δείξει πως το κοβάλτιο προκαλεί αύξηση της πρωτεΐνης HIF-2α, χωρίς όμως να ενεργοποιεί την έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης της ερυθροποιητίνης (EPO), όπως παρατηρείται σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, η παρουσία κοβαλτίου δεν φαίνεται να επηρεάζει καθολικά τη μεταγραφή

μέσω στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HREs), αλλά επιδρά πιο στοχευμένα αναστέλλοντας τη λειτουργία του HIF-2α. Η συγκεκριμένη αυτή επίδραση συνοδεύεται από μειωμένη αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ανοδικό διεγερτικό παράγοντα 2 (upstream stimulatory factor 2) USF2, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-2α στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα εξαρτάται από την παρουσία ενός παράγοντα ευαίσθητου στο κοβάλτιο, ανάγκη που δεν παρατηρείται στην περίπτωση του HIF-1α [7].

1.6.3.1 Ρύθμιση μετα-μεταφραστικά μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες

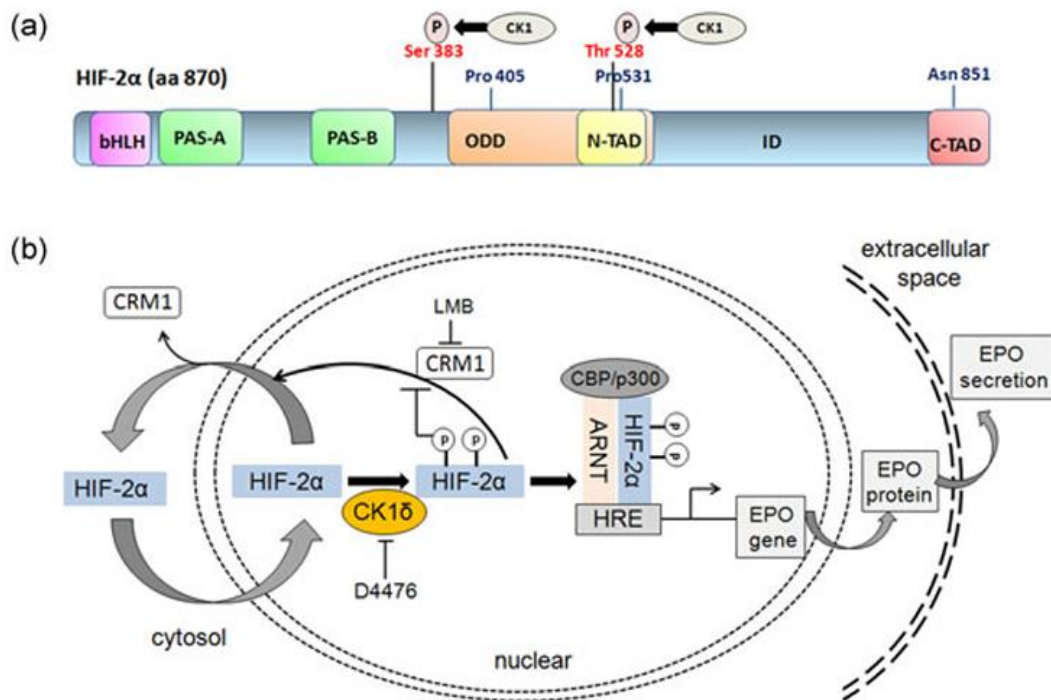
Η μεταμεταφραστική ρύθμιση του HIF-2α περιλαμβάνει τόσο πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις όσο και ενζυμικές τροποποιήσεις, γεγονός που επηρεάζει την έκφραση και τη μεταγραφική του ενεργότητα. Μεταξύ των πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με τον HIF-2α συγκαταλέγονται η EST-1 (telomere elongation protein), η ELK-1 (ETS like-1 protein) -μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS, οι οποίοι είναι ομόλογοι του ογκογονιδίου v-ets του ιού ερυθροβλάστωσης E26, ο απαραίτητος ρυθμιστικός παράγοντας του NF-κΒ και ο USF2 (upstream stimulatory factor 2). Οι εν λόγω πρωτεΐνες διαμορφώνουν ένα εξειδικευμένο μεταγραφικό υπερσύμπλοκο, γνωστό ως ενισχύσωμα (enhanceosome) του HIF-2α, που είναι απαραίτητο για την εκλεκτική ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων του HIF-2α. Επιπλέον είναι γνωστό πως ο HIF-2α αλληλεπιδρά με πρόσθετους ρυθμιστικούς παράγοντες όπως ο HIF associated factor (HAF), η Int6 (integrator complex subunit 6), η Poly (ADP-ribose) polymerase-1 και ο MYC (myelocytomatosis oncogene), οι οποίοι επηρεάζουν τη μεταγραφική του ενεργότητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο HAF, ο οποίος έχει δειχθεί ότι προωθεί την μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-2α μέσω δέσμευσης στην καρβοξυτελική του επικράτεια. Αντιθέτως, στην περίπτωση του HIF-1α, ο HAF προάγει την αποσταθεροποίησή του συνδεόμενος με την αμινοτελική του επικράτεια σε μία διαδικασία που εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος [7].

1.6.3.2 Ρύθμιση μετα-μεταφραστικά μέσω ενζυμικών τροποποιήσεων

Όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές ενζυμικές τροποποιήσεις, αυτές είναι πολυάριθμες και ανεξάρτητες του οξυγόνου, και περιλαμβάνουν την σουμοϋλίωση, την ακετυλίωση και τη φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, η σουμοϋλίωση λαμβάνει χώρα στο κατάλοιπο λυσίνης 394 (K394) του HIF-2α στη θέση LK394EE. Η σύζευξή του με την πρωτεΐνη SUMO2 (small ubiquitin-like modifier protein) έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αποδόμησή του υπό συνθήκες υποξίας μέσω της δράσης λιγασών ουβικιτίνης που στοχεύουν σε σουμοϋλιωμένα υποστρώματα (SUMO-targeted ubiquitin ligases). Παράλληλα, η λειτουργική δραστηριότητα του HIF-2α επηρεάζεται από τροποποιήσεις τύπου ακετυλίωσης. Ο HIF-2α μπορεί να ακετυλωθεί σε πολλαπλά κατάλοιπα λυσίνης από την ακετυλοτρανσφεράση CBP (CREB-binding protein) καθώς και να απακετυλωθεί από την απακετυλάση SIRT1 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1), η οποία ενισχύει τη σηματοδότηση του HIF-2α. Μέσω αυτών των τροποποιήσεων ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων-στόχων του HIF-2α, όπως η ερυθροποιητίνη (EPO).

Ακόμη έχει αναφερθεί πως ο HIF-2α υφίσταται μία σειρά φωσφορυλίσεων, οι οποίες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση της λειτουργικής του δραστηριότητας. Μεταξύ

των εμπλεκόμενων κινασών, η κινάση της καζεΐνης 2 έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνει τον HIF-2α στο κατάλοιπο θρεονίνης 844 (Thr844), γεγονός που συσχετίζεται με αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α, ενδεχομένως λόγω μείωσης της συγγένειάς του με τον ανασταλτικό παράγοντα FIH. Αντίστοιχα, η κινάση PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) προκαλεί φωσφορυλίωση του HIF-2α στο κατάλοιπο θρεονίνης 324 (Thr324), παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1 (specificity protein 1) και επάγει την έκφραση του γονιδίου Nijmegen breakage syndrome. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) και συγκεκριμένα η ισομορφή CK1δ. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει πως η CK1δ ρυθμίζει θετικά την δραστικότητα του HIF-2α, στοχεύοντας σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης (Ser383 and Thr528). Παρόλο που οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις δεν μεταβάλλουν τη σταθερότητα του HIF-2α ούτε την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή USF2, φαίνεται εντούτοις πως επηρεάζουν τη διαδικασία πυρηνικής εξαγωγής που διαμεσολαβείται μέσω του CRM1 (chromosomal maintenance 1). Η λειτουργική σημασία της CK1δ επιβεβαιώνεται από πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία αποσιώπηση ή αναστολή της CK1δ μειώνει την υποξική επαγωγή δύο εξειδικευμένων γονιδίων-στόχων του HIF-2α, της EPO και του PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα του ίδιου του HIF-2α. Αντίστοιχα, παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α είτε μέσω μεταλλαξιγένεσης των θέσεων-στόχων της CK1 (αντικατάσταση των δύο καταλοίπων Ser383 και Thr528 με αλανίνη) είτε με φαρμακολογική αναστολή με τον CK1 αναστολέα D4476, διαταράσσει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-2α και, ως εκ τούτου, αποδυναμώνει την μεταγραφική του ικανότητα. Ωστόσο, χορήγηση λεπτομυκίνης B, ενός εξειδικευμένου αναστολέα της CRM1, σε κύτταρα που εκφράζουν τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-2α αποκαθιστά τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-2α μεταλλάγματος. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως η CK1-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση είναι κρίσιμη για την πυρηνική διατήρηση του HIF-2α. Καταστολή, τέλος, είτε της CK1δ είτε των θέσεων φωσφορυλίωσης του HIF-2α συσχετίζεται με σημαντική μείωση της έκκρισης ερυθροποιητίνης σε ηπατοκυτταρικά καρκινικά μοντέλα, αναδεικνύοντας έναν νέο ρυθμιστικό άξονα που περιλαμβάνει την HIF-2α/CK1 συνιστώσα και υπογραμμίζοντας τη σημασία της δραστηριότητας του HIF-2α στην προσαρμογή στην υποξία [7].



Εικόνα 5. Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από την CK1δ.

(α) Η CK1δ φωσφορυλιώνει άμεσα τον HIF-2α στα κατάλοιπα Ser383 και Thr528.

(β)

Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της έκκρισης ερυθροποιητίνης (EPO) εξαρτώμενης από το HIF-2α, με τη συμμετοχή των CK1δ και CRM1.

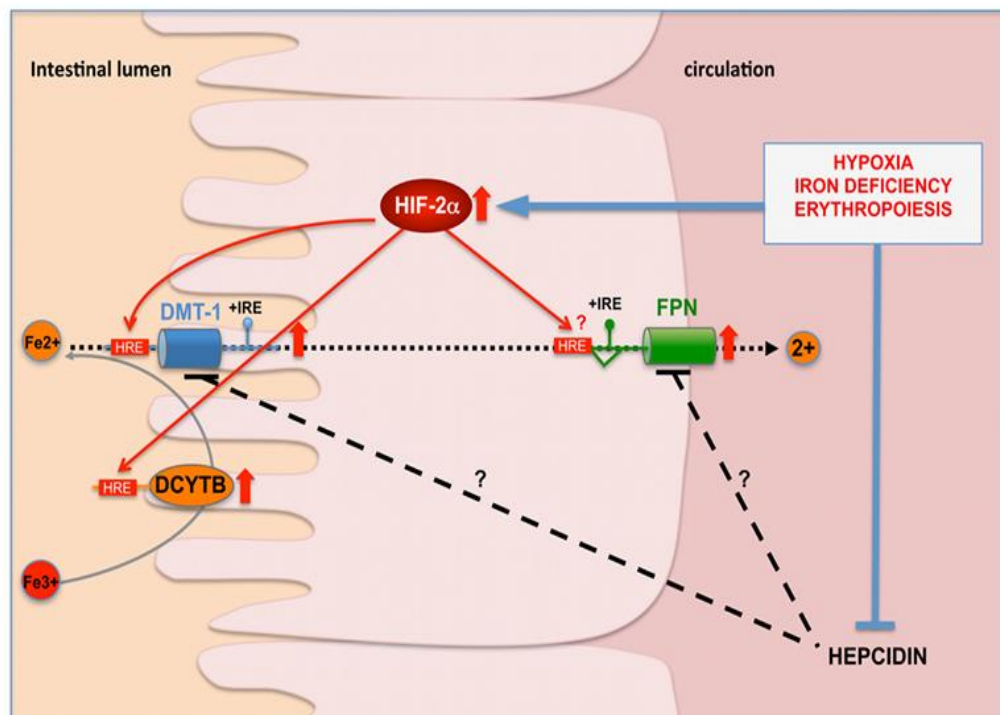
Στην υποξία, ο HIF-2α σταθεροποιείται και εισέρχεται στον πυρήνα, αλλά μπορεί να εξαχθεί ξανά στο κυτταρόπλασμα μέσω μιας CRM1-εξαρτώμενης διαδικασίας. Η CK1δ φωσφορυλιώνει άμεσα τον HIF-2α στα κατάλοιπα Ser383 και Thr528, αποτρέποντας την έξοδό του από τον πυρήνα και προάγοντας το σχηματισμό ετεροδιμερούς με τον ARNT. Το σύμπλοκο δεσμεύεται σε αλληλουχίες HRE στις περιοχές ενισχυτή του γονιδίου-στόχου EPO, οδηγώντας σε διέγερση της έκφρασης και παραγωγής της ερυθροποιητίνης [7].

1.7 Ο ρόλος του HIF-2α στην ομοιοστασία του σιδήρου

Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για μία σειρά από κρίσιμες βιοσυνθετικές και μεταβολικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων τη βιοσύνθεση της αίμης και συμπλεγμάτων σιδήρου-θείου, τη μεταφορά οξυγόνου, τη μιτοχονδριακή αναπνοή και την αντιγραφή του DNA. Στον ανθρώπινο οργανισμό ο σίδηρος βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ των διαφόρων ιστών. Περίπου 1 γραμμάριο σιδήρου αποθηκεύεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό (65% με 80% του συνολικού σιδήρου) κυκλοφορεί σε ένα κλειστό κύκλωμα. Σε αυτό το κύκλωμα τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα καταστρέφονται μέσω ερυθροφαγοκυττάρωσης από μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος στον σπλήνα, γεγονός που επιτρέπει την ανακύκλωση του σιδήρου και την επαναφορά στον μυελό των οστών για την ερυθροποίηση, την ενσωμάτωσή του δηλαδή σε νέα ερυθροκύτταρα. Η ημερήσια απορρόφηση του διατροφικού σιδήρου κυμαίνεται στο 1mg και πραγματοποιείται στον εγγύς δωδεκαδάκτυλο, αποτελώντας μια διαδικασία απαραίτητη για την αναπλήρωση φυσιολογικών απωλειών, όπως εκείνων που οφείλονται σε μικρές αιμορραγίες ή σε επιθηλιακή απολέπιση. Ωστόσο, η υπερβολική συσσώρευση σιδήρου ενδέχεται να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species ή ROS) μέσω της αντίδρασης Fenton/Haber-Weiss, συμβάλλοντας στην παθογένεση νοσημάτων που σχετίζονται με υπερφόρτωση σιδήρου, όπως η κληρονομική αιμοχρωμάτωση και η β-θαλασσαιμία.

Η απορρόφηση σιδήρου αυξάνεται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου ή αναιμίας, αυξημένης ερυθροποιητικής δραστηριότητας και υποξίας ενώ μειώνεται όταν υπάρχει υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο ή φλεγμονή. Αυτή η ρύθμιση βασίζεται σε ένα σύνθετο δίκτυο σημάτων τα οποία αντικατοπτρίζουν τη συνολική κατάσταση του σιδήρου στον οργανισμό και επηρεάζουν τους εντερικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αντίχρευση και μεταφορά του. Όπως αναφέρθηκε η ομοιοστασία του σιδήρου ρυθμίζεται συστημικά από την ηπατική ορμόνη επιδίνη, ωστόσο περιλαμβάνει και μία σειρά από μόρια-κλειδιά. Αναλυτικότερα, ο τρισθενής σίδηρος Fe^{3+} υπό αναγωγικές συνθήκες μετατρέπεται σε δισθενή σίδηρο Fe^{2+} μέσω του κυτοχρώματος b561 DCYTB (duodenal cytochrome b) στον δωδεκαδάκτυλο, ενός ενζύμου που φέρει δύο ομάδες αίμης και εξαρτάται από το ασκορβικό οξύ για την αναγωγή του Fe^{3+} . Ο ανηγμένος Fe^{2+} μεταφέρεται στον οργανισμό μέσω ενός συζευγμένου με πρωτόνια μεταφορέα μετάλλων, του DMT1 (divalent metal transporter 1), γνωστού και ως NRAMP2. Παρότι μπορεί να μεταφέρει διάφορα δισθενή ιόντα, ο Fe^{2+} αποτελεί το κύριο φυσιολογικό του υπόστρωμα. Η κρίσιμη λειτουργία του DMT1 στο λεπτό έντερο αναδεικνύεται από το γεγονός ότι απουσία του μεταφορέα σε πειραματικά μοντέλα ποντικών επιφέρει αναιμικό φαινότυπο, ενώ σε ανθρώπους μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον DMT1 προκαλεί υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, η οποία μπορεί να συνοδεύεται από υπερβολική συσσώρευση σιδήρου στο ήπαρ. Ο σίδηρος που απορροφάται από τα ώριμα εντεροκύτταρα είτε αποθηκεύεται στην φερριτίνη είτε εξέρχεται διαμέσου της βασικοπλευρικής μεμβράνης στο πλάσμα του αίματος ως Fe^{2+} μέσω του μεταφορέα φερροπορτίνη. Αξίζει να σημειωθεί πως απαλοιφή του γονιδίου της φερροπορτίνης *Fpn* στο εντερικό σύστημα επίμυων είχε ως αποτέλεσμα υπερφόρτωση των εντεροκυττάρων με σίδηρο και νεογνική θνησιμότητα.

Η αυξημένη απορρόφηση σιδήρου (που αντιστοιχεί σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου) συσχετίζεται με την ενισχυμένη έκφραση των DMT1, DCYTB και FPN τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, ενώ αντίστροφη σχέση εμφανίζει η έκφραση της ηπατικής επιδίνης καθώς ρόλος της είναι να εμποδίσει την έξοδο του σιδήρου στο πλάσμα μέσω της φερροπορτίνης. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν αναδείξει τον HIF-2α ως έναν σημαντικό τοπικό ρυθμιστή της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου καθώς ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων μεταφορέων σιδήρου στα εντεροκύτταρα. Πράγματι, επίμυες στους οποίους απουσιάζει ο HIF-2α στο εντερικό επιθήλιο καταδεικνύουν σημαντική μείωση στην έκφραση των γονιδίων *Dmt1*, *Dcytb* και *Fpn*, που δεν αντισταθμίζεται από τον HIF-1α. Η ελάττωση της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων συσχετίστηκε με σημαντική μείωση των επιπέδων σιδήρου στο πλάσμα και στο ήπαρ καθώς και με αισθητή μείωση της ηπατικής έκφρασης της επιδίνης, ευρήματα που υπογραμμίζουν τον κεντρικό ρόλο του HIF-2α στη διατήρηση της ομοιοστασίας του σιδήρου [8].



Εικόνα 6. Ο HIF-2α ρυθμίζει μεταγραφικά την έκφραση βασικών γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά του σιδήρου.

Υπό συνθήκες ανεπάρκειας σιδήρου, υποξίας ή αυξημένης ερυθροποιητικής δραστηριότητας, ο HIF-2α σταθεροποιείται στα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου και προάγει τη μεταγραφή των *DMT1*, *DCYTB*, και *FPN*. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των *DMT1* και *DCYTB* στην παρυφή της κορυφαίας μεμβράνης, καθώς και της *FPN* στη βασική μεμβράνη. Έχει αποδειχθεί ότι ο HIF-2α συνδέεται άμεσα σε συναινετικά στοιχεία HRE στις ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών των γονιδίων *DCYTB* και *DMT1*. Σε συστημικό επίπεδο, η ηπατική εψιδίνη καταστέλλεται, εμποδίζοντας την ανασταλτική της δράση στην απορρόφηση του σιδήρου από το δωδεκαδάκτυλο [8].

Συνεπώς, τόσο ο HIF-2α όσο και η εψιδίνη αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές της ομοιοστασίας του σιδήρου ενώ η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι καλά τεκμηριωμένη και έχει αποδειχθεί σε βασικές διεργασίες. Ενδεικτικά:

1. Η ηπατική εψιδίνη μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα του HIF-2α στο έντερο, μέσω σημάτων που μεταφέρονται από το ένα όργανο στο άλλο ('hetero-tissue' crosstalk).
2. Ο HIF-2α στους νεφρούς αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας και αναιμίας, προάγοντας την παραγωγή ερυθροποιητίνης (EPO), η οποία στη συνέχεια καταστέλλει την ηπατική εψιδίνη.
3. Το ήπαρ μπορεί να εκφράσει HIF-2α, ο οποίος στη συνέχεια καταστέλλει άμεσα την εψιδίνη μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού. Ειδικότερα, όταν απουσιάζει η πρωτεΐνη VHL, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-2α, παρατηρείται καταστολή του υποκινητή του γονιδίου της εψιδίνης *HAMP*. Επίσης, σε μόλυνση από τον ιό HCV, η παρουσία ενδοκυτταρικού HIF-2α αυξάνεται λόγω παραγωγής ROS, προκαλώντας καταστολή της εψιδίνης και υπερφόρτωση σιδήρου [9].

2. Σκοπός

Παρά το γεγονός ότι ο HIF-1α αποτελεί την πιο γνωστή και καλά χαρακτηρισμένη ισομορφή της οικογένειας των επαγόμενων από υποξία μεταγραφικών παραγόντων, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τον HIF-2α ως ένα σημαντικό ρυθμιστή ενός πλήθους διεργασιών και κατ' επέκταση γονιδίων που εμπλέκονται στην προσαρμογή του οργανισμού στην υποξία. Ενδεικτικά, τέτοιες διεργασίες περιλαμβάνουν την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική μετανάστευση, την ωρίμανση των αιμοφόρων αγγείων καθώς και τη μετάσταση.

Το σύνολο των γονιδίων ωστόσο που ρυθμίζονται από τον HIF-2α δεν είναι πλήρως εξακριβωμένο. Στην κατεύθυνση αυτή, προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διερεύνησαν την πιθανή επίδραση του HIF-2α στην έκφραση διαφόρων γονιδίων, με τεχνικές RNA αλληλούχισης και στατιστικής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δύο συνθήκες κυττάρων Huh7, υποξία και υποξία με siRNA του HIF-2α, και συλλέχθηκε το συνολικό RNA των κυττάρων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση RNA (RNA sequencing) και στατιστική ανάλυση των RNAseq δεδομένων, όπου εξετάστηκαν τα γονίδια που αυξορρυθμίζονται και μειορρυθμίζονται έπειτα από αποσιώπηση του HIF-2α, καθώς και ανάλυση οντολογίας για τον καθορισμό των βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια αυτά. Από την ανάλυση φάνηκε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων εμπλέκεται κυρίως στην ομοιοστασία του σιδήρου και την σηματοδότηση TGF-β. Από τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκε το γονίδιο της αιμοτζουβελίνης, το οποίο εμπλέκεται και στα δύο μονοπάτια και παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα. Στη συνέχεια, με real-time PCR (RT-PCR) επιβεβαιώθηκαν τα στατιστικά δεδομένα, ότι δηλαδή ο HIF-2α επηρεάζει πράγματι την έκφραση της αιμοτζουβελίνης. Ένας λογικός μηχανισμός ρύθμισης της αιμοτζουβελίνης από τον HIF-2α είναι η ύπαρξη ενός HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης, όπου προσδένεται ο HIF-2α.

Το ερώτημα λοιπόν που θέλουμε να απαντήσουμε είναι εάν υπάρχει πράγματι κάποιο μοτίβο HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης και στη συνέχεια, εφόσον εντοπιστεί, να διερευνήσουμε την πιθανότητα να αποτελεί ένα λειτουργικό HRE του HIF-2α ή εάν πρόκειται για ένα τυχαίο μοτίβο. Για τον λόγο αυτό, σκοπός της πτυχιακής μου εργασίας είναι να πραγματοποιηθεί αρχικά βιοπληροφορική αναζήτηση για τον εντοπισμό ενός πιθανού HRE και ακολούθως, κατά το πειραματικό κομμάτι, κλωνοποίηση του υποκινητή της ανθρώπινης αιμοτζουβελίνης στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic, με στόχο να διεξαχθεί παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τέλος, να μελετηθεί η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης υπό συνθήκες επαγωγής του HIF-2α (υποξία).

3. Υλικά

3.1 Εκκινητές

Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν στην PCR (polymerase chain reaction), προκειμένου να ενισχυθεί το τμήμα 1.000 βάσεων του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης το οποίο περιέχει το HRE και να ληφθεί επαρκής ποσότητα του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να περιλαμβάνουν την αλληλουχία αναγνώρισης δύο περιοριστικών ενζύμων, των SacI και XhoI, προκειμένου να γίνει σε επόμενο βήμα η κλωνοποίηση, καθώς και μία ακολουθία θυμινών η οποία προσδίδει σταθερότητα στους εκκινητές.

- Εμπρόσθιος εκκινητής με αλληλουχία 5' TTTTGAGCTCCTCTGCAACCTTGAAGC3', ο οποίος περιλαμβάνει την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου SacI 5' GAGCTC 3'.
- Ανάστροφος εκκινητής με αλληλουχία 5' TTTTCTCGAGGGAGAAATTCCAGAGAGC 3', ο οποίος περιλαμβάνει την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου XhoI 5' CTCGAG 3'.

Ένα δεύτερο σετ εκκινητών (GL2 και RV3) χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση του τμήματος του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic και είναι οι ακόλουθοι:

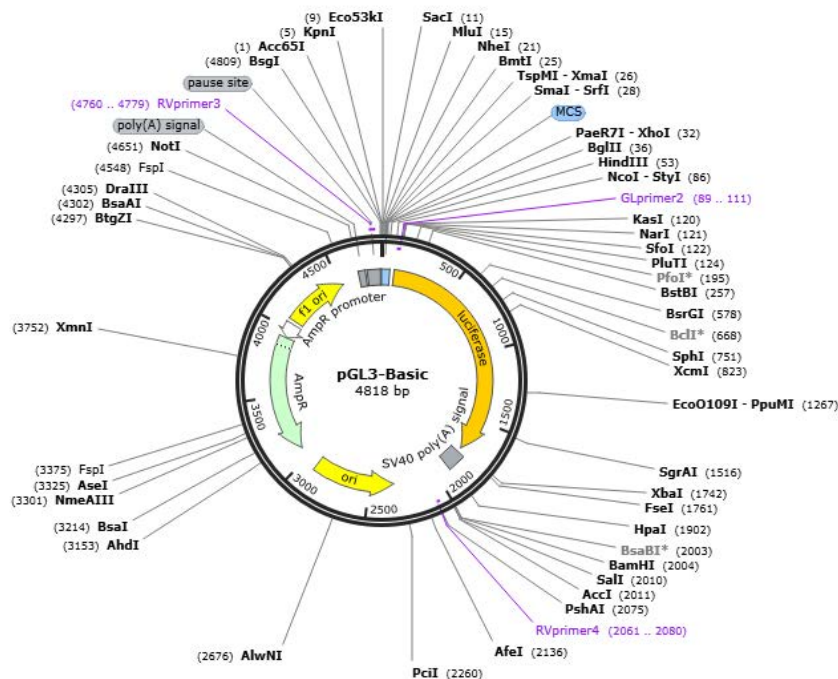
- GL2: 5' CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA 3'
- RV3: 5' CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3'

3.2 Βακτηριακά στελέχη

- TOP10 δεκτικά βακτήρια Escherichia Coli: Στέλεχος βακτηρίων Escherichia coli το οποίο έχει επεξεργαστεί χημικά προκειμένου να μπορεί να προσλαμβάνει με ευκολία DNA από το περιβάλλον, προσδίδοντάς του υψηλή αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού.

3.3 Βακτηριακοί φορείς

- PGL3 basic: Πλασμιδιακός φορέας με μέγεθος 4.818 bp. Διαθέτει το γονίδιο της λουσιφεράσης, το οποίο χρησιμεύει στη μέτρηση της ενεργότητας αλληλουχιών υποκινητή και ενισχυτή μέσω της δοκιμασίας της λουσιφεράσης (luciferase assay), καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Δεν διαθέτει υποκινητή.



Εικόνα 7. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα PGL3 basic.

Διακρίνονται τα σημεία πέψης ενζύμων περιορισμού πάνω στο γονιδίωμα, το γονίδιο της λουσιφεράσης, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και η θέση έναρξης της αντιγραφής (ori).

3.4 Ένζυμα

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- DNA πολυμεράση Vent (New England Biolabs) για την αντίδραση PCR.
- SacI-HF (New England Biolabs) για την πέψη πλασμιδίου και υποκινητή με σκοπό την κλωνοποίηση.
- XhoI (New England Biolabs) για την πέψη πλασμιδίου και υποκινητή με σκοπό την κλωνοποίηση.
- T4 DNA λιγάση (New England Biolabs) για την ένωση των συμπληρωματικών άκρων του ενθέματος και του φορέα.

3.5 Αντιβιοτικά

- Αμικικιλίνη: Αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των πενικιλινών ευρέως φάσματος. Χρησιμοποιείται για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων.
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Pen/Strep): μίγμα αντιβιοτικών που προστίθεται στις κυτταροκαλλιέργειες

3.6 Θρεπτικά μέσα για καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

- Luria-Bertani broth (LB): θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων.

Σύσταση:

10g/L Bacto-Tryptone

5g/L Bacto-Yeast Extract

5g/L NaCl
(20g/L agar για τρυβλία-στερεή καλλιέργεια)
Αμπικιλίνη σε αναλογία 1:1000

3.7 Μέσα για καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων
Σημείωση: Το πλήρες θρεπτικό μέσο (DMEM +/+) περιέχει, στα 450ml, 50ml ορό FBS και 5ml μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Pen/Strep)
- Fetal Bovine Serum (FBS): ορός εμβρύου βοός, παρέχει αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες για την διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό ευκαρυωτικών κυττάρων σε in vitro καλλιέργεια. Προστίθεται στο θρεπτικό μέσο σε συγκέντρωση 10%.
- Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x: ισότονο διάλυμα αλάτων, χρησιμοποιείται για πλύση των κυττάρων
- Διάλυμα θρυψίνης: Η θρυψίνη αποτελεί πρωτεολυτικό ένζυμο, χρησιμοποιείται για την αποκόλληση προσκολλημένων κυτταροκαλλιιεργειών

3.8 Διαλύματα

3.8.1 Διαλύματα για PCR

- DMSO: οργανική ένωση που χρησιμοποιείται στην PCR διότι 1) μειώνει τη θερμοκρασία τήξης, διευκολύνοντας την πρόσδεση των εκκινητών στο DNA 2) αποτρέπει την επαναδιάταξη του DNA και τον σχηματισμό δευτεροταγών δομών.
Συνολικά βελτιώνει την ενίσχυση του DNA μέσω PCR καθώς και την ειδικότητα και απόδοση της αντίδρασης.
- Buffer για την DNA πολυμεράση Vent (ThermoPol reaction buffer από NewEngland Biolabs): παρέχει το ιδανικό χημικό περιβάλλον για την βέλτιστη λειτουργία του ενζύμου.
Σύσταση:
20 mM Tris-HCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
10 mM KCl
2 mM MgSO₄
0.1% Triton® X-100
pH 8.8 στους 25°C

3.8.2 Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA): διατήρηση pH και ηλεκτρικής αγωγιμότητας.

- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer): περιέχει κυανό της ξυλόλης και μπλε της βρωμοφαινόλης για τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης και γλυκερόλη ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή των δειγμάτων στα ``πηγαδάκια`` της πηκτής.
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: οπτικοποίηση των ζωνών του DNA.

3.8.3 Διαλύματα για ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης

- NTI buffer: χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση της πηκτής αγαρόζης.
- NT3 buffer: αιθανολικό διάλυμα πλύσης.
- NE buffer: διάλυμα έκλουσης.

3.8.4 Διαλύματα για καθαρισμό DNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη

- Υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa): χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση του DNA.
- Διαλύματα αιθυλικής αλκόολης 70% και 100%: απομάκρυνση αλάτων και ανεπιθύμητων προσμίξεων.

3.8.5 Διαλύματα για παρασκευή δεκτικών βακτηρίων TOP10

- Θρεπτικός ζωμός TYM
Σύσταση:
20g/L Bacto-Tryptone
5g/L Bacto-Yeast Extract
5,8g/L NaCl
2,4g/L MgSO_4
- Διάλυμα TFB-I (transformation buffer I)
Σύσταση:
30mM CH_3COOK
50mM MnCl_2
100mM KCl
10mM CaCl_2
15% Glycerol pH 7
- Διάλυμα TFB-II (transformation buffer II)
Σύσταση:
10mM MOPS
75mM CaCl_2
10mM KCl
20% Glycerol pH 7

3.8.6 Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδιακού DNA

- Διάλυμα επαναδιάλυσης (resuspension buffer P1): περιέχει Tris-HCl για ρύθμιση του pH, EDTA για δέσμευση δισθενών ιόντων και RNase A για αποδόμηση του RNA
- Διάλυμα λύσης (lysis buffer): περιέχει NaOH για την διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και αποδιάταξη του DNA και SDS (sodium dodecyl sulfate) για διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

- Διάλυμα εξουδετέρωσης (neutralization buffer): περιέχει οξικό κάλιο (CH_3COOK) για επαναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA.
- Υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης: για κατακρήμνιση του DNA.

3.8.7 Διαλύματα για Western Blot

- Laemmli buffer: SDS, Tris, DTT, χρωστική, γλυκερόλη
- Πηκτή διαχωρισμού (lower gel) 10%: 2,5ml lower buffer, 2,5ml ακρυλαμίδιο, 40μl APS (ammonium persulfate), 20μl TEMED (tetramethylethylenediamine), 5ml H_2O
- Πηκτή επιστοίβαξης (upper gel): 2ml upper buffer, 0,9ml ακρυλαμίδιο 40%, 50μl APS, 50μl TEMED, 5ml H_2O
- DTT (dithiothreitol): για αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών
- Running buffer
- Transfer buffer
- Μεθανόλη 100%: οργανικός διαλύτης, χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF
- TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween): διάλυμα πλύσης, περιέχει 1x TBS, Tween, H_2O
- Διάλυμα γάλακτος κορεσμού (blocking): 5% γάλα σκόνη σε διάλυμα TBS-T
- Διάλυμα blocking BSA (bovine serum albumin): 5% BSA σε διάλυμα TBS-T

3.8.8 Διαλύματα για δοκιμασία λουσιφεράσης (Promega)

- Διάλυμα PLB 1x (passive lysis buffer): διάλυμα για ήπια λύση ευκαρυωτικών κυττάρων.
- Stop & Glo® buffer: διάλυμα για το αντιδραστήριο Stop & Glo®.

3.9 Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο διαμόλυνσης PEI (polyethylenimine): υδρόφιλο κατιονικό πολυμερές, χρησιμοποιείται ευρέως ως ένας μη-ιικός φορέας νουκλεοτιδίων.
- Stop & Glo®: αντιδραστήριο για την δοκιμασία της λουσιφεράσης
- Luciferase Assay Reagent II (LAR II): παράγει φωταυγές σήμα.

3.10 Κυτταρικές σειρές

- Κυτταρική σειρά Huh7: ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

3.11 Αντισώματα

- anti-tubulin (προέλευση από κουνέλι, αραίωση 1:1000 σε TBS-T): αναγνωρίζει την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη.
- anti-HIF-2α (προέλευση από κουνέλι, αραίωση 1:1000 σε TBS-T): αναγνωρίζει τον HIF-2α.

- anti-rabbit (αραίωση 1:5000 σε γάλα): δευτερεύων αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP (horseradish peroxidase).

4. Μέθοδοι

4.1 Ενίσχυση τμήματος του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE με PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) είναι μία μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων που παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία [12]. Απαραίτητα συστατικά σε μία PCR αποτελούν ένα ζευγάρι εκκινητών, το DNA προς ενίσχυση, μία θερμοάαντοχη DNA πολυμεράση και τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs). Οι εκκινητές είναι σύντομα ολιγονουκλεοτίδια σχεδιασμένα ώστε να είναι συμπληρωματικά με τα άκρα του DNA προς ενίσχυση. Για την αντίδραση είναι επίσης απαραίτητα το buffer του ενζύμου καθώς και διπλά αποστειρωμένο νερό (ddH₂O) [13]. Η αντίδραση περιλαμβάνει 3 επιμέρους στάδια: την αποδιάταξη, κατά την οποία το DNA θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (94°C) με αποτέλεσμα την διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων του DNA. Έπειτα την υβριδοποίηση, η οποία πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (37°C-72°C) επιτρέποντας την πρόσδεση των εκκινητών στο συμπληρωματικό μονόκλωνο DNA, ξεκινώντας από το 3' άκρο και οδηγώντας στη δημιουργία 2 δίκλωνων μορίων DNA. Τελευταίο στάδιο αποτελεί η επιμήκυνση των εκκινητών από την θερμοάαντοχη DNA πολυμεράση, με κατεύθυνση 5' → 3', στη βέλτιστη θερμοκρασία για την δραστηριότητά της (75°C-80°C). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 30-40 κύκλους στον θερμοκυκλοποιητή, μία συσκευή η οποία ελέγχει τον χρόνο και τη θερμοκρασία κάθε σταδίου της αντίδρασης, οδηγώντας εντέλει στην ενίσχυση του DNA-στόχου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ενισχύθηκε τμήμα της αλληλουχίας του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE μεγέθους 1.000 ζευγών βάσεων. Για την ενίσχυση του τμήματος αυτού σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές:

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'TTTTGAGCTCCTCTGCAACCTTGAAGC3'

Ανάστροφος εκκινητής: 5'TTTTCTCGAGGGAGAAATTCCAGAGAGC 3'

Με έντονα γράμματα έχουν σημειωθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων SacI και XhoI αντίστοιχα.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 9 αντιδράσεις, καθεμία με προσθήκη διαφορετικής ποσότητας DMSO (χωρίς DMSO, 0,5μl DMSO, 1μl DMSO) και σε διαφορετική θερμοκρασία: 62 °C, 65 °C και 67 °C. Για διευκόλυνση, δημιουργήθηκαν 3 διαφορετικά master mix για κάθε περιεκτικότητα DMSO ενώ το κάθε master mix προοριζόταν για 3 αντιδράσεις, που αντιστοιχούσαν στις 3 διαφορετικές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήσαμε το DMSO λόγω της ικανότητάς του να διασπά τους δεσμούς πρωτεϊνών με το DNA, καθιστώντας το DNA προσβάσιμο από την DNA πολυμεράση, ενώ οι 3 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας αποσκοπούν στη διερεύνηση της βέλτιστης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών.

Το DNA-στόχος είναι DNA που απομονώθηκε στο εργαστήριο από κύτταρα Huh7 και η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η DNA polymerase Vent λόγω της υψηλής της αξιοπιστίας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων.

Master Mix	1	2	3
H ₂ O	135 µl	133 µl	131 µl
Buffer 10x	20 µl	20 µl	20 µl
NTPs 10µM	4 µl	4 µl	4 µl
F primer	10 µl	10 µl	10 µl
R primer	10 µl	10 µl	10 µl
DNA	20 µl	20 µl	20 µl
DNA pol Vent	1 µl	1 µl	1 µl
DMSO	-	0,5 µl	1 µl
Σύνολο	200 µl	200 µl	200 µl

Σημείωση: Οι όγκοι υπολογίστηκαν για 4 αντιδράσεις (3 αντιδράσεις για τις 3 διαφορετικές θερμοκρασίες και 1 επιπλέον αντίδραση)

4.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης αποτελεί μία απλή και αποτελεσματική μέθοδο για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και καθαρισμό κομματιών DNA μεγέθους 0,5-25 kb [14]. Όταν τοποθετηθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, το DNA, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθεί προς τον θετικό πόλο του πεδίου. Παράλληλα, καθώς το DNA έχει ομοιόμορφο λόγο μάζα/φορτίο τα μόρια DNA διαχωρίζονται βάση του μεγέθους τους μέσα στην πηκτή αгарόζης. Η αρχή που διέπει τη μετανάστευση των μορίων DNA στην πηκτή βασίζεται στο ότι η απόσταση που διανύουν τα μόρια DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μοριακό τους βάρος [15].

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης:

1. Ζύγισμα 0,6gr αгарόζης για πηκτωμα 60ml περιεκτικότητας 1% σε αгарόζη
2. Διαλυτοποίηση της αгарόζης σε 60ml διαλύματος TAE 1x με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων.
3. Προσθήκη 6µl βρωμιούχου αιθιδίου (1:1000) και ανάδευση.

Προετοιμασία δειγμάτων:

4. Προσθήκη loading buffer 1x (από αρχική συγκέντρωση 6x) στα δείγματα που θα φορτωθούν.

Προετοιμασία ηλεκτροφόρησης:

5. Μεταφορά του διαλύματος αгарόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έως ότου να κρυώσει και να σχηματίσει πηκτωμα.
6. Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής (20 µl δείγματος ανά πηγαδάκι).
7. Εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού δυναμικού 120V.
8. Οπτικοποίηση κάτω από φως UV μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

4.3 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με gel extraction

Αφού προσδιορίσαμε το επιθυμητό προϊόν (το τμήμα του υποκινητή που ενισχύσαμε) με ηλεκτροφόρηση, καθιστώντας το ορατό στο UV, στη συνέχεια έπρεπε να γίνει απομόνωση του επιθυμητού DNA από την πηκτική αгарόζης, ώστε να λάβουμε καθαρή την ποσότητα DNA που ενισχύθηκε μέσω της PCR. Αυτό πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit της εταιρείας Macherey-Nagel «PCR clean-up and Gel extraction» [16]. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Με νυστέρι απομακρύνεται η περιττή ποσότητα της πηκτικής αгарόζης που δεν περιέχει το DNA και η πηκτική με το επιθυμητό DNA μεταφέρεται σε erpendorf.
2. Στο erpendorf προστίθεται buffer NTI σε αναλογία μάζας δείγματος προς όγκο buffer NTI 1:2 και ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5-10 λεπτά μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως η πηκτική. Ενδιάμεσα, ανά 2 λεπτά περίπου, γίνεται ανάδευση στο vortex προκειμένου να διευκολυνθεί η διαδικασία της διαλυτοποίησης.
3. Το δείγμα φορτώνεται σε clean-up column, χωρητικότητας έως 700μl, η οποία έχει τοποθετηθεί μέσα σε collection tube (περιέχονται στο kit). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000g και απόρριψη του διηθήματος (flow-through). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για την υπόλοιπη ποσότητα του δείγματος.
4. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύση της στήλης με προσθήκη 700μl buffer NT3, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000g και απόρριψη του flow-through. Συνίσταται η επανάληψη αυτού του βήματος για την ελαχιστοποίηση της μεταφοράς χαοτροπικών αλάτων και βελτίωση του λόγου A_{260}/A_{230} .
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 11.000g ώστε να απομακρυνθεί το buffer NT3 και να στεγνώσει πλήρως η αιθανόλη που περιέχει.
6. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 20μl διαλύματος έκλουσης. Έπειτα από επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000g. Η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται για 2^η φορά με την ίδια ποσότητα διαλύματος έκλουσης.

4.4 Παρασκευή δεκτικών βακτηρίων E. Coli TOP10

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 3ml θρεπτικό υλικό TYM και 3μl streptomycin, εμβολιάζονται 3μl βακτηρίων, τα οποία έχουμε πάρει από διάλυμα αποθήκευσης glycerol stock.
2. Επώαση overnight στους 37°C υπό ανάδευση (160rpm).
3. Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνονται 500μl βακτηρίων και προστίθενται σε 3ml φρέσκου θρεπτικού υλικού TYM χωρίς αντιβιοτικά. Ακολουθεί επώαση για 2,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (160rpm).
4. Παράλληλα, σε κωνική φιάλη που περιέχει 5ml TYM εμβολιάζεται 1,5ml της πρωινής καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά.
5. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση ώστε να υπολογισθεί η οπτική πυκνότητα (optical density-OD) της καλλιέργειας στην κωνική φιάλη: το φωτόμετρο μηδενίζεται με προσθήκη 1ml TYM

στην κυψελίδα και γίνει φωτομέτρηση 1ml καλλιέργειας. Εάν η οπτική πυκνότητα δεν έχει την επιθυμητή τιμή ($OD=0,35-0,4$), η καλλιέργεια επωάζεται για ακόμη 30 λεπτά και επαναλαμβάνεται η μέτρηση μέχρι η OD να φτάσει την κατάλληλη τιμή.

6. Ακολουθεί ψυχόμενη φυγοκέντρηση ($4^{\circ}C$) της καλλιέργειας στα 4.000rpm για 5 λεπτά.

7. Απόρριψη υπερκειμένου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος βακτηρίων σε 1ml διαλύματος TFBI. Προσθήκη της υπόλοιπης ποσότητας TFBI μέχρι τα 25ml.

8. Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.

9. Φυγοκέντρηση ($4^{\circ}C$) της καλλιέργειας στα 4.000rpm για 5 λεπτά.

10. Απόρριψη υπερκειμένου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος βακτηρίων σε 2ml διαλύματος TFBII.

11. Επώαση για 1 ώρα στον πάγο.

12. Τα βακτήρια μοιράζονται ανά 100μl σε 20 erppendorf και αποθηκεύονται στους $-80^{\circ}C$.

Σημείωση: Όλη η διαδικασία πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από την φλόγα.

4.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10 με τον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic

1. Σε erppendorf με στοκ γλυκερόλης 100μl βακτηρίων TOP10 προστίθενται 9,2μl του πλασμιδιακού φορέα PGL3 (συγκέντρωση $0,5\mu g/\mu l$).

2. Επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.

3. Μεταφορά στο heatblock ($42^{\circ}C$) για 2 λεπτά.

4. Άμεση μεταφορά σε πάγο για 3 λεπτά.

5. Προσθήκη 700μl LB, ελαφρά ανάδευση και επώαση υπό ανάδευση (160rpm) στους $37^{\circ}C$ για 1 ώρα.

6. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκειμένου, αφήνοντας ~100μl θρεπτικού για την επαναδιάλυση του ιζήματος.

7. Στρώνουμε 3 σταγόνες περίπου της καλλιέργειας σε τρυβλίο LB με αμπικιλίνη. Το τρυβλίο επωάζεται overnight στους $37^{\circ}C$.

8. Το επόμενο πρωί λαμβάνεται με τιπάκι μία αποικία και εμβολιάζεται σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιέχει 30ml LB και 30μl αμπικιλίνη (αναλογία 1:1.000), αφήνοντας το τιπάκι μέσα στο θρεπτικό.

9. Επώαση overnight στους $37^{\circ}C$ υπό ανάδευση (160rpm).

4.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation)

Επόμενο βήμα αποτελεί η απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα PGL3 basic από τα βακτηριακά κύτταρα που μετασχηματίσαμε. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας (30ml) από την κωνική φιάλη σε eppendorf. Φυγοκέντρωση καλλιέργειας στα 12.000g για 1 λεπτό.
 2. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 1,5ml διαλύματος επαναδιάλυσης (Resuspension buffer). Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 3. Προσθήκη 1,5ml διαλύματος λύσης (Lysis buffer), ανακινώντας ελαφρά. Επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
 4. Προσθήκη 1,8ml διαλύματος εξουδετέρωσης (Neutralization buffer). Επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
 5. Φυγοκέντρωση στα 12.000g για 15 λεπτά και λήψη του υπερκειμένου με μία πιπέτα.
 6. Σε καθαρό eppendorf προστίθεται 450μl του υπερκειμένου και 450μl ισοπροπανόλης (αναλογία 1:1) , ανακινώντας ελαφρά.
 7. Επώαση στην κατάψυξη (-20°C) για 30 λεπτά. Φυγοκέντρωση στα 12.000g για 10 λεπτά.
 8. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 500μl 70% κρύας αιθανόλης.
 9. Φυγοκέντρωση στα 12.000g για 5 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου.
 10. Μόλις στεγνώσει πλήρως η αιθανόλη, πραγματοποιείται επαναδιάλυση του DNA σε 20μl διπλά αποστειρωμένου νερού (ddH₂O).
- Η συγκέντρωση του DNA μπορεί να μετρηθεί στο Nanodrop.

4.7 Πέψη του πλασμιδιακού φορέα PGL3 basic και του ενθέματος HJV promoter με ένζυμα περιορισμού

Προκειμένου να γίνει η κλωνοποίηση, να εισαχθεί δηλαδή το ένθεμα HJV promoter στον πλασμιδιακό φορέα, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πέψη τόσο του ενθέματος όσο και του φορέα με τα ίδια ένζυμα περιορισμού ώστε να προκύψουν συμπληρωματικά άκρα. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν είναι τα SacI και XhoI, καθώς εντοπίζονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των ενζύμων αυτών τόσο στο ένθεμα όσο και στον πλασμιδιακό φορέα.

1. Για κάθε πέψη παρασκευάστηκε το αντίστοιχο μείγμα πέψης, όπως αναγράφεται παρακάτω.

Πέψη PGL3 basic:

	Όγκος (μl)
H₂O	8μl
Buffer 1x	4μl
PGL3 basic	25μl
SacI	1μl
XhoI	1μl

Η συγκέντρωση του PGL3 basic ήταν 0,0378μg/μl, οπότε χρησιμοποιήθηκαν 0,945μg για την πέψη.

Πέψη HJV promoter:

	Όγκος (μl)
H₂O	22,5μl

Buffer 1x	4μl
HJV promoter	11,5μl
SacI	1μl
XhoI	1μl

Η συγκέντρωση του HJV promoter ήταν 0,0439μg/μl, οπότε χρησιμοποιήθηκαν 0,5μg για την πέψη.

2. Τα μείγματα επωάζονται στους 37°C για 1,5 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση της πέψης, η διαδικασία που ακολουθείται για το ανηγμένο πλασμίδιο PGL3 basic περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, με σκοπό την απομόνωση του επιθυμητού τμήματος του πλασμιδίου (δηλαδή του μεγαλύτερου τμήματος, και όχι του μικρότερου που αντιστοιχεί στο τμήμα μεταξύ των θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων). Στη συνέχεια το επιλεγμένο DNA εκχυλίζεται από την πηκτή με χρήση των πρωτοκόλλων που περιγράφηκαν παραπάνω (βλ. Ενότητες 4.2 «Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης» & 4.3 «Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με gel extraction») και γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA (ποσοτικοποίηση) στο Nanodrop.

Παράλληλα, το τμήμα του HJV promoter απαιτεί καθαρισμό μετά την διαδικασία της πέψης, ώστε να απομακρυνθούν τα ένζυμα και το buffer της αντίδρασης. Ο καθαρισμός αυτός επιτυγχάνεται με κατακρήμνιση με αιθανόλη (Ethanol precipitation).

4.8 Κατακρήμνιση με αιθανόλη του HJV promoter

1. Προσθήκη 1/10 του όγκου της αντίδρασης οξικό νάτριο (CH₃COONa) και 3x του όγκου κρύα 100% αιθανόλη (αποθηκευμένη στους -20 °C). Ανάδευση.

Σημείωση: Εμείς είχαμε 40μl αντίδρασης πέψης, επομένως προσθέσαμε 4μl CH₃COONa και 120μl 100% αιθανόλη.

2. Επώαση στους -20°C για 1 ώρα.

3. Φυγοκέντρωση στα 13.300rpm για 30 λεπτά στους 4 °C.

4. Απόρριψη υπερκειμένου, προσέχοντας να μην διαταραχθεί το ίζημα.

5. Προσθήκη 500μl κρύας 70% αιθυλικής αλκοόλης (αποθηκευμένη στους -20 °C).

6. Φυγοκέντρωση στα 13.300rpm για 10 λεπτά.

7. Απόρριψη υπερκειμένου μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει πλήρως η αιθανόλη.

8. Ανασύσταση ιζήματος σε 20μl H₂O.

Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του DNA στο Nanodrop.

4.9 Αντίδραση λιγάσης

Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας κλωνοποίησης είναι η αντίδραση λιγάσης, κατά την οποία επιτυγχάνεται η σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων που προέκυψαν από την περιοριστική πέψη.

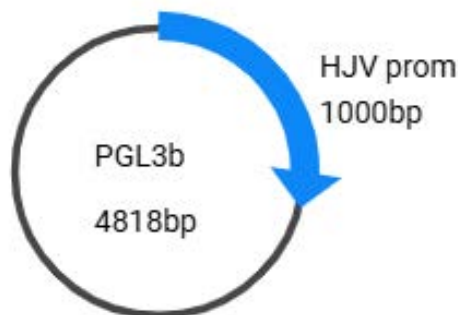
1. Σε ειδικά erppendorf κατάλληλα για χρήση σε θερμοκυκλοποιητή παρασκευάζεται το μείγμα της αντίδρασης λιγάσης. Εμείς παρασκευάσαμε 3 διαφορετικά μείγματα καθώς επιλέξαμε 3 διαφορετικές αναλογίες ενθέματος προς πλασμίδιο, συγκεκριμένα 1:1, 3:1 και 5:1. Πρόκειται για αναλογία μαζών (kb).

Ο όγκος (σε μl) του ενθέματος και του πλασμιδίου που απαιτείται υπολογίζεται με την χρήση του προγράμματος NEBio ligation calculator, στο οποίο εισάγουμε το μέγεθος τόσο του ενθέματος (1.000 bp) όσο και του πλασμδιακού φορέα (4.818 bp) καθώς και τα ng του φορέα που θα χρησιμοποιήσουμε, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι 50ng. Το πρόγραμμα μας δίνει την μάζα (σε ng) ενθέματος και πλασμιδίου που απαιτείται για κάθε αναλογία. Γνωρίζοντας την συγκέντρωση του ενθέματος (49,2 ng/ μl) και του πλασμδιακού φορέα (26,1 ng/ μl) υπολογίζεται εύκολα ο απαιτούμενος όγκος.

Αναλογία ένθεμα:πλασμίδιο	1:1	3:1	5:1
H ₂ O	14,9 μl	14,5 μl	14,1 μl
Buffer 1x	2 μl	2 μl	2 μl
Ένθεμα (HJV promoter)	0,21 μl	0,63 μl	1,05 μl
Πλασμδιακός φορέας (PGL3 basic)	1,9 μl	1,9 μl	1,9 μl
T4 λιγάση	1 μl	1 μl	1 μl

2. Επώαση overnight στους 16 °C.

Το προϊόν κλωνοποίησης που αναμένουμε αναπαρίσταται παρακάτω:



Εικόνα 8. Αναπαράσταση του πλασμδιακού φορέα PGL3 basic που έχει προσλάβει το ένθεμα HJV promoter. Αναγράφονται τα αντίστοιχα μεγέθη σε ζεύγη βάσεων (base pairs, bp). Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Biorender.

4.10 Μετασχηματισμός βακτηρίων με το προϊόν κλωνοποίησης

Για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων του προϊόντος κλωνοποίησης, αυτό εισάγεται σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα E. coli TOP10, σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο μετασχηματισμού.

1. Σε 3 erppendorf, καθένα από τα οποία περιέχει 100μl βακτηρίων TOP10 σε στοκ γλυκερόλης, μεταφέρουμε το προϊόν κλωνοποίησης. Σε κάθε erppendorf προστίθεται και μία διαφορετική αναλογία ενθέματος : πλασμιδίου (1:1, 3:1, 5:1).
2. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Μεταφορά των erppendorf από τον πάγο στους 42 °C για 2 λεπτά (heatshock) και κατόπιν απευθείας στον πάγο για ακόμη 3 λεπτά.
4. Προσθήκη 700μl LB σε κάθε erppendorf. Ακολουθεί καλή ανάδευση πάνω-κάτω και επώαση για 1 ώρα στον επωαστήρα, σε συνθήκες 37 °C και 160rpm.
5. Φυγοκέντρωση στα 13.000rpm για 1 λεπτό. Κατόπιν, το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά, διατηρώντας περίπου 100μl θρεπτικού LB για την επαναδιάλυση του ιζήματος.
6. Σε 3 τρυβλία LB με αμπικιλίνη (1:1, 3:1, 5:1) προστίθεται κατά προσέγγιση 3 σταγόνες από το erppendorf με την αντίστοιχη αναλογία και επιστρώνονται πάνω στο στερεό θρεπτικό με τη χρήση αποστειρωμένου spreader.
7. Την επόμενη μέρα, προετοιμάζεται στοκ LB με αμπικιλίνη σε αναλογία 1:1.000 (55ml LB και 55μl αμπικιλίνη) και μοιράζεται σε 12 δοκιμαστικούς σωλήνες (4ml στον καθένα). Σε κάθε αναλογία αντιστοιχούν 4 δοκιμαστικοί σωλήνες.
8. Με τιπάκι λαμβάνεται μία αποικία από το τρυβλίο και μολύνεται το θρεπτικό ενός δοκιμαστικού σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ώστε να μολυνθούν και οι υπόλοιποι δοκιμαστικοί σωλήνες με την αποικία της αντίστοιχης αναλογίας.
9. Επώαση overnight στον επωαστήρα (37 °C , 160rpm).

4.11 Απομόνωση DNA από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και δοκιμαστικές πέψεις

Επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η απομόνωση του προϊόντος κλωνοποίησης από τα μετασχηματισμένα βακτήρια με τη μέθοδο mini preparation [βλ. ενότητα 4.6 «Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation)»]. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενσωμάτωσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα, καθώς και του σωστού προσανατολισμού του, απαιτείται η διεξαγωγή δοκιμαστικών πέψεων, ακολουθούμενες από ηλεκτροφόρηση για την ανάλυση του πλασμιδιακού DNA.

Αρχικά πραγματοποιείται μονή πέψη με το ένζυμο XhoI, προκειμένου να εκτιμηθεί το συνολικό μέγεθος της ανηγμένης κατασκευής. Η παρουσία ζώνης περίπου στα 6.000bp υποδηλώνει θετικό κλώνο που έχει προσλάβει τον φορέα με το ένθεμα. Οι θετικές αποικίες από την πρώτη πέψη υποβάλλονται σε μία δεύτερη, διπλή πέψη με τα ένζυμα SacI και XhoI τα οποία κόβουν εκατέρωθεν του ενθέματος, απελευθερώνοντας το ένθεμα. Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της δεύτερης πέψης αναμένεται η εμφάνιση 2 ζωνών: μία ζώνη στα 1.000bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα και μία δεύτερη ζώνη στα ~5.000bp που αντιπροσωπεύει τον πλασμιδιακό φορέα.

1. Πραγματοποιούνται μια σειρά από πέψεις, αρχικά μονές ακολουθούμενες από διπλές, προκειμένου να λάβουμε δύο τουλάχιστον θετικές αποικίες.

- Το βασικό μείγμα πέψης που παρασκευάζεται για κάθε μονή πέψη είναι το εξής: 2 μl buffer, 0,25 μl XhoI, 0,5 μg DNA και ο υπόλοιπος όγκος σε ddH₂O μέχρι να συμπληρωθούν τα 20 μl της αντίδρασης.
- Αντίστοιχα, το βασικό μείγμα πέψης που παρασκευάζεται για κάθε διπλή πέψη είναι το εξής: 2 μl buffer, 0,25 μl SacI, 0,25 μl XhoI, 0,5 μg DNA και ο υπόλοιπος όγκος σε ddH₂O μέχρι να συμπληρωθούν τα 20 μl της αντίδρασης.

2. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 1 ώρα στην περίπτωση μονής πέψης και για 1,5 ώρα στην περίπτωση διπλής πέψης και ηλεκτροφόρηση (βλ. ενότητα 4.2 «Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης»).

4.12 Μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10 με το DNA που απομονώθηκε από τις 2 θετικές αποικίες

Εφόσον βρεθούν οι δύο θετικές αποικίες, με το DNA που απομονώθηκε πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων E. Coli TOP10 (βλ. Ενότητα «4.10 Μετασχηματισμός βακτηρίων με το προϊόν κλωνοποίησης »), τα οποία καλλιεργούνται σε τρυβλίο LB με αμπικιλίνη 1:1000, με σκοπό να λάβουμε πολλαπλές αποικίες με το σωστό προϊόν κλωνοποίησης και συνεπώς επαρκή ποσότητα πλασμιδιακού DNA για τις μετέπειτα πειραματικές διαδικασίες. Ακολουθεί μεταφορά των αποικιών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με LB και αμπικιλίνη 1:1000 (40ml LB, 40μl αμπικιλίνη) και επώαση overnight στον επωαστήρα (37 °C, 160 rpm), με σκοπό την απομόνωση του DNA με στήλη.

4.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini preparation) με στήλη

Την επόμενη μέρα, το DNA απομονώνεται από τις καλλιέργειες στους δοκιμαστικούς σωλήνες σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel «Plasmid DNA purification» [17]. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο βασίζεται στη χρήση ειδικών στηλών καθαρισμού, επιτρέποντας την απομόνωση πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας. Πιο αναλυτικά:

1. Μεταφορά καλλιέργειας σε eppendorf (χωρητικότητας 700μl, όσα eppendorf χρειάζονται για όλη την καλλιέργεια) και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
2. Προσθήκη 80μl παγωμένου διαλύματος επαναδιάλυσης (resuspension buffer) ανά eppendorf και καλή επαναδιάλυση (τεχνική up and down με χρήση πουάρ). Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το περιεχόμενο τριών eppendorf ενώνεται σε ένα. Προστίθενται ανά eppendorf 250μl διαλύματος λύσης (lysis buffer), το οποίο έχει θερμανθεί στο 37°C, και ακολουθεί ήπια ανακίνηση. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 300μl διαλύματος εξουδετέρωσης (neutralization buffer) ανά eppendorf και ήπια ανακίνηση. Επώαση για περίπου 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς να υπερβαίνονται τα 5 λεπτά).
5. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Σε σωληνάκι συλλογής (collection tube) τοποθετείται η ειδική στήλη καθαρισμού (NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid)) που περιέχεται στο kit. Λαμβάνονται 700μl υπερκειμένου από το βήμα 5 με πιπέτα και μεταφέρονται στη στήλη. Συνολικά

χρησιμοποιήθηκαν 4 στήλες με τα αντίστοιχα collection tubes (2 στήλες για κάθε θετική αποικία).

7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διήθημα απορρίπτεται, η στήλη επανατοποθετείται στο collection tube και τα βήματα 6 και 7 επαναλαμβάνονται για το υπόλοιπο δείγμα, έως ότου διέλθει όλος ο όγκος του λυμένου δείγματος μέσω της στήλης.

8. Επόμενο βήμα αποτελούν οι πλύσεις της μεμβράνης. Για το σκοπό αυτό, προστίθενται στη στήλη 600μl αιθανολικού διαλύματος πλύσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό. Το διήθημα απορρίπτεται, η στήλη επανατοποθετείται στο collection tube και διεξάγεται ακόμη μία φυγοκέντρηση στα 11.000g για 4 λεπτά προκειμένου να στεγνώσει πλήρως η αιθανόλη.

9. Τελευταίο βήμα αποτελεί η έκλυση του DNA από την στήλη, που επιτυγχάνεται με 2 εκλούσεις. Οι στήλες μεταφέρονται σε νέα erpendorf και προστίθενται 30μl διαλύματος έκλυσης (elution buffer), το οποίο έχει θερμανθεί στους 72°C. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό (1^η έκλυση). Για την 2^η έκλυση, οι στήλες τοποθετούνται σε νέα erpendorf, όπου προστίθενται 20μl διαλύματος έκλυσης και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

Η συγκέντρωση του DNA που απομονώσαμε μπορεί να μετρηθεί στο Nanodrop.

4.14 Τελική επιβεβαιωτική πέψη του DNA που απομονώθηκε με στήλη

Για την επιβεβαίωση ότι το DNA που απομονώθηκε με την ανωτέρω διαδικασία αντιστοιχεί πράγματι στο επιθυμητό προϊόν κλωνοποίησης (βλ. Εικόνα 8. «Αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα PGL3 basic που έχει προσλάβει το ένθεμα HJV promoter»), κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθεί μία τελική ενζυμική πέψη η οποία θα επιβεβαιώσει την ορθότητα της κατασκευής.

1. Παρασκευή μείγματος πέψης:

	Αποικία 1	Αποικία 2
H₂O	15,5 μl	15 μl
Buffer	2 μl	2 μl
SacI	0.25 μl	0.25 μl
XhoI	0.25 μl	0.25 μl
DNA	2 μl	2,5 μl

Σημείωση: Η ποσότητα του DNA (σε μl) που απαιτείται από κάθε αποικία υπολογίζεται με βάση την συγκέντρωση του απομονωμένου DNA και το γεγονός ότι απαιτείται 0,5μg DNA από την κάθε αποικία.

2. Επώαση για 1,5 ώρα στους 37°C.

3. Προσθήκη 4μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και ηλεκτροφόρηση (βλ. ενότητα 4.2 «Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης»).

4.15 Απόψυξη και ανακαλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7

Το επόμενο μέρος του πειράματος περιλαμβάνει τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με το προϊόν κλωνοποίησης, η επαγωγή υποξίας και ο έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIV promoter.

Πρωταρχικό βήμα αποτελεί η απόψυξη των κυττάρων Huh7 από το υγρό άζωτο (-196°C), όπου διατηρούνται για μακροχρόνια αποθήκευση. Για τον σκοπό αυτό, επιδιώκεται η ταχεία απόψυξη (~1 λεπτό) σε υδατόλουτρο στους 37°C και η μεταφορά των κυττάρων σε προθερμασμένο θρεπτικό μέσο. Πιο αναλυτικά:

1. Το cryovial με τα κύτταρα μεταφέρεται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο (37°C) μέχρι να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.
2. Το περιεχόμενο του cryovial μεταφέρεται αργά (σταγόνα-σταγόνα) σε falcon που περιέχει 10ml προθερμασμένο θρεπτικό μέσο DMEM +/+.
3. Φυγοκέντρωση για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο αναρροφάται με παστέρ, ώστε να απομακρυνθεί ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας DMSO (dimethyl sulfoxide), ο οποίος είναι τοξικός για τα κύτταρα, αφήνοντας λίγο θρεπτικό.
4. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα που περιέχει 6ml DMEM +/+ και αποθηκεύονται στους 37°C στην νορμοξία.

Καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, καταναλώνουν το θρεπτικό μέσο που τους παρέχεται και παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι μεταβάλλουν το pH της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό, είναι κρίσιμη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, δηλαδή το μοίρασμα των κυττάρων σε περισσότερο χώρο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως εξής:

1. Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου DMEM με γυάλινη παστέρ.
2. Πλύση των κυττάρων με PBS 1x: προσθήκη 5ml PBS, φροντίζοντας να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στον πάτο της φλάσκας, και αφαίρεσή του.
3. Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση στους 37 °C για 5 λεπτά. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει από τον πάτο της φλάσκας και ``κολυμπάνε`` στο θρεπτικό.
4. Στη φλάσκα με τα κύτταρα προστίθεται 4ml θρεπτικό μέσο DMEM, για την επαναιώρηση των κυττάρων και την απενεργοποίηση της θρυψίνης.
5. Ποσότητα 1ml από το αιώρημα μεταφέρεται σε νέα φλάσκα με 8ml DMEM.

4.16 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με PEI

Η παροδική διαμόλυνση αποτελεί μία μέθοδο εισαγωγής πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και έκφρασης των κλωνοποιημένων γονιδίων. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος στηρίζεται στην χρήση του μη λιπιδικού κατιονικού πολυμερούς PEI (polyethylenimine). Λόγω του θετικού του φορτίου, το PEI σχηματίζει σύμπλοκο με το αρνητικά φορτισμένο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Το σύμπλοκο αυτό είναι συμπαγές, σταθερό και θετικά φορτισμένο, οπότε αλληλεπιδρά με τα ανιονικά κατάλοιπα της λιπιδικής

μεμβράνης και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Από την προηγούμενη μέρα τα κύτταρα έχουν μοιραστεί σε δύο 12-well plates.
2. Προετοιμασία του μίγματος διαμόλυνσης (transfection mix). Σε falcon προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά (οι ποσότητες αντιστοιχούν σε 1 πηγαδάκι):
 - 150μl θρεπτικό DMEM -/-
 - 1μg DNA (0,9μg DNA του φορέα PGL3 basic με τον HJV promoter + 0,1μg DNA Renilla)
 - 2μl PEI
 - Γενικά η αναλογία είναι 1μg DNA: 2μl PEI.

Σημείωση: Το πείραμα διαθέτει θετικό και αρνητικό κοντρόλ, για τα οποία παρασκευάζεται ξεχωριστά το μίγμα διαμόλυνσης (περιέχει τα ίδια συστατικά και ποσότητες με μόνη διαφορά το DNA). Θετικό κοντρόλ αποτελεί το ίδιο πλασμίδιο PGL3 το οποίο διαθέτει κλωνοποιημένο 5 φορές το HRE του VEGF, ενώ αρνητικό κοντρόλ το πλασμίδιο PGL3 basic άδειο.

Ακολουθεί καλή ανάμειξη του μίγματος με πιπετάρισμα και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Προσθήκη 350μl DMEM 5% FBS στο μίγμα διαμόλυνσης.
4. Αφαίρεση θρεπτικού από τα πηγαδάκια και πλήση των κυττάρων με PBS 1x.
5. Σε κάθε πηγαδάκι μοιράζονται 500μl από το μίγμα διαμόλυνσης.
6. Επώαση για 2 ώρες στον επωαστήρα (37 °C).
7. Μετά το τέλος της επώασης, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με DMEM πλήρες (προσθήκη 1ml DMEM +/+ ανά πηγαδάκι).
8. Επώαση των 2 plates κυττάρων για 24 ώρες στη νορμοξία, 37 °C.
9. Την επόμενη μέρα το ένα plate με τα κύτταρα μεταφέρεται στην υποξία (37 °C, 1% O₂), για 16 ώρες.

Σημείωση: Είχαμε 3 βιολογικές επαναλήψεις για καθένα από τα δείγματα, αρνητικό και θετικό κοντρόλ. Τα τελευταία 3 πηγαδάκια χρησιμοποιήθηκαν για την μετέπειτα διεξαγωγή πειράματος Western Blot.

4.17 Δοκιμασία λουσιφεράσης

Το επόμενο πρωί διεξάγεται η δοκιμασία λουσιφεράσης. Η παρούσα μέθοδος χρησιμοποιείται για την ποσοτική αξιολόγηση της μεταγραφικής ενεργότητας γονιδίων, αξιοποιώντας το ένζυμο λουσιφεράση (πυγολαμπίδας και ρενίλλας), τα οποία εκπέμπουν φως με το φαινόμενο της βιοφωταύγειας όταν προστεθεί το υπόστρωμά τους. Στο παρόν πείραμα, μελετάται η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της αιματζουβελίνης, ο οποίος έχει κλωνοποιηθεί ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης στο πλασμίδιο PGL3 basic. Τα κύτταρα έχουν διαμολυνθεί ήδη από το προηγούμενο στάδιο με το πλασμίδιο PGL3 basic, που περιλαμβάνει

τον υποκινητή HJV promoter καθώς και το γονίδιο λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, και με ένα δεύτερο πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο λουσιφεράσης της ρενίλλα, το οποίο χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των μετρήσεων. Το πείραμα εκτελέστηκε με χρήση των υλικών και του πρωτοκόλλου που περιέχεται στο kit «Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System» της εταιρείας Promega.

1. Προετοιμασία των διαλυμάτων:

- **1x Passive Lysis Buffer (PLB):** 1 μέρος PLB 5x και 4 μέρη ddH₂O. Καλή ανάμειξη.
- **Αντιδραστήριο Stop and Glo:** Υπόστρωμα Stop and Glo 50x και προσθήκη ποσότητας Stop and Glo Buffer ώστε το υπόστρωμα να φτάσει συγκέντρωση 1x.
- Σε ένα 96-well plate μοιράζουμε 20μl LAR II /πηγαδάκι.

2. Προετοιμασία των κυττάρων:

- Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια με πιπέτα.
- Πλύση με 1ml PBS.

3. Προσθήκη 100μl PLB/ πηγαδάκι και επώαση για 15 λεπτά με ανάδευση στην τραμπάλα.

4. Μεταφορά 100μl PLB lysate σε αριθμημένα eppendorf (ένα για κάθε πηγαδάκι).

5. Μέτρηση στο λουμινόμετρο:

1^η μέτρηση: Στο 96-well plate, στο οποίο έχουμε προσθέσει το LAR II, μεταφέρουμε γρήγορα τα δείγματα και εισάγουμε το plate στο λουμινόμετρο. Πραγματοποιείται μέτρηση δραστηριότητας της λουσιφεράσης πυγολαμπίδας.

2^η μέτρηση: Σε κάθε πηγαδάκι του 96-well plate προστίθεται 10μl αντιδραστήριου Stop and Glo. Το plate εισάγεται στο λουμινόμετρο και πραγματοποιείται μέτρηση δραστηριότητας της λουσιφεράσης ρενίλλα.

6. Οι μετρήσεις εξάγονται στο excel και πραγματοποιείται κανονικοποίηση των τιμών.

4.18 Western Blot

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συνθήκη υποξίας και η επαγωγή του HIF-2α πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot), χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον HIF-2α, ώστε να τον εντοπίσουμε, καθώς και για την τουμπουλίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως κοντρόλ για την διασφάλιση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

1. Ετοιμασία δειγμάτων:

- Αφαίρεση θρεπτικού από τα κύτταρα του 12-well plate και πλύση με PBS (για το πιάτο της υποξίας η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα στον υποξικό θάλαμο).
- Προσθήκη 40μl LAEMMLI 2x ανά πηγαδάκι και μεταφορά του λύμματος κυττάρων σε eppendorf.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων ώστε να κατέβει το DNA και υποβολή σε υπέρηχους (sonication) για τη διάσπαση της χρωματίνης.
- Προσθήκη 1M DTT στα δείγματα (τελική συγκέντρωση 50mM) και θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (spin) ώστε να κατέβουν οι υδρατμοί.

2. Προετοιμασία πηκτωμάτων ακρυλαμίδης:

- Τοποθέτηση των τζαμιών, των διαχωριστικών (spacers) και των πλακών σε κατάλληλη συσκευή για την παρασκευή των πηκτωμάτων
- Παρασκευή πηκτής διαχωρισμού (lower gel 10%) και μεταφορά αργά ανάμεσα στα τζάμια. Η πηκτή καλύπτεται με 5ml ddH₂O ώστε το πήκτωμα να κατανεμηθεί ομοιόμορφα και να ισιώσει. Αφήνω για 15 λεπτά για να κρυώσει.
- Ακολουθώ το ddH₂O απορρίπτεται και τοποθετούνται τα χτενάκια στην πηκτή.
- Παρασκευή πηκτής επιστοιβάξης (upper gel), η οποία προστίθεται γρήγορα στη συσκευή πάνω από το lower gel. Αφήνω για 15 λεπτά.

3. Ηλεκτροφόρηση:

- Η πηκτή μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται πλήρως με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (running buffer).
- Φόρτωση 30μl από το δείγμα και 1μl μάρτυρα με χρήση γυάλινης πιπέτας και ηλεκτροφόρηση στα 130 Volt για 1,5 ώρα.

4. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF:

- Αφαίρεση του πηκτώματος ακρυλαμίδης από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθέτησή του σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 1x.
- Εμβάπτιση 6 χαρτιών Whatman σε transfer buffer και της μεμβράνης PVDF σε διάλυμα μεθανόλης 100% ώστε να ενεργοποιηθεί η μεμβράνη.
- Ακολουθεί η εξής τοποθέτηση: 3 χαρτιά Whatman, μεμβράνη PVDF, πήκτωμα ακρυλαμίδης και τέλος 3 χαρτιά Whatman στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς.
- Ηλεκτρομεταφορά στα 50mA για 1 ώρα.

5. Ανοσοανίχνευση:

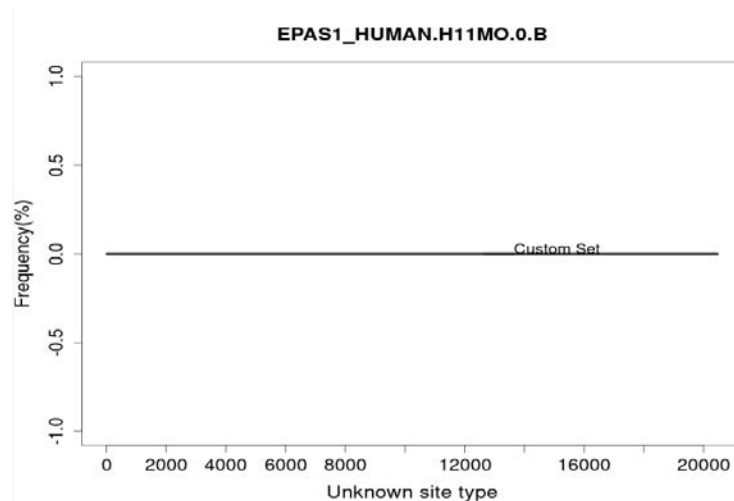
- Πλύσεις της μεμβράνης με TBST και επώαση για 1h σε 5% γάλα TBST στην τραμπάλα.
- Μετά την επώαση, εκτελούνται 2 πλύσεις της μεμβράνης σε TBST και η μεμβράνη κόβεται στη μέση. Το ένα μισό τοποθετείται σε falcon με αντίσωμα για τον HIF-2α (anti-HIF-2α) και το άλλο μισό σε falcon με αντίσωμα για την τουμπουλίνη (anti-tubulin).
- Επώαση ολονύχτια στο coldroom υπό ανάδευση.
- Την επόμενη μέρα, πλύση της μεμβράνης με TBST και επώαση με το δευτερεύων αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP (anti-rabbit) στην τραμπάλα για 1 ώρα.
- Τέλος, εκτελούνται τρεις 5λεπτες πλύσεις του πηκτώματος με TBST, προσθήκη λουμινόλης σε σταγόνες και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων στο Imager με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

5. Αποτελέσματα

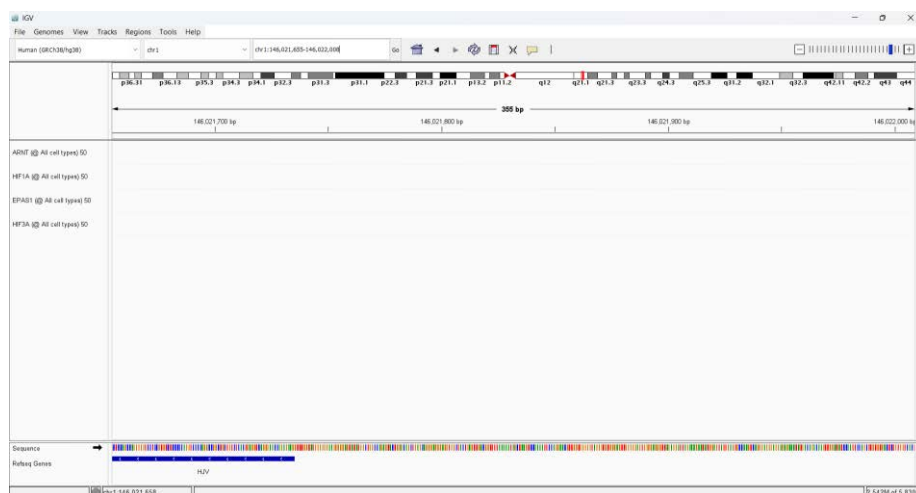
5.1 Βιοπληροφορική αναζήτηση για το HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης

Πρωταρχικό βήμα ήταν η αναζήτηση πιθανού μοτίβου HRE στον υποκινητή της αιματζουβελίνης, μέσω του οποίου ο HIF-2α ελέγχει μεταγραφικά το γονίδιο. Η αναζήτηση στηρίχθηκε στην χρήση ειδικών προγραμμάτων και, συγκεκριμένα, στο Signal Search

Analysis της Expasy, ένα πρόγραμμα αναζήτησης HRE στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και στην πλατφόρμα CHIPAtlas, που οπτικοποιεί περιοχές δέσμησης πρωτεϊνών στο DNA ώστε να διερευνηθεί η πιθανή δέσμηση του HIF-2α στο γονιδίωμα.

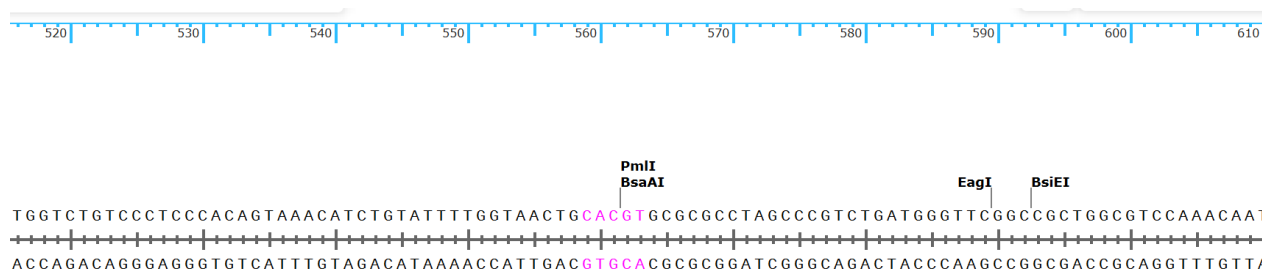


Εικόνα 9. Έλεγχος ύπαρξης μοτίβου HRE στο γονίδιο της HJV με χρήση του προγράμματος Expasy SSA. Το αποτέλεσμα δείχνει απουσία εντοπισμού HRE στο γονίδιο της αιμοτζουβελίνης.



Εικόνα 10. CHIP-atlas δεδομένα για πρόσδεση των HIF στην HJV. Η εικόνα δείχνει απουσία θέσεων δέσμησης των HIF γονίδιο της αιμοτζουβελίνης.

Η αναζήτηση και στα δύο προγράμματα ήταν αρνητική, υποδηλώνοντας απουσία δεδομένων στη βιβλιογραφία πάνω στο κομμάτι αυτό. Ωστόσο, μέσω αναζήτησης στο γονιδίωμα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene, βρέθηκε το μοτίβο HRE με τη συναινετική αλληλουχία 5'ACGTG 3', 559 βάσεις από την αρχή (καθοδικά) του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης.



Εικόνα 11. Τμήμα από την αλληλουχία του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης όπου επισημαίνεται το HRE. Εντοπίζεται στις 559 βάσεις από την αρχή του υποκινητή.

Παρακάτω παρατίθεται ολόκληρη η αλληλουχία του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης, όπου επισημαίνεται το HRE, το οποίο είναι και το μοναδικό HRE που εντοπίζεται.

>1 dna:chromosome chromosome:GRCh38:1:146036736:146038236:1

5' AGCCAGCTTCCTATTATAGACACTTAGGTTATTTCTAGCCCTTTGCTCTTTGGAACAAAAA
AATGCTGTCATATACGGTCTTGTACATATGTAATTTTGCGCATGTGTGGAATAAATGTCC
AGGAACTAGAAATTGACTTTTCTTAAAGCTGTGAAACAAGATACTACTACAGAATTTTAA
ATAGGAGAAATTCCAGAGAGCTTCCTTTTAATTTTCCTCTTGTAGGTTTTTCCTGCAGTC
TAAATTGCTTAGCCTAGAAATAAACGGGAAGACAAACCTGATTATTTAGTTCTGATACTC
TAAAGGAATCAAGCGTATTTTCAGATGCGTTGGTGGTATAGTGGTGAGCATAGCTGCCTTC
CAAGCAGTTGACCCGGGTTTCGATTCCCGGCCAACGCAGTGTCAGTTTTTCTCTTCAGCTT
TTTAGACTGAGTAGGCCTGGAAACCGAGCAAAGTAGGGAACACAGGAAAAGAGTTTTGA
CCACTTTTGTGTCTAGGTCTGCACCAAGTATGGTCTGTCCCTCCACAGTAAACATCTGTA
TTTTGGTAACTG **CACGT** GCGCGCCTAGCCCGTCTGATGGGTTTCGGCCGCTGGCGTCCAAA
CAATAACTCTCCTAGGGGTCTAGGGAAGTTAACAATAACTCTCCTAGGGGTCTAAGGAAG
TGTCTGAAATAGAGGCTGGTTGGATTGTTTTTCTGAATCGGCAGAGGTGGCTCTGATAT
ATTTATGAGTCAAGATGAGGAAGTCAGCACAAAGCTCCCACAATGCCAGAGAGTACACAGC
GCTTCTTGTACCTGTGAGGGAAGCAAGAAATTAAGACGGGGCTCTCATCCCCCTCCCCAGC
TCACTAGCTCCGTTTTTCTTCCGGTTCCACCATTCTGGGAAGAGAAACCTCAATTCCGTG
GTACAGGCTGCAGATGTAATTTGAAAAATCCTTCGAGGCTGCCCCCTCTCATCCCTGGGCG
AAGCAGCTTGATTCCTTGGAGGGGGAAGAGGGAATGGAGGCAGAGAGGTGAGAGGAGA
GAGGCGAGAGGCGGCGTGGTCCCGGGTTGCAGCTGACGCTTTCTGCCCTCTAGTCAGGAC
CTTGGCCCGCCGCCGCCAGCGGAGCGGGTGGTGCTATCGCTGGCATCGAGGGATTTAGA
GTCTAAGAACTGATTCAGGTGTCTGGAGCTTCAAGGTTGCAGAGTGAAAAAGTTTGGAAT
TGATTGATGCGGACGTCAGGGACTGGCCAAATAAAAGTAGCACGAAATAGCCATTCCTAT

TTCAAGAGGCATTAAATCCAGCTGTAGCGCGCCGCCTGGTTAGTGGCTCGCCGTGATCGTA
TAGTGGTTAGTACTCTGCGTTGTGGCCGCAGCAACCTCGGTTCTGAATCCGAGTCACGGCA
GGTGGTTCTAACTTGCTGGGGTGGCGGTTTTTTTTTTTTTAATTAACACTTTTAAAAGA
GTGACACATGCTTGTAATTCTGCCTTCGCTTAAGGCATCCCCGCGGAAGTGCAGTCCACA
G 3'

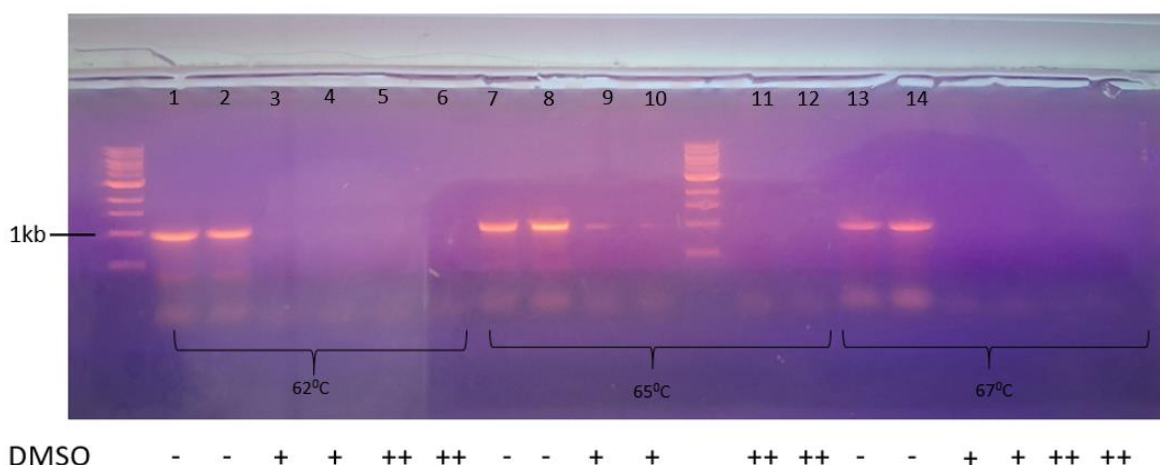
5.2 Ενίσχυση τμήματος του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE με PCR

Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές που στοχεύουν στην ενίσχυση ενός τμήματος 1.000 βάσεων της περιοχής του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης που περιλαμβάνει το πιθανό HRE στη θέση 559 ενώ η αλληλουχία, συγκεκριμένα, ξεκινά από τη θέση 188 του υποκινητή και τελειώνει στη θέση 1.187.



Εικόνα 12. Αναπαράσταση της θέσης υβριδοποίησης των εκκινητών πάνω στον *HJV promoter*. Το τμήμα που ενισχύουν έχει μέγεθος 1.000bp. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Biorender.

Το αποτέλεσμα της ενίσχυσης επιβεβαιώνεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, όπου παρατηρείται η αναμενόμενη ζώνη στο 1kb.



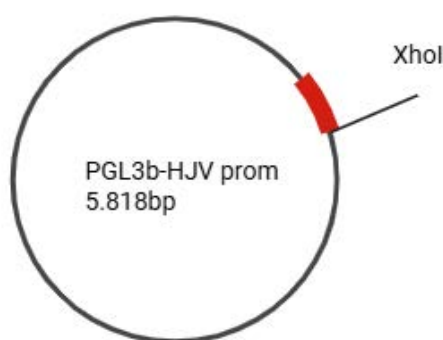
Εικόνα 13. Ενίσχυση τμήματος του υποκινητή της *HJV* με PCR.

Το τμήμα που ενισχύεται έχει μέγεθος 1.000bp. Πραγματοποιήθηκαν 9 αντιδράσεις, με 2 επαναλήψεις η καθεμία, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και περιεκτικότητας σε DMSO. Παρατηρείται στις διαδρομές 1,2,7,8,13 και 14 το προϊόν της αντίδρασης στο αναμενόμενο μέγεθος (1kb).

Συμπερασματικά, η ενίσχυση του τμήματος του υποκινητή του γονιδίου της αιμοτζουβελίνης, που περιέχει την αλληλουχία ενδιαφέροντος (HRE του HIF-2α), επιτεύχθηκε και προχωρήσαμε στην κλωνοποίησή του.

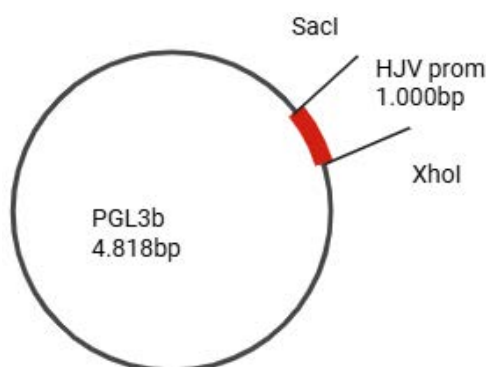
5.3 Εύρεση κλώνων με το σωστό προϊόν κλωνοποίησης

Αφού πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic και ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων TOP10 με το προϊόν κλωνοποίησης, είναι αναγκαίο να βρεθούν οι αποικίες που έχουν λάβει το σωστό προϊόν, δηλαδή με το εισαγμένο ένθεμα και με τον κατάλληλο προσανατολισμό (βλ. Εικόνα 8). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές πέψεις, αρχικά μονές με το ένζυμο XhoI, ώστε να βρεθούν οι αποικίες που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το ένθεμα. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης, αναμένοντας να δούμε ένα προϊόν στα 6.000 ζεύγη βάσεων, το οποίο αντιστοιχεί στο ανηγμένο πλασμίδιο με το ένθεμα.

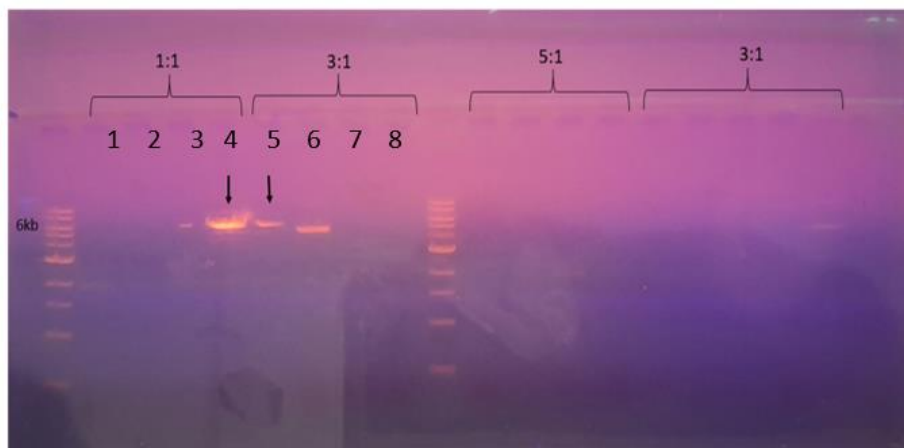


Εικόνα 14. Θέση κοπής του περιοριστικού ενζύμου XhoI και το προϊόν που προκύπτει. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Biorender.

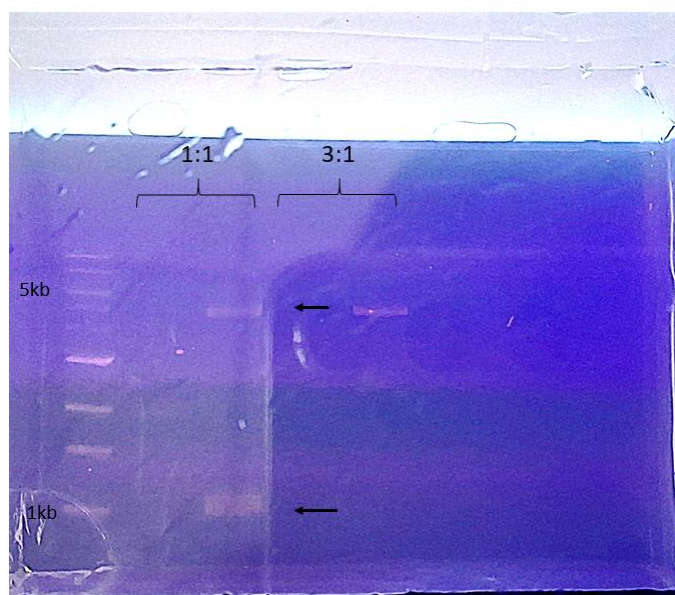
Ακολούθησε διπλή πέψη των θετικών αποικιών της μονής πέψης με τα ένζυμα SacI και XhoI, ηλεκτροφόρηση και έλεγχος για την ύπαρξη δύο ζωνών: αναμένεται 1 ζώνη στα 5.000bp που αντιστοιχεί στον άδειο πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic και 1 δεύτερη ζώνη στα 1.000bp που αντιστοιχεί στον HJV promoter. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου βρεθούν δύο θετικές αποικίες.



Εικόνα 15. Θέση κοπής των περιοριστικών ενζύμων XhoI και SacI και το προϊόν που προκύπτει. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Biorender.

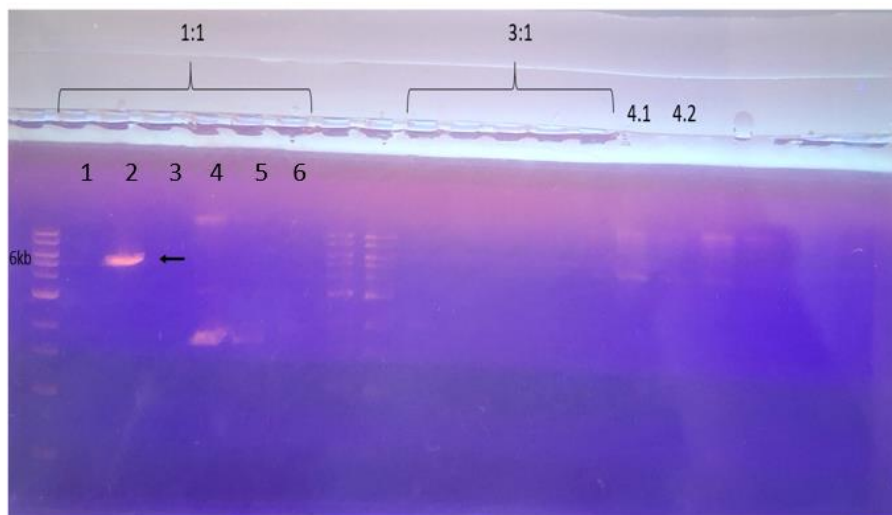


Εικόνα 16. Μονή πέψη με *XhoI* του πλασμιδίου που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Παρατηρείται στις διαδρομές 4 και 5 το αναμενόμενο προϊόν στα 6.000 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στο ανηγμένο πλασμίδιο με το ένθεμα.



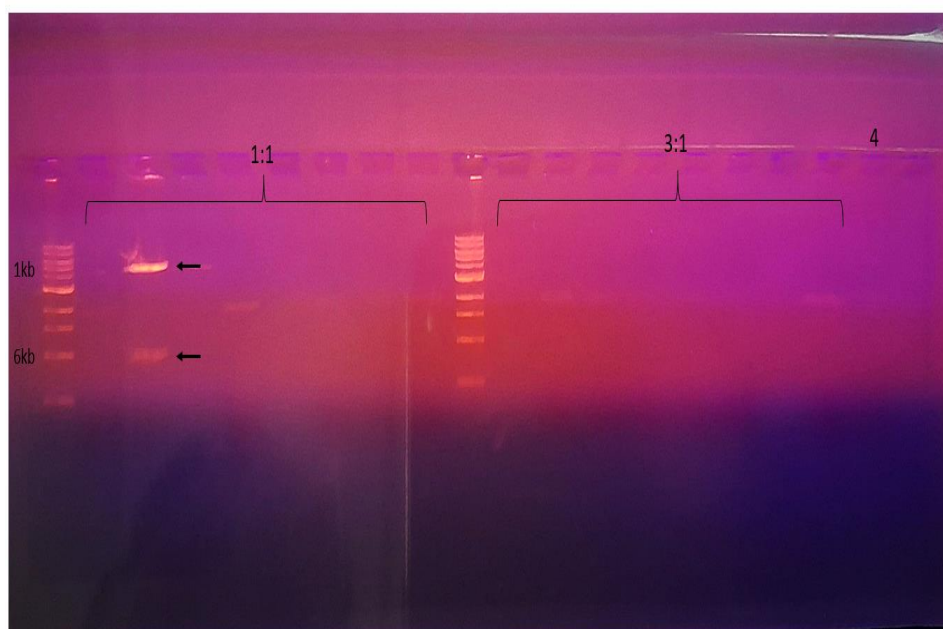
Εικόνα 17. Διπλή πέψη με *SacI* και *XhoI* των θετικών αποικιών της μονής πέψης. Παρατηρείται πως η μία μόνο αποικία είναι εν τέλει η σωστή, δίνοντας τις 2 αναμενόμενες ζώνες στα 5kb και 1kb.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου βρεθούν δύο θετικές αποικίες (μονή πέψη-ηλεκτροφόρηση, διπλή πέψη-ηλεκτροφόρηση).



Εικόνα 18. Μονή πέψη με *XhoI* του πλασμιδίου που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

Παρατηρείται στη διαδρομή 2 το αναμενόμενο προϊόν στα 6.000 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στο ανηγμένο πλασμίδιο με το ένθεμα.



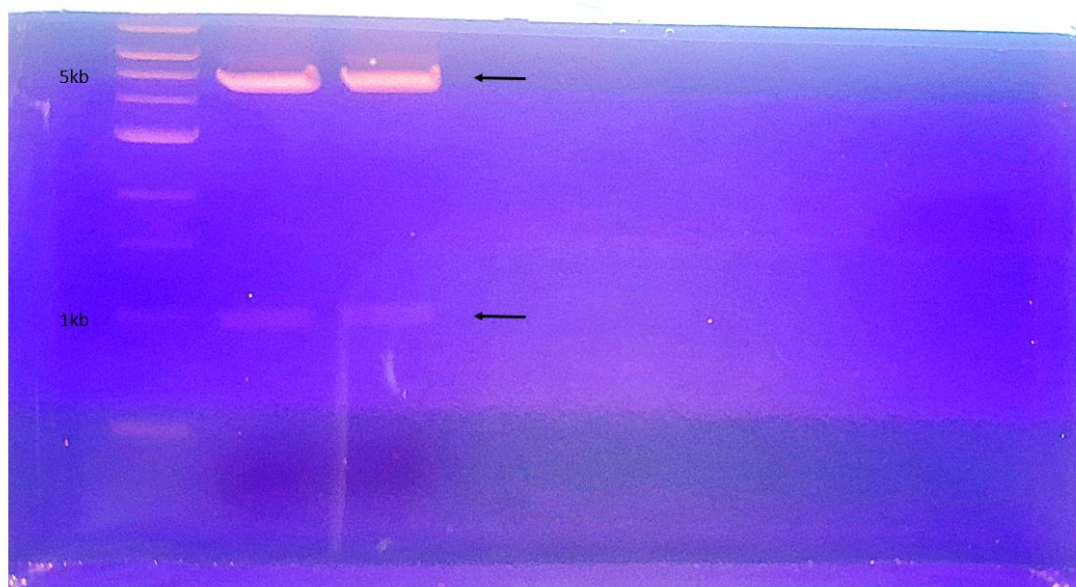
Εικόνα 19. Διπλή πέψη με *SacI* και *XhoI* της θετικής αποικίας της μονής πέψης.

Παρατηρείται πως η θετική αποικία από την μονή πέψη επιβεβαιώνεται, δίνοντας τις 2 αναμενόμενες ζώνες στα 5kb και 1kb.

5.4 Τελική επιβεβαιωτική πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε με στήλη

Εφόσον βρέθηκαν οι δύο θετικές αποικίες, που έχουν προσλάβει δηλαδή τον πλασμιδιακό φορέα με το ένθεμα HJV promoter (βλ. Εικόνα 8), με το DNA που απομονώθηκε από τις θετικές αποικίες μετασχηματίστηκαν δεκτικά βακτήρια *E. Coli* TOP10 με σκοπό την παραγωγή πολλαπλών αποικιών με το σωστό προϊόν κλωνοποίησης καθώς και την απόκτηση επαρκούς ποσότητας DNA για τις επόμενες πειραματικές διαδικασίες. Αφού απομονώθηκε, επομένως, το πλασμιδιακό DNA από τα νέα μετασχηματισμένα βακτήρια, πραγματοποιήθηκε

μία τελική επιβεβαιωτική διπλή πέψη, με τα ένζυμα *SacI* και *XhoI*, για τον έλεγχο της ορθότητας του προϊόντος κλωνοποίησης.



Εικόνα 20. Διπλή πέψη με *SacI* και *XhoI* του DNA που απομονώθηκε με στήλη από τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

Επιβεβαιώνεται η ορθότητα του προϊόντος κλωνοποίησης και των δύο βακτηριακών αποικιών, από την εμφάνιση των 2 αναμενόμενων ζωνών στα 5kb και 1kb.

5.5 Έλεγχος της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου υποκινητή με αλληλούχιση

Το DNA που απομονώθηκε και από τις δύο θετικές αποικίες στάλθηκε για αλληλούχιση, προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η ορθότητα της κλωνοποίησης. Πράγματι, η αναμενόμενη αλληλουχία με την αλληλουχία που μας στάλθηκε πίσω από την εταιρεία ταυτίζονται.

5.6 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7 με PEI και δοκιμασία λουσιφεράσης

Εν τέλει, με το πλασμιδιακό DNA υψηλής καθαρότητας που απομονώθηκε με Mini preparation με τη χρήση ειδικών στηλών, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων Huh7, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο διαμόλυνσης PEI. Ακολούθως διεξήχθη δοκιμασία λουσιφεράσης, προκειμένου να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης υπό συνθήκη επαγωγής του HIF-2α (υποξία). Η ποσοτικοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας βασίστηκε στη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας, καθώς ο υποκινητής της αιμοτζουβελίνης έχει ενσωματωθεί ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic, ενώ η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με βάση την δραστηριότητα της λουσιφεράσης Renilla. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με την εισαγωγή των δειγμάτων στο λουμινόμετρο και οι τιμές που μας εμφανίζει εξάγονται στο excel προκειμένου να γίνει κανονικοποίηση. Είχαμε 3 βιολογικές επαναλήψεις για καθένα από το δείγμα (HJV), θετικό και αρνητικό κοντρόλ. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι τιμές που αντιστοιχούν στον μέσο όρο των τριών επαναλήψεων.

RLU	Νορμοξία	Υποξία
HJV	0,165	0,31
Ctrl +	0,13	1,731
Ctrl -	0,083	0,692

Πίνακας 1. Οι κανονικοποιημένες τιμές της δοκιμασίας λουσιφεράσης.

RLU=Relative Luciferase Units, οι τιμές της δραστηριότητας της λουσιφεράσης πυγολαμπίδας μετά την κανονικοποίηση Ctrl -=το αρνητικό κοντρόλ, Ctrl +=το θετικό κοντρόλ.

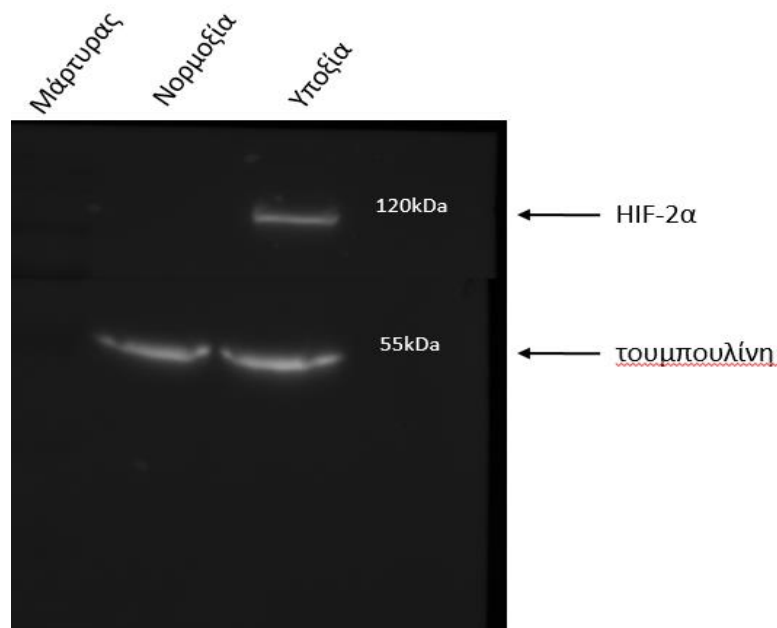
FC Hypoxia	
HJV	1,875
Ctrl +	13,271
Ctrl -	8,334

Πίνακας 2. Ο βαθμός μεταβολής του μέσου όρου των δειγμάτων (HJV), αρνητικού (Ctrl-) και θετικού (Ctrl+) κοντρόλ στην υποξία.

Ερμηνεύοντας των Πίνακα 1, φαίνεται πως η δραστηριότητα της λουσιφεράσης, η οποία αντανακλά την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης, σχεδόν διπλασιάζεται στην υποξία σε σύγκριση με τη νορμοξία. Δεδομένου ότι η υποξία αποτελεί τη συνθήκη επαγωγής του HIF-2α, μπορούμε να υποθέσουμε πως ο HIF-2α ελέγχει μεταγραφικά τον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης και είναι πιθανώς υπεύθυνος για την επαγωγή του γονιδίου. Η ορθότητα του πειράματος τεκμηριώνεται από τα πειράματα ελέγχου. Ως θετικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πλασμιδιακός φορέας ο οποίος διαθέτει κλωνοποιημένο 5 φορές το HRE του VEGF, και παρατηρείται σημαντικός πολλαπλασιασμός της δραστηριότητας της λουσιφεράσης, όπως αναμενόταν. Ωστόσο στο αρνητικό κοντρόλ, που περιλάμβανε το κενό πλασμίδιο PGL3 basic, παρόλο που αναμενόταν αμελητέα μεταβολή στη δραστηριότητα της λουσιφεράσης μεταξύ νορμοξίας και υποξίας, παρατηρείται αύξηση της τιμής της λουσιφεράσης. Η αύξηση αυτή πιθανώς οφείλεται σε επιμόλυνση του αρνητικού κοντρόλ, η οποία χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

Στον Πίνακα 2 αναγράφονται οι τιμές του βαθμού μεταβολής της δραστηριότητας λουσιφεράσης, που αντιστοιχούν στον πολλαπλασιασμό της μεταγραφικής ενεργότητας υπό συνθήκη υποξίας σε σύγκριση με τη νορμοξία. Συγκεκριμένα, η έκφραση του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης σχεδόν διπλασιάζεται στην υποξία, ενώ το θετικό κοντρόλ εμφανίζει την αναμενόμενη αύξηση. Το αρνητικό κοντρόλ ωστόσο παρουσιάζει οκταπλάσια αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας στην υποξία, γεγονός που χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση.

5.7 Western Blot



Εικόνα 21. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών. Διακρίνεται ο HIF-2α και η τουμπουλίνη.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών δείχνουν ορθά τον εντοπισμό της τουμπουλίνης στα 55kDa, το οποίο πρόκειται για το μοριακό της βάρος, τόσο στην νορμοξία όσο και στην υποξία, επιβεβαιώνοντας την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Επίσης, διακρίνεται ο HIF-2α στα 120kDa αποκλειστικά στη συνθήκη υποξίας, επιβεβαιώνοντας την επαγωγή της υποξίας και την έκφραση της πρωτεΐνης.

6. Συζήτηση

Η αιμοτζουβελίνη πρόκειται για μία μεμβρανική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο HFE2 και αποτελεί μέλος της οικογένειας των μορίων απωθητικής καθοδήγησης (RGM family). Λειτουργεί ως BMP συνυποδοχέας, μία υποοικογένεια κυτοκινών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF-β. Η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης περιλαμβάνει τη σύνδεση των BMP προσδετών στους BMP υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και τον σχηματισμό συμπλόκου. Η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad1/5/8 στο κυτταρόπλασμα, οι οποίες σχηματίζουν ετερομερές σύμπλοκο με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου δρουν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων [2].

Ο βιολογικός ρόλος της αιμοτζουβελίνης έγκειται στη ρύθμιση της έκφρασης της εψιδίνης, οδηγώντας μέσω της οδού σηματοδότησης BMP-HJV-SMAD στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της εψιδίνης, λόγω των ειδικών στοιχείων απόκρισης στις BMP που εντοπίζονται στον υποκινητή του γονιδίου της εψιδίνης Hamp [1]. Η εψιδίνη αποτελεί μία πεπτιδική ορμόνη ηπατικής προέλευσης που συνιστά έναν βασικό ρυθμιστή της συστημικής ομοιοστασίας του σιδήρου. Ασκεί τη δράση της μέσω επαγωγής της ουβικιτινίωσης και, συνεπώς, της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης της φερροπορτίνης, της μοναδικής γνωστής πρωτεΐνης εξαγωγής σιδήρου από τα κύτταρα. Η αναστολή της φερροπορτίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης καθώς και της απελευθέρωσης του διαιτητικού σιδήρου από τα εντεροκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα αντίστοιχα [5].

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως μεταλλάξεις στο γονίδιο HFE2 αλλά και σε οποιαδήποτε από τις πρωτεϊνικές επικράτειες της αιμοτζουβελίνης διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης και μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση νεανικής αιμοχρωμάτωσης, μία κληρονομική νόσο που χαρακτηρίζεται από υπερβολική συσσώρευση σιδήρου στον οργανισμό [2].

Πέραν της ρύθμισης της συστημικής ομοιοστασίας του σιδήρου από την εψιδίνη, εμπλέκονται και ορισμένα μόρια-κλειδιά, όπως το κυτόχρωμα b561 DCYTB και ο μεταφορέας μετάλλων DMT1. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες έχουν αναδείξει τον HIF-2α ως έναν σημαντικό ρυθμιστή της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου, καθώς ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων μεταφορέων σιδήρου στα εντεροκύτταρα [8].

Ο HIF-2α, επίσης γνωστός ως EPAS1, αποτελεί το δεύτερο μέλος της οικογένειας των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων HIF, οι οποίοι αποτελούν βασικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου. Πρόκειται για μία διμερή πρωτεΐνη που δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, απαραίτητος για την προσαρμογή του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας, ρυθμίζοντας την έκφραση των σχετιζόμενων γονιδίων [7].

Συνεπώς, τόσο ο HIF-2α όσο και η εψιδίνη αποτελούν κεντρικοί ρυθμιστές της ομοιοστασίας του σιδήρου ενώ η μεταξύ τους αλληλεπίδραση έχει τεκμηριωθεί και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον συντονισμό μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την απορρόφηση και μεταφορά του σιδήρου στον οργανισμό. Μία υπόθεση είναι ότι συνδετικό κρίκο μεταξύ HIF-2α και εψιδίνης αποτελεί η αιμοτζουβελίνη, δεδομένου ότι η συμβολή της στην έκφραση της εψιδίνης είναι ήδη καλά καθορισμένη.

Προγενέστερα πειράματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας, τα οποία περιλάμβαναν μεταγραφομική ανάλυση RNAseq δεδομένων από κύτταρα Huh7 με στόχο τη διερεύνηση

πιθανών επιδράσεων του HIF-2α στην έκφραση γονιδίων, ανέδειξαν την αιμοτζουβελίνη ως πιθανό γονίδιο στόχο του HIF-2α. Συγκεκριμένα, ώριμο mRNA συλλέχθηκε από κύτταρα Huh7 που καλλιιεργήθηκαν υπό δύο διαφορετικές συνθήκες (υποξία και υποξία με αποσιώπηση/siRNA του HIF-2α) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση RNA. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των δεδομένων RNAseq, ώστε να εξεταστούν τα γονίδια που εμφανίζουν αυξο-ρύθμιση και μειο-ρύθμιση έπειτα από αποσιώπηση του HIF-2α, καθώς και ανάλυση οντολογίας, προκειμένου να καθοριστούν οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται κυρίως με την ομοιοστασία του σιδήρου και την σηματοδότηση TGF-β. Ένα γονίδιο το οποίο ξεχώρισε, καθώς συμμετέχει σε αμφότερες τις διαδικασίες και εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα, ήταν αυτό της αιμοτζουβελίνης. Για την επιβεβαίωση των στατιστικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro*. Ειδικότερα, αυτά περιλάμβαναν την καλλιέργεια κυττάρων Huh7, την απομόνωση του RNA, τη μετατροπή σε cDNA και την εκτέλεση ποσοτικής real-time PCR (RT-PCR). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν αύξηση των επιπέδων του mRNA της αιμοτζουβελίνης σε συνθήκες υποξίας, ενώ έπειτα από siRNA του HIF-2α τα επίπεδα του mRNA μειώνονται. Ένας εύλογος μηχανισμός ρύθμισης της αιμοτζουβελίνης από τον HIF-2α είναι η ύπαρξη HRE στον υποκινητή της αιμοτζουβελίνης, όπου προσδένεται ο HIF-2α.

Στην παρούσα εργασία, διεξήχθη βιοπληροφορική αναζήτηση για την πιθανή ύπαρξη HRE στο γονίδιο της αιμοτζουβελίνης, με χρήση του προγράμματος Signal Search Analysis και της πλατφόρμας CHIPAtlas. Ωστόσο, οι αναζητήσεις δεν απέδωσαν θετικό αποτέλεσμα, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία διαθέσιμων δεδομένων για την εν λόγω περιοχή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χειροκίνητη αναζήτηση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SnapGene, όπου εντοπίστηκε η συναινετική αλληλουχία του HRE (5'ACGTG3') στην περιοχή του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης. Το βασικό ερώτημα που προκύπτει, επομένως, είναι κατά πόσο το συγκεκριμένο μοτίβο αποτελεί πράγματι λειτουργικό HRE του HIF-2α ή εάν πρόκειται για τυχαία αλληλουχία.

Με σκοπό να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση τμήματος της περιοχής του υποκινητή της ανθρώπινης αιμοτζουβελίνης που περιέχει το HRE στον πλασμιδιακό φορέα PGL3 basic και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή υπό συνθήκη επαγωγής του HIF-2α (υποξία). Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν, σε πρώτο στάδιο, η ενίσχυση του τμήματος-στόχου του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης με PCR από DNA ανθρώπινων κυττάρων ήπατος και πιο συγκεκριμένα από κύτταρα Huh7, ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης και καθαρισμός με gel extraction. Παράλληλα, ο πλασμιδιακός φορέας PGL3 basic πολλαπλασιάστηκε μέσω μετασχηματισμού δεκτικών βακτηρίων E.Coli TOP10 και απομονώθηκε με τη μέθοδο Mini Preparation. Το ένθεμα και το πλασμίδιο υποβλήθηκαν σε διπλή πέψη με τα ένζυμα SacI και XhoI, προκειμένου να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα, και ακολούθησε αντίδραση λιγάσης με σκοπό την ενσωμάτωση του υποκινητή στον πλασμιδιακό φορέα. Το προϊόν κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων, τα οποία καλλιιεργήθηκαν και στη συνέχεια ελέγχθηκαν για την παρουσία του ενθέματος μέσω απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και δοκιμαστικών πέσεων, μονών και διπλών, μέχρι να βρεθεί το σωστό προϊόν κλωνοποίησης. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήθηκαν δύο θετικές αποικίες, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω επαναλαμβάνοντας το πρωτόκολλο μετασχηματισμός-καλλιέργεια-απομόνωση DNA-πέψη-ηλεκτροφόρηση. Οι αποικίες επίσης ελέγχθηκαν με αλληλούχιση για το σωστό ένθεμα και την κλωνοποίησή του.

Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε την απόψυξη και την καλλιέργεια ευκαρυωτικών καρκινικών κυττάρων Huh7, με σκοπό την παροδική διαμόλυνσή τους με το προϊόν κλωνοποίησης χρησιμοποιώντας το κατιονικό πολυμερές PEI. Τέλος, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε δύο συνθήκες, νορμοξία και υποξία (1% O₂), και υποβλήθηκαν σε δοκιμασία λουσιφεράσης προκειμένου να μετρηθεί η δραστηριότητα της λουσιφεράσης, η οποία αποτελεί δείκτη της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης.

Το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας λουσιφεράσης έδειξε σχεδόν διπλασιασμό της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης σε συνθήκες υποξίας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τα προγενέστερα στατιστικά και πειραματικά δεδομένα του Εργαστηρίου Βιοχημείας, καθώς και την υπόθεση πως ο HIF-2α, ο οποίος είναι γνωστό ότι επάγεται κατά την υποξία, προσδένεται στο HRE του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης και δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής. Το γεγονός ότι ο υποκινητής δεν παρουσιάζει τη μέγιστη μεταβολή στην έκφραση μπορεί να εξηγηθεί καθώς πρόκειται για πλήρη υποκινητή, με τον οποίο μπορούν ενδεχομένως να αλληλεπιδρούν ρυθμιστικοί αναστολείς ή άλλες πρωτεΐνες και συνεπώς να περιορίσουν τον βαθμό μεταβολής. Η ορθότητα του πειράματος τεκμηριώνεται από τα πειράματα ελέγχου. Συγκεκριμένα, το θετικό κοντρόλ (ο ίδιος πλασμιδιακός φορέας PGL3 ο οποίος διαθέτει κλωνοποιημένο 5 φορές το HRE του VEGF) παρουσίασε σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα της λουσιφεράσης, όπως και αναμενόταν. Ωστόσο στο αρνητικό κοντρόλ (PGL3 basic χωρίς ένθεμα), ενώ αναμενόταν αμελητέα μεταβολή, παρατηρήθηκε οκταπλάσια αύξηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης. Η μη αναμενόμενη αύξηση πιθανώς αποδίδεται σε επιμόλυνση του αρνητικού κοντρόλ ή χρήση λανθασμένου πλασμιδίου, ωστόσο απαιτούνται περεταίρω επαναληπτικά πειράματα για επιβεβαίωση.

Τα έως τώρα αποτελέσματα δεν μας επιτρέπουν να υποστηρίξουμε με βεβαιότητα την ειδική επαγωγή του υποκινητή της αιμοτζουβελίνης από τον HIF-2α και να αποκλείσουμε την πιθανή εμπλοκή του HIF-1α στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Επομένως, μελλοντικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αποσιώπηση του HIF-2α μέσω siRNA, επαγωγή υποξίας και εφαρμογή της ίδιας πειραματικής διαδικασίας (διαμόλυνση με PEI και δοκιμασία λουσιφεράσης) ώστε να εξεταστεί εκ νέου η δραστηριότητα της λουσιφεράσης. Επιπλέον, θα ήταν σκόπιμο να διεξαχθεί υπερέκφραση του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και να εξεταστεί η επίδραση στην ενεργότητα του υποκινητή μέσω της ίδιας διαδικασίας. Τέλος, θα είχε ενδιαφέρον να ελεγχθεί άμεσα η πιθανή πρόσδεση του HIF-2α στον υποκινητή, άρα να επιβεβαιωθεί πειραματικά η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο, κάτι που θα μπορούσε να επιτευχθεί με πείραμα chipPCR (Chromatin Immunoprecipitation PCR/ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ακολουθούμενη από PCR).

7. Βιβλιογραφία

- [1] Zhang, A. (2010). Control of systemic iron homeostasis by the Hemojuvelin-Hepcidin axis. *Advances in Nutrition*, 1(1), 38–45. <https://doi.org/10.3945/an.110.1009>
- [2] Core, A. B., Canali, S., & Babitt, J. L. (2014). Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00104>
- [3] Silvestri, L., Pagani, A., & Camaschella, C. (2007). Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*, 111(2), 924–931. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100677>
- [4] Dogan, D. Y., Urzica, E. I., Hornung, I., Kastl, P., Oguama, D., Fette, F. M., Nguyen, L. H., Rosenbauer, F., Zacharowski, K., Klingmüller, U., Gradhand, E., Von Knethen, A., Popp, R., Fleming, I., Schrader, L., & Steinbicker, A. U. (2024). Hemojuvelin-mediated hepcidin induction requires both bone morphogenetic protein type I receptors ALK2 and ALK3. *Blood Advances*, 8(11), 2870–2879. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023012322>
- [5] Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Hepcidin-Ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6493. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- [6] Kovac, S., Boser, P., Cui, Y., Ferring-Appel, D., Casarrubea, D., Huang, L., Fung, E., Popp, A., Mueller, B. K., & Hentze, M. W. (2016b). Anti-hemojuvelin antibody corrects anemia caused by inappropriately high hepcidin levels. *Haematologica*, 101(5), e173–e176. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.140772>
- [7] Befani, C., & Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9087–9098. <https://doi.org/10.1002/jcp.26805>
- [8] Mastrogiannaki, M., Matak, P., & Peyssonnaud, C. (2013). The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood*, 122(6), 885–892. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-427765>
- [9] Formica, V., Riondino, S., Morelli, C., Guerriero, S., D'Amore, F., Di Grazia, A., Del Vecchio Blanco, G., Sica, G., Arkenau, H., Monteleone, G., & Roselli, M. (2023). HIF2 α , Hepcidin and their crosstalk as tumour-promoting signalling. *British Journal of Cancer*, 129(2), 222–236. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02266-2>
- [10] Wicks, E. E., & Semenza, G. L. (2022). Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *Journal of Clinical Investigation*, 132(11). <https://doi.org/10.1172/jci159839>
- [11] Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-Inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.022>

- [12] Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, March 6). Polymerase chain Reaction (PCR). StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- [13] Canene-Adams, K. (2013). General PCR. *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 291–298. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00024-0>
- [14] Voytas, D. (1992). Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Immunology*, 2(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1004s02>
- [15] Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62. <https://doi.org/10.3791/3923>
- [16] Macherey-Nagel. *PCR clean-up and Gel extraction*. November 2024 / Rev. 09
- [17] Macherey-Nagel. *Plasmid DNA purification*. November 2024 / Rev. 15
- [18] Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M., & Leahy, D. J. (2013). Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 227–240. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00018-5>
- [19] Ehrhardt, C., Schmolke, M., Matzke, A., Knoblauch, A., Will, C., Wixler, V., & Ludwig, S. (2006). Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*, 6(3), 179–184. <https://doi.org/10.1002/sita.200500073>
- [20] Demeneix, B., & Behr, J. (2005). Polyethylenimine (PEI). *Advances in Genetics*, 215–230. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(05\)53008-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(05)53008-6)
- [21] Niederkofler, V. (2005). Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2180–2186. <https://doi.org/10.1172/jci25683>
- [22] Lee, D., Zhou, L., Zhou, Z., Xie, J., Jung, J., Liu, Y., Xi, C., Mei, L., & Xiong, W. (2010). Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*, 115(15), 3136–3145. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-251199>
- [23] Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., & Camaschella, C. (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 8(6), 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>
- [25] Zhang, A., Gao, J., Koeberl, D. D., & Enns, C. A. (2010). The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16416–16423. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.109488>
- [26] Lin, L., Goldberg, Y. P., & Ganz, T. (2005). Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*, 106(8), 2884–2889. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1845>

- [27] Babitt, J., Huang, F., Wrighting, D. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* **38**, 531–539 (2006). <https://doi.org/10.1038/ng1777>
- [28] Andriopoulos Jr, B., Corradini, E., Xia, Y. *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* **41**, 482–487 (2009). <https://doi.org/10.1038/ng.335>
- [29] Bolondi, G., Garuti, C., Corradini, E., Zoller, H., Vogel, W., Finkenstedt, A., Babitt, J. L., Lin, H. Y., & Pietrangelo, A. (2010). Altered hepatic BMP signaling pathway in human HFE hemochromatosis. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 45(4), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.08.010>
- [30] Brasse-Lagnel, C., Poli, M., Lesueur, C., Grandchamp, B., Lavoinnie, A., Beaumont, C., & Bekri, S. (2010). Immunoassay for human serum hemojuvelin. *Haematologica*, 95(12), 2031–2037. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.022129>
- [31] Casanovas, G., Mleczko-Sanecka, K., Altamura, S. *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med* **87**, 471–480 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0447-2>
- [32] D'Alessio, F., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2012). The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *Journal of Hepatology*, 57(5), 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.015>
- [33] Enns, C. A., Ahmed, R., & Zhang, A. (2012). Neogenin Interacts with Matriptase-2 to Facilitate Hemojuvelin Cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35104–35117. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.363937>
- [34] Kuninger, D., Kuns-Hashimoto, R., Nili, M. *et al.* Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. *BMC Biochem* **9**, 9 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9->
- [35] Lin, L., Nemeth, E., Goodnough, J. B., Thapa, D. R., Gabayan, V., & Ganz, T. (2007). Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 40(1), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.06.023>
- [36] Maxson, J. E., Chen, J., Enns, C. A., & Zhang, A. (2010). Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39021–39028. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.183160>
- [37] Papanikolaou, G., Samuels, M., Ludwig, E. *et al.* Mutations in *HFE2* cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* **36**, 77–82 (2004). <https://doi.org/10.1038/ng1274>

- [38] McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P. P., Richard, D. E., & Dubois, C. M. (2004). Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6561–6569. <https://doi.org/10.1074/jbc.m413248200>
- [39] Nili, M., Shinde, U., & Rotwein, P. (2010). Soluble Repulsive Guidance Molecule c/Hemojuvelin Is a Broad Spectrum Bone Morphogenetic Protein (BMP) Antagonist and Inhibits both BMP2- and BMP6-mediated Signaling and Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24783–24792. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.130286>
- [40] Shi, Y., Gilkes, D.M. HIF-1 and HIF-2 in cancer: structure, regulation, and therapeutic prospects. *Cell. Mol. Life Sci.* **82**, 44 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05537-0>
- [41] Bakleh, M. Z., & Zen, A. a. H. (2025b). The distinct role of HIF-1A and HIF-2A in hypoxia and angiogenesis. *Cells*, 14(9), 673. <https://doi.org/10.3390/cells14090673>
- [42] Bao, M. H., & Wong, C. C. (2021). Hypoxia, metabolic reprogramming, and drug resistance in liver cancer. *Cells*, 10(7), 1715. <https://doi.org/10.3390/cells10071715>
- [43] Semenza, G. L. (2021). Breakthrough science: hypoxia-inducible factors, oxygen sensing, and disorders of hematopoiesis. *Blood*, 139(16), 2441–2449. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011043>
- [44] Bertout, J., Patel, S. & Simon, M. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 967–975 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrc254>
- [45] Covello, K. L., & Simon, M. (2004). HIFs, hypoxia, and vascular development. *Current Topics in Developmental Biology/Current Topics in Developmental Biology*, 37–54. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(04\)62002-3](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(04)62002-3)
- [46] Hu, C., Wang, L., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of Hypoxia-Inducible factor 1A (HIF-1A) and HIF-2A in hypoxic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9361-9374.2003>
- [47] Krelle, A. C., Okoli, A. S., & Mendz, G. L. (2013). HUH-7 Human Liver Cancer Cells: A model system to understand Hepatocellular Carcinoma and therapy. *Journal of Cancer Therapy*, 04(02), 606–631. <https://doi.org/10.4236/jct.2013.42078>
- [48] Schwartz, A. J., Das, N. K., Ramakrishnan, S. K., Jain, C., Jurkovic, M. T., Wu, J., Nemeth, E., Lakhali-Littleton, S., Colacino, J. A., & Shah, Y. M. (2018). Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 336–348. <https://doi.org/10.1172/jci122359>
- [49] Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.014>
- [50] Taylor, M., Qu, A., Anderson, E. R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F. J., & Shah, Y. M. (2011). Hypoxia-Inducible factor-2A mediates the adaptive increase of intestinal

ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*, 140(7), 2044–2055. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.007>

[51] Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., & Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 1037–1044. <https://doi.org/10.1172/jci15686>

[52] Peyssonnaud, C., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2008). Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*, 7(1), 28–32. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5145>

[53] Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S., & Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1159–1166. <https://doi.org/10.1172/jci38499>

[54] XU M., WANG J., XIE J. (2017). Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors. *Acta Physiologica Sinica*, October 25, 2017, 69(5): 598–610 DOI: 10.13294/j.aps.2017.0054