



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) από τον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α»

ΣΤΥΜΟΝΙΑΡΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF MEDICINE



MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN
Clinical Applications of Molecular Medicine

Master of Science Thesis

**“Investigation of the regulatory mechanism of the S-phase
kinase-associated protein 2 (SKP2) gene by the hypoxia-
inducible transcription factor HIF-2 α ”**

STYMONIARIS EVANGELOS

LARISA

SEPTEMBER 2025

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- **Λιάκος Παναγιώτης, Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- **Μυλωνής Ηλίας, Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- **Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων του τμήματος Ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

Thesis advisory committee

- **Liakos Panagiotis, Professor of Medical Biochemistry of the Department of Medicine of the University of Thessaly**
- **Mylonis Ilias, Associate Professor of Biochemistry of the Department of Medicine of the University of Thessaly**
- **Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases of the Department of Medicine of the University of Thessaly**

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Περίληψη	9
Abstract.....	11
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Υποξία.....	12
1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες Επαγόμενοι από την Υποξία (HIFs: Hypoxia Inducible Factors)	12
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α	14
1.4 Ρύθμιση του HIF-2α	15
1.4.1 Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-2α	15
1.4.2 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	16
1.4.2.1 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης	16
1.4.2.2 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω ακετυλίωσης	17
1.4.2.3 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω Σουμοϋλίωσης	18
1.5 Γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από τον HIF-2α και τους HIF	19
1.6 Σημαντικές αλληλεπιδράσεις του HIF-2α με πρωτεΐνες	20
1.6.1 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τους παράγοντες ETS1, ELK-1 και SP1	20
1.6.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την Reptin52.....	21
1.7 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και HIF-2α.....	22
1.8 Η πρωτεΐνη Skp2 (S-phase kinase associated protein 2)	23
1.9 Γονιδιακή ρύθμιση της πρωτεΐνης Skp2.....	25
1.10 Η πρωτεΐνη Skp2 στον καρκίνο	26
Σκοπός της εργασίας.....	27
2. Υλικά	28
2.1 Εκκινητές	28
2.2 Αντισώματα	28
2.3 Κυτταρικές σειρές.....	29
2.4 Βακτηριακοί πλασμιδιακοί φορείς.....	29

2.5 Διαλύματα	30
3. Μέθοδοι	32
3.1 Μέθοδοι καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων	32
3.1.1 Επανέναρξη καλλιέργειας κυττάρων Huh7 από το υγρό άζωτο	32
3.1.2 Διαδικασία προετοιμασίας κυττάρων Huh7 για την διατήρησή τους στο υγρό άζωτο.	32
3.1.3 Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	33
3.1.4 Εισαγωγή κυττάρων σε συνθήκες υποξίας	33
3.2 Μέθοδοι βακτηριακών κυττάρων	33
3.2.1 Δημιουργία βακτηρίων δεκτικών προς μετασχηματισμό TOP10	33
3.2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με την μέθοδο θερμικού σοκ.....	34
3.2.3 Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων	35
3.2.4 Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας	35
3.3 Μέθοδοι ανάλυσης DNA	36
3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	36
3.3.2.Αντίδραση Πέψης DNA	38
3.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA	39
3.3.4 Αντίδραση λιγάσης	40
3.4 Μέθοδοι Απομόνωσης και καθαρισμού DNA.....	41
3.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	41
3.4.2 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	42
3.4.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με κατακρήμνιση ισοπροπανόλης	43
3.4.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την χρήση στήλης.	44
3.5 Μέθοδοι μελέτης της γονιδιακής έκφρασης.....	45
3.5.1 Παροδική Διαμόλυνση θηλαστικών κυττάρων με την χρήση του αντιδραστηρίου PEI	45
3.5.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης.....	46
3.6 Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών	47
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	47

3.6.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	48
3.6.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot	48
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
4.1 Αναζήτηση μοτίβων HRE στο γονίδιο Skp2 και ενίσχυση της αλληλουχίας HRE- υποκινητή από DNA κυττάρων Huh7.....	50
4.2 Κλωνοποίηση της αλληλουχίας του υποκινητή της Skp2	52
4.2.1 Έλεγχος κλωνοποιημένων βακτηριακών κλώνων και του προσανατολισμού της ένθεσης.....	53
4.5 Αλληλούχηση της πλασμιδιακής κατασκευής	57
4.6 Διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με την πλασμιδιακή κατασκευή και δοκιμασία έκφρασης λουσιφεράσης	58
4.7 Έλεγχος επαγωγής του παράγοντα HIF-2α στην υποξία.....	60
5. Συζήτηση	61
Βιβλιογραφία	65

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών κλινικές εφαρμογές μοριακής ιατρικής στο εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν και ήταν κοντά μου σε αυτό το βήμα και αυτήν την χρονική περίοδο από την αρχή.

Πρώτα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κύριο Παναγιώτη Λιάκο ο οποίος με καθοδήγησε ορθά και με υπευθυνότητα και φυσικά μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την ερευνητική μου εργασία με την επίβλεψή του. Τον ευχαριστώ καθώς είχα την δυνατότητα να εργαστώ σε ένα εκπαιδευτικό περιβάλλον και να εκπονήσω ένα σημαντικό ερευνητικό θέμα. Πάνω από όλα, τον ευχαριστώ για την υπομονή του και την προσεκτική καθοδήγηση και τον προβληματισμό που μου καλλιέργησε σε βαθιά και ενδιαφέρον ερευνητικά θέματα και θέματα στον κλάδο της Κλινικής Βιοχημείας, και φυσικά για την άμεση επικοινωνία μας σε πιο απλά και καθημερινά πλαίσια. Χωρίς τον κύριο Λιάκο δεν θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας, χωρίς την συμβουλευτική και εποικοδομητική επίβλεψή του σε όλα.

Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ τον κύριο Ηλία Μυλωνή ο οποίος δέχθηκε να είναι μέρος της τριμελούς επιτροπής και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ιωάννα Γκοτινάκου για την πολύτιμη συμβολή τους κατά την διάρκεια της έρευνας. Τους ευχαριστώ άπειρα για την βοήθειά τους σε ότι χρειάστηκα. Επιπλέον ευχαριστώ τον διευθυντή του εργαστηρίου τον κύριο Σίμο Γεώργιο ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου έρευνα στο εργαστήριο Βιοχημείας και την κυρία Χαχάμη για την πολύτιμη μετάβαση γνώσεων τους στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού.

Ταυτόχρονα θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Μπόγδανο Δημήτριο ο οποίος αποτελεί μέρος της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής εργασίας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος ιατρικής Λάρισας και τους συμφοιτητές μου για το φιλικό περιβάλλον.

Πάνω από όλα ευχαριστώ την οικογένεια μου λόγω της καθημερινής υποστήριξης, σιγουριάς και ανεκτίμητης αγάπης. Σε αυτούς αφιερώνω την πραγματοποίηση του μεταπτυχιακού προγράμματος και χάρη σε αυτούς έγινε δυνατή η μετάβαση μου σε ένα επόμενο ακαδημαϊκό βήμα το οποίο έχει ιδιαίτερη σημασία για εμένα.

Περίληψη

Η επιβίωση των κυττάρων στις χαμηλές συνθήκες οξυγόνου εξαρτάται από την ενεργοποίηση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF. Η οικογένεια των HIF αποτελείται από τρεις ισομορφές και το ενδιαφέρον μας επικεντρώνεται στον HIF-2α ο οποίος παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση κυρίως στο ενδοθήλιο, το ήπαρ και τους πνεύμονες. Ο HIF-2α ενεργοποιεί μια σειρά γονιδίων με στόχο την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία και προκειμένου να επάγει την έκφραση γονιδίων του, συνδέεται σε ειδικά μοτίβα στο γονιδίωμα τους τα οποία ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE: Hypoxia Responsive Element).

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας, τα οποία αναδείχθηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων RNA-seq και ανάλυσης RT-qPCR, έδειξαν πως ο HIF-2α ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου Skp2 στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος Huh7. Το γονίδιο Skp2 είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης S-phase kinase protein associated protein 2 (Skp2). Η πρωτεΐνη Skp2 αποτελεί μέρος του συμπλόκου E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης. Κύριος ρόλος της Skp2 είναι η ρύθμιση της πολυουβικουιτίνωσης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p27 και p21, συμβάλλοντας στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η αναζήτηση μοτίβων HRE στο γονίδιο Skp2 τα οποία μπορεί να εξηγούν την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου Skp2 στην υποξία. Ο έλεγχος της ρυθμιστικής αλληλουχία (ενισχυτής και υποκινητής) του γονιδίου Skp2 ανέδειξε την ύπαρξη ενός πιθανού στοιχείου HRE. Στην συνέχεια η ρυθμιστική αλληλουχία επιλέχθηκε να κλωνοποιηθεί και να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργοποίησή της. Έτσι απομονώθηκε DNA από ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα και σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση της ρυθμιστικής αλληλουχίας μέσω PCR. Η αλληλουχία κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα ο οποίος φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης. Και εφόσον η αλληλουχία του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου ελέγχθηκε μέσω αλληλούχησης και πέψη περιοριστικών ενζύμων πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων ηπατοκαρκινώματος Huh7 και διαμόλυνση τους με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Κατόπιν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας και ελέγχθηκε η επαγωγής της μεταγραφής μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης.

Τα πρώτα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν μια ήπια επαγωγή της μεταγραφής σε συνθήκες υποξίας που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Ωστόσο χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση. Επίσης θα ήταν σημαντικό να εξεταστεί η άμεση σύνδεση

του HIF-2α στο γονίδιο Skp2 και να απαντηθούν τα ερωτήματα της συνεργατικής ή μοναδικής ρύθμισης από τον HIF-2α ώστε να αναδειχθεί μια πιθανή συμβολή των υποξικών συνθηκών στην επαγωγή του γονιδίου Skp2, έναν γονίδιο το οποίο αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου.

Abstract

The activation of hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) in low oxygen conditions is crucial for cell survival. The HIF factor family consists of three isoforms, and our research focuses on HIF-2 α , who is expressed mainly in the endothelium, liver, and lungs. HIF-2 α triggers the expression of a range of genes that help cells adapt to hypoxic conditions. In order to induce the expression of its genes, it binds to specific motifs in their genome called Hypoxia Response Elements (HRE).

Previous findings from my undergraduate thesis, based on bioinformatic analysis of RNA-seq data and RT-qPCR experiments, demonstrated that HIF-2 α positively regulates the expression of the Skp2 gene under hypoxic conditions in Huh7 hepatocellular carcinoma cells. The Skp2 gene encodes S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), a component of the E3 ubiquitin ligase complex. Skp2 plays a key role in promoting cell cycle progression by mediating the polyubiquitination and subsequent degradation of the cell cycle inhibitors p27 and p21.

Taking under consideration the above, the aim of this study was to search for HRE motifs in the Skp2 gene that could explain the induction of Skp2 gene expression in hypoxia. Analysis of the regulatory sequence (enhancer and promoter) of the Skp2 gene revealed the existence of a possible HRE element. The regulatory sequence was then selected for cloning and assessment of its transcriptional activation. For this purpose, DNA was isolated from human cancer liver cells Huh7, and specific primers were designed to amplify the regulatory sequence with PCR reaction and the amplified fragment was cloned into a luciferase reporter plasmid. After the recombinant construct was validated by sequencing and restriction enzyme digestion, Huh7 hepatocellular carcinoma cells were transfected with the plasmid construct and cultured under normoxic and hypoxic conditions. Finally, transcriptional activity was assessed with a luciferase reporter assay.

The initial results of this study indicate a mild induction of transcription under hypoxic conditions, in line with our previous results from bioinformatic analysis. However, further investigation is needed. It is also important to investigate the direct interaction of HIF-2 α and the Skp2 gene and to determine whether HIF-2 α regulates Skp2 in a cooperative or unique manner. It is quite important to understand how hypoxia induces Skp2, a key regulator of cell cycle progression.

1. Εισαγωγή

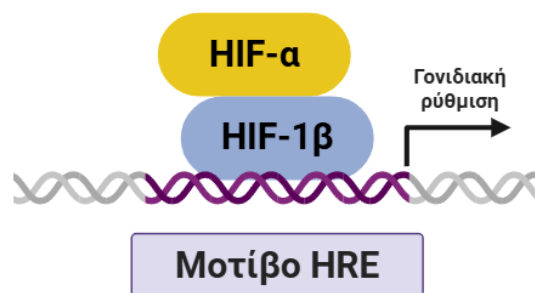
1.1 Υποξία

Το οξυγόνο είναι κύριο συστατικό για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων και η διασφάλιση μιας σταθερής συγκέντρωσης ουσιαστικής για την επιβίωσή τους είναι σημαντική. Η επαρκής μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και τελικά στα κύτταρα ενός οργανισμού είναι απαραίτητη για την κυτταρική λειτουργία ώστε η αναπνευστική αλυσίδα και η οξειδωαναγωγική ομοιοστάση να λάβει μέρος (1). Η μειωμένη μεταφορά οξυγόνου ή η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από τους ιστούς οδηγεί σε συνθήκη χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου για την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία η οποία ονομάζεται υποξία (2). Η φυσιολογική συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον η οποία ορίζει την κυτταρική ομοιοστασία είναι 21% ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων ορίζεται κατά μέσο όρο ως 7-5%. Στην υποξία η συγκέντρωση του οξυγόνου στα κύτταρα ορίζεται ως $<2\% \text{ O}_2$, (1, 3). Οι χαμηλές συνθήκες οξυγόνου στα κύτταρα μπορεί να υφίσταται για σύντομο χρονικό διάστημα ή να παραμένουν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα καθιστώντας την χρόνια υποξία. Για την προσαρμογή στην υποξία τον πιο κεντρικό ρόλο έχουν οι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες επαγόμενοι από την υποξία HIFs (Hypoxia Inducible Factors) (2).

1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες Επαγόμενοι από την Υποξία (HIFs: Hypoxia Inducible Factors)

Οι Μεταγραφικοί παράγοντες Επαγόμενοι από την Υποξία HIFs αποτελούν τους μεταγραφικούς παράγοντες τον HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Παρόλα αυτά καλύτερα μελετημένοι είναι οι HIF-1 και HIF-2. Οι HIF είναι μέρος της μεγαλύτερης οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων bHLH οι οποίοι έχουν ρόλο στην διαφοροποίηση και την ανάπτυξη (4). Ενεργοποιούνται στις συνθήκες χαμηλού οξυγόνου και μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης είναι οι κύριοι παράγοντες της κυτταρικής ομοιοστάσης στην υποξία. Φέρουν την επικράτεια bHLH, (α-έλικα/θηλιά/α-έλικα), μία αλληλουχία βασικών αμινοξέων με την οποία προσδένονται στο DNA ως διμερή. Για τον σκοπό αυτό οι παράγοντες HIF είναι διμερή και αποτελούνται από μία α και

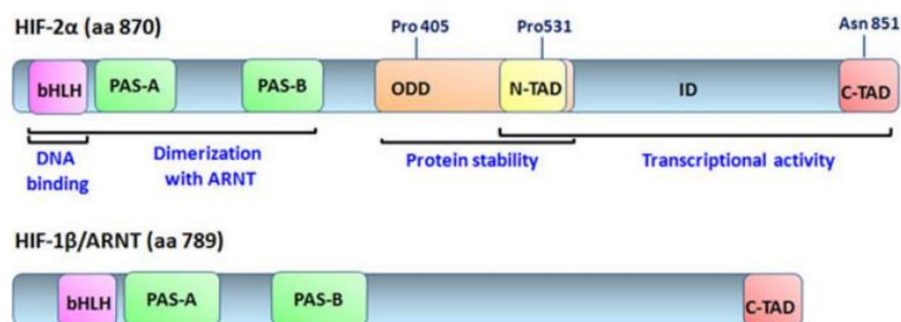
μία β υπομονάδα. Η β υπομονάδα ονομάζεται ARNT ή HIF-β. Ο HIF-1β πρώτα ανακαλύφθηκε ως διμερές του υποδοχέα των διοξινών ARH (aryl hydrocarbon receptor) στην αντιμετώπιση ξενοβιοτικών και στην συνέχεια ως διμερές των μεταγραφικών παραγόντων HIF (5). Όλοι οι HIFs διαθέτουν την HIF-β ως β υπομονάδα ενώ η α υπομονάδα διαφέρει ανάλογα με τον HIF, δηλαδή πρόκειται για τις HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α ανάλογα. Για τον λόγο αυτό οι HIF συνήθως αναφέρονται με το όνομα της α υπομονάδας τους ως HIF-1/2/3α. Οι HIF-α και ο HIF-β φέρουν την επικράτεια PAS υπεύθυνη για τον διμερισμό τους. Τα διμερή των HIF συνδέονται στο γονιδίωμα πάνω σε μοτίβα απόκρισης στην υποξία HREs, (HRE: Hypoxia Responsive Element). Επάγουν την έκφραση γονιδίων κυρίως της αγγειογένεσης, της κυτταρικής επιβίωσης και της γλυκόλυσης και μέσω της σύνδεσης και αλληλεπίδρασης με άλλους συμπαράγοντες της μεταγραφής έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων στην υποξία με σκοπό την κυτταρική ομοιοστασία στις συνθήκες χαμηλού οξυγόνου (6).



Εικόνα 1.1: Οι παράγοντες HIF-α αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα HIF-1β και μαζί ως διμερή αναγνωρίζουν και συνδέονται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων. (BioRender)

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α

Ο HIF-2α είναι ο δεύτερος της οικογένειας των HIF και δεύτερος καλύτερα μελετημένος HIF μετά από τον HIF-1α. Η αμινοξική τους αλληλουχία ταυτίζεται κατά 48% και οι ομοιότητες μεταξύ τους στην μεταγραφική ρύθμιση είναι μεγαλύτερες σε σύγκριση με τον HIF-3α. Όπως αναφέρθηκε ο HIF-2α όπως και οι υπόλοιποι HIF, φέρει μία επικράτεια διμερισμού με την β υπομονάδα PAS και μία επικράτεια σύνδεσης στο γονιδίωμα σε στοιχεία HRE, bHLH (7). Για την μεταγραφική ενεργοποιητική του δράση διαθέτει δύο επικράτειες, την N-TAD και C-TAD οι οποίες εντοπίζονται προς το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα. Η N-TAD βοηθά στην επιλογή των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2α. Η ODD (Oxygen-Dependent Degradation) επικράτεια ρυθμίζει τον HIF-2α με οξυγονοεξαρτώμενο τρόπο και είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυσή του στις φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (7). Ο HIF-2α κωδικοποιείται από το γονίδιο EPAS1. Σε αντίθεση με τον HIF-1α οποίος εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ο HIF-2α εμφανίζει ιστοειδική έκφραση στους ιστούς του ενδοθηλίου και κυρίως στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τον σπλήνα, τον εγκέφαλο, το έντερο και τον πλακούντα (7, 8). Ο ρόλος του είναι η επαγωγή της αγγειογένεσης και έχει ουσιαστικό ρόλο στην ερυθροποίηση ενώ η επαγωγή του είναι κρίσιμη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (9). Επίσης ο ρόλος του στην αγγειογένεση είναι διευρυμένος σε όλα τα στάδια, κατά την επαγωγή αλλά και την δημιουργία και ωρίμανση των νεοσχηματισμένων αγγείων (7). Ο HIF-2α έχει αναδειχθεί ως επικρατέστερος HIF στην χρόνια υποξία), όπου παρατηρείται αλλαγή στην αναλογία τύπος και τα επίπεδα του είναι περισσότερο αυξημένα σε σύγκριση με τον HIF-1α (10). Το mRNA του EPAS1 υποστηρίζεται πως είναι σταθερότερο και αποικοδομείται λιγότερο από του HIF-1α στην χρόνια υποξία και αυτός αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να εξηγήσουν αυτήν την διαφορά στην επικράτηση του HIF-2α στην χρόνια υποξία (10).



Εικόνα 1.2: Τα διμερή HIF-2α και HIF-1β. Παρουσιάζονται οι υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α και τα κατάλοιπα τα οποία υδροξυλιώνονται στις φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, *Befani, C., & Liakos, P. Journal of Cellular Physiology*

1.4 Ρύθμιση του HIF-2α

Ο HIF-2α αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης κατά την υποξία στα κύτταρα στα οποία εκφράζεται. Η ρύθμιση του εξαρτάται κατά το μεγαλύτερο μέρος από την διαθεσιμότητα του οξυγόνου, ενώ ρυθμίζεται επιπλέον μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης και της σουμυλίωσης.

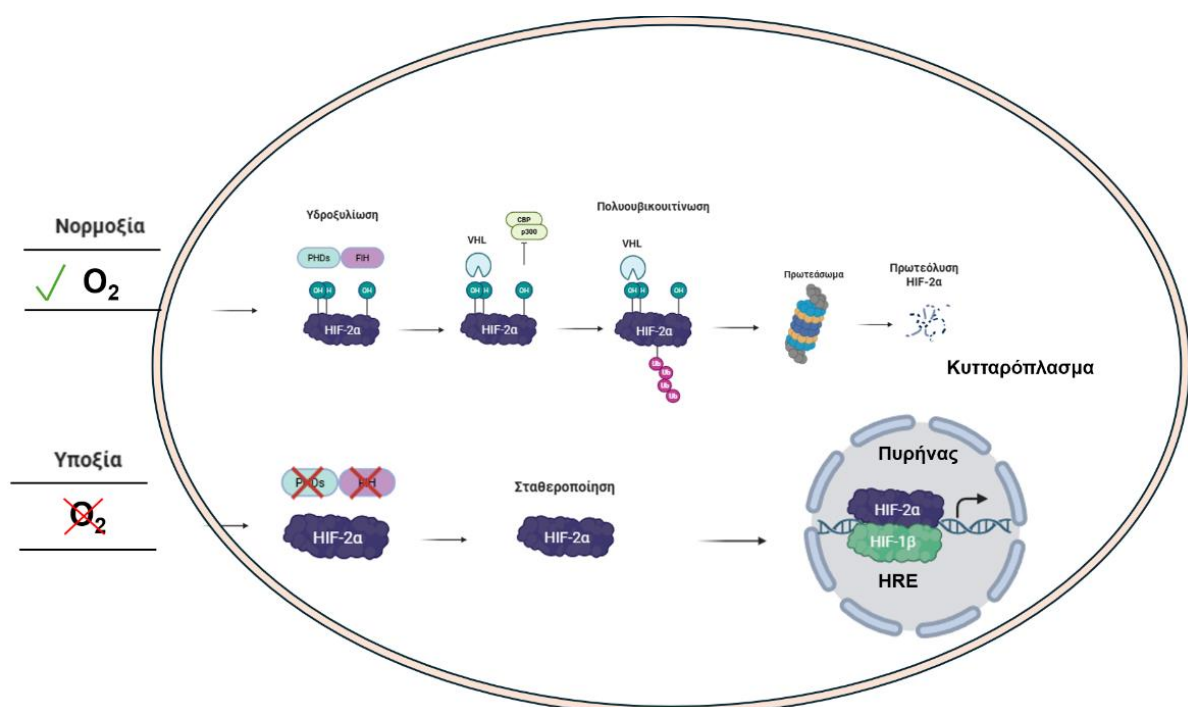
1.4.1 Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-2α

Η κατηγορία των υδροξυλασών PHD είναι μία κατηγορία ενζύμων οι οποίες περιέχουν πολλές ισομορφές και δρουν με την παρουσία των συμπαραγόντων: μοριακό οξυγόνο, το δισθενή σίδηρο και το ασκορβικό οξύ και συνεπώς δρουν και υδροξυλιώνουν πρωτεΐνες όταν το οξυγόνο είναι διαθέσιμο (11). Για τον λόγο αυτό θεωρούνται ως πρωτεΐνες αισθητήρες του μοριακού οξυγόνου και ο κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση και υδροξυλίωση των παραγόντων HIF της υποξίας (11, 12).

Οι υδροξυλάσες PHD υδροξυλιώνουν τον HIF-2α σε δύο σημεία στην αμινοξική του αλληλουχία στα κατάλοιπα προλίνης Pro-405 και Pro-531 (13). Έπειτα, η τροποποίηση της υδροξυλίωσης προσελκύει τον παράγοντα pVHL (von Hippel-Lindau) ο οποίος αποτελεί σήμα για την πολυουβικουϊτίνωση του HIF-2α και την πρωτεόλυσή του στο πρωτεάσωμα. Καθώς, όμως στην υποξία το οξυγόνο δεν είναι διαθέσιμο, και αποτελεί απαραίτητο συμπάραγοντα των PHDs αναστέλλεται η υδροξυλίωση του. Συνέπεια αυτών είναι η συσσώρευση του HIF-2α ο οποίος δεν πρωτεολύεται, σταθεροποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα για να επάγει την λειτουργία του ως μεταγραφικός παράγοντας (13).

Μία ακόμα ρυθμιστική υδροξυλίωση του HIF-2α πραγματοποιείται στην θέση 803, όπου εντοπίζεται μία ασπαραγίνη η οποία υδροξυλιώνεται από τον παράγοντα αναστολής HIF, τον FIH (factor inhibiting HIF) (14). Η ασπαραγίνη-803 είναι μέρος της περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο C-TAD. Η υδροξυλίωση προκαλεί της αναστολής της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP/p300 με αποτέλεσμα μειωμένη μεταγραφική ενεργοποίηση. Ο FIH αξιοποιεί το οξυγόνο και το 2 οξογλουταρικό ως απαραίτητους συμπάραγοντες, και στις συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, ο FIH όπως και με τις PHDs, αναστέλλεται και δεν υδροξυλιώνει τον παράγοντα HIF-2α (15).

Συνεπώς, η υποξία δημιουργεί την άμεση συσχέτιση μεταξύ της μοριακής ενεργοποίησης του HIF-2α με την αναστολή της υδροξυλίωσής του.



Εικόνα 1.3 : Η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α η οποία εξαρτάται από την παρουσία του οξυγόνου και ρυθμίζεται μέσω υδροξυλίωσης.

1.4.2 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

1.4.2.1 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης

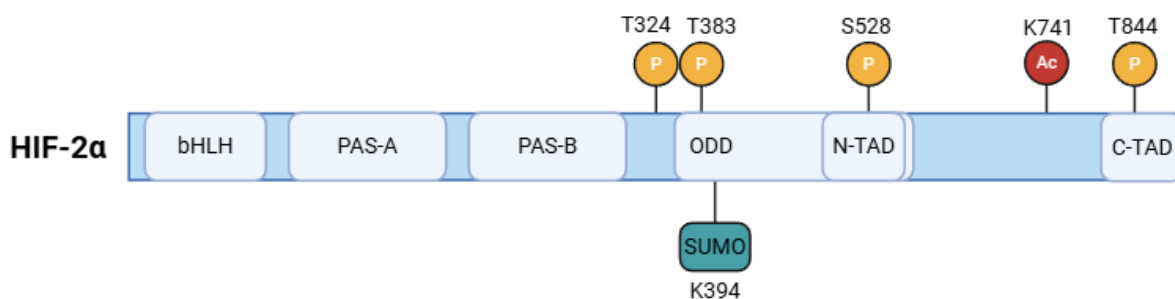
Η φωσφορυλίωση είναι η πιο διαδεδομένη και συχνή τροποποίηση των πρωτεϊνών η οποία έχει ρόλο τόσο στην κυτταρική σηματοδότηση όσο και σε κάθε κυτταρική λειτουργία των κυττάρων. Κατά την φωσφορυλίωση η φωσφορική ομάδα ενός μορίου ATP προστίθεται στο υδροξύλιο μίας σερίνης S, τυροσίνης T ή θρεονίνης Y. Τα ένζυμα υπεύθυνα για την φωσφορυλίωση ονομάζονται κινάσες ενώ για την αντίστροφη διαδικασία υπεύθυνες είναι οι φωσφατάσες.

Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την κινάση CK2 και την CK1 η οποίες ανήκουν στην κινάσες καζεΐνης. Η CK1 φωσφορυλιώνει τον HIF-2 σε δύο διακριτές θέσεις, στην σερίνη Ser388 και την θρεονίνη Thr-528 (16). Η φωσφορυλίωση από την CK1, έχει ως συνέπεια την

συγκέντρωση του HIF-2α στον πυρήνα και την αύξηση της μεταγραφικής του δράσης. Αυτό συμβαίνει καθώς εμποδίζεται η αλληλεπίδραση με την εξπορτίνη CRM1 ο HIF-2α δεν εξάγεται από τον πυρήνα κατά την υποξία και παραμένει συγκεντρωμένος εκεί .

Η CK2 φωσφορυλιώνει την θρεονίνη Thr844. Το κατάλοιπο 844 βρίσκεται στο εσωτερικό της επικράτειας μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD του HIF-2α και η φωσφορυλίωση του οδηγεί στην μειωμένη αλληλεπίδραση με την ανασταλτικό παράγοντα FIH, γεγονός που αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α (17).

Επιπλέον πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει πως ο HIF-2 φωσφορυλιώνεται από την κινάση PDK1 στην θρεονίνη Thr324. Η φωσφορυλίωση αυτή αναστέλλει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1 και ταυτόχρονα η αναστολή αυτή συνεπάγεται την μειωμένη έκφραση του γονιδίου NSBS1, το οποίο συμμετέχει στην επιδιόρθωση του γονιδιώματος (18).



Εικόνα 1.4 : Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο σχήμα αναπαρίσταται το κατάλοιπο και το είδος της τροποποίησης. (BioRender)

1.4.2.2 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω ακετυλίωσης

Η ακετυλίωση είναι η μεταφορά μίας ακετυλομάδας στην θέση όπου βρίσκεται ένα υδρογόνο στο αμινοξύ Λυσίνη K. Την τροποποίηση της ακετυλίωσης πραγματοποιούν οι ακετυλοτρανσφεράσες ενώ η ακετυλίωση είναι αναστρέψιμη από τις απακετυλάσες

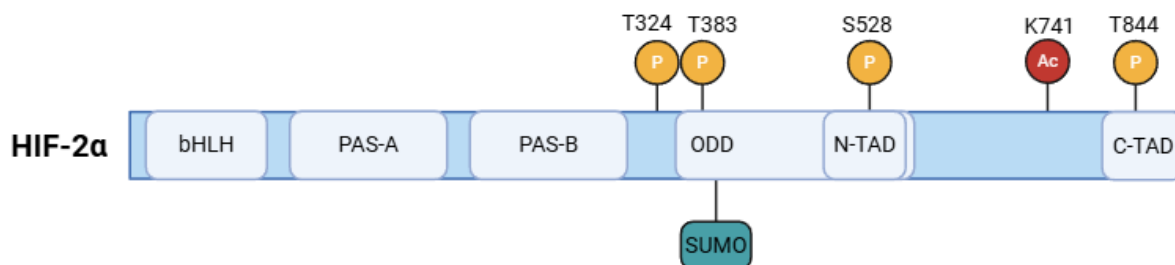
Η SIRT1 απακετυλάση δρα στον HIF-2α και τον απακετυλιώνει σε συγκεκριμένη θέση στην K-741 ενώ η ακετυλίωση πραγματοποιείται από την ακετυλάση CBP (19). Η δράση της SIRT1 εξαρτάται από την παρουσία NAD⁺ και έχει εντοπιστεί πως απακετυλιώνει τον HIF-2α σε

κύτταρα καρκίνου του ήπατος και του νεφρού (19, 20). Η απακετυλίωση δρα θετικά στην λειτουργία του HIF-2α και ενισχύεται η δράση του. Σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος η απακετυλίωση οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων EPO, VEGF από τον HIF-2α (19). Όταν η υποξία παραμένει χρονικά και μειώνεται η παραγωγή NAD⁺, μειώνεται και η δράση της SIRT1 και η θετική ρύθμιση στον HIF-2α ο οποίος παραμένει ακετυλιωμένος. Αντίθετα η SIRT1 απακετυλιώνει τον HIF-1 αλλά μειώνεται η μεταγραφική του ενεργότητα. Συνεπώς η απακετυλίωση των HIF έχει αντίθετο αποτέλεσμα, ενισχύοντας την δράση του HIF-2 αλλά μειώνοντας την μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α (19, 20).

1.4.2.3 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω Σουμοϋλίωσης

Η σουμοϋλίωση ανήκει στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σύνδεσης μικρών πρωτεϊνών και είναι αναστρέψιμη. Η SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) αποτελεί μία μικρή πρωτεΐνη η οποία έχει ομοιότητα στην δομή με την ουβικουΐτινη. Η σουμοϋλίωση καταλύεται από ένα ενζυμικό μηχανισμό στον οποίο συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες και πραγματοποιείται σε 3 στάδια, με το τελικό να αποτελεί την μεταφοράς της SUMO στην πρωτεΐνη στόχο. Η SUMO είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικιτίνη στη δομή και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό. Η σουμοϋλίωση επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, την αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, την αποικοδόμηση του RNA ή συνήθως μπορεί να οδηγεί την πρωτεΐνη σε πρωτεόλυση όπως στην περίπτωση του HIF-2α. Καθώς συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση διαταραχές στον μηχανισμό της σουμοϋλίωσης οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών (21).

Ο HIF-2α σουμοϋλιώνεται στην θέση της λυσίνης K-394. Η τροποποίηση αυτή οδηγεί στην πρωτεόλυσή του μέσω πολυουβικουιτίνωσης από την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες RNF4, VHL και στην συνέχεια αποικοδόμησής του (22, 23).



Εικόνα 1.4 : Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο σχήμα αναπαρίστανται το κατάλοιπο και το είδος της τροποποίησης. (BioRender)

1.5 Γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από τον HIF-2α και τους HIF

Οι παράγοντες HIF είναι κρίσιμοι για τα κύτταρα στις συνθήκες υποξίας. Χάρη στα γονίδια τα οποία επάγουνε, οι HIF-1/2α συμπράττουν καθοριστικά στην επιβίωση των κυττάρων στις συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας του οξυγόνου. Παρόλο που ο κεντρικός στόχος και των δύο μεταγραφικών παραγόντων είναι η προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες υποξίας, μπορεί να ενεργοποιούν ίδια αλλά και διαφορετικά γονίδια (6, 24).

Οι κύριες κυτταρικές διεργασίες στις οποίες συμβάλλουν και οι παράγοντες HIF αποτελούν η αγγειογένεση, η κυτταρική επιβίωση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η μεσεγγυματικότητα και η κυτταρική μετανάστευση (24).

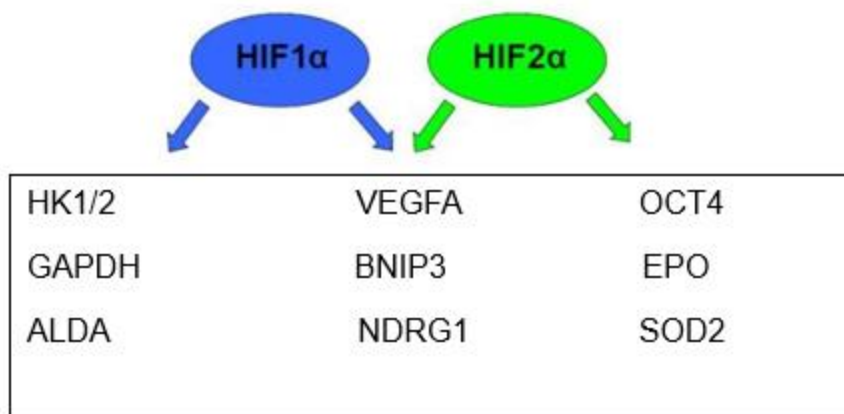
Σημαντικά κοινά γονίδια στόχοι των δύο μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν τα VEGFA και DLL4 της αγγειογένεσης (25), τα NDRG1, DLL4 στην απόκριση στο υποξικό στρες και την διαφοροποίηση (26), τα ADM, BNIP3 (24, 27) στην κυτταρική επιβίωση, τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT1, την καρβονική ανυδράση 12 (CA XII) στην ρύθμιση του pH, και γονίδια μεταλλοπρωτεασών MMPs τα οποία συμβάλλουν στην μετάσταση (28, 29).

Παρόλου που και οι δύο HIF ελέγχουν γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην γλυκόλυση ο HIF-1α σχετίζεται με την ρύθμιση πολλών περισσότερων γονιδίων της γλυκόλυσης σε σύγκριση με τον HIF-2α. Ένα μεγάλο ποσοστό από τα γονίδια τα οποία επάγει ο HIF-1 αφορούν την γλυκόλυση (HK1/2, GLUT1/3, GAPDH, PGK, ALDC, ALDA) (30). Ο HIF-2α υποστηρίζεται πως πιθανόν επάγει το GLUT1.

Μια κύρια ξεχωριστή διαφορά της ρύθμισης του HIF-2α είναι η επαγωγή του OCT4. Ο OCT4 αποτελεί έναν κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή της βλαστικότητας στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ο οποίος ρυθμίζει επιπλέον γονίδια μεταγραφικών παραγόντων. Ο OCT4 μέσω της επαγωγής του από τον HIF-2α, στα κύτταρα του ενδοθηλίου, συμμετέχει στην αγγειογένεση και προσφέρει προστατευτικό χαρακτήρα (2, 31, 32).

Μία ακόμη σημαντική διαφορά παρατηρείται όσον αφορά την γονιδιακή ρύθμιση από τους HIF. Έχει εντοπιστεί πως στα μακροφάγα ο HIF-2α αυξάνει την έκφραση της αργινάσης I η οποία ανταγωνίζεται με την συνθετάση του μονιξειδίου του αζώτου (NOS) για την διαθεσιμότητα της αργινίνης η οποία αποτελεί το υπόστρωμα των δύο ενζύμων και με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή του NO (32). Η μικρή διαθεσιμότητα του NO, εμποδίζει την δράση των T-

λεμφοκυττάρων και στον καρκίνο ενισχύει την ανάπτυξη και εξάπλωση ενός όγκου (33). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίστροφη ρύθμιση του HIF-1α ο οποίος ενισχύει την έκφραση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου NOS. Συνεπώς ενισχύει την παραγωγή του NO αντίθετα από τον HIF-2α (34).



Εικόνα 1.5 : Ρύθμιση της επαγωγής γονιδίων από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α και τον HIF-1α

1.6 Σημαντικές αλληλεπιδράσεις του HIF-2α με πρωτεΐνες

Ο ρόλος της μεταγραφικής ρύθμισης του HIF-2α είναι εξαιρετικά σημαντικός για την επιβίωση των κυττάρων στις συνθήκες υποξίας. Ο HIF-2α αλληλεπιδρά με ένα σύνολο μεταγραφικών παραγόντων για την επαγωγή διάφορων γονιδίων στα κύτταρα όπου εκφράζεται. Εκτός από την απαραίτητη αλληλεπίδραση του HIF-2α με την δεύτερη υπομονάδα HIF-1β, έχουν παρατηρηθεί πρόσθετες σημαντικές αλληλεπιδράσεις του με άλλες πρωτεΐνες.

1.6.1 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τους παράγοντες ETS1, ELK-1 και SP1

Η πρωτεΐνη ETS1 διαθέτει μία ETS επικράτεια σύνδεσης στο DNA και αναγνωρίζει την αλληλουχία GGAA/T. Τα γονίδια τα οποία ρυθμίζει συμμετέχουν στην ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων, στην κυτταρική γήρανση και τον κυτταρικό θάνατο και έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με τον HIF-2α. Αυξημένη έκφραση της ETS1 έχει βρεθεί στον καρκίνο του πνεύμονα, γαστρικού και άλλους (35). Η οικογένεια των ETS1 επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση με την θετική και αρνητική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων και ο ETS1 επάγει την έκφραση του VEGF-R1/2 (36).

Για την πλήρη επαγωγή του VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα συμμετέχει και ο HIF-2α ο οποίος αλληλεπιδρά με τον ETS-1. Στην αλληλεπίδραση μέρος λαμβάνει η καρβοξυτελική επικράτεια ενεργοποίησης του HIF-2α με την περιοχή του 7^{ου} εξονίου του ETS-1 (37). Σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 βρέθηκε πως ο HIF-2α αλληλεπιδρά με τον ELK-1 και είναι επεύθυνοι για την ρύθμιση των γονιδίων CITED2 και WISP2 κατά την υποξία (38). Παράλληλα έχει βρεθεί ότι ο ETS-1 συμμετέχει στην επαγωγή γονιδίων στην υποξία (CA9, LOXL2, NDRG1) αλλά και την νορμοξία ανεξάρτητα από την αλληλεπίδρασή του με άλλους παράγοντες HIF (39). Για την επαγωγή του γονιδίου της ενδοσιαλίνης, μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση και την ανοσιακή άμυνα στην υποξία, λαμβάνει μέρος η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ETS-1 και τον παράγοντα SP1 όταν παρατηρείται πυκνή κυτταρική ανάπτυξη (40).

Ο SP1 μεταγραφικός παράγοντας λειτουργεί μέσω της επικράτειας δακτυλίου ψευδαργύρου και συμμετέχει στον έλεγχο γονιδίων για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. Σε κύτταρα του καρκίνου των ωοθηκών, στην υποξία, ο HIF-2α σε σύνδεση του με τον SP1 ενεργοποιούν την έκφραση του παράγοντα πήξης του αίματος VII (FVII) (9). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως για την επαγωγή του γονιδίου δεν συμμετέχει η υπομονάδα ARNT αλλά ο HIF-2α με τον SP1 ο οποίος προσελκύει την απακετυλάση HDAC4 στον υποκινητή του γονιδίου FVII, για την ενεργοποίηση του γονιδίου. Επιπλέον η σύνδεση του HIF-2α με τους μεταγραφικούς παράγοντες MIZ1-MYC-MAX-SP1 σε υποξία στα κύτταρα νεφρικού καρκινώματος συμμετέχει στην σταθεροποίηση των μεταγραφικών συμπλόκων, κυρίως του MYC-MAX και την επαγωγή των γονιδίων ενισχύοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (41).

1.6.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την Reptin52

Η Reptin 52 αποτελεί μία συντηρημένη πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει σε πολλούς κυτταρικούς μηχανισμούς όπως της μεταγραφικής ρύθμισης, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της αναγνώρισης θρεπτικών, της αναγνώρισης και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (42). Αποτελεί μέρος σε διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (43). Αποτελείται από 463 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 52kDa. Ανήκει στις AAA+ πρωτεΐνες που σχετίζονται με ATPάσες (44). Είναι εξαμερής και διαθέτει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Σε ένα από τα σύμπλοκα της με την εξαμερή πρωτεΐνη την Pontin σχηματίζει ένα δωδεκαμερές σύμπλοκο και μαζί αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την μεταγραφή ή και την επιδιόρθωση του DNA (42).

Η Reptin 52 αλληλεπιδρά με τον HIF-2α εκατέρωθεν της οξυγονοεξαρτώμενης επικράτειάς του ODD. Η αλληλεπίδρασή τους παρατηρείται και στις συνθήκες νορμοξίας και στις συνθήκες υποξίας. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-2 από τις ERK1/2 ευνοεί την αλληλεπίδραση του με την Reptin 52 και την συσσώρευση του συμπλόκου και των δύο πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα (45). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει αρνητική απόρροια στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α. Τα γονίδια VEGF, SERPINE1, EPO εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη μεταγραφή mRNA και έκφραση η οποία αυξάνεται με αποσιώπηση της Reptin 52 (45). Αποδεικνύεται ότι ο HIF-2α αποσταθεροποιείται χωρίς όμως να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά του επίπεδα από την κατευθυνόμενη αποικοδόμηση του μέσω υδροξυλίωσης (45). Η αλληλεπίδραση του HIF-2 με την Reptin 52 είναι ένδειξη της πολυπλοκότητας της ρύθμισης του και ενός παράλληλου μηχανισμού καταστολής της μεταγραφικής δράσης του HIF-2α χωρίς να γνωρίζουμε την ακριβή φύση της αλληλεπίδρασης η οποία οδηγεί στην αποσταθεροποίησή του (45).

1.7 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και HIF-2α

Το Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα HCC (Hepatocellular Carcinoma) είναι ο πιο συχνός καρκίνος του ήπατος στους ενήλικες και ο έκτος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως. Εμφανίζει μεγάλη θνησιμότητα καθώς το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών σε χρονικό διάστημα πέντε ετών είναι μόλις 15% (46). Το HCC είναι ένας ετερογενής καρκίνος, και προϋποθέτει εξατομικευμένες προσεγγίσεις στην θεραπεία.

Οι άνδρες εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα κινδύνου ανάπτυξης HCC. Η ποιότητα ζωής μεγαλύτερης κατανάλωση αλκοόλ, καπνίσματος και κακής διατροφής συγκριτικά με τις γυναίκες μπορεί ίσως να εξηγεί τα μεγαλύτερα ποσοστά HCC στους άνδρες (47). Τους κύριους παράγοντες κινδύνου για το HCC αποτελούν οι ιώσεις της ηπατίτιδας B, C, το λιπώδες ήπαρ, αλκοολική ηπατίτιδα που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ίνωσης, κίρρωσης και στη συνέχεια στον καρκίνο (48). Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) έχει πλέον εξελιχθεί στην κύρια αιτία ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και η συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα που ορίζεται ως ηπατική στεάτωση μπορεί να προκαλέσει την NAFLD.

Ο HCC είναι ένας από τους καρκίνους με τις λιγότερες σωματικές μεταλλάξεις. Η συχνότερη γενετική μετάλλαξη η οποία προκαλεί HCC είναι μεταλλάξεις του γονιδίου TERT, με αυξημένη έκφραση της τελομεράσης (49).

Η έκφραση του HIF-2α όχι όμως του HIF-1α έχει βρεθεί στη νορμοξία αυξημένη σε στεατωτικά κύτταρα HCC σε σύγκριση με τα μη στεατωτικά (50). Στην υποξία η αύξηση της έκφρασης του HIF-2α βρέθηκε ότι συνδέεται με αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με τη σύνθεση λιπιδίων. Τα στεατωτικά κύτταρα HIF-2α-KD (-/-) παρουσίαζαν στην υποξία μειωμένη ποσότητα λιπιδίων σε σύγκριση με τα μη στεατωτικά (50). Παρόλα αυτά ο λεπτομερής μηχανισμός που στην υποξία οδηγεί με την αύξηση της έκφρασης του HIF-2α και στην αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών της σύνθεσης λιπιδίων παραμένει άγνωστος (50).

Παράλληλα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα στο HCC έχει εντοπιστεί πως το γονίδιο του παράγοντα SCF (Stem Cell Factor) φέρει στοιχείο απόκρισης στην υποξία HRE στο οποίο συνδέεται ο HIF-2α και επάγει την έκφρασή του. Ο SCF αποτελεί μία κυτοκίνη η οποία συνδέεται στον υποδοχέα c-kit οδηγεί στον διμερισμό του και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν εκτός από τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων την μετάσταση (51). Η έκφραση του SCF ήταν υψηλότερη σε κύτταρα Huh7 σε σύγκριση με άλλους κυτταρικούς τύπους HCC (52).

Έχει βρεθεί πως στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και ο HIF-1α και ο HIF-2α επάγουν την έκφραση του VEGF (53).

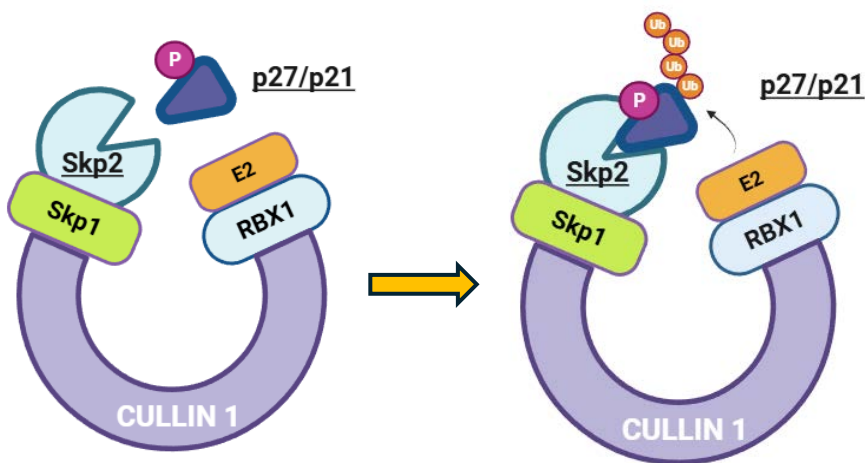
1.8 Η πρωτεΐνη Skp2 (S-phase kinase associated protein 2)

Η πρωτεΐνη Skp2 κωδικοποιείται από το γονίδιο Skp2 και ανήκει στην οικογένεια των F-box πρωτεϊνών που περιέχουν επικράτεια LRR πλούσια σε λευκίνες (LRR: Leucine Rich Domain). Οι F-box πρωτεΐνες περιέχουν το μοτίβο F-box το οποίο συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Οι F-box πρωτεΐνες είναι μέρη των συμπλόκων SCF-E3 λιγάσης της Ουβικουιτίνης (Scaffold E3 ligase complex). Ρόλος της F-box πρωτεΐνης στο σύμπλοκο E3, είναι η αναγνώριση πρωτεϊνών στόχων και η αλληλεπίδραση μαζί τους (54). Η αναγνώριση μίας πρωτεΐνης και η αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο E3, οδηγεί στην πολυουβικουιτίνωση και την ακολουθούμενη αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα μέσω του μηχανισμού Ουβικουιτίνωσης-Πρωτεασώματος (UPS: Ubiquitin-Proteasome System) (55). Η πρωτεΐνη Skp2 είναι μέρος του συμπλόκου RBX1-Cullin1-Skp1-Skp2. Το σύμπλοκο ανήκει στην οικογένεια των Ring-Cullin λιγασών E3, με την RBX1 ως πρωτεΐνη Ring επικράτειας για την αλληλεπίδραση με το E2 ένζυμο και την πρωτεΐνη Skp1 ως πρωτεΐνη ανάπτορα για την σύνδεση της Skp2 (56). Οι F-box πρωτεΐνες έχουν ρόλο στην ρύθμιση άλλων πρωτεϊνών και κατά συνέπεια

στην ρύθμιση κυτταρικών μηχανισμών όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (57). Η Skp2 έχει κύριο ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και μέσω του συμπλόκου E3, οδηγεί σε πρωτεόλυση τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p27/p21 η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των συμπλόκων κυκλινών και κυκλοεξαρτώμενων κυκλινών και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (58). Η πολυουβικουιτίνωση του p27 στην θρεονίνη 186 (Thr187) επιτρέπει την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S (59, 60). Μελέτες διπλής αποσιώπησης της Skp2 (-/-) σε εμβρυικούς μυοβλάστες ποντικού (MEFs) είχε ως αποτέλεσμα στα κύτταρα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εξαιτίας της συσσώρευσης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p27/p21 (61-63). Επιπλέον η Skp2 θεωρείται ρυθμιστής του παράγοντα της απόπτωσης p53 η υπερέκφραση της Skp2 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα του p53 ενώ με μειωμένη Skp2 παρατηρείται συσσώρευση του p53 (64).

Επίσης έχει βρεθεί ότι η Skp2 επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση. Μέσω της πολυουβικουιτίνωσης στην λυσίνης K-63 η πρωτεΐνη YAP μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων περιλαμβανόμενου του YAP (65).

Συμπερασματικά τα σημερινά βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η κατευθυνόμενη ουβικουιτίνωση από την Skp2 δρα ως κυτταρικό σήμα είτε για πρωτεόλυση όπως στην περίπτωση των αναστολέων p27/p21/p53 είτε σε ενδοκυτταρική μετατόπιση στην περίπτωση του παράγοντα YAP.



Εικόνα 1.6 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Skp2 ως μέρος του συμπλόκου της λιγάσης της ουβικουιτίνης. Αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και τις οδηγεί σε ουβικουιτίνωση. Ρυθμίζει τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p27/p21. (BioRender)

1.9 Γονιδιακή ρύθμιση της πρωτεΐνης Skp2

Η πρωτεΐνη Skp2 ρυθμίζεται σε γονιδιακό επίπεδο από αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες κατά κανόνα επάγουν την μεταγραφή του γονιδίου της Skp2. Εξωκυττάρια σήματα πολλαπλασιασμού τα οποία ενεργοποιούν την κινάση JAK2 και έπειτα την STAT3 κατευθύνουν την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου Skp2 (55). Η αύξηση της Skp2 θα οδηγήσει στην αυξημένη πρωτεόλυση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p27/p21 και θα εγκαθιδρύσει την μετάβαση από την G1 στην S φάση, μέσω του JAK2/STAT3 μονοπατιού (66). Παράλληλα ο NF-κΒ μέσω μονοπατιών και σηματοδότησης που ενεργοποιεί συμμετέχει στην αύξηση της έκφρασης του Skp2 κατά την G1 και συμβάλλει στην μετάβαση της G1 φάσης (67).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT έχει επίσης βρεθεί πως είναι ικανή να αυξήσει την έκφραση της Skp2 αλλά δεν την ενεργοποιεί (55). Ο παράγοντας υπεύθυνος για την ενίσχυση της έκφρασης μέσω του PI3K/AKT μονοπατιού είναι ο E2F1 (61). Η σύνδεση του E2F1 στο γονίδιο Skp2 παρατηρείται πως είναι μειωμένη με ταυτόχρονη καταστολή του μονοπατιού PI3K/AKT (66).

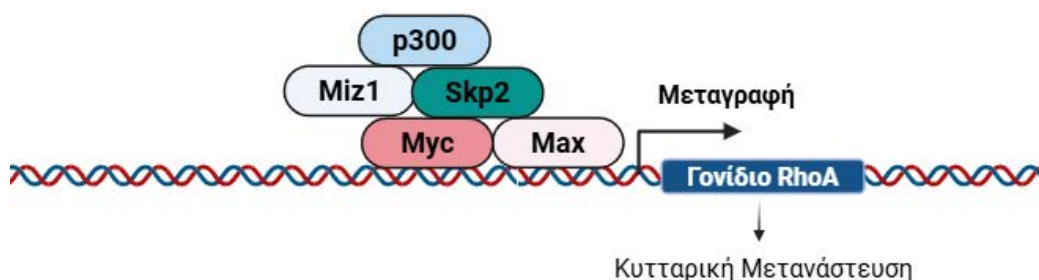
Παράλληλα και το NOTCH μονοπάτι έχει αναδειχθεί ως ρυθμιστής της έκφρασης της Skp2 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα CBF1 (68). Η προσδετοεξαρτώμενη και μη ενεργοποίηση του NOTCH1 καθοδηγεί την ενεργοποίηση του CBF1 σε μεταγραφικό επαγωγέα και την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου Skp2 (68). Συμπληρωματικά έχει εντοπιστεί πως σε κύτταρα νευροβλαστώματος ο μεταγραφικός παράγοντας MYCN συνδέεται στον υποκινητή του γονιδίου Skp2 και αυξάνει την έκφρασή του (69). Σε T λεμφοκύτταρα με την ενεργοποίηση του υποδοχέα TCR (T-cell Receptor) οι μεταγραφικοί παράγοντες SP1, ELK1 επάγουν την έκφραση του Skp2 (70). Επιπλέον θετικοί ρυθμιστές του Skp2 είναι οι πρωτεΐνες FOMX1 και GABP1 (55).

Αντίθετα ο παράγοντας FOXP3 έχει βρεθεί ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του γονιδίου Skp2 (61). Η ενεργοποίηση του FOXP3 ελέγχει αρνητικά την έκφραση της Skp2 σε καρκινικά μαστοκύτταρα συνδεόμενος στον υποκινητή του γονιδίου Skp2 (71). Ο FOXP3 είναι κρίσιμος για την ενεργοποίηση της ανοσοκατασταλτικής δράσης των T-ρυθμιστικών κυττάρων TREGs (72).

1.10 Η πρωτεΐνη Skp2 στον καρκίνο

Η Skp2 με την πολυουβικουτίνωση και πρωτεόλυση των αναστολέων CIP/KIP (p27, p21 p53) οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και έτσι το γονίδιο Skp2 καθίσταται ένα από τα γονίδια τα οποία προάγουν τον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό (58). Η αύξηση των επιπέδων της έκφρασης της Skp2 στον καρκίνο έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης της και την αυξημένη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η αυξημένη έκφραση Skp2 θεωρείται ένας από τους δείκτες κακής πρόγνωσης για τους ασθενείς σε πολλούς τύπους καρκίνου με κυριότερο τον καρκίνο του μαστού (55). Η Skp2 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την p300. Η ακετυλοτρανσφεράση p300 οδηγεί στην ενεργοποίησή του p53. Η Skp2 ανταγωνίζεται το p53 για την σύνδεση στην p300 και μειώνει την ενεργοποίησή του προσθέτοντας έναν ακόμα αρνητικό μηχανισμό ρύθμισης του p53 από την Skp2 επιπλέον από την πολυουβικουτίνωσή και πρωτεόλυση του, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (73).

Συσχέτιση έχει παρατηρηθεί μεταξύ της υπερέκφρασης του Skp2 και της μετανάστευσης στον καρκίνο. Αλληλεπιδράσεις της Skp2 περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες Myc και Miz1. Και οι τρεις πρωτεΐνες μαζί δημιουργούν ένα σύμπλοκο και η Skp2 δρα ως παράγοντας ο οποίος ενισχύει την προσέλκυση της Miz. Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου μαζί με την ακετυλοτρανσφεράση p300 οδηγεί στην ενεργοποίηση της έκφρασης της κινάσης RhoA, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της κυτταρικής μετανάστευσης (74). Η κινάση RhoA φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης (MLC: Myosin Light Chain) και απενεργοποιεί την κοφιλίνη οδηγώντας στην κυτταρική κίνηση και την μετάσταση στον καρκίνο (75). Παράλληλα η Skp2 συμμετέχει στην αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα TWIST ο οποίος ενισχύει την μεσεγχυματικότητα και την επιθετικότητα του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα η Skp2 οδηγεί σε πρωτεόλυση την E3 λιγάση του TWIST με αποτέλεσμα την μειωμένη πρωτεόλυση και την αύξηση της συγκέντρωσης του TWIST στο κύτταρο (76).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Skp2 με το μεταγραφικό σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταγραφή της κινάσης RhoA, η οποία συμβάλει στην κυτταρική μετανάστευση στον καρκίνο. (BioRender)

Σκοπός της εργασίας

Η εργασία αυτή ασχολείται με τον ρόλο του HIF-2α ως ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης. Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου Skp2 από τον παράγοντα HIF-2α. Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου υποστηρίζουν πως ο HIF-2α ρυθμίζει θετικά το γονίδιο Skp2 στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος Huh7. Τα αποτελέσματα αυτά αναδείχθηκαν με βιοπληροφορική ανάλυσης δεδομένων RNA-seq από κύτταρα Huh7 και με μελέτη της έκφρασης με ποσοτική RT-qPCR. Ο στόχος της παρούσας εργασίας επικεντρώθηκε στη μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου Skp2 από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α

Οι παράγοντες HIF σε συνθήκες υποξίας μετατοπίζονται στον πυρήνα και προκειμένου να επάγουν τα γονίδια στόχους τους, συνδέονται σε ειδικά μοτίβα, τα μοτίβα απόκρισης στην υποξία τα HRE (Hypoxia Response Element: RCGTG). Έτσι για να εξηγηθεί η επαγωγή του γονιδίου Skp2 στην υποξία, πρώτος στόχος της εργασίας θα είναι η αναζήτηση της ύπαρξης πιθανών μοτίβων HRE στη ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου, Skp2. Στη συνέχεια η αλληλουχία η οποία φέρει τα HRE θα ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και έπειτα θα κλωνοποιηθεί σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα ο οποίος περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης. Η κλωνοποίηση θα πραγματοποιηθεί ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης προκειμένου να ελεγχθεί η μεταγραφική δραστηριότητα της αλληλουχίας.

Στη συνέχεια, ο ανασυνδυασμένος φορέας ο οποίος περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης με την αλληλουχία HRE του γονιδίου Skp2 θα χρησιμοποιηθεί για να διαμολυνθούν κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος Huh7 και θα καλλιεργηθούν τόσο συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες υποξίας. Με δοκιμασία λουσιφεράσης θα ελεγχθεί η ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου Skp2 στην υποξία.

2. Υλικά

2.1 Εκκινητές

‘5 → 3’	Εκκινητές	T _m	Ποσοστό GC
Πρόσθιος Εκκινητής	TTTT GAGCTC GAGGCAGTTACTTTTCAAGC	69,2°C	45%
Οπίσθιος Εκκινητής	TTTT GAGCTC GCAACGTTCCATCCCC	69,5°C	63%

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με σκοπό την ενίσχυση της ρυθμιστικής αλληλουχίας, του υποκινητή και ενισχυτή, του γονιδίου Skp2 μέσω της αντίδρασης PCR. Οι εκκινητές περιέχουν την αλληλουχία ‘5-GAGCTC-3’ αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης SacI και τέσσερις επιπλέον θυμίνες για την σταθερότητα του εκκινητή και την δυνατότητα πέψης από την SacI.

2.2 Αντισώματα

Τα αντισώματα αξιοποιήθηκαν για την αναγνώριση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot. Για τον προσδιορισμό της ίσης ποσότητας ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της β-τουμπουλίνης ως εσωτερικός έλεγχος.

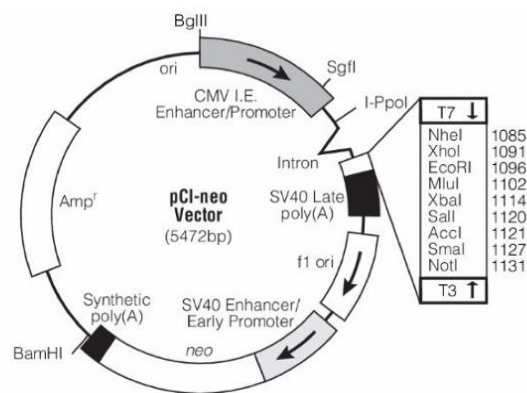
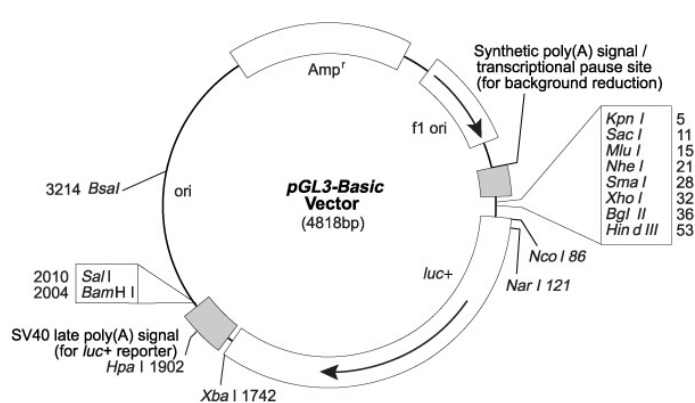
<u>Προμήθεια</u>	<u>Προέλευση</u>	<u>Αναλογία</u>	<u>Στόχος</u>
Cell signaling	Ορός κουνελιού	1:1000	HIF-2α
Cell signaling	Ορός κουνελιού	1:1000	β-Τουμπουλίνη
Cell signaling	Ορός κουνελιού	1:5000	Rabbit

2.3 Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά Huh7 αποτέλεσε παράγοντα μελέτης σε αυτήν την διπλωματική εργασία. Τα κύτταρα Huh7 τα οποία προέρχονται από ενήλικο άνδρα, είναι επιθηλιακά κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και ευρέως χρησιμοποιούμενα σε μελέτες που αφορούν τον καρκίνο του ήπατος.

2.4 Βακτηριακοί πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακός φορέας PGL3-Basic (4.818bp) αξιοποιήθηκε για τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας και για αυτόν τον σκοπό περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας καθοδικά της θέσης του πολυσυνδέτη (MCS: multiple cloning site). Ο φορέας PGL3-Promoter είναι πανομοιότυπος με τον PGL3-basic με την διαφορά πως περιέχει την ρυθμιστική αλληλουχία SV-40 ανοδικά του γονιδίου Luc. Επιπλέον το πλασμίδιο pCI-Renilla παράγει την λουσιφεράση Renilla και αποτελεί δείκτη της διαμόλυνσης στον υπολογισμό της επαγωγής της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας. Οι πλασμιδιακοί φορείς προμηθεύτηκαν από την εταιρία Promega.



Εικόνα 2.1 : Οι πλασμιδιακοί φορείς PGL3-Basic, pCI-Renilla

2.5 Διαλύματα

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS

PBS 10X	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
NaCl	138mM
KCl	2.67mM
Na₂HPO₄	8.1mM
KH₂PO₄	1.47mM

Πίνακας 2.1

Ρυθμιστικό Διάλυμα TBS-Tween20

TBST 10X	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	20mM
NaCl	150mM
TWEEN	0.1%
H₂O	1000ml

Πίνακας 2.2

Διάλυμα Running Buffer

RUNNING BUFFER 5X	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	50mM
ΓΛΥΚΙΝΗ	1.92mM
SDS	1%

Πίνακας 2.3

Διάλυμα Transfer buffer

Transfer Buffer	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	125mM
DTT	0.5mM
SDS	0.2%

Πίνακας 2.4

Διάλυμα TAE

TAE 50X	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
TRIS	24.2%
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	5.71%
EDTA 0.5M	0.05M

Πίνακας2.4

Διάλυμα LB (Luria Broth)

LB BROTH	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
TRYPTONE	(10g) [∞]
YEAST EXTRACT	(5g) [∞]
NaCl	86mM
H ₂ O	1L

Πίνακας2.5

Πηκτή Διαχωρισμού

ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	
<u>ΧΗΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
Ακρυλαμίδιο	10%
EDTA	2mM
APS	0.04%
TEMED	0.02%
SDS	0.1%
TRIS	0.375M

Πίνακας2.6

Πηκτή Συσσωρεύσης

ΠΗΚΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ	
<u>ΧΗΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
Ακρυλαμίδιο	4.5%
EDTA	2mM
APS	0.04%
TEMED	0.04%
SDS	0.1%
TRIS	0.125mM

Πίνακας2.7

Διαλύματα TFB-I/II

TFB-I		TFB-II	
CH ₃ COOK	30 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂	50 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	KCl	10 mM
KCl	100 mM	γλυκερόλη	20%
γλυκερόλη	15%		

Πίνακας2.8

3. Μέθοδοι

3.1 Μέθοδοι καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων

3.1.1 Επανέναρξη καλλιέργειας κυττάρων Huh7 από το υγρό άζωτο

Για την επανέναρξη κυτταρικής καλλιέργειας Huh7 το φιαλίδιο των κυττάρων μεταφέρεται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο, το οποίο ρυθμίζεται στην θερμοκρασία των 37°C. Με χειροκίνητη ανακίνηση το φιαλίδιο θερμαίνεται για σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι να υγροποιηθεί. Στην συνέχεια το φιαλίδιο αποστειρώνεται εξωτερικά με την χρήση αιθανόλης 70% και ύστερα μεταφέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής. Το διάλυμα με τα κύτταρα διασπείρεται σε πιάτο το οποίο περιέχει θρεπτικό μέσο DMEM με 10% ορό FBS εμβρύου βόου (Fetal Bovine Serum) και 100U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο Heal Force HF 90 ο οποίος διατηρεί σταθερή την θερμοκρασία στους 37°C και την συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται πλύση του πιάτου με PBS 1X και αλλαγή του θρεπτικού μέσου για την απομάκρυνση των νεκρών ή μη προσκολλημένων κυττάρων από την καλλιέργεια.

3.1.2 Διαδικασία προετοιμασίας κυττάρων Huh7 για την διατήρησή τους στο υγρό άζωτο.

Για την διατήρηση των κυττάρων μίας κυτταρικής καλλιέργειας χωρίς την καταστροφή των μεμβρανών τους με σκοπό την επανέναρξη της σε ένα μεταγενέστερο χρόνο, τα κύτταρα μεταφέρονται στο υγρό άζωτο στην θερμοκρασία των -196°C για θεωρητικά άπειρο χρονικό διάστημα. Για τα κύτταρα Huh7 το διάλυμα κατάλληλο για την διατήρησή τους αποτελείται από θρεπτικό μέσο DMEM με 10% ορό FBS (Fetal Bovine Serum) και 10% DMSO.

Αρχικά, το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται από το πιάτο και πραγματοποιείται μία πλύση στα κύτταρα με διάλυμα PBS 1X. Αφού αφαιρεθεί το PBS προστίθεται 1ml θρυψίνης 0.2% και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών προσκόλλησης. Έπειτα προστίθεται 4ml DMEM για την αναστολή της θρυψίνης και τα κύτταρα μεταφέρονται σε Falcon tube και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 3000rpm. Τέλος το μέσο DMEM αφαιρείται και το κύτταρα επαναιωρούνται σε 1ml του διαλύματος DMEM 10% FBS 10% DMSO.

3.1.3 Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

Οι κυτταρικές καλλιέργειες επιτρέπουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε επιφάνειες περιορισμένου μεγέθους. Όταν τα κύτταρα μίας καλλιέργειας αναπτυχθούν και καλύψουν όλη την επιφάνεια ενός πιάτου είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε νέο πιάτο. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας βασίζεται στην χρήση μίας πρωτεάσης σερίνης αργινίνης, την θρυψίνη, για την πέψη των πρωτεϊνών προσκόλλησης και την αποκόλλησή των κυττάρων από τον πυθμένα του πιάτου. Πρώτα πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και γίνεται πλύση των κυττάρων με 1X PBS. Έπειτα προστίθεται 1ml 0.2% θρυψίνης και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 5-7 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται 4ml μέσου DMEM για την απενεργοποίηση της θρυψίνης και 1ml των επαναιωρημένων κυττάρων μεταφέρονται σε νέο πιάτο με 6ml θρεπτικού μέσου DMEM (+/+) το οποίο περιέχει 10% ορό FBS εμβρύου βόου (Fetal Bovine Serum) και αντιβιοτικών 100U/ml πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκαν σε ειδικό επωαστικό θάλαμο, Heal Force HF 90 ο οποίος διατηρεί σταθερή την θερμοκρασία στους 37°C και την συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα 5% CO₂.

3.1.4 Εισαγωγή κυττάρων σε συνθήκες υποξίας

Τα κύτταρα εισήχθησαν στον υποξικό θάλαμο και παράμειναν στις υποξικές συνθήκες για 16 ώρες με σκοπό να εξασφαλιστεί η σταθεροποίηση του HIF-2α. Εσωτερικά οι συγκεντρώσεις των αερίων παραμένουν σταθερές, οι οποίες είναι για το οξυγόνο O₂=1% και το διοξείδιο του άνθρακα CO₂=5%. Χρησιμοποιήθηκε ο υποξικός θάλαμος IN VIVO₂ 200.

3.2 Μέθοδοι βακτηριακών κυττάρων

3.2.1 Δημιουργία βακτηρίων δεκτικών προς μετασχηματισμό TOP10

Η παρασκευή δεκτικών κυττάρων TOP10 προς μετασχηματισμό βασίζεται στην χρήση διαλύματος με το άλας CaCl₂ το οποίο έχει παρατηρηθεί πως βελτιώνει την εισαγωγή μεγαλύτερων μορίων πλασμιδιακού DNA στα οποία έχει γίνει εισαγωγή με ένθεμα. Το CaCl₂ βοηθάει στην εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων στην μεμβράνη των βακτηρίων και επιτρέπει την προσέλκυση του DNA στην μεμβράνη και έπειτα διευκολύνεται η διαδικασία του

μετασχηματισμού με την τεχνική του θερμικού σοκ εισάγοντας τα βακτήρια από τον πάγο στους 42°C για μικρό χρονικό διάστημα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια E.Coli τα οποία εμβολιάζουμε αρχικά σε υγρή καλλιέργεια με όγκο 3ml του θρεπτικού TYM και αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη (100μg/μl) 1:1000 και επωάζουμε για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 150rpm. Την επόμενη ημέρα παίρνουμε μία ποσότητα 3ml από την ολονύχτια καλλιέργεια και μεταφέρουμε σε νέα καλλιέργεια 3ml TYM με τελική αραίωση 1:100 και με την απουσία αντιβιοτικού με στόχο να επιτρέψουμε την γρήγορη ανάπτυξη βακτηρίων και την εισαγωγή στην εκθετική φάση επωάζοντας για 2-3 ώρες με συνεχόμενη ανάδευση για την καλύτερη οξυγόνωση της καλλιέργειας. Στην συνέχεια εμβολιάζουμε μία καλλιέργεια 50ml TYM με 250μl από την προηγούμενη καλλιέργεια των 3ml, πραγματοποιώντας 1:1250 αραίωση. Επωάζουμε την καλλιέργεια έως ότου η πυκνότητα των βακτηρίων την οποία μετρούμε με φωτομέρηση να φτάσει σε μήκος κύματος 600nm, $OD_{600} = 0.35 - 0.4$ το οποίο αναλογεί σε ένα πλήθος 9×10^6 κυττάρων E.Coli. Όταν τα κύτταρα φτάσουν αυτήν την οπτική συγκέντρωση τότε φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στα 4000g για 5 λεπτά στους 4°C για να αναστείλουμε τον μεταβολισμό των βακτηρίων. Έπειτα προσθέτουμε στο βακτηριακό ίζημα το διάλυμα TFB-I (25ml) επαναιωρούμε και επωάζουμε τα βακτήρια για 10 λεπτά το οποίο περιέχει $CaCl_2$ για την εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων της μεμβράνης. Φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες 4000g για 5 λεπτά στους 4°C και αφού απορρίψουμε το υπερκείμενο TFB-I στην συνέχεια προσθέτουμε το διάλυμα TFB-II 2ml το οποίο περιέχει γλυκερόλη με συγκέντρωση 20%. Επαναιωρούμε και επωάζουμε στον πάγο για 60 λεπτά. Στην συνέχεια μπορούμε να μοιράσουμε και να αποθηκεύσουμε τα βακτήρια στην θερμοκρασία των -80°C. Το διάλυμα προστατεύει την μεμβράνη των βακτηρίων από την βαθιά ψύξη και τα καθιστά έτοιμα για μετασχηματισμό μόλις τα ξεπαγώσουμε.

3.2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με την μέθοδο θερμικού σοκ

Με την διαδικασία του μετασχηματισμού γίνεται δυνατή η εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτηρικά κύτταρα. Το θερμικό σοκ αποτελεί μία αποτελεσματική και την πιο κοινή μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμών βακτηρίων TOP10. Βασίζεται στην δημιουργία πόρων στην βακτηριακή μεμβράνη από την οποία μπορεί να εισέλθει το πλασμιδιακό DNA. Αναλυτικά 100μl διαλύματος δεκτικών βακτηρίων TOP10 μεταφέρονται από τους -80°C στον πάγο και προστίθεται 1μg πλασμιδιακού DNA. Πραγματοποιείται επώαση 30 λεπτών στον πάγο

και στην συνέχεια ακολουθεί το θερμικό σοκ και τα βακτήρια μεταφέρονται στους 42°C για 2 λεπτά και μετά ξανά επώαση στον πάγο για 3 λεπτά. Έπειτα προστίθεται 700μl θρεπτικού μέσου LB και τα βακτήρια επωάζονται στους 37°C για 1. Στο τέλος μία ποσότητα των βακτηρίων μεταφέρεται σε τριβλίο το οποίο περιέχει αντιβιοτικό αμικικιλίνη (1mg/ml) για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Το τριβλίο επωάζεται σε ενυδατωμένο θάλαμο στους 37°C για 16 ώρες.

3.2.3 Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων

Η επιλογή των βακτηριακών κλώνων οι οποίοι έχουν προκύψει από επιτυχή μετασχηματισμό στηρίζεται την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό στο πλασμίδιο το οποίο εισέρχεται στα βακτήρια.

Το πλασμίδιο PGL3-Basic περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και τα τριβλία τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηρίων περιέχουν αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 1mg/ml στο στερεό LB-Agar. Συνεπώς το σύνολο των βακτηριακών κλώνων οι οποίοι προέκυψαν είχανε μετασχηματιστεί. Το μέσο ανάπτυξης Luria-Bertani (LB) περιέχει περιέχει χλωριούχο νάτριο για την ρύθμιση της ωσμωτικότητας και την παροχή ιόντων Na-Cl. Επιπλέον περιέχει προϊόν πέψης καζεΐνης ως πηγή αμινοξέων και πηγή αζώτου και εκχύλισμα ζύμης η οποία προσφέρει παράγοντες ανάπτυξης και βιταμίνες. Το άγαρ είναι υπεύθυνο για την στερεοποίηση του υγρού. Το μέσο LB αποστειρώνεται πριν την χρήση και την προσθήκη του αντιβιοτικού.

3.2.4 Ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας

Η ανάπτυξη υγρής βακτηριακής καλλιέργειας μας δίνει την δυνατότητα χρήσης των βακτηρίων ως βιοτεχνολογικό εργαλείο όπως, για την απομόνωση ενός πλασμιδίου σε μεγάλη ποσότητα ή την υπερέκφραση και απομόνωση μίας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Για την ανάπτυξη μίας υγρής καλλιέργειας μία αρχική ποσότητα βακτηρίων ανάλογα με τον όγκο της εμβολιάζεται στο υγρό θρεπτικό μέσο. Το υγρό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το LB (Luria-Bertani, medium). Το LB περιέχει χλωριούχο νάτριο για την ρύθμιση της ωσμωτικότητας και την παροχή ιόντων Na-Cl. Επιπλέον περιέχει προϊόν πέψης

καζεΐνης ως πηγή αμινοξέων και αζώτου και εκχύλισμα ζύμης η οποία προσφέρει παράγοντες ανάπτυξης και βιταμίνες. Το μέσο LB αποστειρώνεται πριν την χρήση. Τα βακτήρια TOP10 αναπτύσσονται υπό συνεχή ανάδευση για την καλή οξυγόνωση της καλλιέργειας, σε θερμοκρασία 37°C για την βέλτιστη ανάπτυξή τους για 16 ώρες μέχρι την στατική φάση ανάπτυξης. Παράλληλα για την ανάπτυξη των βακτηρίων που φέρουν το πλασμίδιο ανθεκτικότητας προστίθεται αντιβιοτικό με τελική συγκέντρωση 1μg/μl.

Για την ανάπτυξη καλλιιεργειών μικρής κλίμακας, με σκοπό την απομόνωση και την πέψη του πλασμιδιακού DNA, μία αποικία από το τριβλίο εμβολιάστηκε σε 5ml υγρής καλλιέργειας με την προσθήκη 5μl αντιβιοτικού αμπικιλίνης ($C_A=1\text{g/ml}$) και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 150rpm.

Για την ανάπτυξη καλλιιεργειών μεσαίας κλίμακας, με σκοπό την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεγαλύτερη ποσότητα, αναπτύσσεται πρώτα μία μικρή καλλιέργεια 5ml όπως αναφέρθηκε, η οποία επώαζεται για 4 ώρες. Από αυτήν την καλλιέργεια 40μl χρησιμοποιούνται και εμβολιάστηκαν σε μεσαία καλλιέργεια των 40ml στην οποία προστέθηκαν 40μl αντιβιοτικού αμπικιλίνης ($C_A=1\text{g/ml}$) και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 150rpm.

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης DNA

3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μία πολυδύναμη τεχνική η οποία διεύρυνε ταχέως τις δυνατότητες της ανάλυσης του DNA καθώς επιτρέπει την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων από ένα αρχικό μορίο DNA. Αρχικά σχεδιάζονται δύο μικρού μήκους μόρια DNA οι εκκινητές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί και συνδέονται αντιπαράλληλα στην επιθυμητή αλληλουχία του DNA. Η αντίδραση αξιοποιεί υψηλή θερμοκρασία για τον διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA. Στην συνέχεια πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών σε θερμοκρασία χαμηλότερη της αποδιάταξης η οποία εξαρτάται κυρίως από το μήκος τους και το ποσοστό βάσεων GC% των εκκιντών. Για την δημιουργία του νέου κλώνου DNA, αξιοποιείται το ένζυμο της DNA πολυμεράσης το οποίο συνεχίζει την επέκταση ενός κλώνου DNA αξιοποιώντας ως

πρότυπο τον υπάρχων κλώνο του DNA και η σύνδεση των εκκινητών επιτρέπει την δράση του ενζύμου για την δημιουργία αντιγράφων του αρχικού μορίου DNA. Καθώς για την αποδιάταξη του DNA αναπτύσσεται υψηλή θερμοκρασία στην αντίδραση το ένζυμο της Taq-pol πολυμεράσης η οποία χρησιμοποιείται απομονώνεται από θερμοφιλά βακτήρια το *Thermus aquaticus*. Η πραγματοποίηση της αντίδρασης βασίζεται στην χρήση ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμοκυκλοποιητή, κατάλληλος για την ρύθμιση της θερμοκρασία και την μεταβολή της ανάλογα με το κάθε στάδιο της αντίδρασης. Η αντίδραση αποτελείται από τρία διακριτά στάδια:

1. Το πρώτο στάδιο, της αποδιάταξης του DNA όπου οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται σε θερμοκρασία 95°C
2. Το δεύτερο στάδιο, της υβριδοποίησης των εκκινητών στην μήτρα των αποδιαταγμένων κλώνων σε θερμοκρασία 55 °C -65 °C η οποία καθορίζεται από το μήκος των εκκινητών, το ποσοστό σε G-C και επαναλήψεις GC. Για την αποτελεσματική σύνδεση των εκκινητών και ενίσχυση του DNA, οι εκκινητές σχεδιάζονται με μικρή απόκλιση στην θερμοκρασία υβριδοποίησης.
3. Το τρίτο στάδιο της, δημιουργίας του κλώνου του DNA όπου λειτουργεί η DNA πολυμεράση και επιμηκώνει την μήτρα του DNA σε θερμοκρασία την οποία δρα η κάθε ισομορφή της θερμοφιλης πολυμεράσης η οποία εισάγεται στην αντίδραση.

Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει το πρότυπο DNA, τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση. Επίσης περιέχει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια τα οποία θα δράσουν ως υπόστρωμα και ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο καθορίζει την ύπαρξη ιόντων Mg^{2+} , το pH και την ιοντική ισχύ για την λειτουργία της πολυμεράσης.

Στα πλαίσια της μελέτης η αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ρυθμιστικής αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου SKP2 πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο πολυμεράσης Vent® DNA Polymerase και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα ThermoPol® Reaction Buffer της εταιρίας NEW ENGLAND Biolabs®. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αποτυπώνονται παρακάτω μαζί με το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή το οποίο σχεδιάστηκε:

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων:

DNA:	50ng
Νουκλεοτίδια (dNTPS):	200nM
Εκκινητής Forward:	0,5μM
Εκκινητής Reverse:	0,5μM
P.Δ. Πολυμεράσης:	1X (200mM Mg ²⁺)
DNA Πολυμεράση:	0,5U

Ο συνολικός όγκος αντίδρασης είναι 50μl, με την προσθήκη απιονισμένου νερού χωρίς την παρουσία DNάσης,Rnάσης.

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

1 Κύκλος:	94 °C	3 λεπτά
30 Κύκλοι:	94 °C	1 λεπτό
	62 °C	30 δευτερόλεπτα
	72 °C	2 λεπτά
1 Κύκλος:	72 °C	5 λεπτά

Ο πρώτος κύκλος των τριών λεπτών βοηθάει στην πλήρη αποδιάταξη του ολικού χρωμοσωμικού DNA. Οι 30 κύκλοι περιέχουν τα στάδια της αντίδρασης PCR όπως αναφέρθηκαν. Ο τελευταίος κύκλος των 4 λεπτών προσφέρει την δυνατότητα στην πολυμεράση, να ολοκληρώσει την επέκταση ημιτελών κλώνων, στην θερμοκρασία στην οποία δρα.

3.3.2 Αντίδραση Πέψης DNA

Η πέψη ενός μορίου DNA σε περισσότερα μόρια μικρότερου μήκους ή ενός κυκλικού μορίου σε ένα γραμμικό μόριο πραγματοποιείται εύκολα με μία αντίδραση πέψης. Η αντίδραση πέψης γίνεται μέσω των ενζύμων τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες στο DNA και δημιουργούν δίκλωνες πέψεις στο δίκλωνο DNA. Μία περιοριστική ενδονουκλεάση έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει μία ξεχωριστή αλληλουχία DNA συνήθως 6 βάσεων και να πέπτει σε κάθε επανάληψη της αλληλουχίας που συναντά σε ένα μόριο. Ένα ένζυμο μπορεί να δημιουργεί μονόκλωνα ή δίκλωνα άκρα. Χάρη στην εξειδίκευση

στις διαφορετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν, επιτρέπουν τον συνδυασμό διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων ώστε να προκύψει ο επιθυμητός συνδυασμός μορίων DNA με τα επιθυμητά τελικά άκρα από το αρχικό μόριο DNA. Οι πέψεις είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην διαδικασία της κλωνοποίησης για την μετατροπή ενός φορέα σε γραμμικό και στην δημιουργία όμοιων μονόκλωνων άκρων με σκοπό την ενσωμάτωση ενός ενθέματος σε έναν φορέα.

Η αντίδραση πέψης ελέγχου πραγματοποιείται με τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

Όγκος αντίδρασης 20μl

Πλασμιδιακό DNA:	0,5μg
Ρυθμιστικό διάλυμα:	1X
Περιοριστική Ενδονουκλεάση:	2U

Η αντίδραση παρασκευαστικής πέψης πραγματοποιείται με τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

Όγκος αντίδρασης 50μl

Πλασμιδιακό DNA:	1μg
Ρυθμιστικό διάλυμα:	1X
Περιοριστική Ενδονουκλεάση:	20U

3.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η δημιουργία ενός πηκτώματος αгарόξης (πολυσακχαρίτης) αποτελεί ένα πορώδες πλέγμα το οποίο μπορούν να διασχίζουν νουκλεοτιδικά μακρομόρια. Η απόσταση που μετακινούνται μέσα στην πηκτή καθορίζεται από το μήκος τους και την πυκνότητα της πηκτής η οποία εξαρτάται από την συγκέντρωση της αгарόξης. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα στην πηκτή ενώ μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά. Μικρότερη συγκέντρωση αгарόξης επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ανάλυση μεγαλύτερων μορίων DNA ενώ μεγαλύτερη συγκέντρωση αгарόξης μικρών μορίων DNA. Παράλληλα υπερελικωμένα κυκλικά μόρια DNA κινούνται γρηγορότερα σε σύγκριση με τα γραμμικά ανάλογα τους. Το DNA εξαιτίας του αρνητικού φορτίου του που αποδίδεται στις φωσφορικές του ομάδες κινείται στο ηλεκτρικό πεδίο προς τον θετικά φορτισμένο

πόλο μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος TAE. Για την οπτικοποίηση του DNA γίνεται χρήση Βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο έχει την ικανότητα να συνδέεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει υπό την υπεριώδη ακτινοβολία (UV light). Στα δείγματά της ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε διάλυμα φόρτωσης το οποίο περιέχει γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στον πυθμένα και χρωστικές (όπως το bromophenol blue) για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Επίσης η ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση του «Μάρτυρα», ο οποίος αποτελείται από θραύσματα DNA γνωστού μήκους βοηθά στην εκτίμηση των τμημάτων DNA στα δείγματά μας.

3.3.4 Αντίδραση λιγάσης

Η χρήση του ενζύμου της λιγάσης μας δίνει την δυνατότητα της σύνδεσης δύο μορίων DNA. Για την στοχευμένη σύνδεση δύο μορίων DNA, αυτά πρέπει να διαθέτουν όμοια μονόκλωνα άκρα αλλιώς η λιγάση θα συνδέσει αυθαίρετα δίκλωνα άκρα τα οποία θα εντοπίσει. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός νέου φωσφοδιεστερικού δεσμού με την μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας ενός μορίου ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) στο 5' ελεύθερο άκρο το οποίο προσβάλλεται από το υδροξύλιο στο 3' ελεύθερο άκρο και σχηματίζεται ο φωσφοδιεστερικός δεσμός.

Κατά την κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρεις αντιδράσεις λιγάσης με διαφορετικές αναλογίες ενθέματος ως προς τον πλασμιδιακό φορέα 1:1, 3:1, 5:1. Οι αντιδράσεις υπολογίστηκαν με την χρήση 50ng από τον πλασμιδιακό φορέα για κάθε αντίδραση. Μετά την προσθήκη όλων των συστατικών πραγματοποιούμε σύντομο vortex και στο τέλος προσθέτουμε το ένζυμο λιγάσης (T4 ligase, NEB) και αναδεύουμε με την χρήση της πιπέτας. Η αντίδραση επώάζεται στους 16°C για 16 ώρες ολονύχτια στον θερμοκυκλοποιητή. Μετά την ολοκλήρωση των 16 ωρών η θερμοκρασία μεταβάλλεται στους 4°C για την διατήρηση του DNA.

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων

Όγκος αντίδρασης 20μl

DNA φορέα (4.886bp):	50ng
DNA ενθέματος (1.332bp):	13,63ng/40,89ng/68,15ng (1:1/3:1/5:1)
P.Δ. Λιγάσης:	1X
T4 Λιγάση:	1U

3.4 Μέθοδοι Απομόνωσης και καθαρισμού DNA

3.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τα κύτταρα καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το kit Nucleospin Tissue της εταιρίας Macherey Nagel το οποίο επιτρέπει την απομόνωση ευκαριωτικού DNA υψηλής καθαρότητας με χρήση στήλης κατάλληλο για αντιδράσεις PCR. Για την απομόνωση αρχικά πραγματοποιείται η συλλογή και η λύση των κυττάρων. Το κυτταρικό εκχύλισμα φορτώνεται στην στήλη και με την παρουσία χαστροπικών αλάτων το DNA προσδένεται στην στήλη. Στην συνέχεια πραγματοποιείται πλύση για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων πρωτεϊνικών προσμίξεων. Το DNA συλλέγεται με την προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύς για την έκλυση της στήλης.

Όσον αφορά τα βήματα που ακολουθήθηκαν αναλυτικά: Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις στα κύτταρα με διάλυμα PBS 1X, έπειτα η περίσσεια PBS της πλύσης αφαιρέθηκε, και τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 1ml PBS 1X με την χρήση ξύστρας και μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο 1,5ml. Αμέσως μετά έγινε η προσθήκη 200μl του διαλύματος επαναιώρησης T1, 200μl από το διάλυμα λύσης B3 και 25μl του διαλύματος πρωτεϊνάσης K, το μείγμα αναμείχθηκε με vortex και επώαστηκε για 10-15 λεπτά στους 70°C για την λύση των μεμβρανών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών με την παρουσία υδροχλωρικής γουανιδίνης στο διάλυμα B3 η οποία ταυτόχρονα προετοιμάζει την σύνδεση του DNA στην στήλη ως χαστροπικός παράγοντας. Έπειτα προστέθηκαν 210μl 100% διαλύματος αιθανόλης και το διάλυμα αναμείχθηκε με vortex. Η αιθανόλη ελαττώνει την πολικότητα στο διάλυμα και ενισχύει την σύνδεση του DNA στην στήλη και την απομάκρυνση του RNA ενώ επιπλέον βοηθάει στην δευτεροταγή αποδιάταξη των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα. Έπειτα, το κυτταρικό εκχύλισμα μεταφέρεται στην στήλη και φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα με τα συστατικά που δεν συγκρατήθηκαν στην στήλη απορρίπτεται. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται δύο πλύσεις, η μία με την προσθήκη 500μl από το διάλυμα BW το οποίο περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη βοηθώντας στην απομάκρυνση πρωτεϊνικών προσμίξεων από την στήλη και η δεύτερη πλύση πραγματοποιείται με την προσθήκη 600μl από το διάλυμα B5 το οποίο περιέχει αιθανόλη. Μετά από κάθε πλύση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό και απόρριψη του εκλούσματος. Ακολουθεί μία επιπλέον φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 11.000g με σκοπό να απομακρυνθεί η

περίσσεια αιθανόλης η οποία αναστέλλει τις ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος προστίθεται στην στήλη 100μl από το διάλυμα της έκλουσης BE το οποίο περιέχει χαμηλή συγκέντρωση αλάτων και επιτρέπει την αποσύνδεση του DNA από την στήλη. Η στήλη φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1 λεπτό το διάλυμα της έκλουσης με το DNA συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

3.4.2 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης είναι σημαντική για την απομόνωση DNA χωρίς την παρουσία ανεπιθύμητων τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους. Η απομόνωση από την πηκτή βασίζεται στην επιλεκτική απομάκρυνση της ζώνης η οποία περιέχει το DNA από την πηκτή με νυστέρι. Το ακριβές πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Macherey-Nagel από το kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up. Το κομμάτι πηκτής που απομονώθηκε ζυγίζεται. Αρχικά προστίθεται το διάλυμα NTI με αναλογία 200μl ανά 100mg πηκτώματος. Η δράση του NTI χαοτροπικού διαλύματος το οποίο περιέχει θειακυανική γουανιδίνη είναι να διασπάσει τους δεσμούς που συνθέτουν την πηκτή και να την διαλυτοποιήσει, επιπλέον αναστέλλει πρωτεΐνες/ένζυμα τα οποία πιθανόν να βρίσκονται στην πηκτή ενώ έπειτα βοηθά στην πρόσδεση του DNA πάνω στην στήλη. Το πήκτωμα επωάζεται για 5-10 λεπτά στους 50°C, με ενδιάμεσο vortex, μέχρι ωστόσο να διαλυτοποιηθεί ολοκληρωτικά. Στην συνέχεια, 700μl της διαλυμένης πηκτής μεταφέρονται στο σωληνάριο της στήλης και η στήλη φυγοκεντρείται στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα και το έκλουσμα απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να μεταφερθεί όλο το διάλυμα στην στήλη. Έπειτα 700μl διαλύματος πλύσης NT3 το οποίο περιέχει αιθανόλη προστίθεται στην στήλη και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα. Το βήμα της πλύσης επαναλαμβάνεται μία ακόμη φορά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στα 11.000g για να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης από την στήλη η οποία μπορεί να αναστείλει ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος, προστίθεται προσεκτικά στην στήλη 15-30μl διαλύματος έκλουσης NE χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων (Tris-HCL pH=8.5) για την αποδέσμευση του DNA από την στήλη και γίνεται φυγοκέντρωση στα 11.000g για 1 λεπτό. Το υγρό της έκλουσης το οποίο περιέχει το DNA συλλέγεται.

3.4.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με κατακρήμνιση ισοπροπανόλης

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA βασίζεται στην χρήση ισχυρής βάσης υδροξειδίου του νατρίου NaOH για την λύση των βακτηρίων και την αποδιάταξη του βακτηριακού DNA και του πλασμιδιακού το οποίο όμως επαναφέρεται στην δίκλωνη μορφή του μετά την εξουδετέρωση του υψηλού pH με διάλυμα οξικού καλίου CH₃COOK. Για την τελική απομόνωση του πλασμιδιακού DNA προστίθεται ισοπροπανόλη ώστε να καθιστεί αδιάλυτο και να κατακρημνιστεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με ανοσοκατακρήμνιση ισοπροπανόλης επιτρέπει την απομόνωση υψηλής ποσότητας πλασμιδιακού DNA το οποίο χρησιμεύει στην μελέτη και τον έλεγχο πλασμιδιακών κατασκευών.

Πιο αναλυτικά 1,5ml από την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, μεταφέρονται σε σωληνάριο 1,5ml και φυγοκεντρούνται για την καθίζηση των βακτηρίων για 1 λεπτό στα 11.000g. Έπειτα το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 150μl παγωμένου διαλύματος επαναιώρησης, το οποίο είναι παγωμένο για την αναστολή της μεταβολικής τους δραστηριότητας και περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCL για την σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών, EDTA για την αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων και Rnάση για την αποικοδόμηση του RNA και γίνεται επώαση για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται 200μl διαλύματος λύσης το οποίο περιέχει SDS και NaOH και πραγματοποιείται ελαφριά ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά, για την αλκαλική λύση των μεμβρανών (SDS) και την αποδιάταξη του DNA (NaOH) και των πρωτεϊνών (SDS, NaOH). Στην συνέχεια προστίθεται 150μl διαλύματος εξουδετέρωσης το οποίο περιέχει οξικό νάτριο για την αναστολή της αλκαλικής λύσης με εξουδετέρωση του βασικού pH και επώαση 5 λεπτών στον πάγο, με σκοπό την διατήρηση της ακεραιότητας του πλασμιδιακού DNA το οποίο επαναφέρεται στην δίκλωνη μορφή του. Μετά την εξουδετέρωση το βακτηριακό λύμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 4°C στα 12.000g. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει διαλυτό στο υπερκείμενο υγρό το οποίο συλλέγεται σε νέο σωληνάριο 1,5ml. Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 450μl ισοπροπανόλης (1:1 αναλογία) και μεταφορά του σωληναρίου στους -20°C για 30 λεπτά για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το πλασμιδιακό DNA σχηματίζει ίζημα με την μορφή πέλλετ και γίνεται προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης για την πλύση του DNA. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στην συνέχεια το σωληνάριο διατηρείται

ανοικτό για την εξάτμιση της περίσσειας της αιθανόλης. Μόλις εξατμιστεί η αιθανόλη, το πλασμιδιακό DNA επαναιωρείται σε 50μl καθαρού νερού χωρίς προσμίξεις.

3.4.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την χρήση στήλης.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA βασίζεται στην χρήση ισχυρής βάσης υδροξειδίου του νατρίου NaOH για την λύση των βακτηρίων και την αποδιάταξη του βακτηριακού DNA και του πλασμιδιακού το οποίο όμως επαναφέρεται στην δίκλωνη μορφή του μετά την εξουδετέρωση του υψηλού pH με διάλυμα οξικού καλίου CH₃COOK. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με την χρήση στήλης επιτρέπει την απομόνωση υψηλής καθαρότητας DNA για την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR, την αλληλούχηση του πλασμιδιακού DNA και την μελέτη γονιδιακών κατασκευών.

Αξιοποιήθηκε το kit Nucleospin Plasmid, Macherey-Nagel. Η υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, φυγοκεντρείται για την καθίζηση των βακτηρίων για 15 λεπτά στις 4.500rpm σε θερμοκρασία 4°C για την αναστολή του μεταβολισμού των βακτηρίων. Έπειτα το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και τα βακτήρια επαναιωρούνται ανάλογα με τον όγκο της καλλιέργειας ανά 5ml καλλιέργειας σε 250μl διαλύματος A1 απαναιώρησης, το οποίο περιέχεται στο kit και περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCL για την σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών, EDTA για την αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων και Rnάση για την αποικοδόμηση του RNA. Έπειτα προστίθεται 250μl διαλύματος λύσης A2 το οποίο περιέχει SDS και NaOH και πραγματοποιείται ελαφριά ανάδευση και επώαση για 5-10 λεπτά, για την αλκαλική λύση των μεμβρανών (SDS) και την αποδιάταξη του DNA (NaOH) και των πρωτεϊνών (SDS, NaOH). Στην συνέχεια προστίθεται 300μl διαλύματος εξουδετέρωσης A3 το οποίο περιέχει οξικό νάτριο για την αναστολή της αλκαλικής λύσης με εξουδετέρωση του βασικού pH και άλατα τα οποία ευνοούν την σύνδεση του DNA στην στήλη και γίνεται ελαφριά ανάδευση και επώαση μέχρι ο δείκτης χρώματος του pH να μετατραπεί σε άσπρο χρώμα. Μετά την εξουδετέρωση το βακτηριακό εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στους 4°C στα 11.000g. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει διαλυτό στο υπερκείμενο υγρό το οποίο μεταφέρεται στην στήλη. Η στήλη φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1 λεπτό για την σύνδεση του πλασμιδιακού DNA με την παρουσία χαστροπικών αλάτων. Το υγρό που περνάει από την στήλη περιλαμβάνει όσα συστατικά δεν συγκρατούνται και απορρίπτεται. Στην συνέχεια πραγματοποιείται πλύση της στήλης και προστίθεται 500μl από το διάλυμα AW το οποίο περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών

προσμίξεων που συγκρατήθηκαν στην στήλη. Η στήλη φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1 λεπτό και το υγρό έκλουσης απορρίπτεται. Ακολουθεί πλύση με διάλυμα αιθανόλης και 600μl από το διάλυμα A4 προστίθεται στην στήλη. Ξαναγίνεται φυγοκέντρωση στα 11.000g για 1 λεπτό και το υγρό έκλουσης απορρίπτεται. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στα 11.000g για να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης από την στήλη η οποία μπορεί να αναστείλει ενζυμικές αντιδράσεις. Τέλος προστίθεται προσεκτικά στην στήλη 40μl διαλύματος έκλουσης AE χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων για την αποδέσμευση του DNA από την στήλη. Με φυγοκέντρωση στα 11.000g για 1 λεπτό το υγρό της έκλουσης DNA αποθηκεύεται.

3.5 Μέθοδοι μελέτης της γονιδιακής έκφρασης

3.5.1 Παροδική Διαμόλυνση θηλαστικών κυττάρων με την χρήση του αντιδραστηρίου PEI

Η PEI (πολυαιθυλενοϊμίνη) είναι μία κατιοντική ένωση η οποία έχει την ικανότητα της δημιουργίας συμπλόκων με το DNA το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο. Τα σύμπλοκα τα οποία δημιουργούνται εισάγονται στα κύτταρα με την διαδικασία της ενδοκύττωσης. Στην συνέχεια το PEI δεσμεύει πρωτόνια και το ενδόσωμα διαρρηγνύεται. Έτσι το DNA μεταφέρεται στον πυρήνα όπου μπορεί να μεταγραφεί. Η διαμόλυνση με PEI χρησιμοποιείται για την μελέτη της λειτουργίας γονιδίων ή την έκφραση επιθυμητών πρωτεϊνών.

Για την διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είχανε την στιγμή της διαμόλυνσης σε κάθε 12-well-plate πυκνότητα 50%, για την καλύτερη απόδοση της διαμόλυνσης. Στο μείγμα της διαμόλυνσης για κάθε 12-well-plate προστίθεται 150μl θρεπτικού μέσου DMEM 5% FBS χωρίς την παρουσία αντιβιοτικών, και 1μg DNA με αναλογία DNA/PEI=1/2 οπότε 1μg DNA και 2μl PEI σε κάθε συνθήκη διαμόλυνσης. Το μείγμα επωάζεται για 15-20 λεπτά για την δημιουργία των συμπλόκων PEI/DNA και στην συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται στα κύτταρα τα οποία περιέχουν θρεπτικό μέσο DMEM 5% FBS χωρίς την παρουσία αντιβιοτικών. Τα κύτταρα επωάζονται 4 ώρες κατά τις οποίες πραγματοποιείται η διαμόλυνση και η εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA. Στην συνέχεια το θρεπτικό αντικαθίσταται με πλήρες θρεπτικό DMEM +/- (10% FBS, αντιβιοτικά 100U/ml πενικιλίνη & στρεπτομυκίνη). Τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες για την έκφραση του πλασμιδιακού φορέα και την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί η επιθυμητή ανάλυση.

3.5.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η δοκιμασία λουσιφεράσης είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται στις μελέτες γονιδιακής έκφρασης και βασίζεται στην ποσοτικοποίηση του φωτός που παράγει το ένζυμο λουσιφεράση. Η Firefly λουσιφεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο εκφράζεται στην πυγολαμπύδα και καταλύει την οξείδωση του υποστρώματος της λουσιφερίνης με την χρήση οξυγόνου και ενός μορίου ATP την οποία μετατρέπει σε οξυλουσιφερίνη. Η αντίδραση παράγει φως ανάλογο της συγκέντρωσης της λουσιφεράσης. Μελέτες οι οποίες ασχολούνται με τον προσδιορισμό της έκφρασης ενός γονιδίου αξιοποιούν πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι περιέχουν το γονίδιο της Firefly λουσιφεράσης και πραγματοποιείται η κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου ανοδικά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Στην δοκιμασία λουσιφεράσης αξιοποιείται και μια δεύτερη λουσιφεράση η Renilla η οποία εισάγεται με διαφορετικό πλασμίδιο στα κύτταρα και καθώς εκφράζεται σταθερά χρησιμεύει ως εσωτερικό κοντρόλ για την κανονικοποίηση των τιμών της Firefly λουσιφεράσης. Η ποσοτικοποίηση του φωτός μας παρέχει δεδομένα για την ενεργότητα του γονιδίου που μελετάται.

Για την δοκιμασία λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρίας Promega-Dual Luciferase Assay. Αρχικά πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πλύση των κυττάρων στο 12-well-plate με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Έπειτα γίνεται προσθήκη σε κάθε πηγάδι 100μl του διαλύματος λύσης PLB (passive lysis buffer) το οποίο περιέχεται στο kit για την λύση των κυττάρων και επώαση για 15 λεπτά με συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κυτταρικά λύματα φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στα 11.000g και το υπερκείμενο στο οποίο περιέχεται διαλυμένη η λουσιφεράση συλλέγεται για την μέτρηση. Σε κάθε κυτταρική συνθήκη προστίθεται 20μl του υποστρώματος λουσιφερίνης και γίνεται ποσοτικοποίηση του φωτός της λουσιφεράσης Firefly. Στην συνέχεια προστίθεται στα ίδια δείγματα 10μl διάλυμα Stop & Glow το οποίο διακόπτει την αντίδραση της Firefly και περιέχει το υπόστρωμα της Renilla, για την μέτρηση του φωτός και την ποσοτικοποίηση της λουσιφεράσης Renilla η οποία έχει τον ρόλο του εσωτερικού κοντρόλ. Οι δύο λουσιφεράσες καταλύουν διαφορετικά υποστρώματα και επιτρέπουν την μέτρηση στο ίδιο κυτταρικό εκχύλισμα. Η έκφραση της λουσιφεράσης προκύπτει ως ο λόγος της εκπομπής Firefly/Renilla=RLU (related luciferase unit) και ο υπολογισμός του μέσου όρου των επαναλήψεων. Στην συνέχεια το εύρος αλλαγής υπολογίστηκε ως ο όρος των τιμών μεταξύ των δύο συνθηκών.

3.6 Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών

3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος αξιοποιείται ένα πορώδες πηγμα το οποίο αποτελείται από το πολυμερές πολυακρυλαμίδιο και οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται αφού έχουν αποδιαταχθεί με την χρήση του παράγοντα Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Το SDS οδηγεί στην προσθήκη αρνητικού φορτίου το οποίο είναι ομοιογενές και επιτρέπει την κίνηση των πρωτεϊνών προς τον θετικό πόλο. Οι μικρότερες σε μοριακό βάρος πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και διανύουν μεγαλύτερη απόσταση από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό ενώ οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες ενώ οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες κινούνται αργότερα και μετακινούνται λιγότερο μέσα στην πηκτή. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου στην πηκτή ευνοεί τον καλύτερο διαχωρισμό πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους ενώ μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου ευνοεί τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με μεγάλο μοριακό βάρος. Επιπλέον η ταχύτητα της κίνησης των πρωτεϊνών επηρεάζεται από την τάση του ηλεκτρικού πεδίου το οποίο εφαρμόζεται στο ενδιάμεσο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Οι πρωτεΐνες ξεκινούν την διαδρομή τους από την πηκτή συσσώρευσης η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη κίνηση των πρωτεϊνών και την άφιξη τους στην πηκτή διαχωρισμού κατά την ίδια χρονική στιγμή όπου λαμβάνει μέρος ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Ως ένδειξη των μοριακών βαρών χρησιμοποιείται μάρτυρας σημασμένων πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών επιτρέπει την ανάλυση των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα και την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών με την χρήση μεθόδων όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad όπου προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer). Για την προετοιμασία των δειγμάτων αρχικά συλλέχθηκαν τα κύτταρα με ξύστρα σε 40μl διάλυμα 2X LAEMMLI. Η χρωματίνη θραυσματοποιήθηκε με την χρήση υπερήχων και στην συνέχεια προστέθηκε αναγωγικός παράγοντας DTT $C_T=100\text{mM}$ και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά

για την ολοκληρωτική αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης 20μl δείγματος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συνθήκη.

3.6.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Για τον σκοπό της ανάλυσης πρωτεϊνών οι οποίες έχουν διαχωριστεί μέσω ηλεκτροφόρησης σε ένα πήγμα ακολουθεί η μεταφορά τους σε μεμβράνη. Η σύνδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη η οποία αποτελεί ένα στερεό μέσο τις καθιστά λιγότερο εύθραυστες και τις προστατεύει από μηχανικές βλάβες. Επιπλέον η μεμβράνη επιτρέπει την προσβασιμότητα και την ανίχνευση των πρωτεϊνών από πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που αξιοποιούνται στην ανοσοποτύπωση κατά Western blot. Η μεταφορά πραγματοποιείται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου προς την μεμβράνη PVDF με την διενέργεια ηλεκτρικού πεδίου και την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer). Αρχικά η μεμβράνη PVDF είναι υδρόφοβη και εμβαπτίζεται σε αιθανόλη για να είναι δυνατή η προσρόφηση του ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο είναι υδρόφιλο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad και η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με την ημι-ενυδατωμένη μέθοδο. Δημιουργήθηκε ένα σύνολο στρώσεων όπου στην βάση προς τον θετικό πόλο τοποθετούνται: 3 διηθητικά χαρτιά Whatman τα οποία διαβρέχονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, στο κέντρο βρίσκεται η μεμβράνη PVDF, πάνω από την μεμβράνη τοποθετείται η πηκτή με τις πρωτεΐνες και τέλος πάνω από την πηκτή τοποθετούνται 3 επιπλέον διηθητικά χαρτιά Whatman τα οποία διαβρέχονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών διασφαλίστηκε με την παρουσία σταθερής ηλεκτρικής έντασης 80mAh για 90 λεπτά.

3.6.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western blot βασίζεται στην χρήση αντισωμάτων για την εξειδικευμένη ανίχνευση πρωτεϊνών οι οποίες έχουν προηγουμένως διαχωριστεί σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Πρώτος σκοπός για την συλλογή ειδικών σημάτων ανίχνευσης είναι η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων των πρωτεϊνών με την χρήση γάλακτος. Συνεπώς η μεμβράνη με τις πρωτεΐνες επώαστηκε με διάλυμα γάλακτος 5% TBS 0,1% Tween για 1 ώρα και στην συνέχεια για την απομάκρυνση της περίσσειας γάλακτος πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με διάλυμα TBST-0,1%

για 15 λεπτά. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνδεση των ειδικών αντισωμάτων για τον HIF-2α και την β-τουμπουλίνη. Το διάλυμα αντισώματος παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας προμήθειας (TBS και 0,1%Tween και 5% BSA) και η μεμβράνη επώαστηκε ολονύχτια με συνεχή ανακίνηση σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα έγιναν 3 πλύσεις για 15 λεπτά, με TBST-0,1%. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο ανιχνεύει το πρωτογενές αντίσωμα σύμφωνα με τον οργανισμό προέλευσης. Η επώαση διήρκησε για 1 ώρα με συνεχή ανακίνηση και ακολούθησαν 3 πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας των μη ειδικών συνδέσεων με TBS-0,1% για 15 λεπτά. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση του σήματος χημειοφωταύγειας από την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος με την προσθήκη του υποστρώματος λουμινινόλης και τους συμπαράγοντες α-κουμαρικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου.

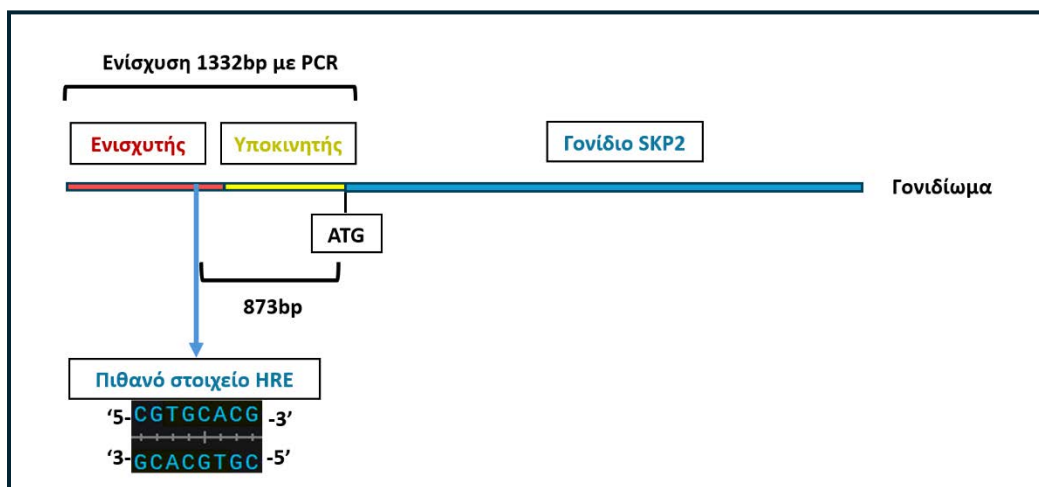
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου στο πλαίσιο της πτυχιακής μου εργασίας, όπου πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση έκφρασης γονιδίων, ταυτοποιήθηκαν γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται στατιστικά με την αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία. Αναφορικά τα δεδομένα συλλέχθηκαν συγκρίνοντας δεδομένα RNA-seq σε συνθήκες υποξίας και συνθήκες υποξίας με ταυτόχρονη αποσιώπηση του HIF-2α (με χρήση siRNA) σε κύτταρα Huh7. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας για τα γονίδια και το γονίδιο Skp2 βρέθηκε το κύριο γονίδιο στην ενότητα της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Στην συνέχεια της πτυχιακής έρευνας επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης και βρέθηκε πως ο HIF-2α ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου Skp2 στην υποξία στα κύτταρα Huh7.

4.1 Αναζήτηση μοτίβων HRE στο γονίδιο Skp2 και ενίσχυση της αλληλουχίας HRE-υποκινητή από DNA κυττάρων Huh7.

Καθότι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF συνδέονται σε ειδικές αλληλουχίες, τα μοτίβα HRE και επάγουν την έκφραση γονιδίων, για τον σκοπό της μελέτης της επαγωγής του γονιδίου Skp2 στην υποξία από τον HIF-2α πρώτα πραγματοποιήθηκε μελέτη για την ύπαρξη πιθανών μοτίβων HRE στη ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου.

Μέσω της βάσης Ensembl genome browser 114, η ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου Skp2 1500bp ζεύγη βάσεων ανοδικά η οποία περιλαμβάνει υποκινητή και ενισχυτή αναλύθηκε για την παρουσία του μοτίβου HRE (A/G)CGTG(C/A) αμφίδρομα. Η αναζήτηση **απέδωσε ένα πιθανό μοτίβο HRE σε απόσταση 873bp από το το κωδικόνιο έναρξης** στην θέση του ενισχυτή δίπλα στον υποκινητή, στην θέση chr5 :36,151,240 – 36, 151, 247 (Εικόνα 5.1). Για την ενίσχυση του τμήματος του πιθανού HRE , σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές οι οποίοι περιλαμβάνουν την ρυθμιστική αλληλουχία μήκους 1.332bp με τον υποκινητή και τον ενισχυτή του γονιδίου Skp2 όπως φαίνεται στο σχήμα της Εικόνας 5.1. Στην συνέχεια απομονώθηκε το γενωμικό DNA από ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος Huh7 και πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για την ενίσχυση της ρυθμιστικής αλληλουχίας του Skp2.



Εικόνα 5.1: Το σχήμα αυτό απεικονίζει την αλληλουχία του γονιδίου SKP2. Αναπαρίσταται η περιοχή του μεταγράφου και η κύρια ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου. Το πιθανό στοιχείο HRE απόκρισης στην υποξία το οποίο εντοπίσαμε βρίσκεται στην περιοχή του ενισχυτή κοντά στον υποκινητή και 873bp ανωδικά του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης.

Παρουσιάζεται η ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου Skp2, με το πιθανό **HRE**, η οποία ενισχύθηκε μέσω της αντίδρασης PCR με την χρήση των εκκινήτων οι οποίοι αναφέρονται στο Ενότητα 2.1.

5'-GAGGCAGTTACTTTTCAAGCTAAGGACCAAGCTTGAAACAAGCATATACCTGCAC
AAGGGAGGTTTAATTTCACTACAGAGCGAATCATTTTTTCAAGGAAACCAGAGGGT
GTGTCATACAGCATCACTGAATATTCTAATATGCGATGAAGCTGTTATGCTTCCTTAT
GAACTTTATAAATCTTCATTTTTATGAGGCTTAGAATTCATCCCCCTTCCCTCTTCCA
CTGTTTTCCCGGGGTCACAGTTGTAGTATAGTTTGCCCAATGGATTTTCGCATGGTCAT
TGTACCTGGAATATGTCACGCTCCCTACTCTTACTGCCCCCAAACCTCTTCTCAGCAGA
GATAGGCTGAAAGCAGCTCGCTTTTAGGCGGCGACGCAAACACACGTAAGCCAGCTG
AGCGACAGCAAGCAACCAAATGGCTTTGCTGGAGGCCCTGCG**TGCAC**GGGTAAA
GCTCGTTGCAAAATACAGTCCTTTTCATTTATTTCCCATGTTGCTATTTATGAGACCTGT
CAAGGCTGCAAGGGCATGCGCAGCCTTCCCACCACACAGGACCCGCTGGGGTCTCC
GGCTCCCCTAAAATTAAACCATTTGTCTCTCGTTCCAACGGCGTGTTTAGCTGTTGTGC
GTTATTTTACAGATAAAGGAAGGATCCCGTCCACAGACCCAATTCTTAGGGCCGCCT
TCTCCCCGACGGAGGAAGAAGCTTCCTGGCAAAAGGACGAACAGGTGCGACGCCAG

CAGTTCGCAGCCTCTCACCTGGCCGGCGGGCTGGGCTACTGTCACCACTCAGCAGCC
AAGGACTTGGGCCCCGCAGCGGCGGCCACTCGGGGTCTGCCGGGTCCCCTCTCTTTC
CGCCTGCTCTCGGCCCCGGACCCCAGACTCAAAAGCGCCTCACGCGTTCCGCCTTAG
GCTCACCGTCCGATCTCGCCAGACAGCGTCTGGACGGGACCGGGAAACGGCGGCCG
CCACAGCTGTCCAGGTTCTGGGATCCACGCTCAGAGACGACAGCGCTGGCGATCAC
CAGAAGGCCTGCGGGCTCCCGAGAAAGGAAAAATCCGTCTACAGTCCAGCGGCTGAC
ATTTCCCAGTCAGCCGTAGCGCCGCCCGCTTCCGCCTCCCCGCCTACCCCGTGGGCC
GACCAGTCCCGCTCCCGCGGGGGGTTGTGGGTATCTCGAAGGCGGGTAAAGCTGCA
AGGGAAGGAAGTAAGGGCGAGCCCGTCGGACTACGAAGCGGGACGGAAACTACAA
TTCCCAGCAGGCCTTGGGCCTCAGTGCGGCCGCGAAGCAGAGCGGGCTGTAGAGCC
TTGCGCGCGCAGTGGGGATGGAACGTTGC-3'

Για τον έλεγχο της ενίσχυσης της προβλεπόμενης αλληλουχίας του υποκινητή ανοδικά του γονιδίου Skp2 με την αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιοριστικής ενδονουκλεάσης AccI και η πέψη περιλάμβανε τα αναμενόμενα τμήματα μέσω των οποίων επιβεβαιώθηκε η σωστή ενίσχυση της αλληλουχίας.

4.2 Κλωνοποίηση της αλληλουχίας του υποκινητή της Skp2

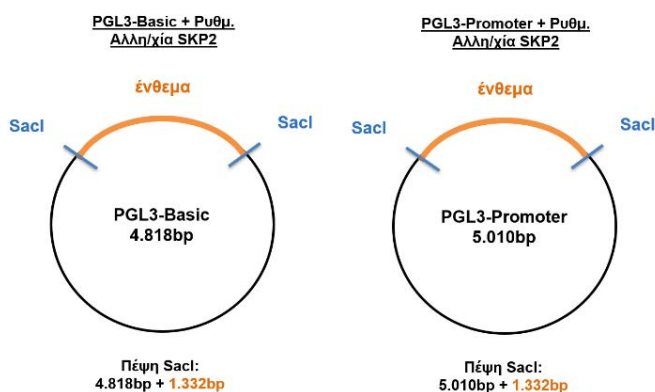
Η κλωνοποίηση της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου Skp2 πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα σε δύο πλασμιδιακούς φορείς οι οποίοι περιέχουν το γονίδιο λουσιφεράσης, τον PGL3-Basic και τον PGL3-Promoter. Αρχικά έγινε η πέψη του φορέα PGL3-Basic, του PGL3-Promoter και του ενθέματος με το ένζυμο SacI. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης και η δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής PGL3B-SKP2 PromHRE και PGL3P-SKP2 PromHRE η οποία διαφέρει μόνο στον φορέα κλωνοποίησης. Δεκτικά βακτήρια TOP10 μετασχηματίστηκαν με στόχο την εισαγωγή της επιθυμητής κατασκευής και στους βακτηριακούς κλώνους που αναπτύχθηκαν ακολούθησε έλεγχος αντίδρασης πέψης για την αναζήτηση των θετικών κλώνων της κλωνοποίησης.

4.2.1 Έλεγχος κλωνοποιημένων βακτηριακών κλώνων και του προσανατολισμού της ένθεσης

Ο έλεγχος για την διάκριση των θετικών και των αρνητικών κλώνων πραγματοποιήθηκε αρχικά μέσω πέψης με το ένζυμο SacI το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση. Το περιοριστικό ένζυμο SacI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAGCTC-3' και πέπτει μεταξύ των 3' άκρων ανάμεσα στις βάσεις TC και τους δύο κλώνους του DNA δημιουργώντας μονόκλινα άκρα.

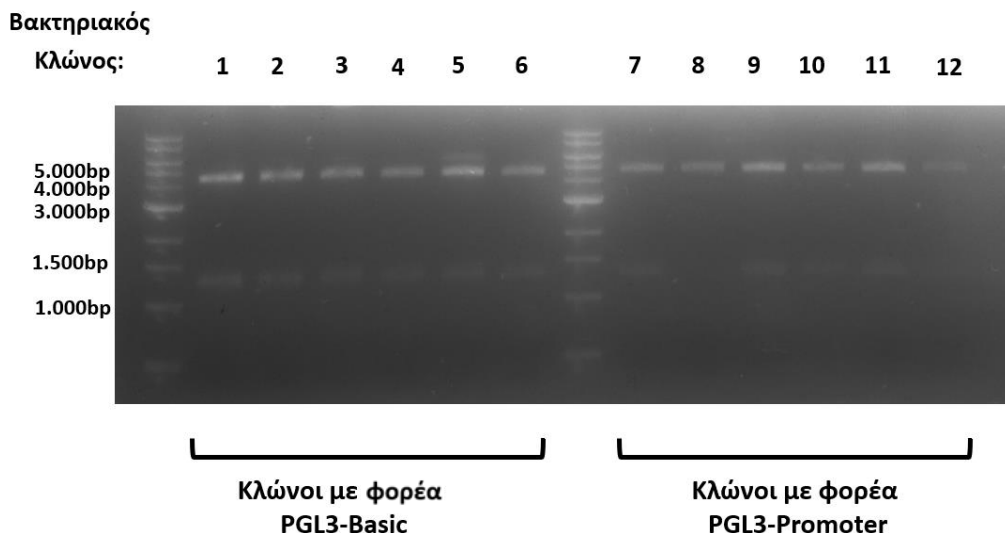
Για τον έλεγχο ότι κλωνοποιήθηκε το ένθεμα, μετά από πέψη με SacI αναμένεται να βρεθούν 2 κομμάτια DNA, το πλασμιδιακό DNA (οι πλασμιδιακοί φορείς: PGL3-Basic 4.818bp και PGL3-Promoter 5.010bp) και το DNA του ενθέματος με μήκος 1.332bp ζεύγη βάσεων (Εικόνα 5.2).

Σύμφωνα με την Εικόνα 5.3, από τους 12 βακτηριακούς κλώνους τους οποίους ελέγξαμε με πέψη του πλασμιδιακού DNA, οι 10 κλώνοι είναι καθαρά εμφανές πως περιέχουν το ένθεμα, στις 1332bp ενώ οι βακτηριακοί κλώνοι 8 και 10 δεν περιέχουν ένθεμα.



Εικόνα 5.2: Σχηματική απεικόνιση της πέψης των πλασμιδιακών κατασκευών με την SacI και τα αναμενόμενα τμήματα τα οποία προκύπτουν για τους θετικούς βακτηριακούς κλώνους οι οποίο φέρουν το κλωνοποιημένο πλασμίδιο. Το DNA τμήμα του ενθέματος 1.332bp θα εντοπίζεται στους θετικούς κλώνους ενώ στους αρνητικούς όχι.

Πέψεις πλασμιδιακών κλώνων με SacI

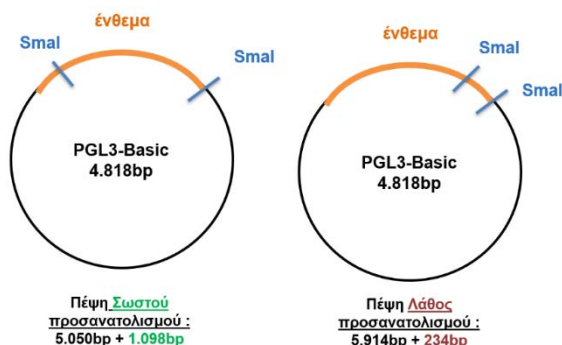


Εικόνα 5.3: Η εικόνα παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο SacI του πλασμιδιακού DNA από 12 διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους. Η πέψη αυτή γίνεται για τον έλεγχο της κλωνοποίησης και οι θετικοί κλώνοι θα περιέχουν το τμήμα DNA το οποίο αντιστοιχεί στο ένθεμα σε μήκος 1332bp. Το τμήμα 234bp δεν φαίνεται στην εικόνα διότι έχει διανήσει μεγαλύτερη πορεία στην διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και βρίσκεται έξω από την πηκτή.

Ο έλεγχος για τους βακτηριακούς κλώνους οι οποίοι περιέχουν το ένθεμα ενσωματωμένο με τον σωστό προσανατολισμό πραγματοποιήθηκε μέσω πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI. Η SmaI πέπτει στην αλληλουχία 5'-CCCGGG-3' μεταξύ των βάσεων CG και στους δύο κλώνους. Το ένζυμο επιλέχθηκε διότι πέπτει πρώτον το πλασμίδιο στην θέση του πολυσυνδέτη και επιπλέον το εσωτερικό του ενθέματος με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορετικά διακριτά τμήματα DNA, τα οποία μας επιτρέπουν να διαχωρίσουμε τον προσανατολισμό της ένθεσης για την ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου Skp2. Πιο συγκεκριμένα η πέψη των φορέων με την σωστή φορά της ένθεσης αναμένεται να περιέχει ένα τμήμα DNA μήκους 1.098bp. Αντίθετα η πέψη των φορέων με λανθασμένη φορά ένθεσης θα έχει ως προϊόν ένα τμήμα 234bp έναντι του 1.098bp.

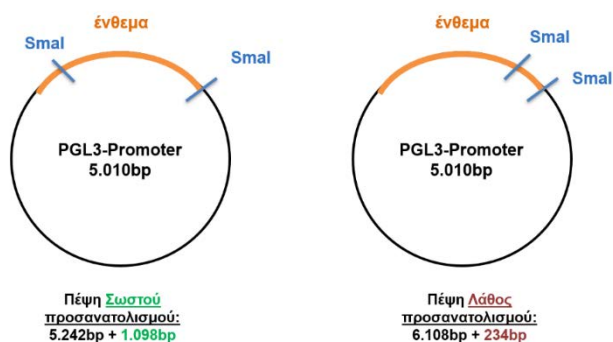
A) Αναμενόμενη πέψη με SmaI σωστού και λάθος προσανατολισμού ένθεσης

PGL3-Basic + Ρυθμ. Αλλη/χία SKP2



B) Αναμενόμενη πέψη με SmaI σωστού και λάθος προσανατολισμού ένθεσης

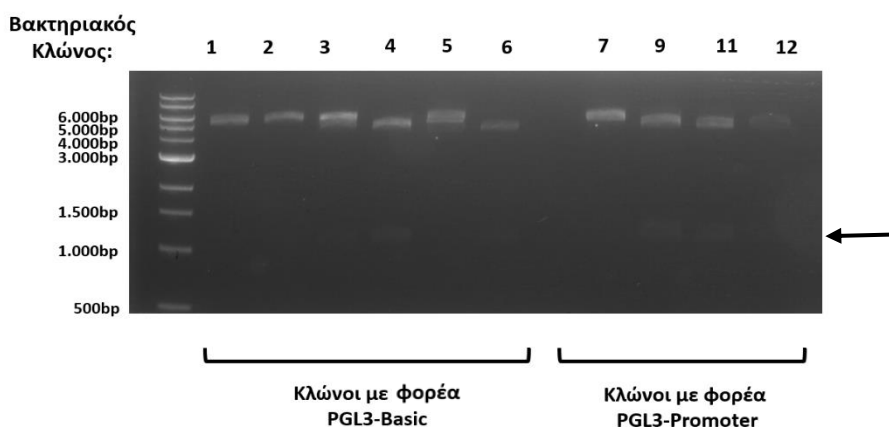
PGL3-Promoter + Ρυθμ. Αλλη/χία SKP2



Εικόνα 5.4: A) Σχηματική απεικόνιση της πέψης του πλασμιδίου PGL3-Basic και των αναμενόμενων τμημάτων με το ένζυμο SmaI για τη επιβεβαίωση της κλωνοποίησης της ρυθμιστικής αλληλουχίας Skp2.

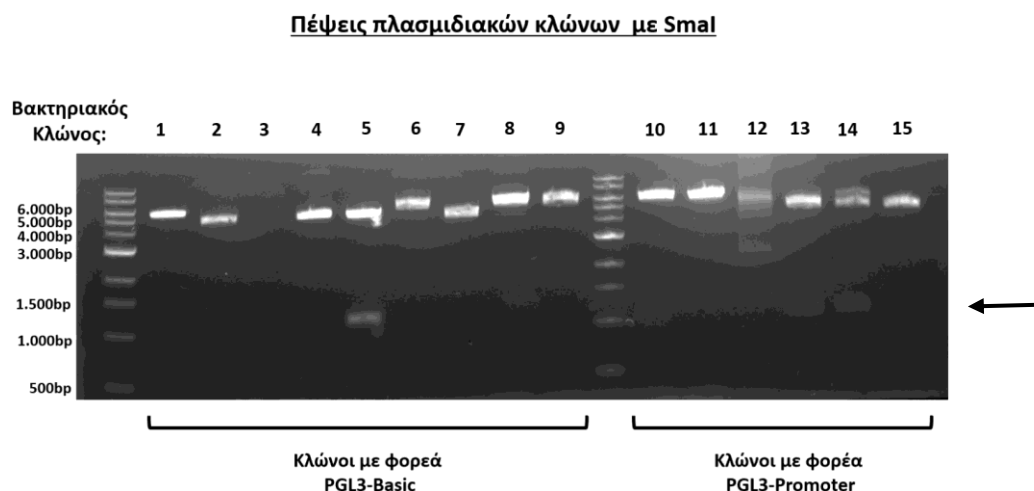
B) Σχηματική απεικόνιση της πέψης του πλασμιδίου PGL3-Promoter και των αναμενόμενων τμημάτων με το ένζυμο SmaI για τη επιβεβαίωση της κλωνοποίησης της ρυθμιστικής αλληλουχίας Skp2.

Πέψεις πλασμιδιακών κλώνων με SmaI



Εικόνα 5.5: Η εικόνα παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο SmaI από 12 διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους. Και οι 12 κλώνοι προηγουμένως ελέγχθηκαν με πέψη με SacI και περιέχουν το ένθεμα. Οι θετικοί κλώνοι με την σωστή φορά ένθεσης διακρίνονται από την ύπαρξη ενός κομματιού DNA μήκους 1.098bp.

Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της Εικόνας 5.5, παρατηρείται ότι ύστερα από πέψη, οι θετικοί κλώνοι είναι οι 4, 9 και 11 όπου είναι εμφανές το τμήμα DNA μήκους 1.098bp. Αντίθετα οι στους υπόλοιπους κλώνους η ένθεση πραγματοποιήθηκε με φορά αντίθετη από την επιθυμητή.



Εικόνα 5.6: Η εικόνα παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης στο πλασμιδιακό DNA σε 15 νέους βακτηριακούς κλώνους με το ένζυμο SmaI. Αυτοί οι κλώνοι δεν ελέγχθηκαν με προηγούμενη με πέψη με SacI για την παρουσία ένθεσης. Οι θετικοί κλώνοι με την σωστή φορά ένθεσης διακρίνονται από την ύπαρξη ενός κομματιού DNA μήκους 1.098bp. Οι αρνητικοί κλώνοι περιέχουν το πλασμίδιο γραμμικό και οι κλώνοι με λανθασμένη φορά ένθεσης αποδίνουν ένα κομμάτι DNA 234bp το οποίο δεν γίνεται διακριτό στην ηλεκτροφόρηση.

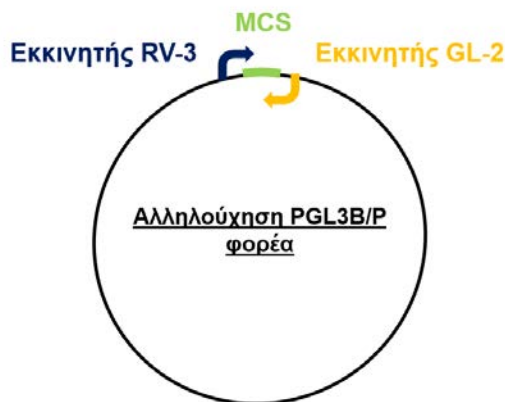
Η πέψη ελέγχου του σωστού προσανατολισμού ένθεσης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο 15 επιπλέον βακτηριακών κλώνων. Το αποτέλεσμα της πέψης στην Εικόνα 5.6. παρουσιάζει την παρουσία τριών θετικών κλώνων, τους 5 και 13, 14.

Συνολικά από τον έλεγχο όλων των βακτηριακών κλώνων προέκυψαν έξι διακριτοί βακτηριακοί κλώνοι με την σωστή φορά της ένθεσης και ο κλώνος 5 (Εικόνα 5.6) επιλέχθηκε για την συνέχεια της μελέτης και ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με την χρήση στήλης.

4.5 Αλληλούχηση της πλασμιδιακής κατασκευής

Μετά την κλωνοποίηση της ρυθμιστικής αλληλουχίας Skp2 η οποία περιέχει το υπό μελέτη πιθανό HRE, το πλασμίδιο του θετικού κλώνου 5 (Εικόνα 5.6) στάλθηκε για αλληλούχηση με σκοπό τον ολοκληρωμένο έλεγχο της θετικής φοράς της ένθεσης και την απουσία παραλλαγών στην αλληλουχία του πιθανού μοτίβου HRE.

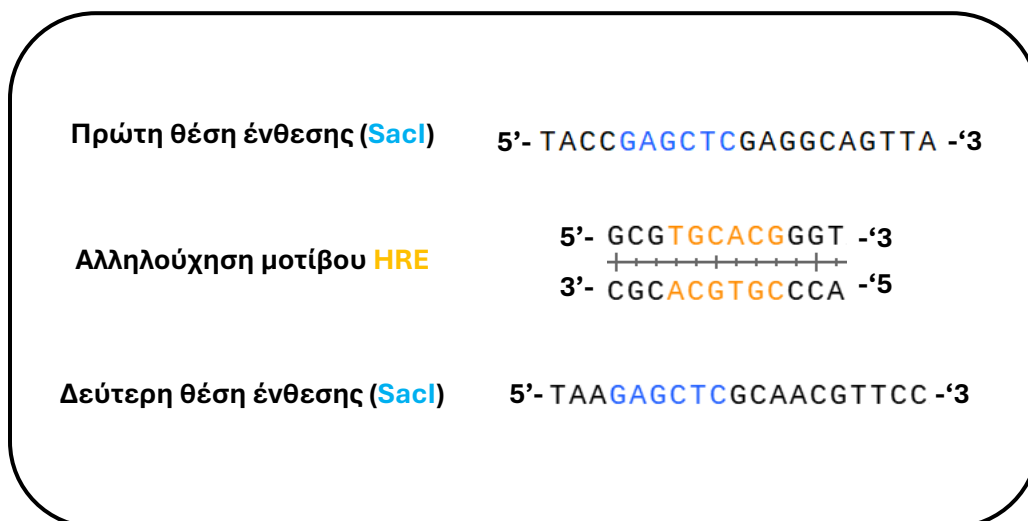
Για την αλληλούχηση αξιοποιήθηκαν δύο καλά χαρακτηριστικές αλληλουχίες που διαθέτει ο πλασμιδιακός φορέας για εκκινητές, για την αλληλούχηση του ενθέματος: Ο εκκινητής RV-3 ο οποίος συνδέεται στην αρχή του πολυσυνδέτη (multicloning site) και μπορεί να συμβάλει στην ανάγνωση της αλληλουχίας που βρίσκεται στο ένα άκρο της ένθεσης και ο εκκινητής GL-2 ο οποίος μπορεί να συμβάλει στην ανάγνωση της αλληλουχία που βρίσκεται στο άλλο άκρο της ένθεσης.



Εικόνα 5.7: Σχηματική απεικόνιση της θέσης σύνδεσης των εκκινητών κατά την αλληλούχηση των PGL3 πλασμιδιακών φορέων. Η αλληλουχία MCS αποτελεί την θέση του πολυσυνδέτη όπου πραγματοποιείται η κλωνοποίηση με ένζυμα περιορισμού. Τα βελάκια αναπαριστούν την θέση σύνδεσης των εκκινητών και την φορά της αλληλούχησης. Οι δύο εκκινητές μας επιτρέπουν την αλληλούχηση του τμήματος του ενθέματος.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επιβεβαιώνουν την επιτυχή κλωνοποίηση οσον αφορά την φορά ένθεσης η οποία ελέγχθηκε και μέσω πέψης ελέγχου και τα αποτελέσματα συμφωνούν. Παράλληλα στο πιθανό μοτίβο HRE το οποίο μελετάται η αλληλούχηση αποδεικνύει

πως δεν περιέχει σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες θα μπορούσαν να εμποδίζουν την σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α.



Εικόνα 5.8: Σχηματική απεικόνιση η οποία παρουσιάζει μέρος της αλληλούχησης της κατασκευής PGL3B-Skp2 PromHRE Για την αλληλούχηση αξιοποιήθηκαν οι εκκινητές GL2 και RV3 οι οποίοι κοινώς χρησιμοποιούνται για την αλληλούχηση των PGL3 φορέων κοντά στην θέση του πολυσυνδέτη. Παρουσιάζονται στο σχήμα τρία σημεία της αλληλούχησης. Πρώτον η αρχική θέση ένθεσης με το ένζυμο SacI, το μοτίβο HRE το οποίο μελετάται στην παρούσα μελέτη και η δεύτερη θέση ένθεσης. Η αλληλούχηση επιβεβαιώνει την σωστή φορά ένθεσης καθώς και την απουσία μεταλλάξεων στο πιθανό HRE.

4.6 Διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με την πλασμιδιακή κατασκευή και δοκιμασία έκφρασης λουσιφεράσης

Έχοντας πλέον διαθέσιμη την κατασκευή PGL3B-SKP2_PromHRE η οποία περιέχει κλωνοποιημένη την ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου Skp2 στον φορέα λουσιφεράσης PGL3-Basic προχωρήσαμε στη μελέτη της επαγωγής του υποκινητή του γονιδίου Skp2 μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με την κατασκευή PGL3B-SKP2 PromHRE για τις συνθήκες νορμοξία και υποξία. Ως αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε ο άδειος φορέας PGL3-Basic. Η κατασκευή μελέτης μας περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου Skp2 με το πιθανό HRE που εντοπίσαμε ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα PGL3-Basic ο οποίος εκφράζει λουσιφεράση. Ως θετικό κοντρόλ αξιοποιήθηκε ανασυνδιασμένο πλασμίδιο του

εργαστηρίου το οποίο φέρει 5-HRE του γονιδίου VEGF ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης, ενός γονιδίου γνωρίζουμε πως επάγεται στην υποξία ως γονίδιο στόχος των HIF.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.1, το αποτέλεσμα της δοκιμασίας λουσιφεράσης έδειξε αρχικά την επιτυχημένη διαμόλυνση της κατασκευής στα κύτταρα Huh7 καθώς όλες οι κανονικοποιημένες τιμές μετρήσεων με την Renilla ως εσωτερικό κοντρόλ έχουν θετικές τιμές. Επιπλέον, οι τιμές της λουσιφεράσης του θετικού κοντρόλ είναι πολύ υψηλότερες στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία όπως αναμένονταν και επιβεβαιώνουν την επαγωγή της υποξίας. Η μεγάλη αύξηση κατά 7.5 φορές εξηγείται από την ύπαρξη 5-HRE στοιχείων στον υποκινητή της λουσιφεράσης. Παρατηρούμε πως το αρνητικό κοντρόλ παρουσίαζε σημαντική επαγωγή της έκφρασης στην υποξία η οποία είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη. Το γεγονός αυτό είναι παράδοξο και χρίζει διερεύνηση.

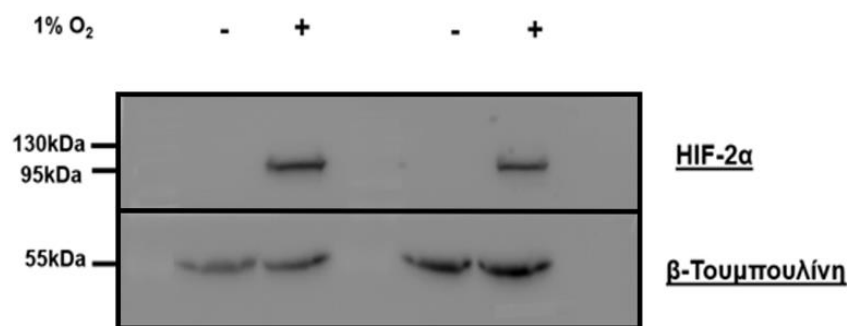
Όσον αφορά την έκφραση της λουσιφεράσης στην κατασκευή PGL3B-SKP2 PromHRE είναι σχετικά χαμηλή στην υποξία και την νορμοξία. Παρόλα αυτά συγκρίνοντας τις συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης στην υποξία η οποία είναι της τάξεως F.C.=1.3 εύρους αλλαγής.

<u>Δοκιμασία</u> <u>Λουσιφεράσης</u>	PGL3B-SKP2 PromHRE	PGL3B (Αρνητικό κοντρόλ)	Πλασμίδιο Luc 5-HRE VEGF (Θετικό κοντρόλ)
Νορμοξία	0.17	0.12	0.22
Υποξία	0.23	0.69	1.73
Εύρος αλλαγής (FC)	1.30	5.68	7.62

Πίνακας 5.1: Ο πίνακας της εικόνας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας λουσιφεράσης για την μελέτη της επαγωγής της έκφρασης λουσιφεράσης από την πλασμιδιακή κατασκευή PGL3-Basic + ρυθμ. αλλ/γία SKP2 με διαμόλυνση σε κύτταρα Huh7 στην υποξία και την νορμοξία. Ως θετικό κοντρόλ αξιοποιήθηκε πλασμίδιο που φέρει 5-HRE ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Ως αρνητικό κοντρόλ αξιοποιήθηκε ο άδειος φορέας PGL3-B. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις του πειράματος. Για την κανονικοποίηση των τιμών πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη διαμόλυνση με πλασμίδιο Renilla λουσιφεράσης Τα αποτελέσματα προκύπτουν μετά από την κανονικοποίηση των τιμών των μετρήσεων λουσιφεράσης Firefly με την Renilla λουσιφεράση (relative luciferase unit) και τον υπολογισμό του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων. Στην συνέχεια το εύρος αλλαγής υπολογίζεται ως ο όρος των τιμών της υποξίας προς της νορμοξία.

4.7 Έλεγχος επαγωγής του παράγοντα HIF-2α στην υποξία

Προκειμένου να ελέγξουμε την επαγωγή του HIF-2α στην υποξία πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western Blot με την χρήση κυτταρικών λυμάτων από κύτταρα Huh7 τα οποία καλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες ταυτόχρονα με τα κύτταρα που αξιοποιήθηκαν στην δοκιμασία λουσιφεράσης. Είναι καλά γνωστό ότι ο HIF-2α στην νορμοξία οδηγείται σε πρωτεόλυση ενώ στην υποξία σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, έτσι αναμένεται σε συνθήκες νορμοξίας να μην εντοπίζεται ενώ στις συνθήκες υποξίας αναμένεται να παρουσιάζει έντονο σήμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης επιβεβαιώνουμε ότι όσον αφορά την συνθήκη νορμοξίας δεν παρατηρείται ο HIF-2α. Ωστόσο στην υποξία το σήμα του HIF-2α επιβεβαιώνει την λειτουργία της συνθήκης υποξίας και την επαγωγή του.



Εικόνα 5.9: Η εικόνα παρουσιάζει την ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot από κυτταρικά εκχυλίσματα Huh7 για τις πρωτεΐνες HIF-2α και β-Τουμπουλίνη στις συνθήκες υποξίας και νορμοξίας.

5. Συζήτηση

Σε συνθήκες υποξίας σημαντικές βιολογικές διεργασίες οι οποίες χρειάζονται το οξυγόνο αναστέλλονται. Για την επιβίωση των κυττάρων, οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF μεταβάλλουν το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα ενεργοποιούν γονίδια της αγγειογένεσης, της ερυθροποίησης, της διαφοροποίησης, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, και της μεσεγχυματικότητας για την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία. Οι HIF αποτελούνται από τρεις ισομορφές και η λιγότερο μελετημένη ισομορφή τους είναι ο HIF2-α, ο οποίος εκφράζεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς ιστούς, κυρίως στο ενδοθήλιο, το ήπαρ και τους πνεύμονες. Έχει βρεθεί πως πολλά γονίδια στόχοι του είναι κοινά με τον HIF-1α ενώ κάποια γονίδια είναι αποκλειστικά ρυθμιζόμενα από τον HIF-2α. Επιπλέον πολλά γονίδια τα οποία επάγονται στην υποξία παραμένει αμφιλεγόμενο ποια ισομορφή των HIF τα ρυθμίζει. Πλέον υποστηρίζεται πως στην χρόνια υποξία τα επίπεδα του HIF-2α στους ιστούς όπου εκφράζεται, είναι υψηλότερα από τον HIF-1α και το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο HIF-2α πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στην χρόνια υποξία.

Προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας τα οποία αναδείχθηκαν μέσω ανάλυσης δεδομένων RNA-seq και με ανάλυση RT-qPCR σε πραγματικό χρόνο έδειξαν πως η έκφραση του γονιδίου Skp2 μειώνεται στατιστικά στην υποξία με την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, Huh7.

Η πρωτεΐνη Skp2 είναι μία F-box πρωτεΐνη και μέρος του συμπλόκου E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης με τις πρωτεΐνες RBX1-Cullin1-Skp1-Skp2. Το σύμπλοκο ανήκει στην οικογένεια των Ring-Cullin λιγασών. ρόλος της Skp2 ως μέρος του συμπλόκου είναι η ρύθμιση της ουβικουιτίνωσης πρωτεϊνών του κυττάρου κυρίως του κυτταρικού κύκλου. Η Skp2 είναι κυρίως υπεύθυνη για την πολυουβικουιτίνωση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p27 στην θρεονίνη 186 (Thr187) και του αναστολέα p21, τους οποίους οδηγεί σε πρωτεόλυση και συμβάλλει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S.

Πρώτος στόχος της παρούσας διπλωματικής έρευνας, αποτέλεσε η αναζήτηση πιθανών μοτίβων HRE (Hypoxia Responsive Element) ανοδικά του γονιδίου Skp2, όπου πιθανόν να συνδέεται ο HIF-2α και να επάγει την έκφραση του Skp2 στην υποξία. Η αναζήτηση των HRE πραγματοποιήθηκε για 1500bp ανοδικά της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου Skp2 και ανέδειξε

την ύπαρξη ενός πιθανού μοτίβου HRE το οποίο βρίσκεται στις 873 βάσεις από το σημείο έναρξης της μετάφρασης του.

Η ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου η οποία φέρει το πιθανό HRE και περιλαμβάνει τον υποκινητή, απομονώθηκε από το γενωμικό DNA κυττάρων Huh7, ενισχύθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα ο οποίος εκφράζει το γονίδιο της λουσιφεράσης. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του ενθέματος για την επαλήθευση της ορθής αλληλουχίας και της κλωνοποίησης της στον πλασμιδιακό φορέα PGL3-Basic. Ακολούθησε ανάπτυξη καλλιέργειας μεσαίας κλίμακας σε βακτηριακά κύτταρα, απομόνωση και διαμόλυνση του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου σε κύτταρα Huh7 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας ώστε να μελετηθεί η επαγωγή του υποκινητή μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας λουσιφεράσης παρουσίασαν διαφορά μεταξύ των συνθηκών νορμοξίας και υποξίας. Παρατηρήθηκε ότι με παρουσία του υποκινητή της Skp2, η έκφραση της λουσιφεράσης αυξήθηκε κατά 1.3 φορές στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία. Ταυτόχρονα στην δοκιμασία λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης θετικού ελέγχου ένα πλασμίδιο του εργαστηρίου με ενσωματωμένη την αλληλουχία 5-HRE του γονιδίου VEGF (PGL3B-5HRE). Στα κύτταρα που εκφράστηκε ο PGL3B-5HRE παρατηρήθηκε επαγωγή στην υποξία κατά 7 φορές όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της παρουσίας των πολλαπλών x5-HRE στοιχείων απόκρισης στην υποξία τα οποία συμβάλλουν στην εκθετική αύξηση της έκφρασης. Ο άδειος πλασμιδιακός φορέας PGL3-Basic, εμφανίζει μη αναμενόμενη αύξηση της έκφρασης από την νορμοξία στην υποξία. Μια πιθανή εξήγηση αποτελεί κάποιο λάθος κατά τον χειρισμό των δειγμάτων των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό και θετικό κοντρόλ. Για την αναζήτηση λαθών που προέκυψαν θα μπορούσε να γίνει, η επανάληψη του πειράματος η οποία θα αποδόσει περισσότερα δεδομένα για την επαγωγή των πλασμιδίων. Παράλληλα, θα μπορούσε να γίνει αλληλούχηση του άδειου πλασμιδίου για την συλλογή πληροφοριών σχετικά με την ακριβή αλληλουχία του αρνητικού κοντρόλ και να ερμηνευτεί η πιθανή επαγωγή που βρέθηκε. Συνολικά, δεν μπορούμε να προχωρήσουμε στην σύγκριση των διαφόρων τιμών με τις τιμές του αρνητικού κοντρόλ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην υποξία και την επαγωγή της ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου Skp2, η οποία περιλαμβάνει ένα πιθανό μοτίβο HRE. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας λουσιφεράσης δείχνουν μια τάση αύξησης της μεταγραφικής

ενεργότητας η οποία συμφωνεί με τα προηγούμενα δεδομένα μας της βιοπληροφορικής ανάλυσης και έκφρασης του γονιδίου με RT-qPCR όπου βρέθηκε μια σημαντική επαγωγή. Όσον αφορά τους περιορισμούς της μελέτης, η κλωνοποίηση της ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου επιτρέπει την μελέτη της ρύθμισης από το σύνολο της αλληλουχίας η οποία πιθανόν να περιέχει στοιχεία αναγνώρισης από επιπλέον μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, το πλασμίδιο δεν παρομοιάζει την οργάνωση της χρωματίνης και πιθανόν ορισμένες αλληλεπιδράσεις να μεταβάλλονται και να επηρεάζουν την έκφραση της λουσιφεράσης.

Είναι ωστόσο σημαντικό να σημειωθεί ότι στο πλαίσιο της διπλωματικής εξετάστηκε μόνο η κύρια ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου Skp2 και πιθανόν να μην προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση κάποιας ρυθμιστικής αλληλουχίας που να βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από τον υποκινητή του γονιδίου και η οποία να είναι απαραίτητη για την βέλτιστη αλληλεπίδραση των HIF στον υποκινητή. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε να πραγματοποιηθούν πειράματα τα οποία να εξετάζουν τη σύνδεση του HIF-2α στο γονίδιο Skp2 και να απαντούν στα ερωτήματα της συνεργατικής ή μοναδικής ρύθμισης από τον HIF-2α. Μία από τις μεθόδους η οποία μπορεί αξιόπιστα να παρέχει δεδομένα για την αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων σε μία αλληλουχία είναι η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ChIP-seq. Εναλλακτικά μελέτες υπερέκφρασης του HIF-2α θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην μελέτη της γονιδιακής ρύθμιση του γονιδίου Skp2.

Δεδομένα ChIP-seq είναι διαθέσιμα στη βάση ChIP-Atlas για πολλούς κυτταρικούς τύπους, αλλά όχι για τα κύτταρα Huh7. Ωστόσο δεδομένα από κύτταρα νεφρικού καρκινώματος καταδεικνύουν την σύνδεση του HIF-2α στην κωδική περιοχή του γονιδίου Skp2. Επιπλέον δεδομένα σε κύτταρα μελανώματος δείχνουν πως ο HIF-1α αλληλεπιδρά στον υποκινητή του γονιδίου Skp2. Για αυτό και πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α είναι ρυθμιστές της έκφρασης στην υποξία. Θα ήταν σημαντικό να ελεγχθεί αν εκτός από τον HIF-2α που δείχνουν τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, υπάρχει μια πιθανή θετική ή αρνητική επίδραση στην επαγωγή του Skp2 από τον HIF-1α.

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α διαδραματίζει καίριο ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση σε συνθήκες υποξίας. Από τις μελέτες του εργαστηρίου αναδείχθηκε η συμμετοχή του στην επαγωγή του γονιδίου Skp2 στην υποξία. Η πρωτεΐνη Skp2 αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου ο οποίος συνεισφέρει στην πρόοδό του και θα ήταν σημαντική η συνέχιση της

της διερεύνησης της αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α με το γονίδιο Skp2 και την κατανόηση της επίδρασης της Skp2 στον κυτταρικό κύκλο σε συνθήκες υποξίας.

Βιβλιογραφία

1. Chen PS, Chiu WT, Hsu PL, Lin SC, Peng IC, Wang CY, et al. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):63.
2. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-17.
3. Gan ES, Ooi EE. Oxygen: viral friend or foe? *Virol J.* 2020;17(1):115.
4. Torres-Machorro AL. Homodimeric and Heterodimeric Interactions among Vertebrate Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23).
5. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15117-23.
6. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014;49(1):1-15.
7. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9087-98.
8. Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225(2):485-8.
9. Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, et al. HIF2alpha-Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(12):5389-401.
10. Bartoszewski R, Moszynska A, Serocki M, Cabaj A, Polten A, Ochocka R, et al. Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia. *FASEB J.* 2019;33(7):7929-41.
11. Yang M, Su H, Soga T, Kranc KR, Pollard PJ. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia (Auckl).* 2014;2:127-42.
12. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):635-41.
13. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9361-74.
14. Pappalardi MB, McNulty DE, Martin JD, Fisher KE, Jiang Y, Burns MC, et al. Biochemical characterization of human HIF hydroxylases using HIF protein substrates that contain all three hydroxylation sites. *Biochem J.* 2011;436(2):363-9.
15. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393-402.
16. Pangou E, Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. HIF-2alpha phosphorylation by CK1delta promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci.* 2016;129(22):4213-26.
17. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23508-14.

18. To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J*. 2006;25(20):4784-94.
19. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*. 2010;38(6):864-78.
20. Yoon H, Shin SH, Shin DH, Chun YS, Park JW. Differential roles of Sirt1 in HIF-1alpha and HIF-2alpha mediated hypoxic responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;444(1):36-43.
21. Mandel N, Agarwal N. Role of SUMOylation in Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022;11(21).
22. Filippopoulou C, Simos G, Chachami G. The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells*. 2020;9(11).
23. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):1922-31.
24. Rathmell WK, Chen S. VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008;8(1):63-73.
25. Dutta D, Ray S, Vivian JL, Paul S. Activation of the VEGFR1 chromatin domain: an angiogenic signal-ETS1/HIF-2alpha regulatory axis. *J Biol Chem*. 2008;283(37):25404-13.
26. Zhang ZY, Zhang SL, Chen HL, Mao YQ, Li ZM, Kong CY, et al. The up-regulation of NDRG1 by HIF counteracts the cancer-promoting effect of HIF in VHL-deficient clear cell renal cell carcinoma. *Cell Prolif*. 2020;53(7):e12853.
27. Sena JA, Wang L, Pawlus MR, Hu CJ. HIFs enhance the transcriptional activation and splicing of adrenomedullin. *Mol Cancer Res*. 2014;12(5):728-41.
28. Duan LJ, Jiang Y, Fong GH. Endothelial HIF2alpha suppresses retinal angiogenesis in neonatal mice by upregulating NOTCH signaling. *Development*. 2024;151(11).
29. Bakleh MZ, Al Haj Zen A. The Distinct Role of HIF-1alpha and HIF-2alpha in Hypoxia and Angiogenesis. *Cells*. 2025;14(9).
30. Hong SS, Lee H, Kim KW. HIF-1alpha: a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat*. 2004;36(6):343-53.
31. Shi Y, Gilkes DM. HIF-1 and HIF-2 in cancer: structure, regulation, and therapeutic prospects. *Cell Mol Life Sci*. 2025;82(1):44.
32. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22.
33. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-alpha isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev*. 2010;24(5):491-501.
34. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res*. 2010;70(19):7465-75.
35. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Med*. 2002;9(3):287-92.
36. Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(4):391-407.

37. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem.* 2003;278(9):7520-30.
38. Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res.* 2006;66(11):5641-7.
39. Salnikow K, Aprelikova O, Ivanov S, Tackett S, Kaczmarek M, Karaczyn A, et al. Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1493-9.
40. Ohradanova A, Gradin K, Barathova M, Zatovicova M, Holotnakova T, Kopacek J, et al. Hypoxia upregulates expression of human endosialin gene via hypoxia-inducible factor 2. *Br J Cancer.* 2008;99(8):1348-56.
41. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007;11(4):335-47.
42. Matias PM, Baek SH, Bandejas TM, Dutta A, Houry WA, Llorca O, et al. The AAA+ proteins Pontin and Reptin enter adult age: from understanding their basic biology to the identification of selective inhibitors. *Front Mol Biosci.* 2015;2:17.
43. Rosenbaum J, Baek SH, Dutta A, Houry WA, Huber O, Hupp TR, et al. The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. *Sci Signal.* 2013;6(266):mr1.
44. Cheung KL, Huen J, Houry WA, Ortega J. Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(1):77-88.
45. Gkoutinakou IM, Befani C, Samiotaki M, Panayotou G, Liakos P. Novel HIF-2alpha interaction with Reptin52 impairs HIF-2 transcriptional activity and EPO secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;557:143-50.
46. Amin N, Anwar J, Sulaiman A, Naumova NN, Anwar N. Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. *Diseases.* 2025;13(7).
47. Wands J. Hepatocellular carcinoma and sex. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1974-6.
48. Tanaka M, Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm Regen.* 2016;36:19.
49. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 2013;4:2218.
50. Chen J, Chen J, Huang J, Li Z, Gong Y, Zou B, et al. HIF-2alpha upregulation mediated by hypoxia promotes NAFLD-HCC progression by activating lipid synthesis via the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Aging (Albany NY).* 2019;11(23):10839-60.
51. Ren X, Hu B, Colletti L. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy. *Surgery.* 2008;143(6):790-802.
52. Wang X, Dong J, Jia L, Zhao T, Lang M, Li Z, et al. HIF-2-dependent expression of stem cell factor promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2017;393:113-24.
53. Nijkamp MW, van der Bilt JD, de Bruijn MT, Molenaar IQ, Voest EE, van Diest PJ, et al. Accelerated perinecrotic outgrowth of colorectal liver metastases following radiofrequency ablation is a hypoxia-driven phenomenon. *Ann Surg.* 2009;249(5):814-23.

54. Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol.* 2000;1(5):REVIEWS3002.
55. Feng T, Wang P, Zhang X. Skp2: A critical molecule for ubiquitination and its role in cancer. *Life Sci.* 2024;338:122409.
56. Wang Z, Fukushima H, Inuzuka H, Wan L, Liu P, Gao D, et al. Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. *Front Oncol.* 2012;1(57).
57. Randle SJ, Laman H. F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2016;36:3-17.
58. Kaldis P. Another piece of the p27Kip1 puzzle. *Cell.* 2007;128(2):241-4.
59. Lu Z, Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle.* 2010;9(12):2342-52.
60. Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol.* 1999;9(12):661-4.
61. Cai Z, Moten A, Peng D, Hsu CC, Pan BS, Manne R, et al. The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy. *Semin Cancer Biol.* 2020;67(Pt 2):16-33.
62. Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW, et al. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell.* 2001;7(3):639-50.
63. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* 2000;19(9):2069-81.
64. Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, Yada M, Ishida N, Imaki H, et al. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(18):10231-6.
65. Yao F, Zhou Z, Kim J, Hang Q, Xiao Z, Ton BN, et al. SKP2- and OTUD1-regulated non-proteolytic ubiquitination of YAP promotes YAP nuclear localization and activity. *Nat Commun.* 2018;9(1):2269.
66. Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(9):4149-56.
67. Schneider G, Saur D, Siveke JT, Fritsch R, Greten FR, Schmid RM. IKKalpha controls p52/RelB at the skp2 gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J.* 2006;25(16):3801-12.
68. Sarmiento LM, Huang H, Limon A, Gordon W, Fernandes J, Tavares MJ, et al. Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation. *J Exp Med.* 2005;202(1):157-68.
69. Evans L, Chen L, Milazzo G, Gherardi S, Perini G, Willmore E, et al. SKP2 is a direct transcriptional target of MYCN and a potential therapeutic target in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2015;363(1):37-45.
70. Appleman LJ, Chernova I, Li L, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates transcription of SKP2 and CKS1, the substrate recognition components of SCFSkp2 ubiquitin ligase that leads p27kip1 to degradation. *Cell Cycle.* 2006;5(18):2123-9.
71. Zuo T, Liu R, Zhang H, Chang X, Liu Y, Wang L, et al. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3765-73.

72. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. 2010;29(29):4121-9.
73. Kitagawa M, Lee SH, McCormick F. Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300. *Mol Cell*. 2008;29(2):217-31.
74. Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY, et al. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(5):457-67.
75. O'Connor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases*. 2013;4(3):141-7.
76. Ruan D, He J, Li CF, Lee HJ, Liu J, Lin HK, et al. Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene*. 2017;36(30):4299-310.