



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη των μεταγραφικών συμπλόκων που εξαρτώνται από την
φωσφορυλίωση του HIF-1α»**

Σιώκα Αναστασία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- ❖ Μυλωνής Ηλίας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας (επιβλέπων)
- ❖ Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας
- ❖ Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων

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

Λάρισα, Οκτώβριος, 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**“Investigation of transcriptional complexes that depend on HIF-1 α
phosphorylation”**

Sioka Anastasia

Advisory thesis committee:

- ❖ Mylonis Ilias, Associate Professor of Biochemistry (Supervisor)
- ❖ Simos Georgios, Professor of Biochemistry
- ❖ Bogdanos Dimitrios, Professor of Medicine and Autoimmune Diseases

Master thesis submitted to the Faculty of Medicine, University of Thessaly, part of the requirements for obtaining an MSc degree in Biochemistry.

Larissa, October, 2025

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. Μυλωνή Ηλία που μου ενέπνευσε την αγάπη για τον εργαστηριακό πάγκο και την έρευνα. Είμαι ευγνώμων για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου έχει μεταλαμπαδεύσει, για τον χρόνο που μου αφιέρωνε καθημερινά και την προθυμία του να λύνει όλες μου τις απορίες. Επιπλέον, τον ευχαριστώ που με βοήθησε να κάνω τα πρώτα ερευνητικά μου βήματα.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας κ. Σίμο Γεώργιο που με δέχτηκε στο εργαστήριο ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και όλα τα μέλη ΔΕΠ που συνέβαλαν στην κατάρτιση μου μέσω των σεμιναρίων και των διαλέξεων στο πλαίσιο του μαθήματος «Κυτταρική Ομοιοστασία και Γονιδιακή Έκφραση».

Επίσης, ευχαριστώ τον υπεύθυνο του εν λόγω μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Μπόγδανο Δημήτριο που επέτρεψε τη συμμετοχή μου σε αυτό και για όλες τις διαλέξεις που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια του έτους από αξιόλογους επιστήμονες.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας: τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κατερίνα Καραλή και Ευάγγελο Στυμονιάρη και την προπτυχιακή φοιτήτρια Παπαευαγγέλου Κωνσταντίνα, με τα οποία συνεργάστηκα άψογα και τα οποία έκαναν ευχάριστη την παραμονή μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής επιτρέποντας την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των αερόβιων οργανισμών. Η παρουσία χαμηλότερων επιπέδων οξυγόνου από τα φυσιολογικά καλείται υποξία και αποτελεί χαρακτηριστικό παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος. Η προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας στηρίζεται σε μία σειρά μεταγραφικών, μεταφραστικών και μορφολογικών αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένου της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIF αποτελούνται από μία α και μία β υπομονάδα για τις οποίες υπάρχουν αρκετές ισομορφές. Η ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο HIF-1 α ισομορφή υπόκειται σε ένα πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που καθορίζουν τη σταθερότητα της, τον υποκυτταρικό της εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες. Αποτελέσματα από πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι ο HIF-1 α πιθανώς αλληλεπιδρά με την υπομονάδα SMC1A του συμπλόκου των κοεζινών που κατά κύριο λόγο ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της παραπάνω αλληλεπίδρασης και η κατανόηση του ρόλου της για την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία. Σύμφωνα με ευρήματα από πειράματα *in vitro* αλληλεπίδρασης, ανοσοκαθίζησης, ανοσοφθορισμού και μεταγραφικής ενεργότητας υποδεικνύεται ότι υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του HIF-1 α με την πρωτεΐνη SMC1A επάγοντας τη μεταγραφή ενός υποσυνόλου από τα γονίδια-στόχους του HIF-1 πιθανώς μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, υπόθεση που είναι υπό διερεύνηση.

ABSTRACT

Oxygen is essential for the preservation of life as it is used to produce energy by aerobic organisms. The existence of lower-than-normal oxygen levels is called hypoxia and characterizes pathological conditions such as cancer. Adaptation of cells to hypoxic conditions relies on transcriptional, translational and morphological responses including the activation of a small family of transcriptional regulators called HIFs (Hypoxia Inducible Factors). HIFs consist of one alpha and one beta subunit that exist in three main isoforms. The oxygen regulated HIF-1 α isoform is subjected to many post-translational modifications that define its stability, subcellular localization and interactions with other proteins. Results from recent experiments show that HIF-1 α possibly interacts with the SMC1A subunit of cohesin complex whose main role is to define topologically associated domains on chromatin. The aim of this thesis was the investigation of HIF-1 α /SMC1A interaction and its role for cellular adaptation to hypoxia. According to our findings from *in vitro* interaction, immunoprecipitation, immunofluorescence and transcriptional activity experiments, it is indicated that there is a direct interaction of HIF-1 α with SMC1A which facilitates the transcription of a subset of HIF-1 target genes, possibly by remodeling chromatin, a hypothesis that is under investigation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Οξυγόνο και υποξία	10
1.2. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia-inducible factors, HIFs)	10
1.3. Ο βιολογικός ρόλος του HIF-1	12
1.4. Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α	17
1.5. Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του <i>HIF1A</i> γονιδίου	18
1.6. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α	20
1.7. Αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες	24
1.8. Ο ρόλος του συμπλόκου των κοεζινών	27
1.9. Σύνθεση υπομονάδων του συμπλόκου των κοεζινών	28
1.10. Ο μηχανισμός δημιουργίας DNA θηλιών από το σύμπλοκο των κοεζινών.	29
2. ΣΚΟΠΟΣ	31
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.1. <u>ΥΛΙΚΑ</u>	32
3.1.1. Βακτηριακά στελέχη	32
3.1.2. Κυτταρικές σειρές	32
3.1.3. Μέσα κυτταροκαλλιέργειας	32
3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς	32
3.1.5. Αντιδραστήρια, αντισώματα και ένζυμα	34
3.1.6. Κιτ	34
3.1.7. Εκκινητές	35
3.2. <u>ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	35
3.2.1. Μέθοδοι με τη χρήση βακτηριακών κυττάρων	35
3.2.1.1. Πέψη του πλασμιδίου pcDNA3-5'<i>cMyc-SMCI</i>Δwt και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με ενδονουκλεάσες περιορισμού.	35
3.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης	37

3.2.1.3. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	40
3.2.1.4. Πραγματοποίηση αντίδρασης λιγάσης για τη σύνδεση του <i>SMC1A</i> cDNA με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1.	41
3.2.1.5. Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια βακτηρίων.	42
3.2.1.6. Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i> με πλασμίδια.	42
3.2.1.7. Ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια μικρής, μεσαίας και μεγάλης κλίμακας.	44
3.2.1.8. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση.	45
3.2.1.9. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας με στήλη καθαρισμού.	46
3.2.1.10. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια.	47
3.2.1.11. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας.	48
3.2.1.12. Δοκιμή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών <i>in vitro</i> .	50
3.2.2. Μέθοδοι με τη χρήση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.	52
3.2.2.1. Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων σε φυσιολογική και μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου.	52
3.2.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	52
3.2.2.3. Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικά κύτταρα με τη χρήση αντιδραστηρίου NucleoZOL.	53
3.2.2.4. Διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων με siRNAs με χρήση κατιονικών πολυμερών (αντιδραστήριο jetPRIME).	54
3.2.2.5. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting).	55
3.2.2.6. Ανοσοκατακρήμνιση ενδογενών πρωτεϊνών.	62
3.2.2.7. Ανοσοκατακρήμνιση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο RECLIP.	64
3.2.2.8. Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών σε σταθερά διαμολυσμένα καρκινικά κύτταρα με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού.	67

3.2.2.9. Σύνθεση cDNA από RNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).	69
3.2.2.10. Real-time PCR (qPCR)	71
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
4.1. Έλεγχος ορθότητας του πλασμιδίου pcDNA3-5' <i>cMyc-SMC1A</i> wt με ενδονουκλεάσες περιορισμού.	74
4.2. Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>SMC1A</i> στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια pGEX-4T-1.	75
4.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> TOP10 με το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A και έλεγχος με ενδονουκλεάσες περιορισμού.	76
4.4. Απομόνωση του πλασμιδίου pGEX-4T-1-SMC1A από υγρή καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας.	77
4.5. Δοκιμή υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A σε βακτήρια <i>E.coli</i> BL21-RIL με διαφορετικές συγκεντρώσεις του IPTG.	77
4.6. Καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-SMC1A με χρωματογραφία αγγιστείας - απουσία και παρουσία DNAσης.	78
4.7. Δοκιμή αλληλεπίδρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A με καθαρισμένα θραύσματα του HIF-1α <i>in vitro</i> .	80
4.8. Ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α από κύτταρα Huh7.	82
4.9. Ανοσοκατακρήμνιση με τη μέθοδο RECLIP του GFP-HIF-1α από σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν στην υποξία τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α.	83
4.10. Έλεγχος του συνεντοπισμού των διαφόρων μορφών του GFP-HIF-1α με την πρωτεΐνη SMC1A με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.	84
4.11. Πραγματοποίηση RT-qPCR αντίδρασης (Reverse Transcription-quantitative PCR) για τα γονίδια <i>LPIN1</i> και <i>PGK1</i> σε κύτταρα Huh7 όπου έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου <i>SMC1A</i> .	86
4.12. Μελέτη της έκφρασης της λιπίνης-1 σε κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν σταθερά στην υποξία τις διάφορες μορφές του HIF-1α μετά από αποσιώπηση του γονιδίου <i>SMC1A</i> .	87
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οξυγόνο και υποξία

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο (O_2) για να παράγουν ενέργεια, αφού αυτό αποτελεί τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας [1]. Στους ανθρώπους, η ανταλλαγή των αερίων λαμβάνει χώρα στις κυψελίδες των πνευμόνων. Πάνω από το 95 % του οξυγόνου που καταλήγει στα τριχοειδή αγγεία μέσω του κυψελιδικού-τριχοειδικού συστήματος ανταλλαγής συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη. Ακολουθώντας, η καρδιά διοχετεύει το οξυγονωμένο αίμα στην περιφέρεια του σώματος [2]. Τα φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς κυμαίνονται από 14,5 % στις κυψελίδες των πνευμόνων έως 3 % στους λεμφικούς ιστούς και κατά μέσο όρο ισούνται με 5 % [3].

Η υποξία (0,5 % έως 2 % οξυγόνο) ορίζεται ως η χαμηλότερη από τα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωση οξυγόνου και μπορεί να είναι είτε παροδική, λόγω ανισορροπίας μεταξύ της παροχής και της κατανάλωσης του οξυγόνου, είτε χρόνια, λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης, χαμηλών επιπέδων αιμοσφαιρίνης, οιδήματος ή φλεγμονής [4]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υποξία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ισχαιμικών διαταραχών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η περιφερική αρτηριακή νόσος [5]. Επιπλέον, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των συμπαγών όγκων, όπου ο ταχύς πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων ξεπερνά την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου και σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υποξικών ζωνών στο εσωτερικό τους [3, 6]. Απεναντίας, η υποξία δεν συσχετίζεται μόνο με παθολογικές αλλά και με φυσιολογικές καταστάσεις όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η έντονη άσκηση και η παρουσία σε υψηλό υψόμετρο [7].

Παρουσία χαμηλών επιπέδων οξυγόνου, ενεργοποιείται μία σειρά μεταγραφικών, μεταφραστικών και μεταβολικών αποκρίσεων ώστε να επιτευχθεί η προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες αυτές [4]. Συγκεκριμένα, σταματάει ο κυτταρικός κύκλος, ελαττώνεται ο ρυθμός διεξαγωγής των ενεργειακά απαιτητικών διεργασιών και συντίθενται παράγοντες που προάγουν την κυτταρική επιβίωση και την αγγειογένεση [1].

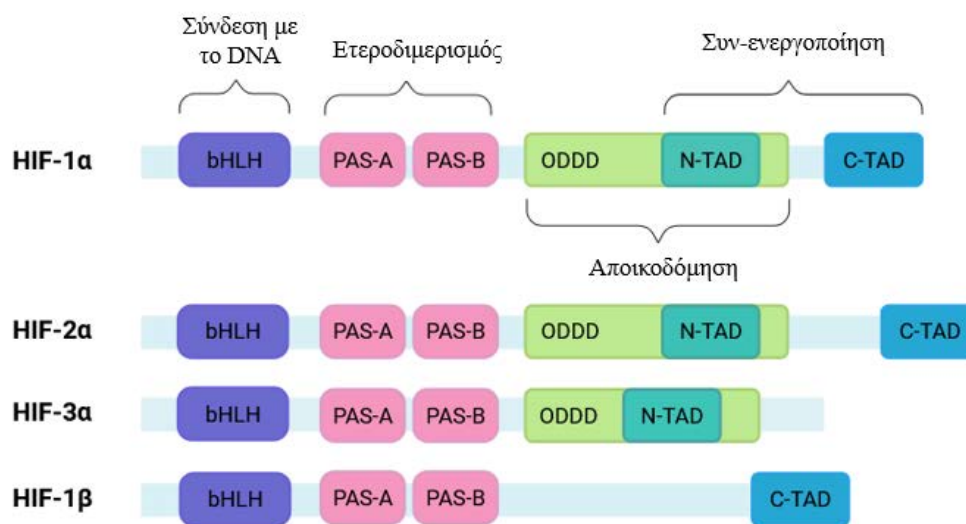
1.2. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia-inducible factors, HIFs)

Το 1992, οι Wang και Semenza ανακάλυψαν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) ως μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) ως απόκριση στην υποξία [3, 6]. Ο HIF σχηματίζει ετεροδιμερή τα οποία αποτελούνται από μία HIF-α και μία HIF-β υπομονάδα, επίσης γνωστή ως ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), που συνδέονται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia response elements, HREs) με τη συναινετική αλληλουχία 5'-RCGTG-3' προκειμένου να ασκήσουν τη μεταγραφική τους δράση [8, 9].

Οι HIF-α και -β υπομονάδες διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο μία επικράτεια bHLH (beta-Helix-Loop-Helix) και δύο επικράτειες PAS (Per/ARNT/Sim), PAS-A και PAS-B, που απαραίτητες για τη σύνδεση τους με το DNA και τον ετεροδιμερισμό τους, αντίστοιχα. Επιπλέον, φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μία ή δύο επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation domains, TADs) που αλληλεπιδρούν με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, μία ανασταλτική επικράτεια (Inhibitory domain, ID) και μία επικράτεια που υπόκειται σε ρύθμιση από το οξυγόνο (Oxygen-dependent degradation domain, ODDD)-παρούσα μόνο στην HIF-α [10, 11]. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν τρεις ισομορφές για την HIF-α υπομονάδα (HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α) και αντίστοιχα, δύο για την HIF-β (HIF-1β και HIF-2β). Οι παραπάνω ισομορφές αποτελούν προϊόντα διαφορετικών γονιδίων (**Εικόνα 1.2**).

Η HIF-1α ισομορφή είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξικών καταλοίπων με μοριακό βάρος 93 kDa, η οποία εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών [14]. Η εν λόγω ισομορφή διαθέτει δύο επικράτειες TAD στο καρβοξυτελικό της άκρο, τις N-TAD (531-575) και C-TAD (786-826), οι οποίες είναι πλούσιες σε όξινα και υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, αντίστοιχα. Επιπλέον, μεταξύ των TADs παρεμβάλλεται η ανασταλτική επικράτεια ID (576-785) και η N-TAD αλληλοεπικαλύπτεται με την οξυγονο-εξαρτώμενη επικράτεια ODDD (401-603) [9]. Επίσης, η HIF-1α ισομορφή φέρει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear localization signals, NLSs), ωστόσο, μόνο το ένα εκ αυτών είναι λειτουργικό [15]. Όσον αφορά την HIF-2α ισομορφή, είναι μία πρωτεΐνη 870 αμινοξικών καταλοίπων με μοριακό βάρος 96,5 kDa και η πρωτοταγή της δομή παρουσιάζει 48% ομολογία με την αντίστοιχη της HIF-1α (85% bHLH, 68% PAS-A και 73% PAS-B) [11]. Η βασική δομική διαφορά των HIF-1α και -2α έγκειται στην επικράτεια ODDD [3]. Επιπλέον, η HIF-2α ισομορφή εκφράζεται μόνο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους όπως τα

ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, τα ηπατοκύτταρα, τα καρδιομυοκύτταρα, τα πνευμονοκύτταρα, τα εντεροκύτταρα και τα αστροκύτταρα [16]. Από την άλλη πλευρά, η HIF-3α ισομορφή ετεροδιμερίζεται με την HIF-1α, αποτρέποντας τον σχηματισμό του μεταγραφικά ενεργού συμπλόκου HIF-1α/HIF-1β [10]. Οι ισομορφές της HIF-β υπομονάδας αποτελούνται από 789 (HIF-1β) και 706 (HIF-2β) αμινοξικά κατάλοιπα και αμφότερες διαθέτουν τις επικράτειες bHLH, PAS και C-TAD, ενώ, απουσιάζουν οι επικράτειες N-TAD και ODDD [12].



Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς δομής των HIF-α (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) και HIF-1β ισομορφών. Διακρίνονται με μωβ χρώμα η επικράτεια δέσμευσης στο DNA bHLH (Beta-Helix-Loop-Helix), με ροζ χρώμα οι επικράτειες ετεροδιμερισμού PAS-A/-B (Per-ARNT-Sim), με ανοιχτό πράσινο χρώμα η επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης ODDD (Oxygen-dependent degradation domain) και με σκούρο πράσινο και μπλε χρώμα οι επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης N-TAD (N-Transactivation domain) και C-TAD (C-Transactivation domain), αντίστοιχα. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [3].

1.3. Ο βιολογικός ρόλος του HIF-1

Φυσιολογικός ρόλος

Ο HIF-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο α) στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, β) στην ανάπτυξη του κυκλοφορικού (αγγειογένεση, ερυθροποίηση) και του ανοσοποιητικού συστήματος [6], γ) στην επούλωση των τραυμάτων και των πληγών, δ) στη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών, ε) στη ρύθμιση του pH [19] κ.ο.κ. Σχετικά με την ερυθροποίηση, ο HIF-1 ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή των γονιδίων *EPOR*, *TF* και *TFR*. Κατ'αυτόν τον τρόπο, διευκολύνει την απορρόφηση του σιδήρου, τη μεταφορά

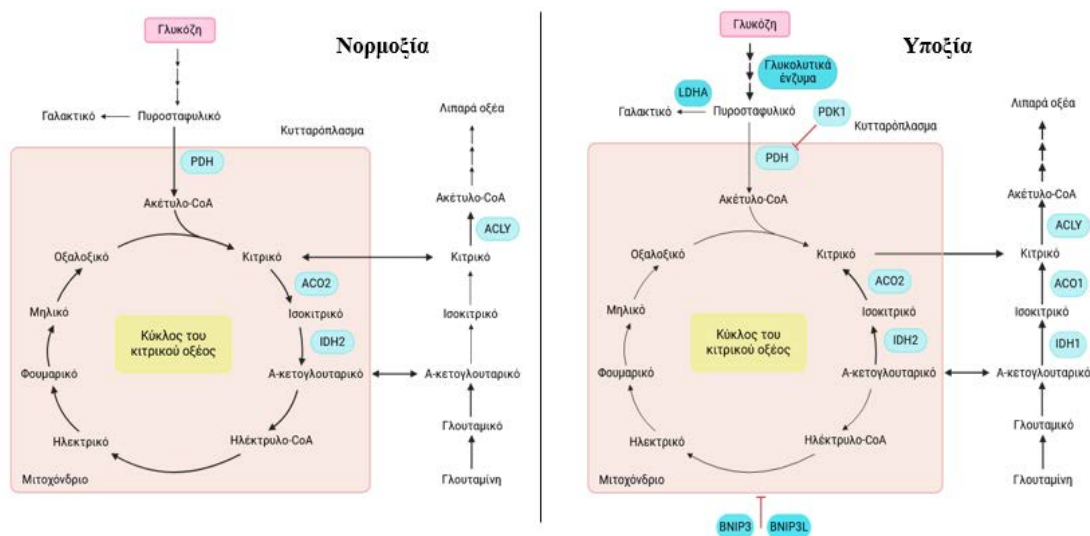
του στον μυελό των οστών και την ενσωμάτωση του στην αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων [18].

Ο ρόλος του HIF-1 στην παθογένεση

Ο ρόλος του HIF-1 σε διάφορα ανθρώπινα νοσήματα είναι διττός. Ο HIF-1 δρα προστατευτικά έναντι κάποιων ασθενειών (περιφερική αρτηριακή νόσος, στεφανιαία νόσος) και συνεισφέρει στην εξέλιξη άλλων (ισχαιμία, καρκίνος) [20]. Όσον αφορά τον καρκίνο, ο HIF-1 ευθύνεται για την κακή πρόγνωση του προάγοντας (α) τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, (β) την οξέωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, (γ) την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), (δ) την αγγειογένεση και (ε) την κυτταρική επιβίωση. Επομένως, επέρχεται ανοχή στη χημειο- και ακτινοθεραπεία [21], επιβίωση και πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων με τη δυνατότητα μετάστασης σε νέες εστίες.

Μεταβολισμός

Η υποξία προωθεί τη μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αναερόβια γλυκόλυση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (**Εικόνα 1.3Α**) [17]. Αναλυτικότερα, ο HIF-1 ενισχύει τη γλυκολυτική οδό επάγοντας την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης 1 και 3 (GLUT1,-3) και των γλυκολυτικών ενζύμων εξοκινάση II (HK2), κινάση του φωσφογλυκερικού I (PGK1) και αφυδρογονάση του γαλακτικού (LDHA). Παράλληλα, αποτρέπει την είσοδο του πυροσταφυλικού στον κύκλο του κιτρικού οξέος επάγοντας την έκφραση του ενζύμου κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού I (PDK1) [7]. Ο HIF-1 καταστέλλει την έκφραση του παράγοντα συναρμολόγησης των ομάδων Fe-S (ISCU) μέσω του miR-210 [22], συστατικών των συμπλόκων I, II και III της αναπνευστικής αλυσίδας και του ενζύμου ακονιτάση. Τέλος, ο HIF-1 προλαμβάνει τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου αντικαθιστώντας την υπομονάδα COX4-1 του κυτοχρώματος c με την ισομορφή της COX4-2, η οποία καθιστά πιο αποτελεσματική την μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας [23].

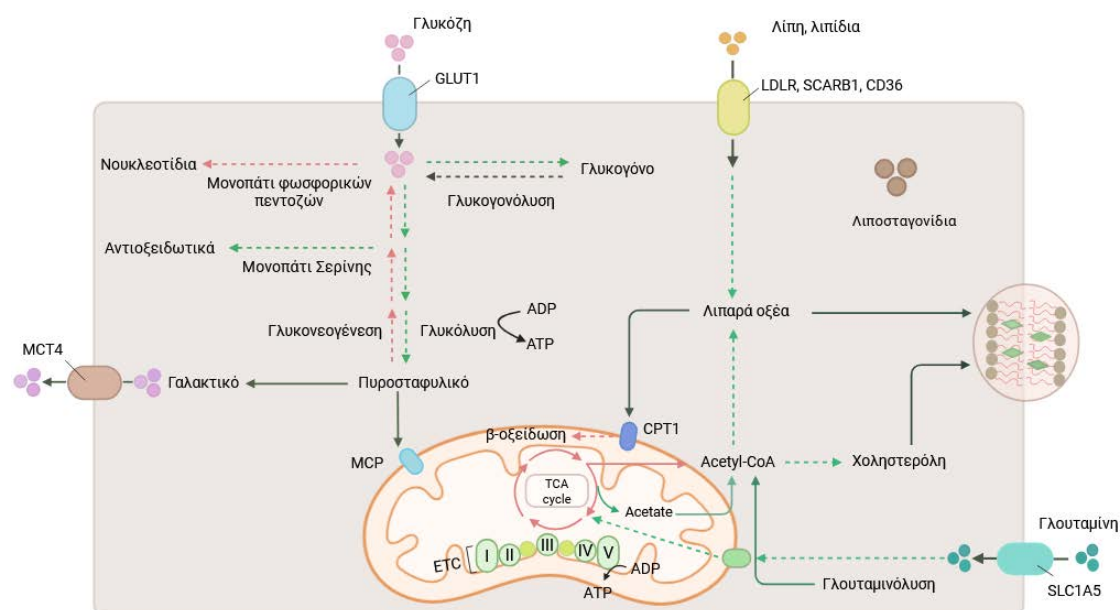


Εικόνα 1.3Α. Ο HIF-1 διευκολύνει τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων από αερόβιο σε αναερόβιο. Στη νορμοξία, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA με τη βοήθεια της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDH) και ακολούθως, εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στην υποξία, η γλυκολυτική οδός ενισχύεται, ωστόσο, το πυροσταφυλικό δεν εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος λόγω αναστολής της PDH από την κινάση PDK1 και μετατρέπεται σε γαλακτικό μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού (LDHA). Επιπλέον, ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων στη νορμοξία, αντίθετα, στην υποξία το κύριο υπόστρωμα αποτελεί η γλουταμίνη. PDH: Pyruvate dehydrogenase, PDK1: Pyruvate dehydrogenase kinase 1, LDHA: Lactate dehydrogenase, ACO(1, 2): Aconitase (1, 2), IDH(1, 2): Isocitrate dehydrogenase (1, 2), ACLY: ATP-citrate lyase, BNIP3(L): BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (like). Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [22].

Το γαλακτικό, το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο δια μέσου του μεταφορέα MCT4 ($K_m = 22 \text{ mM}$) και επαναπροσλαμβάνεται από τα γειτονικά κύτταρα (καρκινικά και στρωματικά) που εκφράζουν τον μεταφορέα MCT1 ($K_m = 3.5\text{--}10 \text{ mM}$). Ακολούθως, το γαλακτικό μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό με τη βοήθεια του ενζύμου LDHB και εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος [24]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στον υποκινητή του γονιδίου *MCT4* εντοπίζονται δύο στοιχεία απόκρισης στην υποξία, επομένως, η μεταγραφή του επάγεται από την υποξία [25].

Ο HIF-1 μειώνει την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και αυξάνει τη σύνθεση ακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω των ενζύμων FASN και SCD, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο λιποτοξικότητας. Επιπλέον, ο HIF-1 επάγει την έκφραση των ενζύμων AGPAT2 [26] και λιπίνη-1 [27] που καταλύουν κατά σειρά τη μετατροπή του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) σε φωσφατιδικό οξύ (PA) και διακυλογλυκερόλη (DAG) με σκοπό την παραγωγή τριγλυκεριδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην υποξία

η γλουταμίνη αποτελεί το κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και κατ'ακολουθία, λιπιδίων γι'αυτό αυξάνει η πρόσληψη της μέσω των μεταφορέων SLC1A5 και SNAT2/SLC38A2 (**Εικόνα 1.3B**) [28].



Εικόνα 1.3B Στην υποξία, αυξάνει η σύνθεση και ελαττώνεται η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων αποτελεί η γλουταμίνη που προσλαμβάνεται μέσω του μεταφορέα SLC1A5. Επιπλέον, αυξάνει η πρόσληψη λιπών και λιπιδίων, τα οποία αποθηκεύονται σε λιποσταγονίδια για την αποφυγή της λιποτοξικότητας. Στην υποξία, επίσης, ενισχύονται η γλυκόλυση και η γλυκογονογένεση, ελαττώνονται η γλυκονεογένεση και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, ενώ, αναστέλλεται ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA). SLC1A5: Solute Carrier Family 1 Member 5, LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor, SCARB1: Scavenger Receptor Class B Member 1, CD36: Cluster of differentiation 36, GLUT1: Glucose transporter type 1, MCT4: Monocarboxylate transporter type 1, CPT1: Carnitine Palmitoyltransferase 1, MCP: Mitochondrial carrier protein, TCA: Tricarboxylic acid cycle. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από [4].

Οξέωση μικροπεριβάλλοντος του όγκου και μετάσταση

Η αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση γαλακτικού οξέος (**Εικόνα 1.3A**) από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε οξέωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Επιπλέον, το ένζυμο καρβονική ανυδράση IX (CA IX) που επάγεται από τον HIF-1 καταλύει τη μετατροπή του CO_2 σε HCO_3^- και H^+ συμβάλλοντας στην αύξηση της οξύτητας του εξωκυττάριου μέσου [29, 30]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το χαμηλό pH διεγείρει τη σύνθεση, έκκριση και ενεργοποίηση ενζύμων που αποικοδομούν το κολλαγόνο της εξωκυττάριας μήτρας ευνοώντας τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [31].

Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση

Ο HIF-1 επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων *TCF3*, *ZFHX1A/B* και *TWIST* που οδηγούν σε επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση των καρκινικών κυττάρων (Epithelial-mesenchymal transition, EMT). Συγκεκριμένα, τα προϊόντα των παραπάνω γονιδίων καταστέλλουν την έκφραση παραγόντων του επιθηλίου όπως της E-καδερίνης και διεγείρουν την έκφραση παραγόντων του μεσεγχύματος. Επιπλέον, ο HIF-1 διατηρεί τα κύτταρα σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση ενεργοποιώντας την οδό Notch [32].

Κυτταρική επιβίωση

Ο HIF-1 αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1 α) εκτοπίζοντας τον μεταγραφικό καταστολέα c-MYC από τον υποκινητή του γονιδίου *CDKN1A*, που κωδικοποιεί τον αναστολέα p21 της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης I (CDK1), β) παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή του *MYC* μετά τη σύνδεση του με τη β-κατενίνη και γ) ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του *MXI1* ενός αναστολέα του c-MYC [33].

Ο τάση-εξαρτώμενος διάυλος ανιόντων 1 (Voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και εξυπηρετεί τη μετακίνηση μεταξύ των μιτοχονδρίων και του κυτταροπλάσματος ιόντων, ATP/ADP, μεταβολιτών, νουκλεοτιδίων και λιπαρών οξέων [34]. Αποτελείται από 19-β πτυχώσεις και μία α-έλικα η οποία αλληλεπιδρά με προ- και αντιαποπτωτικούς παράγοντες της οικογένειας Bcl2 και όχι μόνο [35]. Επιπλέον, ένας αριθμός διαύλων VDAC1 οργανώνονται και σχηματίζουν ένα ολιγομερές σύμπλοκο με έναν υδρόφιλο πόρο διά του οποίου απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c πυροδοτώντας την έναρξη της απόπτωσης. Επίσης, η αλληλεπίδραση της α έλικας με αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως οι HK-I, HK-II και Bcl2 προκαλεί την απομάκρυνση της από το κέντρο του υδρόφιλου πόρου παρεμποδίζοντας τη διέλευση του κυτοχρώματος c [36].

Ο HIF-1 επάγει την έκφραση μίας κολοβής μορφής του VDAC1 (απουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο του) [37], η οποία αλληλεπιδρά με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-XL, HK-I και μορταλίνη (ή GRP75) προάγοντας την κυτταρική επιβίωση [38, 39]. Σε πρόσφατη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Π.Θ., αποδείχθηκε ότι το σύμπλοκο VDAC1-μορταλίνη αλληλεπιδρά με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α (Ser641/643), γεγονός που αποτρέπει τη στρατολόγηση του αποπτωτικού παράγοντα Bax [40].

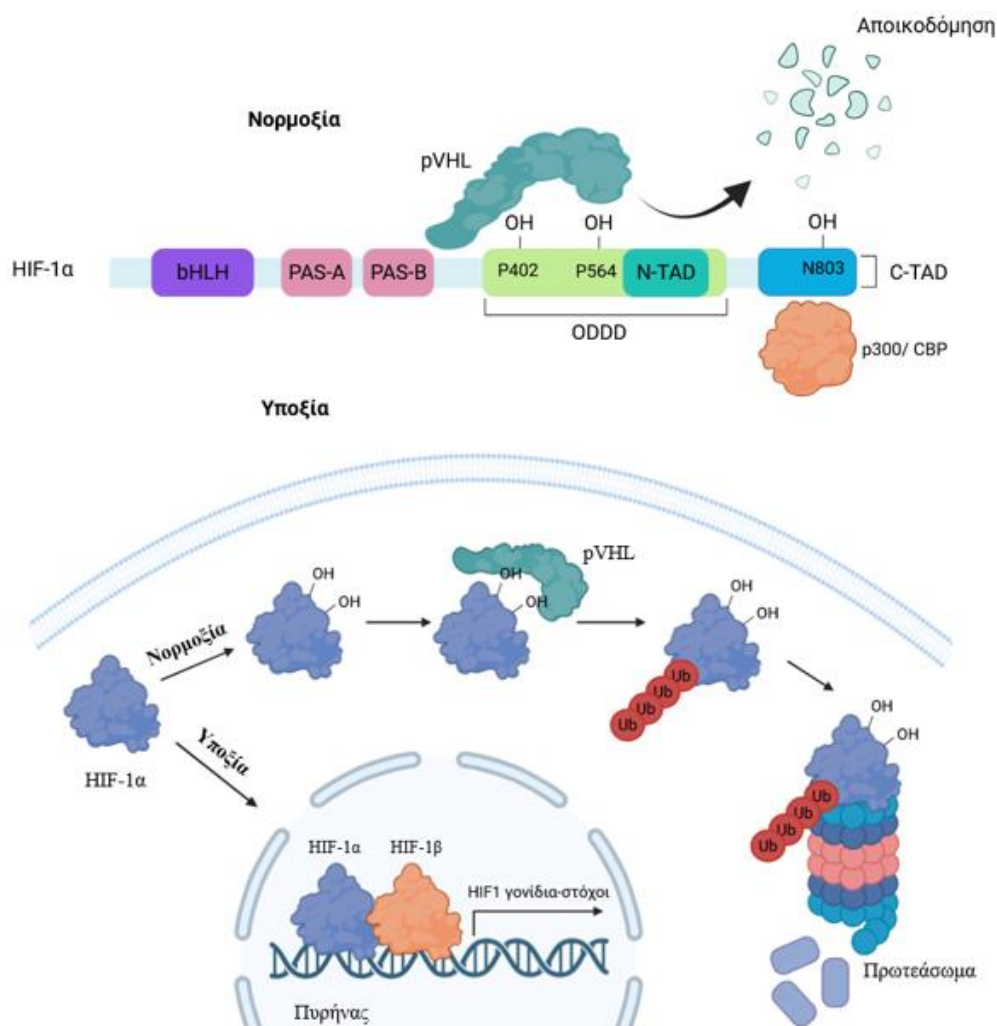
Ο HIF-1 επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων *VEGF*, *ANGPT1*, *ANGPT2* και *TEK* προάγοντας τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Παράλληλα, στρατολογεί κύτταρα του μυελού των οστών (Bone marrow derived cells, BMDCs) στις θέσεις αγγειογένεσης μετά από σύνδεση της χημειοκίνης SDF-1 (Stromal-derived factor-1) με τον υποδοχέα της, CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4) [41]. Αξιίζει να σημειωθεί ότι τα αιμοφόρα αγγεία του όγκου παρουσιάζουν ακανόνιστη μορφολογία και αδυνατούν να συγκρατήσουν το σύνολο του περιεχομένου τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία υποξικών ζωνών σε περιοχές του όγκου που δεν αιματώνονται [42].

1.4. Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

Παρουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων οξυγόνου, ο HIF-1α υπόκειται κατά σειρά σε υδροξυλίωση, πολυουβικουτίνωση και αποικοδόμηση (**Εικόνα 1.4**). Αρχικά, υδροξυλιώνονται τα κατάλοιπα προλίνης (Pro)402 και 564 του HIF-1α από την υδροξυλάση προλίνης 2 (Prolyl-hydroxylase-2, PHD2). Η PHD2 είναι μία διοξυγενάση ($K_m = 230-250 \mu M$), μέλος της οικογένειας PHD (PHD1, PHD2 και PHD3), η οποία χρησιμοποιεί O_2 , Fe^{2+} και ασκορβικό ως συμπαραγόντες για να καταλύσει ταυτόχρονα με την υδροξυλίωση του HIF-1α και την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρικό και CO_2 [43]. Ακολούθως, τα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα Pro402/564 αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη pVHL (Von Hippel-Lindau) μέλους του συμπλόκου μίας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, γεγονός που προάγει την πολυουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα [44]. Επίσης, η υδροξυλάση FIH-1 (Factor inhibiting HIF-1) ($K_m = 90 \mu M$) υδροξυλιώνει τον HIF-1α στο κατάλοιπο Asn803 της επικράτειας C-TAD παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τον συνενεργοποιητή p300/CBP (CREB-binding protein) [45, 46].

Στην υποξία, ο HIF-1α σταθεροποιείται, αφού η PHD2 αναστέλλεται, και εισέρχεται στον πυρήνα όπου σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον HIF-1β (ή ARNT) (**Εικόνα 1.4**). Ακολούθως, τα σύμπλοκα αυτά (HIF-1) συνδέονται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) και στρατολογούν συνενεργοποιητές της μεταγραφής για να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους. Επιπλέον, κατά την υποξία αυξάνονται τα επίπεδα mRNA των PHD2 και PHD3, αλλά όχι της PHD1 [47]. Επίσης, η υποξία διεγείρει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species,

ROS) που οξειδώνουν (α) τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) και (β) τα κατάλοιπα κυστεΐνης του καρβοξυτελικού άκρου της PHD2 με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της [48].



Εικόνα 1.4. Ο οξυγόνο-εξαρτώμενος μηχανισμός ρύθμισης της HIF-1α υπομονάδας: Στη νορμοξία, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης (P)402 και 564 και ακολούθως, αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη pVHL με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα 26S. Επιπλέον, η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης (N)803 αποτρέπει την αλληλεπίδραση του με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300/CBP. Στην υποξία, αντίθετα, ο HIF-1α σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα και ετεροδιμερίζεται με τον HIF-1β για να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. pVHL: protein Von Hippel-Lindau, p300/CBP: p300/ CREB-binding protein. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [2].

1.5. Ανεξάρτητη από οξυγόνο ρύθμιση του *HIF1A* γονιδίου

Μεταγραφή

Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι NF-κB και Stat3 διεγείρουν τη μεταγραφή του *HIF1A*. Τα μέλη της οικογένειας NF-κB (Nuclear factor kappa B) σχηματίζουν ομο- ή ετεροδιμερή σύμπλοκα που κινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, ενώ, βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα μετά τη σύνδεση τους με τον αναστολέα IκB. Χημικοί διαμεσολαβητές (πχ TNFα) και ογκογονίδια ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την αποικοδόμηση του IκB. Επομένως, η απελευθέρωση του NF-κB επιτρέπει την είσοδο του στον πυρήνα με σκοπό την άσκηση του μεταγραφικού του ρόλου [49]. Όσον αφορά τον Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3), η δράση του αναστέλλεται από την κινάση PKR (Protein kinase R) μέσω της TC-PTP (T-cell protein tyrosine phosphatase) [50].

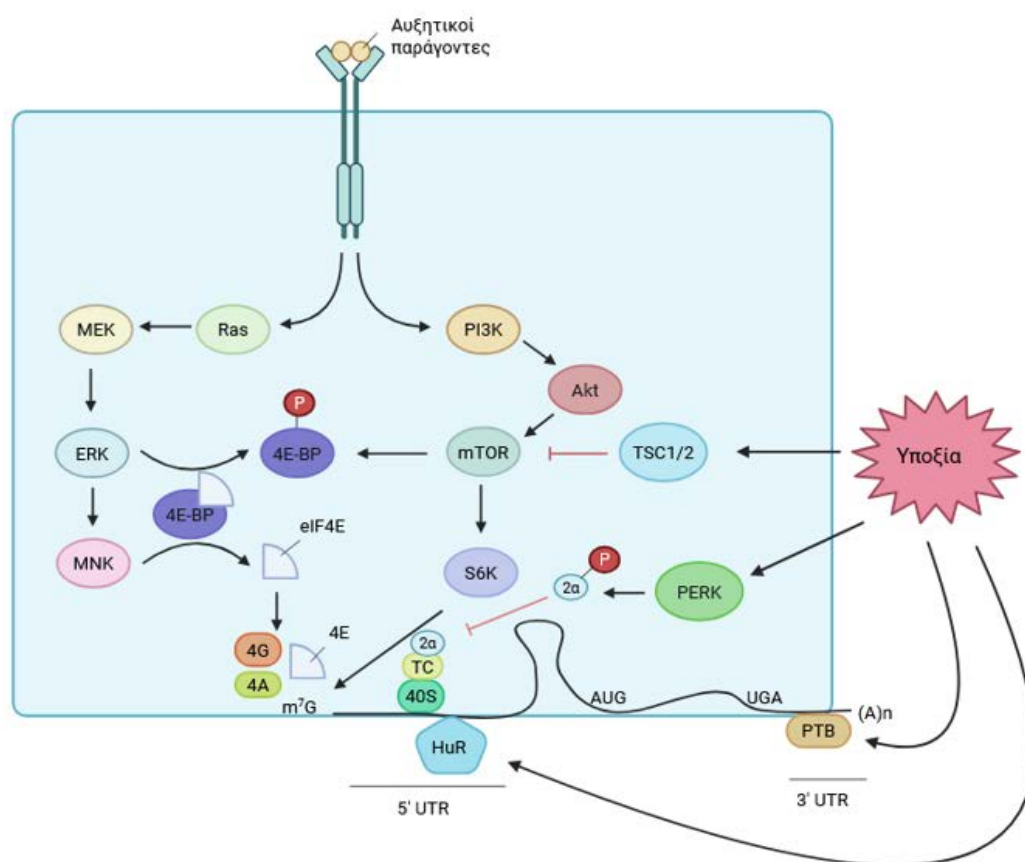
Μετάφραση

Στην υποξία, αναστέλλεται για λόγους εξοικονόμησης ενέργειας η μετάφραση των mRNAs που δεν εξυπηρετούν την προσαρμογή των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες (**Εικόνα 1.5**). Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι μικρότερη του 1%, ενεργοποιείται ταχύτατα η κινάση PERK [PKR-like ER kinase] η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α εμποδίζοντας τη συναρμολόγηση του συμπλόκου eIF2–GTP–met-tRNA στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S). Παρόμοια, σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας, αδρανοποιείται η κινάση mTOR (mammalian target of rapamycin) από τις πρωτεΐνες REDD1 (Regulated in development and damage-response 1) και TSC1/2 (Tuberous sclerosis 1/2) διαταράσσοντας τον σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F (eIF4A–eIF4E–eIF4G) που αναγνωρίζει την 5' καλύπτρα των mRNAs. Επίσης, η υποξία αναστέλλει την επιμήκυνση της μετάφρασης μέσω φωσφορυλίωσης του παράγοντα eEF2 από την κινάση eEF2K η οποία είναι mTOR-εξαρτώμενη [43].

Αντίθετα, η μετάφραση των mRNAs που συμβάλλουν στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία επιτυγχάνεται μέσω (α) σύνδεσης των ριβοσωμάτων σε δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές των mRNAs (Internal ribosome entry sites, IRES) εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής (5' Untranslated region, UTR), (β) αναγνώρισης των 3' και 5' UTR από τις πρωτεΐνες PTB (Polypyrimidine tract-binding protein) και HuR (Human antigen R), αντίστοιχα [36], (γ) αντικατάστασης του συμπλόκου eIF4F από το ομόλογο του eIF4F^H (eIF4A–eIF4E2–eIF4G3) που συνδέεται σε rHREs (reverse Hypoxia Response Elements) και δ) σχηματισμού ενός εναρκτήριου συμπλόκου της

μετάφρασης που αποτελείται από τις HIF-2 α , RBM4 (RNA-binding motif protein 4) και eIF4E2 πρωτεΐνες και συνδέεται σε rHREs [4].

Η μετάφραση των mRNAs των HIF- α ισομορφών στην υποξία αποδόθηκε αρχικά στην παρουσία εσωτερικών θέσεων αναγνώρισης από τα ριβοσώματα (IRES), ωστόσο, αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης μη κωδικοποιητικών RNAs και πρωτεϊνών στις 5' και 3'UTR τους. Επίσης, το *HIF1A* mRNA διαθέτει αλληλουχίες αναγνώρισης από σωματίδια (Signal recognition particles, SRPs) που συνδέονται με το mRNA και το μεταφέρουν σε κατάλληλες πρωτεΐνες-δέσμευσης των σωματιδίων στην επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου για να λάβει χώρα η μετάφραση του [4].



Εικόνα 1.5. Ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του οξυγόνου, τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras-Raf-MEK-ERK και PI3K-Akt αυξάνουν τον ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης παρουσία αυξητικών παραγόντων. Στην υποξία, οι πρωτεΐνες TSC1/2 και PERK αναστέλλουν την έναρξη και επιμήκυνση της μετάφρασης, αντίστοιχα. Ωστόσο, η μετάφραση των mRNAs που εξασφαλίζουν την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των 5' και 3' UTR με τις πρωτεΐνες HuR και PTB, αντίστοιχα. PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, TSC1/2: Tuberous sclerosis 1/2, PERK: PKR-like ER kinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, HuR: Human antigen R, PTB: Polypyrimidine tract-binding protein, UTR: Untranslated region. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [43].

1.6. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1 α

Ο HIF-1α υπόκειται σε πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν τη σταθερότητα του, τον υποκυτταρικό του εντοπισμό και την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Η υδροξυλίωση αναλύθηκε εκτενώς στην ενότητα 1.4, επομένως, παρακάτω θα συζητηθούν κατά σειρά η ουβικιτίνωση, η σουμοϋλίωση, η S-νιτροξυλίωση, η ακετυλίωση και η φωσφορυλίωση.

Ουβικιτίνωση

Δεν έχουν ταυτοποιηθεί τα ακριβή αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης (Lys) του HIF-1α που τροποποιούνται από το σύμπλοκο της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Το εν λόγω σύμπλοκο διαθέτει πέρα από την pVHL τις πρωτεΐνες elongin C, elongin B, cullin-2 και Rbx1. Επιπλέον, η pVHL αναγνωρίζει μέλη της οικογένειας των ενζύμων αποουβικιτίνωσης, την ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση C (Protein kinase C, PKC), υπομονάδες της RNAP II, επομένως, συμμετέχει στη ρύθμιση περισσότερων διεργασιών πέρα από τη σταθερότητα του HIF-1α [43].

Σουμοϋλίωση

Η SUMO είναι μία μικρή πρωτεΐνη (~12 kDa) η οποία υφίσταται σε τρεις ισομορφές, τις SUMO-1, SUMO-2 και SUMO-3. Η πρωτοταγή δομή της SUMO είναι κατά 18% όμοια με αυτήν της ουβικιτίνης, ωστόσο, δεν ισχύει το ίδιο για την τριτοταγή τους δομή όπου η ομοιότητα είναι σημαντική. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σουμοϋλίωση ομοιάζει αρκετά με την ουβικιτίνωση όσον αφορά τον μηχανισμό υλοποίησής τους. Η E3 λιγάση SUMO, RanBP2 καταλύει τη σουμοϋλίωση του HIF-1α στα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης (Lys) 391 και 477 κατά την είσοδο του στον πυρήνα, αφού εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου [58]. Η εν λόγω τροποποίηση προάγει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την pVHL απουσία των υδροξυλιωμένων καταλοίπων προλίνης 402 και 564, και οδηγεί σε ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα [3]. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η σουμοϋλίωση επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών. Λόγου χάρι, η σουμοϋλίωση του APNT στη λυσίνη (Lys)245 αλλάζει τη συγγένεια του για την πρωτεΐνη-ικρίωμα PML (Promyelocytic leukemia protein) αλλά όχι για τον AHR (Aryl hydrocarbon receptor) [54]. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεάση SENP1 (SUMO1/sentrin specific peptidase 1) απομακρύνει τις συζευγμένες με τον HIF-1α ομάδες SUMO-1 διασφαλίζοντας τη σταθερότητα του στην υποξία [43].

S-νιτροξυλίωση

Η κυστεΐνη (Cys)800 του HIF-1α υπόκειται σε S-νιτροζυλίωση αυξάνοντας τη συγγένεια του για τον συν-ενεργοποιητή p300/CBP (CREB binding protein) και κατ'ακολουθία, τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου HIF-1 [61].

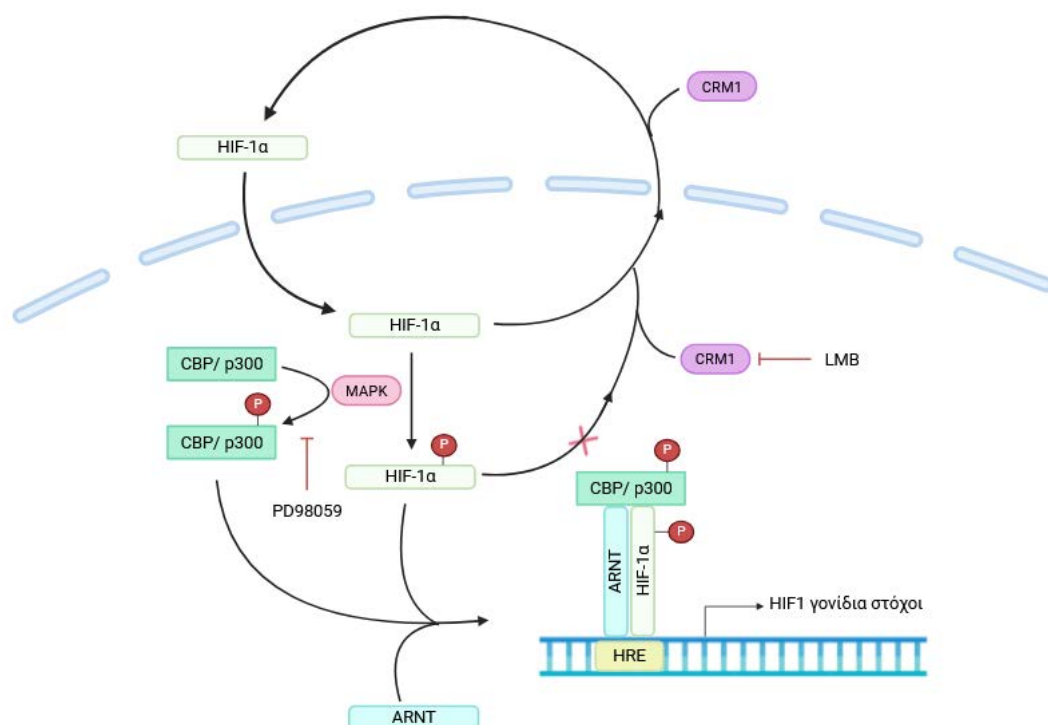
Ακετυλίωση

Η ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (Arrest defective 1) ακετυλιώνει τη λυσίνη (Lys)532 της επικράτειας ODDD του HIF-1α σταθεροποιώντας την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη pVHL της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην υποξία ελαττώνεται η έκφραση της ARD1, αφού ο ακετυλιωμένος HIF-1α που ανιχνεύεται είναι λιγότερος απ'ότι στη νορμοξία παρουσία του αναστολέα MG132 του πρωτεασώματος 26S [58]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον p300/CBP ρυθμίζεται μέσω ακετυλίωσης της λυσίνης (Lys)674 της επικράτειας ID από τον PCAF (p300/CBP-associated factor). Είναι γνωστό ότι η ID φυσιολογικά καταστέλλει τις επικράτειες N- και C-TAD, ωστόσο, η ακετυλίωση της Lys674 προάγει την ενεργοποίηση των TADs και τη στρατολόγηση του p300/CBP. Η τροποποίηση αυτή αντιστρέφεται από την NAD⁺-εξαρτώμενη απακετυλάση SIRT1 (Sirtuin 1) και επιδρά αρνητικά στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 [59].

Φωσφορυλίωση

Οι κινάσες ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) της οικογένειας MAPK (Mitogen-activated protein kinase) φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α επάγοντας τη συσσώρευση του στον πυρήνα (**Εικόνα 1.6**). Συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης (Ser)641 και 643 της επικράτειας ID του HIF-1α καλύπτοντας το πλησιέστερο σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES) [51]. Η εν λόγω μετα-μεταφραστική τροποποίηση παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την εξπορτίνη CRM1 (Chromosome region-maintenance 1) και τη μετακίνηση του στο κυτταρόπλασμα [52]. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του HIF-1α στον πυρήνα συνοδεύεται από την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 αποτέλεσμα, επίσης, της αλληλεπίδρασης του με άλλες πρωτεΐνες της χρωματίνης όπως η μοριακή συνοδός ιστονών NPM1 [53]. Παράλληλα, οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300/CBP ενισχύοντας την αλληλεπίδραση του με τον HIF-1α [54]. Απουσία της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, ο HIF-1α μετακινείται στο κυτταρόπλασμα μέσω της CRM1 και σχηματίζει σύμπλοκα στην εξωτερική μεμβράνη

των μιτοχονδρίων με τη μορταλίνη και τον διάυλο VDAC1 προάγοντας την κυτταρική επιβίωση εμποδίζοντας την παρουσία της Bax στα μιτοχόνδρια [55].



Εικόνα 1.6. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από κινάσες ERK1/2 της οικογένειας των MAPKs επάγει τη συσσώρευση του στον πυρήνα και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAPKs παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με την εξπορτίνη CRM1 και την έξοδο του από τον πυρήνα. Παράλληλα, η φωσφορυλίωση του συνενεργοποιητή της μεταγραφής p300/CBP από τις MAPKs αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου. MAPK: Mitogen-activated protein kinase, CRM1: Chromosome region maintenance 1, ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, p300/CBP: p300/CREB-binding protein, LMB: Leptomycin B. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [51].

Η φωσφορυλίωση του πυρηνικού HIF-1α στη Ser247 της επικράτειας PAS-B από την Ck1δ (Casein kinase 1 delta) παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με τον ARNT [56]. Παράλληλα, η φωσφορυλίωση του μη πυρηνικού HIF-1α διεγείρει τη σύνδεση του με την τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη συμμετρική κατανομή του HIF-1α στους πυρήνες των θυγατρικών κυττάρων κατά την κυτταρική διαίρεση (**Εικόνα 1.7**) [57].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την GSK-3β (Glycogen synthase 3 beta) προάγει την pVHL-ανεξάρτητη ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα [43]. Επίσης, η φωσφορυλίωση του HIF-1α στη Thr796 από μία άγνωστη μέχρι στιγμής κινάση (σε θέσεις φωσφορυλίωσης που

αναγνωρίζονται από την κινάση CK2) αυξάνει τη συγγένεια του για τον p300/CBP και κατ'ακολουθία, τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου [47].

1.7. Αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

Ο HIF-1α αλληλεπιδρά άμεσα με ένα πλήθος παραγόντων που ρυθμίζουν τη α) μεταγραφική του δραστηριότητα, δηλαδή, την ικανότητα του να συνδέεται επιλεκτικά σε HREs και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του, β) τον υποκυτταρικό του εντοπισμό και γ) τη σταθερότητα του. Οι παράγοντες αυτοί συνιστούν μόρια της μεταγραφικής μηχανής (π.χ. μεσολαβητής, TRIM28, SEC), ένζυμα που τροποποιούν επιγενετικά τη χρωματίνη όπως ακετυλοτρανσφεράσες (π.χ. CBP/p300 και Tip60), μεθυλάσες και απομεθυλάσες, μόρια σχετιζόμενα με την απόπτωση (π.χ. μορταλίνη, p53), εξπορτίνες (π.χ. CRM1), πρωτεΐνες-μοριακοί συνοδοί (π.χ. HSP90, NPM1) και ούτω καθεξής [66].

Μορταλίνη

Η μορταλίνη ή GRP75 (Glucose regulated protein 75), μέλος της οικογένειας των HSP70, εξασφαλίζει την κυτταρική επιβίωση παρεμποδίζοντας τη στρατολόγηση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και κατ'ακολουθία, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Αναλυτικότερα, η μορταλίνη αλληλεπιδρά με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α στις θέσεις Ser641/643 και με τον διάυλο ανιόντων VDAC1 (**Εικόνα 1.7**) [40]. Επιπλέον, η μορταλίνη αλληλεπιδρά με τον άγριου τύπου p53 στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας τον μεταγραφικό του ρόλο και αποτρέποντας την προαγωγή της απόπτωσης [63].

p53

Ο p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε απόπτωση (π.χ. Bax) και αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, σε συνθήκες μέτριας υποξίας, ο p53 οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω της E3 λιγάσης της ουβικουτίνης-HDM2 (Human double minute 2) [64]. Αντίθετα, σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας, ο p53 προστατεύει τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α από την HDM2-διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση [65].

OS-9-SSAT2

Οι πρωτεΐνες OS-9 (Osteosarcoma-9) και SSAT2 (Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 2) ενισχύουν την pVHL-διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση του HIF-

1α στη νορμοξία. Συγκεκριμένα, η OS-9 σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την PHD2 και η SSAT2 ενισχύει την αλληλεπίδραση του με την E3 λιγάση της ουβικιτίνης προάγοντας την υδροξυλίωση, ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα [43].

HSP90-RACK1

Η σταθερότητα του HIF-1α ρυθμίζεται, επίσης, μέσω των πρωτεϊνών RACK1 (Receptor for activated C kinase 1) και HSP90 (Heat shock protein 90). Ο RACK1 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και στρατολογεί συστατικά του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης οδηγώντας σε ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα με τρόπο παρόμοιο με την οδό pVHL. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση των RACK1-HIF-1α σταθεροποιείται με τη βοήθεια της ακετυλοτρανσφεράσης SSAT1 (Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1) [43]. Αντίθετα, η πρωτεΐνη-μοριακός συνοδός HSP90 ανταγωνίζεται τον RACK1 για την πρόσδεση του στην επικράτεια PAS του HIF-1α επιτρέποντας τον σχηματισμό του μεταγραφικά ενεργού συμπλόκου HIF-1α-HIF-1β [3].

Μεσολαβητής (Mediator)-Tip60-TRIM28

Ο μεσολαβητής είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης α) διαμεσολαβώντας την επικοινωνία μεταξύ των ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος (υποκινητές-ενισχυτές) και β) διεγείροντας τη μετάβαση από την έναρξη στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Ο μεσολαβητής είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή της πλειοψηφίας των γονιδίων-στόχων του HIF-1. Αναλυτικότερα, η C-TAD του HIF-1α αλληλεπιδρά με την υπομονάδα CDK8 (Cyclin-dependent kinase 8) του μεσολαβητή και προάγει την επιμήκυνση της μεταγραφής προσελκύοντας το σύμπλοκο SEC (Super elongation complex), που φωσφορυλιώνει την καρβοξυτελική επικράτεια (CTD) της RNAPII μέσω της CDK9.

Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων-στόχων του HIF-1 εξαρτώνται από το σύμπλοκο Tip60 (Tat-interacting protein 60), που ακετυλιώνει τις ιστόνες H3-H4 και διεγείρει την φωσφορυλίωση της CTD της RNAPII με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής. Επίσης, ο HIF-1 στρατολογεί τον παράγοντα TRIM28 (Tripartite motif-containing protein 28) και την κινάση που τον φωσφορυλιώνει στη Ser824, DNA-PK. Ο φωσφορυλιωμένος TRIM28 αλληλεπιδρά με την CDK9 του SEC προάγοντας την επιμήκυνση της μεταγραφής [66].

p300/CBP

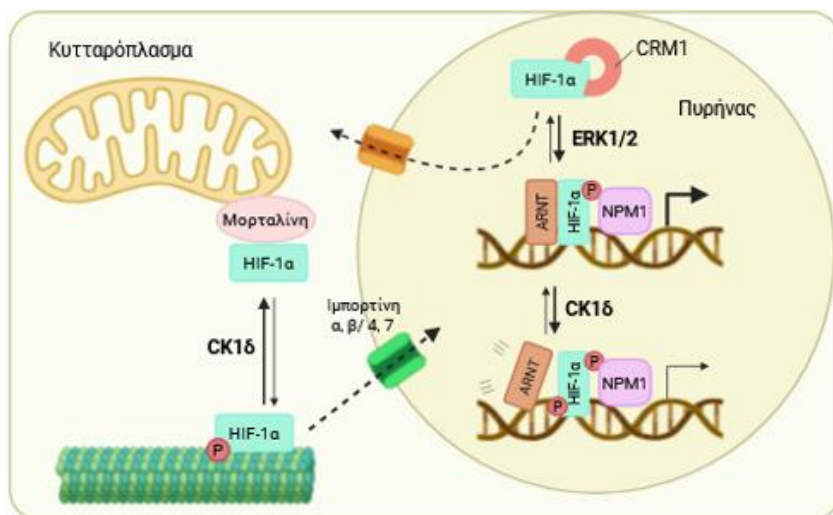
Η ακετυλοτρανσφεράση p300/CBP (CREB binding protein) ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης ακετυλιώνοντας τις ιστόνες και άλλες πρωτεΐνες της μεταγραφικής μηχανής. Επιπλέον, λειτουργεί ως ικρίωμα φέρνοντας σε επικοινωνία διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε συνθήκες υποξίας, ο p300/CBP μέσω των επικρατειών του CH1 και CH3 αλληλεπιδρά με τις C- και N-TAD του HIF-1α. Η αλληλεπίδραση των C-TAD/CH1 είναι ισχυρότερη της αντίστοιχης των N-TAD/CH3, ωστόσο, και οι δύο είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του HIF-1 [3, 66].

CRM1

Η εξπορτίνη CRM1 (Chromosome region maintenance 1) αλληλεπιδρά με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α επιτρέποντας την μετακίνησή του στο κυτταρόπλασμα. Η αλληλεπίδραση των CRM1/HIF-1α διαμεσολαβείται από ένα σήμα εξόδου (NES) πλούσιο σε υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, το οποίο «καλύπτεται» όταν τα γειτονικά κατάλοιπα Ser641/643 φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 (MAPKs) [52]. Η σηματοδότηση των MAPKs ενεργοποιείται από την υποξία και μετά από διέγερση με αυξητικούς παράγοντες στη νορμοξία [43]. Επιπλέον, ο αναστολέας των MAPKs-PD98059 ελαττώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 ακόμη και παρουσία μεταλλάξεων (S→E ή I→A, NES) που διασφαλίζουν τη συσσώρευση του στον πυρήνα [51]. Επομένως, η φωσφορυλίωση του HIF-1 από τις MAPKs προδιαγράφει, πέρα από τον υποκυτταρικό του εντοπισμό, τις αλληλεπιδράσεις του με άλλα πρωτεϊνικά μόρια.

NPM1

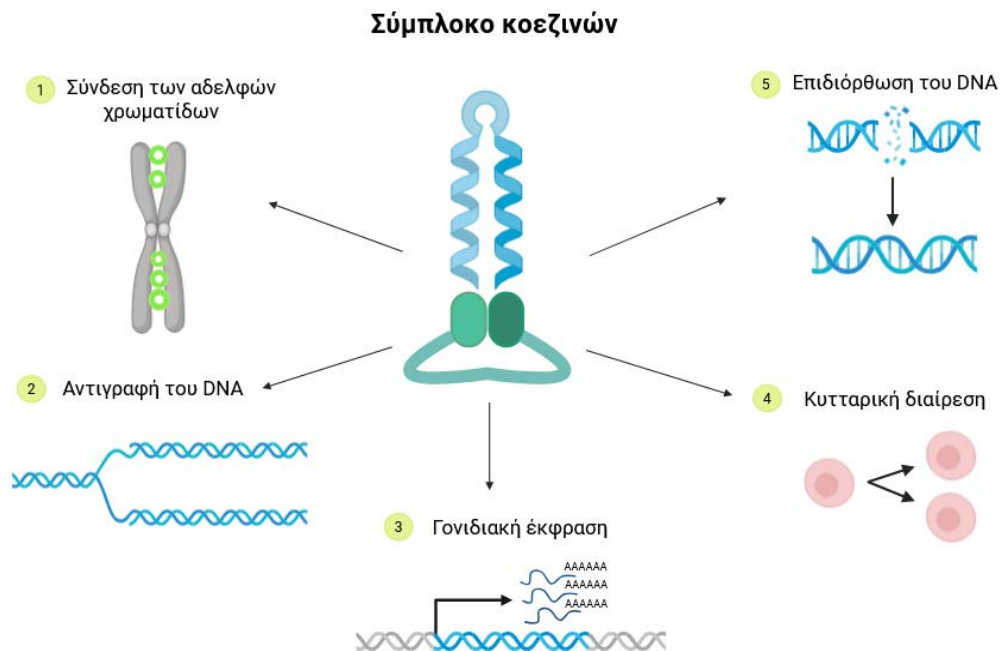
Η NPM1 (Nucleophosmin 1), ένας μοριακός συνοδός ιστονών, συμβάλλει στην αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (**Εικόνα 1.7**). Αυτό το επιτυγχάνει α) σταθεροποιώντας την πρόσδεση του HIF-1 στα HREs, β) αλληλεπιδρώντας με τη μεταγραφικά ενεργή RNAPII και γ) αποσυναρμολογώντας τα νουκλεοσώματα στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής [53].



Εικόνα 1.7. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-1α καθορίζει τον υποκυτταρικό του εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις του με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Ο φωσφορυλιωμένος από τις κινάσες ERK1/2 HIF-1α εγκλωβίζεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και αλληλεπιδρά με την NPM1, η οποία αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου. Αντίστοιχα, ο μη φωσφορυλιωμένος HIF-1α μετακινείται στο κυτταρόπλασμα όπου δημιουργεί σύμπλοκα με αντιαποπτωτική δράση με πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (πχ μορταλίνη). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ καταργεί τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT, καθιστά ασθενέστερες τις αλληλεπιδράσεις του με πρωτεΐνες του αντιαποπτωτικού συμπλόκου και αυξάνει τη συγγένεια του για την τουμποουλίνη των μικροσωληνίσκων. ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2, ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, NPM1: Nucleophosmin 1, CK1δ: Casein kinase 1 delta, CRM1: Chromosome region maintenance 1. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [57].

1.8. Ο ρόλος του συμπλόκου των κοεζινών

Κατά κύριο λόγο, το σύμπλοκο των κοεζινών συνδέει μεταξύ τους τις αδελφές χρωματίδες επιτρέποντας τον σωστό διαχωρισμό τους κατά την ανάφαση της μίτωσης. Επιπλέον, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (α) στην κυτταρική διαίρεση, (β) στην αντιγραφή του DNA, (γ) στην επιδιόρθωση των θραυσμάτων του DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό και (δ) στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης (**Εικόνα 1.8**) [66].

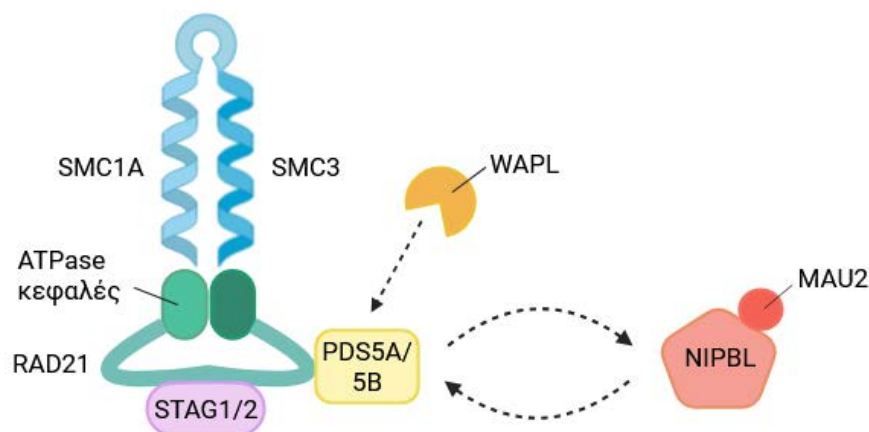


Εικόνα 1.8. Το σύμπλοκο των κοεζινών ελέγχει τις ακόλουθες βιολογικές διεργασίες: (i) σύνδεση των αδελφών χρωματίδων μεταξύ τους, (ii) αντιγραφή του DNA, (iii) επιδιόρθωση των θραυσμάτων του DNA, (iv) κυτταρική διαίρεση και (v) ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [67].

1.9. Σύνθεση υπομονάδων του συμπλόκου των κοεζινών

Το σύμπλοκο των κοεζινών αποτελείται από έναν βασικό πυρήνα (SMC1A, SMC3, RAD21) και κάποιες βοηθητικές υπομονάδες (STAG1/2, PSD5A/5B) (**Εικόνα 1.9**) [66]. Οι υπομονάδες SMC (Structural maintenance of chromosomes) αποτελούνται από δύο αντιπαράλληλες α έλικες, μία αρθρωτή επικράτεια και μία επικράτεια με δραστικότητα ATPάσης. Οι επικράτειες ATPάσης των SMC1A-SMC3 συνδέονται μεταξύ τους μέσω της RAD21. Όσον αφορά τις αμοιβαία αποκλειόμενες βοηθητικές υπομονάδες STAG1/2 (Stromal antigen 1/2) είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου των κοεζινών με το DNA. Παράλληλα, οι αμοιβαία αποκλειόμενες υπομονάδες PDS5A/5B (Precocious Dissociation of Sisters protein 5) συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των θηλιών του DNA και στην απελευθέρωση του συμπλόκου από τη χρωματίνη. Άλλοι ρυθμιστές του συμπλόκου των κοεζινών που συνδέονται με αυτό είναι (α) οι πρωτεΐνες NIPBL (Nipped-B-like protein) και MAU2 που επιτρέπουν τη φόρτωση του στο DNA και (β) η πρωτεάση WAPL που συνεργάζεται με τις PDS5A/5B για την απελευθέρωση του από αυτό. Άρα, οι αμοιβαία αποκλειόμενες υπομονάδες PDS5A/5B ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες NIPBL και MAU2 για σύνδεση τους με το σύμπλοκο των κοεζινών [67]. Επιπλέον, η NIPBL διεγείρει την υδρόλυση του ATP με

αποτέλεσμα την οργάνωση του DNA σε θηλιές. Απουσία της NIPBL ελαττώνεται ο αριθμός των θηλιών του DNA, ενώ, απουσία της πρωτεάσης WAPL (Wings apart-like protein) ο αριθμός και το μέγεθος των θηλιών αυξάνονται οδηγώντας σε συμπύκνωση της χρωματίνης [68].



Εικόνα 1.9. Οι υπομονάδες και οι πρωτεΐνες-ρυθμιστές του συμπλόκου των κοεζινών. Ο πυρήνας του συμπλόκου αποτελείται από τις υπομονάδες SMC1A, SMC3 και RAD21. Οι αμοιβαία αποκλειόμενες υπομονάδες STAG1/2 και PDS5A/5B επιτρέπουν, αντίστοιχα, τη σύνδεση και την απελευθέρωση του συμπλόκου από το DNA. Οι πρωτεΐνες NIPBL και MAU2 εξυπηρετούν τη φόρτωση του συμπλόκου των κοεζινών στο DNA, ενώ, η πρωτεάση WAPL συνεργάζεται με τις PDS5A/5B για να επιτευχθεί το αντίθετο. SMC(1A, 3): Structural maintenance of chromosomes (1A, 3), STAG1/2: Stromal antigen 1/2, PDS5A/5B: Precocious Dissociation of Sisters protein 5A/5B, NIPBL-MAU2: Nipped-B-like protein-MAU2, WAPL: Wings apart-like protein. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com προσαρμοσμένη από την πηγή [67].

1.10. Ο μηχανισμός δημιουργίας DNA θηλιών από το σύμπλοκο των κοεζινών.

Το σύμπλοκο των κοεζινών προσδένεται και μετακινείται κατά μήκος του DNA μέχρις ότου συναντήσει ένα πρωτεϊνικό μόριο CTCF συνδεδεμένο με τη συναινετική αλληλουχία CCCTC. Επιπλέον, οι αμοιβαία αποκλειόμενες υπομονάδες STAG1/2 του συμπλόκου των κοεζινών αλληλεπιδρούν με τα μόρια CTCF [68]. Συνήθως, οι θηλιές που δημιουργούνται στο DNA φέρνουν πλησίον δύο απομακρυσμένες περιοχές του γονιδιώματος όπου εντοπίζονται συνδεδεμένα μόρια CTCF και ο προσανατολισμός τους καθορίζει το εάν θα σταματήσει ή θα συνεχίσει η εξώθηση του DNA διαμέσου του δακτυλίου του συμπλόκου [69]. Όταν το DNA είναι υπερελικωμένο καθίσταται δυσχερής η δημιουργία νέων ή η επιμήκυνση των ήδη υπαρχόντων θηλιών, αντίθετα, όταν η οργάνωση του DNA είναι χαλαρή τα σωστά προσανατολισμένα μόρια CTCF αδυνατούν να σταματήσουν την επιμήκυνση των θηλιών. Επιπλέον, τα υβριδικά RNA-

DNA σύμπλοκα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής παρεμποδίζουν την επιμήκυνση των θηλιών του DNA. Επίσης, το σύμπλοκο των κοεζινών στρατολογεί την RNA πολυμεράση II (RNAPII) στους υποκινητές των γονιδίων που πρόκειται να μεταγραφούν και διεγείρει την απελευθέρωση της από την κατάσταση της παύσης. Υπό διερεύνηση βρίσκεται το πώς σταθεροποιείται το σύμπλοκο των κοεζινών απουσία των μορίων CTCF σε θηλιές οριοθετούνται από ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος όπως υποκινητές και ενισχυτές [67].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο HIF-1α ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά από τις κινάσες πρωτεϊνών ERK1/2 της οικογένειας MAPK και ότι η φωσφορυλίωση αυτή επηρεάζει την πυρηνική του συσσώρευση και τη μεταγραφική του ενεργότητα. Αποτελέσματα από πρόσφατα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και φασματοσκοπίας μάζας (Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous proteins, RIME) έδειξαν ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την υπομονάδα SMC1A του συμπλόκου των κοεζινών. Σκοπός της διπλωματικής μου, αποτέλεσε η διερεύνηση και κατανόηση του ρόλου της αλληλεπίδρασης των HIF-1α-SMC1A για την απόκριση των κυττάρων στην υποξία και οι επιμέρους στόχοι για την επίτευξη αυτού του σκοπού ήταν οι ακόλουθοι:

1. Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *SMC1A* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια pGEX-4T-1.
2. Υπερέκφραση σε βακτήρια και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A με χρωματογραφία αγγιστείας.
3. Δοκιμές αλληλεπίδρασης της GST-SMC1A με τα θραύσματα 1-347 και 348-826 του HIF-1α *in vitro*.
4. Ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α κυττάρων Huh7 ή των WT, IASA και SE μορφών του GFP-HIF-1α σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων Hela.
5. Μελέτη του συνεντοπισμού της πρωτεΐνης SMC1A με τις διάφορες μορφές του GFP-HIF1α με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.
6. Μέτρηση των επιπέδων mRNA δύο γονιδίων-στόχων του HIF-1 (*LIPIN1*, *PGK1*) μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της SMC1A σε κύτταρα Huh7 σε νορμοξία και υποξία (1% O₂).
7. Ανοσοαποτύπωση της λιπίνης-1 μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της SMC1A σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα Hela που εκφράζουν στην υποξία την GFP και τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* TOP10 και BL21(DE3)-RIL είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ο γονότυπος του στελέχους TOP10 είναι ο εξής: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrrR) endA1 λ⁻. Επιπλέον, φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και είναι δεκτικό στον μετασχηματισμό με εξωγενές DNA. Αντίστοιχα, ο γονότυπος του στελέχους BL21(DE3)-RIL είναι ο εξής: F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια διότι διαθέτει πρόσθετα γονίδια που κωδικοποιούν tRNAs συμπληρωματικά για κωδικόνια που απαντώνται συχνά στον άνθρωπο και κωδικοποιούν τα αμινοξέα αργινίνη (Arg, R), ισολευκίνη (Ile, I) και λευκίνη (Leu, L) σε σχέση με άλλα βακτηριακά στελέχη.

3.1.2. Κυτταρικές σειρές

Τα πειράματα σε καρκινικές σειρές ανθρώπου πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα Huh7 και σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα HeLa που εκφράζουν στην υποξία την πρωτεΐνη GFP και τις WT, IASA (ILI(637-639→A και S641→A) και SE (S641→E) μορφές του GFP-HIF-1α, ενώ, δεν εκφράζουν τον ενδογενή HIF-1α (Hela *HIF1A*^{-/-}). Τα κύτταρα Huh7 και HeLa είναι ανθρώπινης προελεύσεως καρκινικά κύτταρα του ήπατος και του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας.

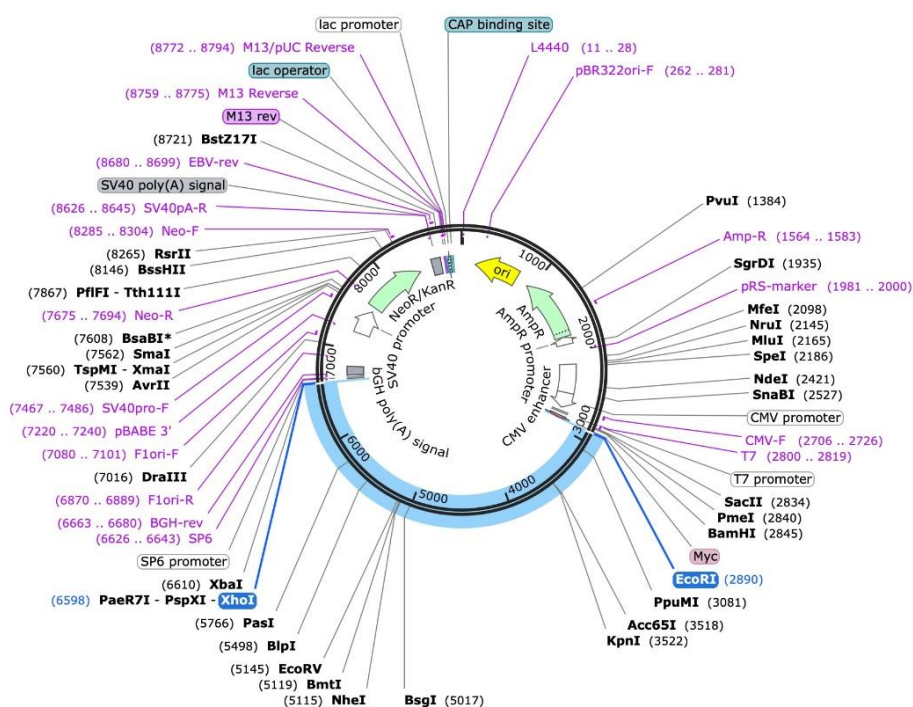
3.1.3. Μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες είναι τα ακόλουθα:

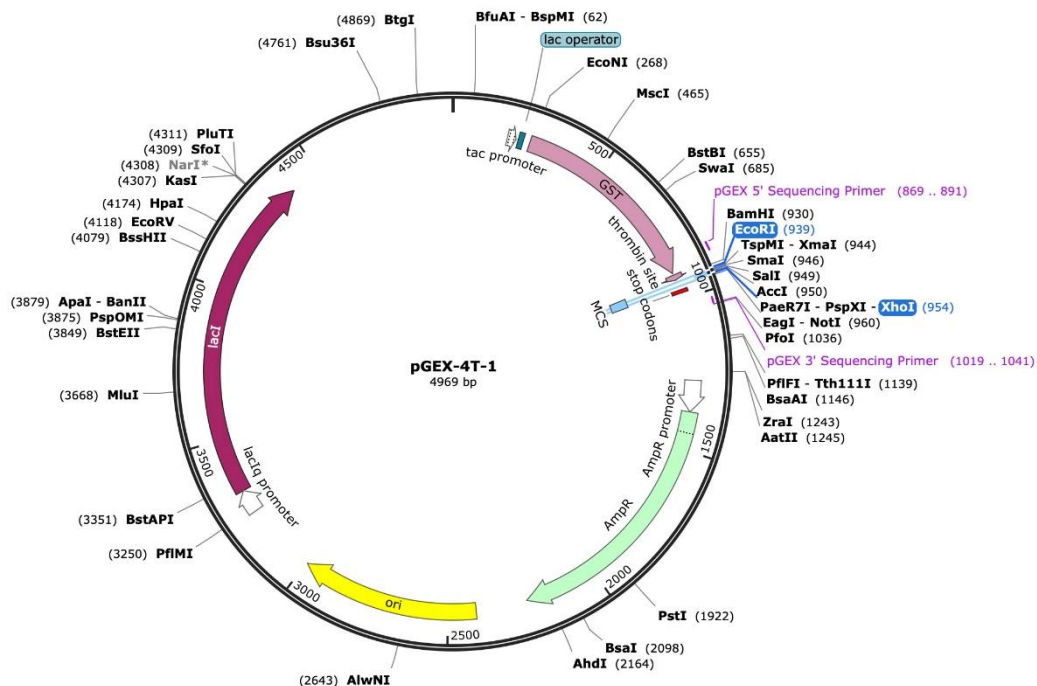
- ❖ Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (Biosera)
- ❖ Ορός βόειου εμβρύου (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco)
- ❖ 2,5 % w/v διάλυμα θρυψίνης (Biosera)
- ❖ Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη (10.000 U/ml) (Biowest), στρεπτομυκίνη (10.000 µg/ml) (Biowest) και G-418 (0,25 mg/ml) (Biosera)

3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν το πλασμίδιο pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt (Addgene) και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 (Amersham). Το πλασμίδιο pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt έχει μέγεθος 9100 bp και φέρει κλωνοποιημένο το cDNA του γονιδίου *SMC1A* (3700 bp) οριοθετημένο από τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRI και XhoI στα 5' και 3' άκρα του, αντίστοιχα. Ανοδικά του πλαισίου ανάγνωσης του cDNA βρίσκεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία *Myc* με αποτέλεσμα η παραγόμενη πρωτεΐνη να είναι χημική. Επιπλέον, το πλασμίδιο διαθέτει τον ιικό υποκινητή SV40 και φέρει δύο γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά νεομυκίνη και αμπικιλίνη, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.1.1**). Όσον αφορά τον φορέα pGEX-4T-1 έχει μέγεθος 4969 bp, διαθέτει τον υβριδικό υποκινητή tac και φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Επίσης, τα γονίδια που κλωνοποιούνται στην περιοχή του πολυσυνδέτη (MCS, Multiple Cloning Site) του πλασμιδιακού φορέα εντοπίζονται καθοδικά του cDNA του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase, GST), και βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή και του χειριστή του οπερονίου της λακτόζης (**Εικόνα 3.1.2**).



Εικόνα 3.1.1. Σχηματικά αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A* wt. (Σχεδιάστηκε στο πρόγραμμα SnapGene: <https://www.snapgene.com> με βάση την αλληλουχία που είναι διαθέσιμη στην Addgene: <https://www.addgene.org>)



Εικόνα 3.1.2. Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1. (Σχεδιάστηκε στο πρόγραμμα SnapGene: <https://www.snapgene.com>)

3.1.5. Αντιδραστήρια, αντισώματα και ένζυμα

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι των εταιρειών AppliChem, Bioline, Biosera, Gibco και Sigma Aldrich. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται σε παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.2.2.5.ΣΤ**) και τα ένζυμα είναι της εταιρείας New England Biolabs® Inc.

3.1.6. Κιτ

Καταγράφονται τα κιτ που χρησιμοποιήθηκαν:

1. «Nucleospin® Gel and PCR clean-up» για τον καθαρισμό DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Macherey-Nagel).
2. «Nucleospin™ Plasmid DNA» για την απομόνωση DNA από υγρές βακτηριακές καλλιέργειες (Macherey-Nagel).
3. «JetPRIME®» για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με νουκλειικά οξέα (Polyplus-transfection®).
4. «NucleoZOL» για την απομόνωση RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα (Macherey-Nagel).

3.1.7. Εκκινητές

Πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) για τα γονίδια *LPINI*, *PGKI* και *ACTIN*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτόν τον σκοπό είναι οι ακόλουθοι:

Πίνακας 3.1.7. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-qPCR.

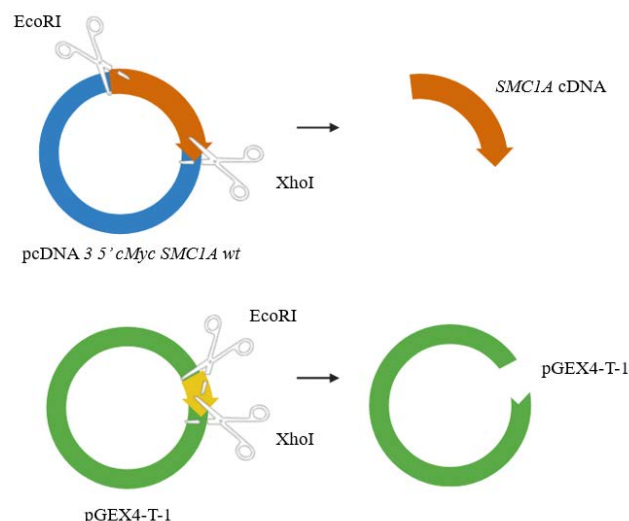
Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών
<i>hLPINI</i> +141 F'	5'-TTTCCACGTCCGCTTTGGG-3'
<i>hLPINI</i> +314 R'	5'-GTGGCCAGGTGCATAGGG-3'
<i>PGKI</i> F'	5' -CTGTGGCTTCTGGCATACT-3'
<i>PGKI</i> R'	5'-CGAGTGACAGCCTCAGTATA-3'
<i>ACTIN</i> F'	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
<i>ACTIN</i> R'	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Μέθοδοι με τη χρήση βακτηριακών κυττάρων

3.2.1.1. Πέψη του πλασμιδίου *pcDNA3-5'cMyc-SMCI_{Aw}t* και του πλασμιδιακού φορέα *pGEX-4T-1* με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Το cDNA του γονιδίου *SMCIA* υπήρχε ήδη κλωνοποιημένο στο πλασμίδιο *pcDNA3-5'cMyc-SMCI_{Aw}t*. Προκειμένου να επιτευχθεί η κλωνοποίηση του στον βακτηριακό πλασμιδιακό φορέα *pGEX-4T-1*, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου *pcDNA3-5'cMyc-SMCI_{Aw}t* και του *pGEX-4T-1* με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* και *XhoI* (Εικόνα 3.2.1.1).



Εικόνα 3.2.1.1. Σχηματική αναπαράσταση της πέψης του πλασμιδίου pcDNA3-5'cMyc-SMCLAwt και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Υλικά

- ❖ 2000 U/ml EcoRI και XhoI (New England Biolabs® Inc.)
- ❖ 10X ρυθμιστικό διάλυμα RCutSmart™ (New England Biolabs® Inc.)
- ❖ H₂O
- ❖ 0,0346 µg/µl pcDNA3-5'cMyc-SMCLAwt
- ❖ 0,0361 µg/µl pGEX-4T-1
- ❖ 500 U/ml φωσφατάση CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) (New England Biolabs® Inc.)
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.1)

1. Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pcDNA3-5'cMyc-SMCLAwt και του φορέα pGEX-4T-1 με 2 U από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI.

Πίνακας 3.2.1.1. Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου pcDNA3-5'cMyc-SMCI_{Aw}t και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1.

Αντιδραστήρια	pcDNA3-5'cMyc-SMCI _{Aw} t	pGEX-4T-1
DNA	20 μl	10 μl
EcoRI	1 μl	1 μl
XhoI	1 μl	1 μl
10X R _{Cut} Smart buffer	5 μ	5 μl
H ₂ O	23 μl	33 μl

2. Επώαση στους 37°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.
3. Προσθήκη 1 μl CIP στον φορέα pGEX-4T-1 μετά την πάροδο των πρώτων 30 λεπτών στους 37°C, για να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του.
4. Απενεργοποίηση όλων των ενζύμων με αύξηση της θερμοκρασίας στους 65°C για 15 λεπτά.

3.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των μακρομορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, η οποία είναι εύκολη στην εφαρμογή, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διακρίνεται σε τρία στάδια: α) παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, β) τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος και διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γ) παρατήρηση-φωτογράφιση του πηκτώματος. Το πήκτωμα αγαρόζης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που διαχωρίζει τα μακρομόρια με βάση το μέγεθος, το φορτίο και άλλες φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Κατά την ηλεκτροφόρηση DNA, τα επιμέρους μόρια κινούνται προς την κάθοδο του ηλεκτρικού πεδίου λόγω του αρνητικού τους φορτίου (παρουσία φωσφορικών ομάδων) και η απόσταση που διανύουν είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Επιπλέον, τα μόρια DNA διατάσσονται υπό τη μορφή ζωνών στο πήκτωμα και η ανίχνευση τους επιτυγχάνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωσης που παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και φθορίζει όταν εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία (302-366 nm). Τέλος, ο προσδιορισμός του μεγέθους τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακών βαρών.

Υλικά

- ❖ Αγαρόζη
- ❖ 1X ρυθμιστικό διάλυμα TAE

Πίνακας 3.2.1.2.A) Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
40 mM Tris, pH 8.00
0,1142% v/v Οξικό οξύ
1 mM EDTA

- ❖ H₂O
- ❖ 10 mg/ ml βρωμιούχο αιθίδιο
- ❖ 6X διάλυμα φόρτωσης (New England Biolabs®inc.)

Πίνακας 3.2.1.2.B) Σύσταση διαλύματος φόρτωσης συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
2,5% Ficoll-400
10 mM EDTA
3,3 mM Tris-Cl, pH 8.00
0,08% SDS
0,02% Χρωστική 1
0,001% Χρωστική 2

- ❖ 0,1 µg/µl μάρτυρας μοριακών βαρών (Bioline)
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Κωνική φιάλη
- ❖ Ογκομετρικός κύλινδρος
- ❖ Φούρνος μικροκυμάτων
- ❖ Εκμαγείο
- ❖ Μήτρα
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- ❖ Τροφοδοτικό
- ❖ Τράπεζα υπεριώδους φωτός

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.2)

A) Προετοιμασία δειγμάτων

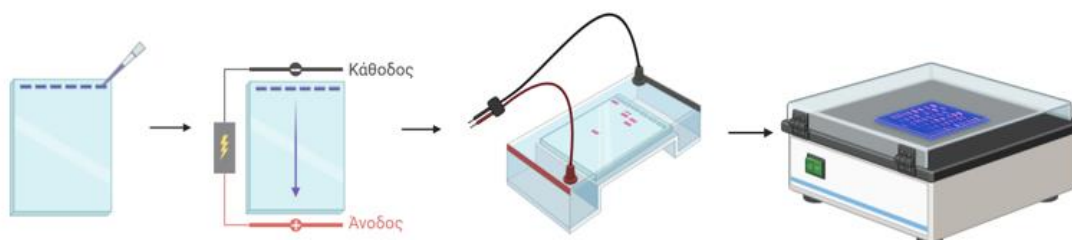
1. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα προς ανάλυση ώστε η τελική του συγκέντρωση του να ισούται με 1x.
2. Ανάμιξη με αναρρόφηση και εκρόφηση του διαλύματος με τη βοήθεια πιπέτας.

B) Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

1. Προσθήκη 0,6 gr αγαρόζης σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE.
2. Θέρμανση στον φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου επιτευχθεί η διαλυτοποίηση της αγαρόζης και το διάλυμα γίνει διαυγές.
3. Ακολούθως, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 12 μl βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση.
5. Απόχυση του διαλύματος σε κατάλληλο εκμαγείο και ενσωμάτωση της μήτρας για τη δημιουργία των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων στο πήκτωμα. Απομάκρυνση των φυσαλίδων με τη βοήθεια ενός ρύγχους πιπέτας.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου η ρευστή αγαρόζη πήξει.

Γ) Ηλεκτροφόρηση

1. Αφαίρεση της μήτρας και μεταφορά του πηκτώματος αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Πλήρωση της δεξαμενής με TAE.
3. Εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος.
4. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης σταθερής έντασης (I) 50 mA.
5. Παρατήρηση των διαχωρισμένων ζωνών των μορίων DNA στην τράπεζα υπεριώδους φωτός και προσδιορισμός του μεγέθους τους με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακών βαρών.



Εικόνα 3.2.1.2. Ηλεκτροφόρηση του DNA σε 1% w/v πηκτώματος αγαρόζης και ανίχνευση των διαχωρισμένων ζωνών παρουσία ακτινοβολίας UV. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

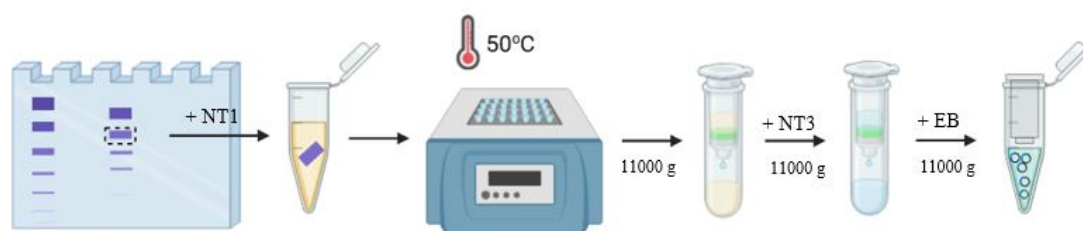
3.2.1.3. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Υλικά

- ❖ Νυστέρι
- ❖ «Nucleospin® Gel and PCR clean-up» κιτ (Macherey-Nagel)
- ❖ Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.3)

1. Εξαγωγή της επιθυμητής ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης με νυστέρι και υπολογισμός του βάρους της.
2. Προσθήκη του διαλύματος NT1 σύμφωνα με την υπόδειξη ότι σε 100 mg πηκτώματος αγαρόζης (< 2% w/v) προστίθενται 200 µl από το NT1.
3. Θέρμανση στους 50°C μέχρις ότου το πήκτωμα διαλυτοποιηθεί.
4. Ακολούθως, μεταφορά του διαλύματος στη στήλη καθαρισμού.
5. Φυγοκέντρωση σε 11000 g για 30 δευτερόλεπτα.
6. Απόρριψη του διερχομένου κλάσματος (flowthrough) και προσθήκη 700 µl από το διάλυμα NT3, το οποίο περιέχει αιθανόλη.
7. Φυγοκέντρωση σε 11000 g για 30 δευτερόλεπτα.
8. Απόρριψη του διερχομένου κλάσματος και φυγοκέντρωση σε 11000 g για 30 δευτερόλεπτα ώστε να στεγνώσει η στήλη.
9. Προσθήκη 25 µl από το διάλυμα έκλουσης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
10. Φυγοκέντρωση σε 11000 g για 1 λεπτό και συλλογή του εκλούσματος.



Εικόνα 3.2.1.3. Παρουσίαση της πορείας απομόνωσης και καθαρισμού DNA από πήκτωμα αγαρόζης. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.1.4. Πραγματοποίηση αντίδρασης λιγάσης για τη σύνδεση του *SMC1A* cDNA με τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1.

Υλικά

- ❖ 0,0346 µg/µl *SMC1A* cDNA
- ❖ 0,0361 µg/µl pGEX-4T-1
- ❖ 400000 U/ml T4 DNA λιγάση (New England Biolabs® inc.)
- ❖ 10X ρυθμιστικό διάλυμα (New England Biolabs® inc.)
- ❖ H₂O
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 200 µl
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Θερμοκυκλοποιητής

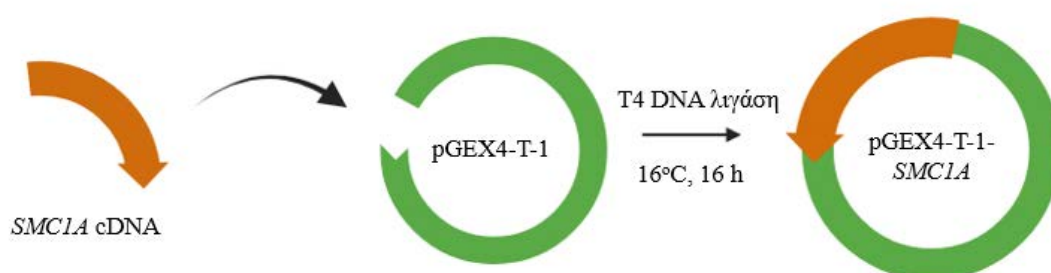
Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.4)

1. Σε ένα σωληνάριο όγκου 200 µl εισήχθησαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Πίνακας 3.2.1.4 Ποσότητες αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση αντίδρασης λιγάσης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
<i>SMC1A</i> cDNA	7,5 µl
pGEX-4T-1	2,5 µl
T4 DNA ligase	1 µl
10X T4 DNA ligase reaction buffer	2 µl
H ₂ O	7 µl

2. Ολονύχτια επώαση στους 16°C (θερμοκυκλοποιητής).



Εικόνα 3.2.1.4. Αντίδραση λιγάσης για την κλωνοποίηση του *SMC1A* cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 (αναλογία 3 *SMC1A* cDNA: 1 pGEX-4T-1). Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.1.5. Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια βακτηρίων.

Υλικά

❖ Luria Broth (LB)-άγαρ

Πίνακας 3.2.1.5. Σύσταση στερεού θρεπτικού υλικού LB.

Αντιδραστήρια
1% w/v Bacto-tryptone
0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης
0,5% w/v NaCl
2% w/v άγαρ

- ❖ H₂O
- ❖ Ποτήρι ζέσεως
- ❖ Αναδευτήρας-μαγνήτης
- ❖ Γυάλινο μπουκάλι
- ❖ Χύτρα υψηλής πίεσης
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Αντιβιοτικό
- ❖ Φλόγιστρο
- ❖ Τρυβλία Petri

Πειραματική διαδικασία

1. Ανάμιξη των χημικών αντιδραστηρίων στις ποσότητες που υποδεικνύονται (Πίνακας 3.2.1.5) με H₂O για την παρασκευή θρεπτικού μέσου LB-άγαρ.
2. Ανάδευση του διαλύματος με τη βοήθεια μαγνήτη για 15-20 λεπτά.
3. Μετάγγιση του σε γυάλινο μπουκάλι και αποστείρωση στη χύτρα.
4. Προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού σε αναλογία 1:1000 αφότου το θρεπτικό μέσο κρυώσει ελαφρώς.
5. Απόχυση του διαλύματος σε τρυβλία Petri και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου επέλθει η πήξη του.
6. Φύλαξη των τρυβλίων για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους 4°C.

3.2.1.6. Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* με πλασμίδια.

Ο μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* με εξωγενές DNA προϋποθέτει τη χημική τους κατεργασία με CaCl₂ ή άλλα δισθενή κατιόντα, ώστε να καταστούν δεκτικά και έπειτα, την υποβολή τους σε θερμικό σοκ ή ηλεκτροδιάτρηση προκειμένου να σχηματιστούν οπές στα τοιχώματά τους. Ακολούθως, τα βακτήρια επιστρώνονται σε

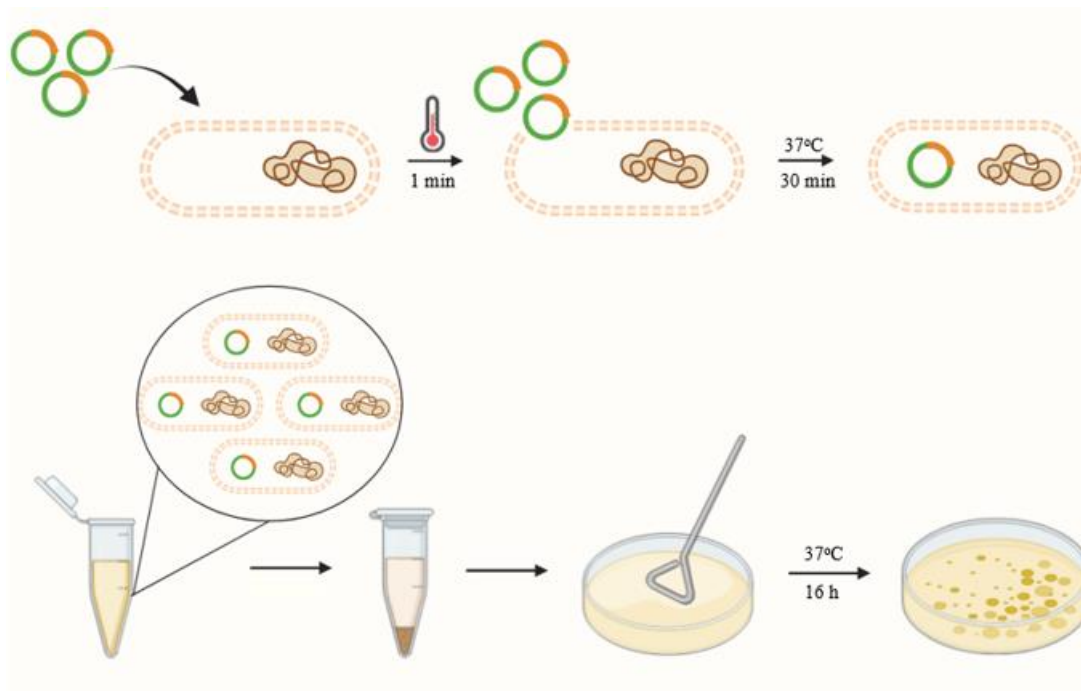
τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Συνεπώς, μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμιδιακό DNA είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό και, έτσι, πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας αποικίες. Στην παρούσα εργασία, βακτήρια *E.coli* TOP10 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri με LB-άγαρ-αμπικιλίνη.

Υλικά

- ❖ *Escherichia coli* TOP10
- ❖ Πλασμίδια
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Πάγος
- ❖ Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
- ❖ Luria Broth (LB)
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Πιπέτα Pasteur
- ❖ Τρυβλία Petri με LB-άγαρ-αντιβιοτικό
- ❖ Φλόγιστρο
- ❖ Επωαστήρας

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.6)

1. Ανάμιξη βακτηρίων *E.coli* TOP10 με τον επιθυμητό πλασμίδιο και ανάδευση.
2. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Μεταφορά στους 42°C για 1 λεπτό και ακολούθως, επαναφορά στον πάγο (θερμικό σοκ).
4. Προσθήκη 1 ml LB και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά για να επέλθει η ανάκαμψη των βακτηρίων και να αρχίσει ο πολλαπλασιασμός τους.
5. Φυγοκέντρηση σε 3000 g για 1 λεπτό.
6. Αφαίρεση του μεγαλύτερου μέρους του υπερκειμένου και επαναιώρηση των βακτηρίων στο εναπομένον υγρό (~100 μl).
7. Επίστρωση αυτών σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό υλικό (LB-άγαρ-αντιβιοτικό) παρουσία φλόγας με τη βοήθεια μίας παραμορφωμένης πιπέτας Pasteur.
8. Ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C, ώστε να σχηματιστούν αποικίες.



Εικόνα 3.2.1.6. Α) Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* TOP10 με πλασμιδιακό DNA. Β) Επίστρωση των βακτηρίων σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό υλικό ώστε να σχηματιστούν αποικίες. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.1.7. Ανάπτυξη βακτηρίων σε υγρή καλλιέργεια μικρής, μεσαίας και μεγάλης κλίμακας.

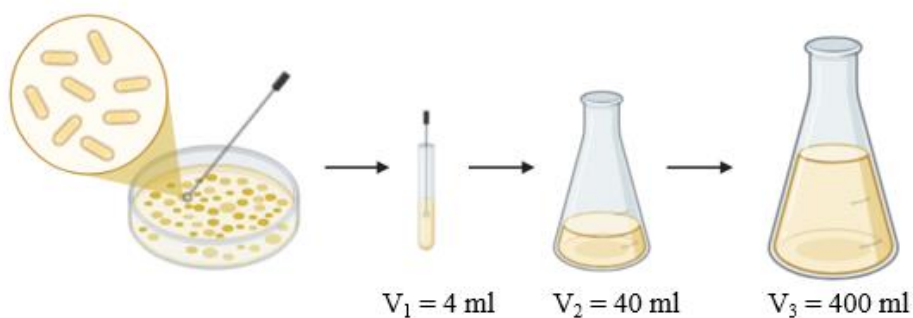
Υλικά

- ❖ Δοκιμαστικοί σωλήνες
- ❖ Κωνικές φιάλες
- ❖ Luria Broth (LB)
- ❖ Αντιβιοτικό
- ❖ Σιφόνιο
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Οδοντογλυφίδα
- ❖ Φλόγιστρο
- ❖ Επωαστήρας

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.1.7)

1. Ξηρή αποστείρωση δοκιμαστικών σωλήνων και κωνικών φιαλών.
2. Προσθήκη 3 ml LB σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα και 3 μl αντιβιοτικού.

3. Επιλογή αποικίας (από ένα τρυβλίο Petri) με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας και ενοφθαλμισμός αυτής στον δοκιμαστικό σωλήνα.
4. Ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό κυκλική ανάδευση.
5. Εμβολιασμός μικρής ποσότητας από την υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας σε κωνική φιάλη που περιέχει 40 ml LB και 40 μ l αντιβιοτικού.
6. Ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό κυκλική ανάδευση.
7. Επανάληψη των 5 και 6 για τη μετάβαση σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.



Εικόνα 3.2.1.7. Μετάβαση από την καλλιέργεια μικρής κλίμακας σε καλλιέργεια μεσαίας και μεγάλης κλίμακας, αντίστοιχα. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.1.8. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση.

Υλικά

- ❖ Διαλύματα αιώρησης (A1), λύσης (A2) και εξουδετέρωσης (A3)
- ❖ Αναδευτήρας
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Ισοπροπανόλη ή 99,8% v/v αιθανόλη
- ❖ H₂O

Πίνακας 3.2.1.8. Σύσταση των διαλυμάτων αιώρησης, λύσης και εξουδετέρωσης.

Διάλυμα αιώρησης	Διάλυμα λύσης	Διάλυμα εξουδετέρωσης
50 M Tris, pH 8.00	0,2 M NaOH	2,8 M KOAc
10 mM EDTA	1% SDS	Glacial Acetic acid, pH 5.10
0,1 mg/ml RNAση		

Πειραματική διαδικασία

1. Ανάδευση της υγρής καλλιέργειας που περιέχεται στον δοκιμαστικό σωλήνα και μεταφορά ενός κλάσματος της σε ένα σωληνάριο όγκου 1,5 ml.
2. Φυγοκέντρηση σε 3000 g για 2-3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου.
3. Προσθήκη 150 μl από το διάλυμα αιώρησης (A1) στο ίζημα των βακτηρίων και ανάδευση.
4. Προσθήκη 150 μl διαλύματος λύσης (A2) και έντονη ανακίνηση.
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
6. Προσθήκη 200-250 μl διαλύματος εξουδετέρωσης (A3).
7. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 15 λεπτά. Προκύπτουν δύο κλάσματα: α) το αδιάλυτο που συνίσταται από χρωμοσωματικό DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια και β) το διαλυτό κλάσμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA.
8. Μεταφορά 400 μl από το διαλυτό κλάσμα σε νέο σωληνάριο και προσθήκη ισοπροπανόλης ($V = V_{\text{διαλ}} \times 0,7$) ή καθαρής αιθανόλης ($V = V_{\text{διαλ}} \times 2,7$), ώστε να ελαττωθεί η πολικότητα του διαλύτη και να διευκολυνθεί η κατακρήμνιση του DNA.
9. Επώαση στους -20°C για 15 λεπτά.
10. Φυγοκέντρηση σε 13000 g (4°C) για 20 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Περιμένουμε μέχρις ότου εξατμιστούν τα υπολείμματα της αλκοόλης.
11. Επαναδιάλυση του DNA σε 30 μl H_2O και αποθήκευση στους -20°C .

3.2.1.9. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας με στήλη καθαρισμού.

Υλικά

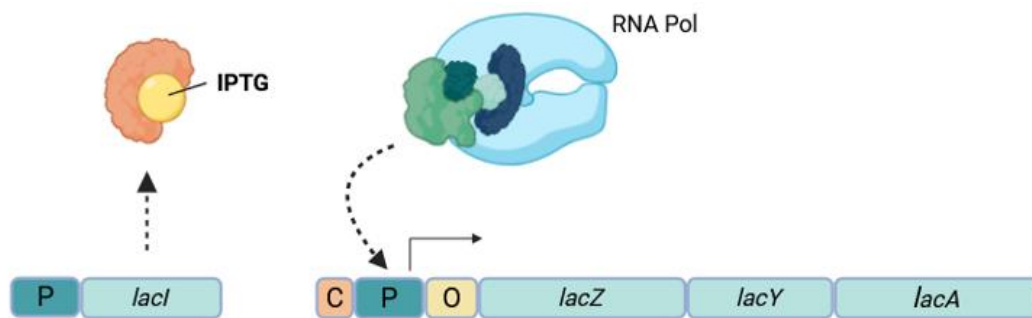
- ❖ «NucleospinTM Plasmid DNA» κιτ (Macherey-Nagel)
- ❖ Πλαστικοί σωλήνες 50 ml
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Φυγόκεντρος
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml

Πειραματική διαδικασία

1. Ανάδευση της υγρής καλλιέργειας που περιέχεται στην κωνική φιάλη και μετάγγιση της σε σωλήνες όγκου 50 ml.
2. Φυγοκέντρηση σε 3000 g για 2-3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου.
3. Προσθήκη 1 ml από το διάλυμα αιώρησης (A1) στο ίζημα των βακτηρίων και ανάδευση.
4. Προσθήκη 1 ml διαλύματος λύσης (A2) και έντονη ανακίνηση.
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Ακολούθως, προσθήκη 1,5 ml από το διάλυμα εξουδετέρωσης (A3).
7. Διαμοιρασμός του περιεχομένου του σωλήνα σε σωληνάρια όγκου 1,5 ml.
8. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 15 λεπτά.
9. Συλλογή του διαλυτού κλάσματος και μεταφορά του σε στήλες καθαρισμού.
10. Φυγοκέντρηση σε 11000 g για 1 λεπτό και απόρριψη του διερχομένου κλάσματος (flowthrough).
11. Προσθήκη 600 μl από το διάλυμα πλύσης (W2) στη στήλη, φυγοκέντρηση σε 13000 g για 1 λεπτό και απόρριψη του διερχομένου κλάσματος.
12. Φυγοκέντρηση σε 11000 g για 2 λεπτά για να στεγνώσει η στήλη.
13. Προσθήκη 50 μl διαλύματος έκλουσης (5 mM Tris-Cl, pH 8.50) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
14. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 1 λεπτό.
15. Συλλογή του εκλούσματος σε ένα σωληνάριο όγκου 1,5 ml και αποθήκευση του στους -20°C.

3.2.1.10. Υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια.

Η υπερέκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια επιτυγχάνεται με την προσθήκη IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), ενός μοριακού αναλόγου της αλλολακτόζης. Αυτή η χημική ένωση προσδένεται στον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης αποτρέποντας τη σύνδεση του στον χειριστή (operator). Συνεπώς, η RNA πολυμεράση είναι ελεύθερη να συνδεθεί στον υποκινητή του οπερονίου λακτόζης και να επάγει την έκφραση των γονιδίων του (**Εικόνα 3.2.1.10**).



Εικόνα 3.2.1.10. Επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης παρουσία IPTG. (C: CAP Site, P: Promoter, O: Operator).

Υλικά

- ❖ Ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανόζη (IPTG)
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Φασματοφωτόμετρο
- ❖ Κυψελίδες
- ❖ Φυγόκεντρος
- ❖ Πλαστικό μπουκάλι με διευρυμένη κεφαλή

Πειραματική διαδικασία

1. Όταν η απορρόφηση (OD_{600}) της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας ισούται με 0,4 προστίθεται ο επαγωγέας IPTG. Η βέλτιστη συγκέντρωση του IPTG για την υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης καθορίζεται μέσα από δοκιμές, όπως αναφέρεται στην αντίστοιχη ενότητα των αποτελεσμάτων (**Ενότητα 4.5**).
2. Επώαση στους 28°C για τρεις ώρες υπό κυκλική ανάδευση.
3. Απόχυση της καλλιέργειας σε σωλήνες φυγοκέντρου.
4. Φυγοκέντρωση σε 2000 g (4°C) για 25 λεπτά.
5. Αφαίρεση του υπερκλειμένου και αποθήκευση του ιζήματος στους -20°C .

3.2.1.11. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας.

Ο καθαρισμός πρωτεϊνών στηρίζεται στην ικανότητα τους να αναπτύσσουν μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση κατάλληλης στήλης αγκιστείας. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να καθαρίσουμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-SMC1A, για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε μία στήλη σφαιριδίων αгарόζης συζευγμένων με ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH).

Υλικά

- ❖ 2000 U/ml DNάση I (New England Biolabs® Inc.)
- ❖ Σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με γλουταθειόνη
- ❖ Διάλυμα λύσης

Πίνακας 3.2.1.11. Σύσταση διαλύματος λύσης.

Αντιδραστήρια
1% Triton X-100
25 mM HEPES
0,5 mM DTT
150 mM NaCl
2 mM MgCl ₂
1 mM PMSF

- ❖ 10 mM διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Συσκευή υπερήχων
- ❖ Πλαστικοί σωλήνες όγκου 15 ml
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια όγκου 1,5 ml
- ❖ Φυγόκεντρος

Πειραματική διαδικασία

A) Κατεργασία ιζήματος βακτηρίων

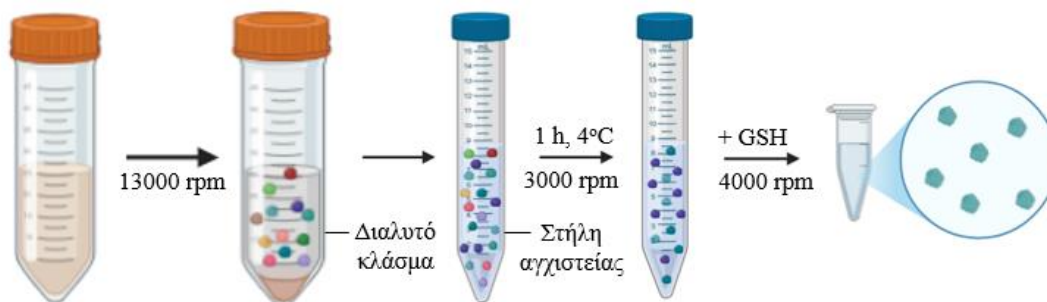
1. Προσθήκη 2 ml διαλύματος λύσης στο ίζημα των βακτηρίων και επαναιώρηση των κυττάρων με τη βοήθεια πιπέτας.
2. Προσθήκη 1 µg DNάσης I στο εναιώρημα των βακτηρίων.
3. Εφαρμογή υπερήχων για 10 δευτερόλεπτα με ένταση 60% στη συσκευή Vibra-cell™ με διάλειμμα 50 δευτερολέπτων (επανάληψη x10) για να επιτευχθεί ο κατακερματισμός της χρωματίνης.
4. Φυγοκέντρωση του ομογενοποιηµατος των βακτηρίων σε 20000 g για 15 λεπτά.
5. Συλλογή του διαλυτού κλάσματος.

B) Ανασύσταση σφαιριδίων αγαρόζης-γλουταθειόνης

1. 200 μl ελαιώματος σφαιριδίων αραρόξης-γλουταθειόνης εισάγονται σε έναν σωλήνα όγκου 15 ml.
2. 3 πλύσεις των σφαιριδίων διάρκειας 5 λεπτών με 2 ml διαλύματος λύσης.

Γ) Καθαρισμός πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (**Εικόνα 3.2.1.11**)

1. Εισαγωγή του διαλυτού κλάσματος του ομογενοποιημάτος των βακτηρίων στα σφαιρίδια αραρόξης και επώαση στους 4°C για μία ώρα υπό κυκλική ανάδευση.
2. Φυγοκέντρηση σε 3000 g (4°C) για 1 λεπτό και αφαίρεση του υπερκειμένου.
3. 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών με 2 ml διαλύματος λύσης για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που αναπτύσσουν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με τα σφαιρίδια.
4. Προσθήκη 100 μl διαλύματος γλουταθειόνης για την έκλυση της πρωτεΐνης που έχει συνδεθεί ειδικά με τα σφαιρίδια. Η γλουταθειόνη ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των σφαιριδίων αραρόξης για τη σύνδεση της με τον επίτοπο GST της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.
5. Φυγοκέντρηση σε 4000 g (4°C) για 1 λεπτό.
6. Συλλογή του υπερκειμένου και αποθήκευση του στους -20°C.

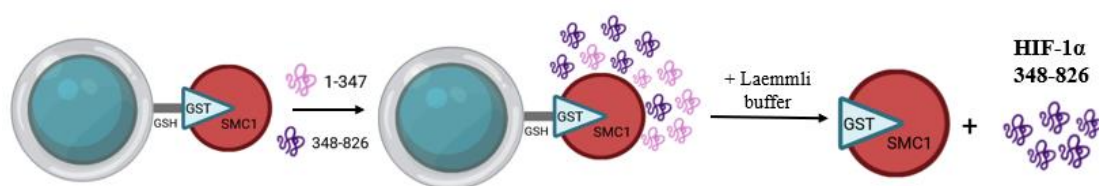


Εικόνα 3.2.1.11. Παρουσίαση της πορείας καθαρισμού μίας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με επίτοπο GST με τη βοήθεια σφαιριδίων αραρόξης συζευγμένων με γλουταθειόνη. (GSH: γλουταθειόνη). Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.1.12. Δοκιμή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vitro*.

Η πρωτεΐνη GST-SMC1A προσδέθηκε σε σφαιρίδια αραρόξης-γλουταθειόνης (Glutathione, GSH) και στη συνέχεια, δύο θραύσματα του HIF-1α προστέθηκαν στα σφαιρίδια προκειμένου α) να διαπιστωθεί εάν η αλληλεπίδραση τους είναι άμεση και β) να προσδιοριστούν οι περιοχές του HIF-1α που συμμετέχουν σε αυτήν. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα θραύσματα του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέθεταν επίτοπο

GST καθώς αποκοπεί από την πρωτεάση TEV στο πλαίσιο προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου [53] (**Εικόνα 3.2.1.12**).



Εικόνα 3.2.1.12. Δοκιμή αλληλεπίδρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A με τα θραύσματα του HIF-1α 1-347 και 348-826 που στερούνται τον επίτοπο GST *in vitro*. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Υλικά

- ❖ Σφαιρίδια αφαρόζης-γλουταθειόνης-GST-SMC1A
- ❖ Θραύσματα του HIF-1α (αμινοξικά κατάλοιπα 1-347 και 348-826, αντίστοιχα)
- ❖ Διάλυμα λύσης
- ❖ 2X διαλύματος Laemmli

Πίνακας 3.2.1.12. Σύσταση διαλύματος Laemmli συγκέντρωσης 2x.

Αντιδραστήρια
187,5 mM Tris-Cl, pH 6.80
25% v/v γλυκερόλη
4,5% w/v SDS
0,015% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης
3% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη

- ❖ H₂O
- ❖ Πλαστικοί σωλήνες όγκου 15 ml
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη 5 μg καθενός από τα θραύσματα του HIF-1α αντίστοιχα σε δύο σωλήνες όγκου 15 ml που περιέχουν σφαιρίδια αφαρόζης-γλουταθειόνης με καθηλωμένη την πρωτεΐνη GST-SMC1A.

2. Επώαση για μία ώρα στους 4°C υπό κυκλική ανάδευση.
3. Φυγοκέντρωση σε 3000 g (4°C) για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου.
4. 3 πλύσεις με διάλυμα λύσης.
5. Προσθήκη 40 µl διαλύματος Laemmli και επώαση στους 95°C για 15 λεπτά.
6. Φυγοκέντρωση σε 4000 g για 3 λεπτά.
7. Συλλογή του εκλούσματος και αποθήκευση του στους -20°C.

3.2.2. Μέθοδοι με τη χρήση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.

3.2.2.1. Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων σε φυσιολογική και μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου.

Η καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πραγματοποιείται σε ελεγχόμενες και αποστειρωμένες συνθήκες. Η κατεργασία των κυττάρων λαμβάνει χώρα σε θάλαμο με νηματική ροή αέρα που εισέρχεται από το επάνω μέρος και κινείται προς τα κάτω προστατεύοντας τα κύτταρα από την επιμόλυνση. Για την ανάπτυξη τους χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium ή DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό βόειου εμβρύου (FBS) και αντιβιοτικά (100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη). Επιπλέον, τα τρυβλία καλλιέργειας τοποθετούνται σε επωαστήρα που διατηρεί σταθερές τη θερμοκρασία (37°C) και τη σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα (5% CO₂) για να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων. Όταν χρειάζεται να γίνει επώαση στην υποξία (1% O₂), τα τρυβλία μεταφέρονται σε κατάλληλο υποξικό θάλαμο InVivo200 (Ruskin) για 24-48 ώρες.

3.2.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων προϋποθέτει την ανακαλλιέργεια τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα αναστολής της ανάπτυξης τους λόγω επαφής (contact inhibition). Αναλυτικότερα, όταν το 80-90% του τρυβλίου καλλιέργειας καλυφθεί από κύτταρα προστίθεται το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη που καταργεί την προσκόλληση των κυττάρων στο τρυβλίο. Η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη τριπλάσιου έως και εξαπλάσιου όγκου θρεπτικού μέσου και ακολούθως, ένα κλάσμα του εναιωρήματος των κυττάρων μεταφέρεται σε νέο τρυβλίο καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο.

Υλικά

- ❖ DMEM (πλήρες) (Biosera)
- ❖ 2,5% w/v διαλύματος θρυψίνης

❖ 1X PBS (Phosphate buffered-Saline)

Πίνακας 3.2.2.2. Σύσταση διαλύματος PBS συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
136 mM NaCl
3 mM KCl
10 mM Na ₂ HPO ₄
1,8 mM KH ₂ PO ₄

- ❖ Τρυβλία 100 mm
- ❖ Επωαστήρας
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου

Πειραματική διαδικασία

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τρυβλίο 100 mm και πλύση με PBS.
2. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 1 ml διαλύματος θρυψίνης.
3. Μεταφορά του τρυβλίου στον επωαστήρα για 5-7 λεπτά.
4. Παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η αποκόλληση τους από το τρυβλίο.
5. Ακολούθως, προσθήκη 3-6 ml DMEM ανάλογα με την αραιώση που είναι επιθυμητή, ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη.
6. Αναρρόφηση και εκρόφηση του εναιωρήματος με τη βοήθεια πιπέτας για να επιτευχθεί η διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων.
7. Μετάγγιση 1 ml από το εναιώρημα των κυττάρων σε νέο τρυβλίο 100 mm που περιέχει 8 ml DMEM.
8. Ανάδευση με σταυροειδείς κινήσεις και τοποθέτηση του τρυβλίου στον επωαστήρα έως την επόμενη ανακαλλιέργεια.

3.2.2.3. Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικά κύτταρα με τη χρήση αντιδραστηρίου NucleoZOL.

Υλικά

- ❖ NucleoZOL (Macherey-Nagel)
- ❖ RNase-free H₂O
- ❖ 1X PBS
- ❖ Ισοπροπανόλη

- ❖ 75% v/v αιθανόλη
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Κατάλληλο εργαλείο για το ξύσιμο της επιφάνειας του τρυβλίου
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Μικροφυγόκεντρος

Πειραματική διαδικασία

A) Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τρυβλίο 60 mm και 2 πλύσεις με PBS.
2. Προσθήκη 1 ml NucleoZOL, λύση και συλλογή των κυττάρων σε σωληνάριο όγκου 1,5 ml με τη βοήθεια κατάλληλου εργαλείου.
3. Προσθήκη 400 μ l RNase-free H₂O στα λύματα των κυττάρων και έντονη ανακίνηση του σωληναρίου για 15 δευτερόλεπτα.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 15 λεπτά.

B) Κατακρήμνιση RNA

1. Μεταφορά των $\frac{3}{4}$ του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο.
2. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης.
3. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 10 λεπτά.

Γ) Πλύση RNA

1. Αφαίρεση του μεγαλύτερου μέρους του υπερκειμένου.
2. Προσθήκη 400 μ l αιθανόλης.
3. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 3 λεπτά.

Δ) Επαναιώρηση RNA

1. Απόρριψη του υπερκειμένου.
2. Επαναιώρηση του RNA σε 25 μ l RNase-free H₂O και αποθήκευση του στους -20°C ή -80°C.

3.2.2.4. Διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων με siRNAs με χρήση κατιονικών πολυμερών (αντιδραστήριο jetPRIME).

Η διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με νουκλεϊκά οξέα επιτυγχάνεται με: α) φυσικές-μηχανικές μεθόδους (π.χ. ηλεκτροδιάτρηση, χρήση υπερήχων), β) χημικές

μεθόδους (π.χ. κατιονικά πολυμερή, λιποσωμάτια) και γ) ιϊκά σωμάτια (π.χ. αδενοϊός, λεντιϊός). Στην παρούσα εργασία, έγινε η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNAs για το γονίδιο *SMC1A* και χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο jetPRIME, ένα κατιονικό πολυμερές που σχηματίζει σύμπλοκα με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα διευκολύνοντας την είσοδο τους στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης. Η εκδήλωση της δράσης των νεοεισερχόμενων νουκλεϊκών οξέων προϋποθέτει την είσοδο τους στον πυρήνα, γεγονός που επιτυγχάνεται μετά την αποσυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου κατά την πρόφαση της μίτωσης.

Υλικά

- ❖ Αντιδραστήριο jetPRIME®
- ❖ siRNAs
- ❖ DMEM (πλήρες)
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Αναδευτήρας (vortex mixer)
- ❖ Επωαστήρας

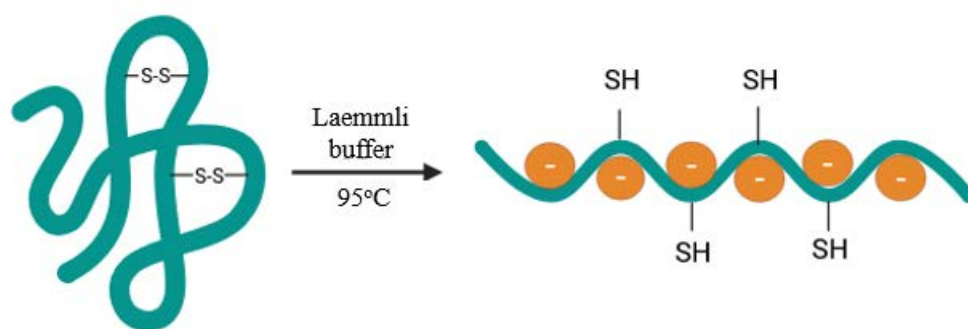
Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος διαμόλυνσης και 4,4 μl siRNAs σε κάθε σωληνάριο.
2. Ανάμιξη του διαλύματος με τη βοήθεια του αναδευτήρα.
3. Προσθήκη 4 μl αντιδραστηρίου jetPRIME® σε κάθε σωληνάριο και ήπια ανακίνηση του σωληναρίου.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
5. Εισαγωγή στάγδην του διαλύματος σε τρυβλία καλλιέργειας 60 mm που περιέχουν 2 ml DMEM και καλύπτονται στο 60-80 % από κύτταρα.
6. Επώαση στους 37°C και σε 5% CO₂ για 24 ώρες.

3.2.2.5. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blotting).

Αρχή της μεθόδου

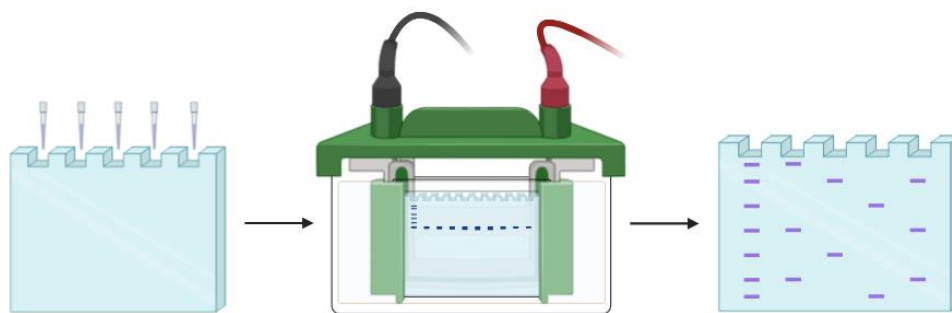
Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE, Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) επιτρέπει τον διαχωρισμό ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι το σχήμα ή το φορτίο τους. Αυτό συμβαίνει επειδή έχει προηγηθεί η αποδιάταξη της τριτοταγούς τους δομής με την προσθήκη Laemmli buffer και θέρμανση στους 95°C. Το Laemmli buffer περιέχει έναν αναγωγικό παράγοντα που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, συνήθως διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT), και το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS). Το SDS είναι ένα αποδιατακτικό μέσο το οποίο συνδέεται με τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης με την εξής αναλογία: ένα μόριο SDS ανά δύο αμινοξέα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, προσδίδει αρνητικό φορτίο στο τελικό σύμπλοκο με αποτέλεσμα την κίνηση του προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φορτίο του συμπλόκου είναι ανάλογο του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης, εφόσον, η αναλογία του αριθμού των μορίων SDS προς τον αριθμό των αμινοξέων παραμένει σταθερή.



Εικόνα 3.2.2.5. Α) Αποδιάταξη των ανώτερων διαμορφώσεων των πρωτεϊνών με την προσθήκη Laemmli buffer και θέρμανση στους 95°C. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Κατά την SDS-ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που λειτουργεί ως μοριακό φίλτρο, επιτρέποντας την ευκολότερη μέσση από τους πόρους του διέλευση των μικρών μορίων συγκριτικά με τα μεγαλύτερα τα οποία καθυστερούν. Όσο μικρότερο είναι το μοριακό βάρος μίας πρωτεΐνης τόσο ταχύτερα κινείται προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου. Αναλυτικότερα, η απόσταση που διανύουν τα πρωτεϊνικά μόρια είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συνίσταται από τα πηκτώματα επιστοιβάξης και διαχωρισμού τα οποία διαφέρουν ως προς τον ρόλο τους. Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα επιστοιβάξης και ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Επίσης, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης είναι πλούσιο

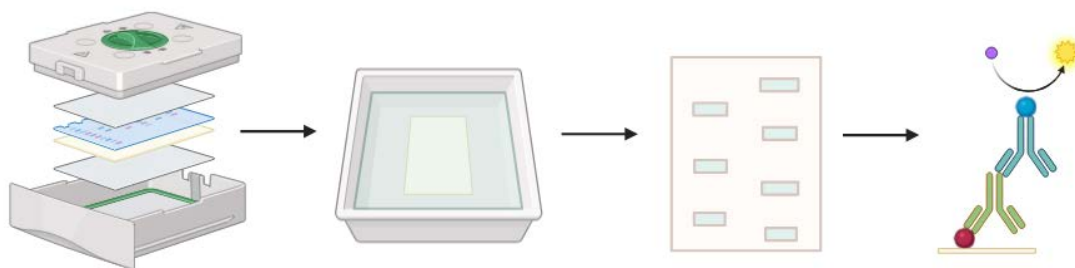
στο αμινοξύ γλυκίνη. Η γλυκίνη παραμένει ακίνητη στο πήκτωμα επιστοιίβαξης καθώς έχει μηδενικό φορτίο σε pH 6,8, pH πηκτώματος επιστοιίβαξης, συμβάλλοντας στην έναρξη διαχωρισμού των πρωτεϊνικών μορίων από το ίδιο σημείο εκκίνησης. Αντίθετα, είναι αρνητικά φορτισμένη σε pH 8,8, pH πηκτώματος διαχωρισμού, με αποτέλεσμα την κίνηση της προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου και τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Παράλληλα με τα δείγματα προς ανάλυση ηλεκτροφορείται και ένα μίγμα σημειασμένων με χρωστικές πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρας) με βάση το οποίο προσδιορίζονται τα μεγέθη των υπό μελέτη πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.2.2.5**).



Εικόνα 3.2.2.5. Β) Τα δείγματα εισάγονται στο πήκτωμα επιστοιίβαξης και ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος λαμβάνει χώρα στο πήκτωμα διαχωρισμού υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών πολλές φορές συνοδεύεται από ηλεκτρομεταφορά αυτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (Polyvinylidene fluoride). Η διαδικασία αυτή καλείται «αποτύπωση» και προϋποθέτει την δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτρομεταφορά των μορίων στηρίζεται στην ικανότητα τους να κινούνται λόγω του αρνητικού τους φορτίου προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου, επομένως, από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προς τη θετικά φορτισμένη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος, ώστε να καταληφθούν οι μη ειδικές θέσεις της και η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια αντισωμάτων, διαδικασία η οποία καλείται «ανοσοανίχνευση». Συγκεκριμένα, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ένα διάλυμα που περιέχει ένα αντίσωμα ειδικό για έναν χαρακτηριστικό επίτοπο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος και έπειτα, σε διάλυμα που περιέχει ένα δεύτερο αντίσωμα που συνδέεται με το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο είτε με μία φθορίζουσα ομάδα είτε με ένα ένζυμο όπως η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης παρουσία H_2O_2 και κουμαρικού οξέος με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός (χημειοφωταύγεια).

Το σήμα εκπομπής αναλύεται και φωτογραφίζεται από το μηχάνημα Uvitec Alliance Chemiluminescence Imaging System (Alliance Software) (Εικόνα 3.2.2.7).



Εικόνα 3.2.2.5. Γ) Απεικονίζονται κατά σειρά τα στάδια της ανοσοαποτύπωσης: ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη, κατάληψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης από μόρια καζεΐνης ή αλβουμίνης και ανοσοανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης μέσω μίας αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

A) Παρασκευή των πηκτωμάτων επιστοιβαξης και διαχωρισμού

Υλικά

- ❖ Συσκευή παρασκευής των πηκτωμάτων (Hoefel)
- ❖ 4X Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβαξης
- ❖ 4X Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού
- ❖ 40% w/v ακρυλαμίδιο: δις-ακρυλαμίδιο
- ❖ 10% w/v υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS)
- ❖ 100% w/v Τετραμεθυλαιθυλενδιαμίνη (Tetramethylethylenediamine, TEMED)
- ❖ H₂O
- ❖ Ποτήρια ζέσεως

Πίνακας 3.2.2.5. Α) Σύσταση πηκτώματος επιστοιβαξης περιεκτικότητας 4,5 % w/v σε ακρυλαμίδιο.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
40% w/v ακρυλαμίδιο	0,45 ml
Διάλυμα επιστοιβαξης 4x	1 ml
Απιονισμένο H ₂ O	2,5 ml
10% w/v APS	30 μl
TEMED	15 μl

Διάλυμα επιστοιβαξης 4x
0,5 M Tris-Cl, pH 6.80
8 mM EDTA
0,4% w/v SDS

Πίνακας 3.2.2.5.B) Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού περιεκτικότητας 10 % w/v σε ακρυλαμίδιο.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	
40% w/v ακρυλαμίδιο	1,875 ml	
Διάλυμα διαχωρισμού 4x	1,875 ml	Διάλυμα διαχωρισμού 4x
Απιονισμένο H ₂ O	3,75 ml	1,5 M Tris-Cl, pH 8.80
10% w/v APS	60 μl	8 mM EDTA
TEMED	30 μl	0,4% w/v SDS

Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθέτηση των διαχωριστικών, των τζαμιών και των πλακών στη Hoefer.
2. Εισαγωγή 7 ml από το πήκτωμα διαχωρισμού ανάμεσα στο τζάμι και την πλάκα της συσκευής και συμπλήρωση με H₂O για να επιτευχθεί η ευθυγράμμιση της επιφάνειας του πηκτώματος.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού.
4. Στη συνέχεια, προσθήκη 4 ml από το πήκτωμα επιστοιβαξης επάνω από το στερεό πλέον πήκτωμα διαχωρισμού και τοποθέτηση κατάλληλης μήτρας για τη δημιουργία των θέσεων εισαγωγής των δειγμάτων.
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά για να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοιβαξης.

B) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Υλικά

- ❖ 1X Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer)

Πίνακας 3.2.2.7. Γ) Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
50 mM Tris-Cl, pH 8.30
384 mM Γλυκίνη
2 mM EDTA
3 mM SDS

- ❖ H₂O
- ❖ 1X διάλυμα Laemmli
- ❖ Μάρτυρας μοριακών βαρών (New England Biolabs)
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- ❖ Τροφοδοτικό
- ❖ Ογκομετρικός κύλινδρος
- ❖ Πιπέτα Pasteur

Πειραματική διαδικασία

1. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφαιρείται η μήτρα σχηματισμού των θέσεων εισαγωγής των δειγμάτων.
2. Προσθήκη διαλύματος ηλεκτροφόρησης μέχρις ότου καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα.
3. Εισαγωγή 25 μl από τα δείγματα και 5 μl από τον μάρτυρα μοριακών βαρών στις αντίστοιχες θέσεις του πηκτώματος επιστοίβαξης.
4. Παροχή ηλεκτρικού ρεύματος έντασης (I) 50 mA για 40 λεπτά.

Γ) Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Υλικά

- ❖ 1X Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

Πίνακας 3.2.2.5.E) Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
12,5 mM Tris-βορικό, pH 8.30
0,1 mM DTT
10 mM SDS

- ❖ H₂O

- ❖ 6 φύλλα διηθητικού χαρτιού
- ❖ Μembrάνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (Polyvinylidene Fluoride)
- ❖ Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς
- ❖ Τροφοδοτικό
- ❖ Ογκομετρικός κύλινδρος
- ❖ Δοχεία

Πειραματική διαδικασία

1. Το πήκτωμα, η μεμβράνη και έξι φύλλα διηθητικού χαρτιού εμβαπτίζονται σε διάλυμα μεταφοράς. Όταν η μεμβράνη είναι PVDF προηγείται η ενεργοποίηση της με εμβάπτιση της σε μεθανόλη.
2. Στην πλάκα ανόδου της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνται κατά σειρά: α) τρία φύλλα διηθητικού χαρτιού, β) η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, γ) το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και δ) τρία διηθητικά χαρτιά.
3. Η πλάκα καθόδου τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς και ξεκινάει η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 80 mA ανά μεμβράνη για 60-75 λεπτά.

Δ) Ανοσοανίχνευση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος

Υλικά

- ❖ 0,1% v/v Tween 20 σε TBS (Tris-buffered saline) 1x (ή 1X TBSt)

Πίνακας 3.2.2.5.ΣΤ) Σύσταση διαλύματος TBS συγκέντρωσης 1x.

Αντιδραστήρια
150 mM NaCl
20 mM Tris-Cl, pH 7.60

- ❖ Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος
- ❖ BSA (Bovine Serum Albumin)
- ❖ Αντισώματα

Πίνακας 3.2.2.5.Ζ) Πληροφορίες για τα πρώτα και δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντισώματα	Οργανισμός	Συγκέντρωση	Αραίωση	Κωδικός	Προέλευση
Anti-HIF-1α	Ποντίκι	250 µg/ml	1:1000	610959	BD Transduction Laboratories™
Anti-HIF-1α	Κουνέλι	1 mg/ml	1:1000	ab216842	Abcam
Anti-SMC1A	Ποντίκι	-	1:1000	6892T	Cell Signaling Technology
Anti-SMC3	Κουνέλι	1 mg/ml	1:1000	ab9263	Abcam
Anti-NPM1	Ποντίκι	-	1:2000	MAB937	Millipore
Anti-LIPIN1	Κουνέλι	-	1:1000	5195T	Cell Signaling Technology
Anti-TUBULIN	Ποντίκι	-	1:1000	3873	Cell Signaling Technology
Anti-ACTIN	Ποντίκι	-	1:5000	58169	Cell Signaling Technology
Anti-MOUSE-HRP	Άλογο	-	1:3000	7076	Cell Signaling Technology
Anti-RABBIT-HRP	Κατσίκια	0,8 mg/ml	1:5000	AP187P	Sigma-Aldrich, Inc.

❖ Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL Kit-Luminata Crescendo Western HRP substrate, Millipore)

Πειραματική διαδικασία

1. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε αποβουτυρωμένο γάλα (5% w/v).
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση.
3. Αντικατάσταση του γάλακτος με διάλυμα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα BSA-TBS-Tween 20 (3% w/v).
4. Ολονύχτια επώαση στους 4°C υπό ανάδευση.
5. 3 πλύσεις με TBS-Tween 20 διάρκειας 5 λεπτών.
6. Προσθήκη του δεύτερου αντισώματος αραιωμένου σε αποβουτυρωμένο γάλα.
7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση.
8. 3 πλύσεις με TBS-Tween 20 διάρκειας 5 λεπτών.
9. Προσθήκη στάγδην 500 µl από το διάλυμα χημειοφωταύγειας στη μεμβράνη και ανάλυση του σήματος εκπομπής με το λογισμικό Alliance του μηχανήματος Uvitec Alliance Chemiluminescence Imaging System.

3.2.2.6. Ανοσοκατακρήμνιση ενδογενών πρωτεϊνών.

Υλικά

- ❖ 1X PBS
- ❖ Διάλυμα λύσης

Πίνακας 3.2.2.6. Σύσταση διαλύματος λύσης.

Αντιδραστήρια
1% Triton X-100
25 mM HEPES
0,5 mM DTT
150 mM NaCl
2 mM MgCl ₂
1 mM PMSF
2mM EDTA

- ❖ Αντισώματα
- ❖ Κατάλληλο εργαλείο για το ξύσιμο της επιφάνειας του τρυβλίου
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Σύριγγα ινσουλίνης
- ❖ Πάγος
- ❖ Μαγνητικά σφαιριδίων συζευγμένα με πρωτεΐνη A (Thermo Fischer)
- ❖ Μαγνήτης
- ❖ 2X διαλύματος Laemmli

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 3.2.2.6)

A) Λύση κυττάρων

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τρυβλίο 100 mm και πλύση με PBS.
2. Προσθήκη 150 μl διαλύματος λύσης και χειροκίνητη λύση των κυττάρων με κατάλληλο εργαλείο.
3. Συλλογή των λυμάτων σε ένα σωληνάριο και τοποθέτηση του στον πάγο.

B) Δημιουργία συμπλόκων της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με αντισώματα IgG

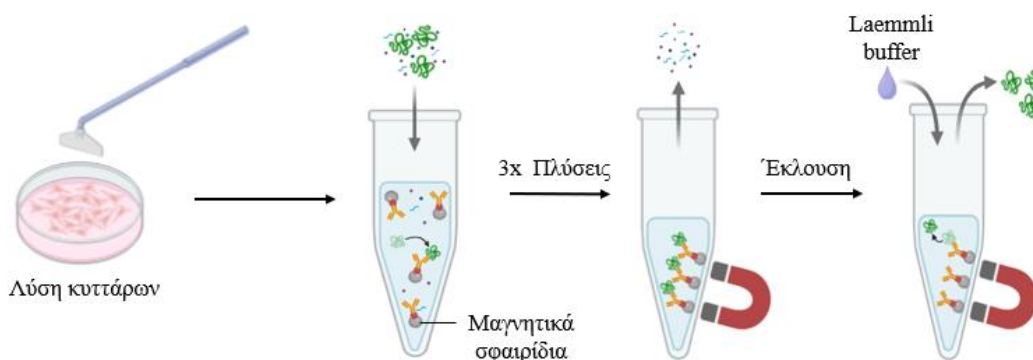
1. Το διάλυμα που περιέχει τα κυτταρικά λύματα αναρροφάται και εκροφάται με μία σύριγγα ινσουλίνης ώστε να επιτευχθεί η αποδέσμευση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης.
2. Φυγοκέντρηση σε 13000 g για 15 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου.
3. Αραίωση του διαλύματος με 150 μl διαλύματος λύσης.
4. Προσθήκη 10 μl αντισωμάτων IgG.
5. Επώση στους 4°C για 1 ώρα και 30 λεπτά υπό κυκλική ανάδευση.

Γ) Προετοιμασία μαγνητικών σφαιριδίων-πρωτεΐνης Α

1. Προσθήκη 35 μl από το εναιώρημα μαγνητικών σφαιριδίων-πρωτεΐνης Α σε ένα σωληνάριο όγκου 1,5 ml.
2. 3 πλύσεις των σφαιριδίων με 300 μl διαλύματος λύσης.

Δ) Ανοσοκατακρήμνιση

1. Μετά το πέρας της επώασης, μεταφορά του κυτταροδιαλύματος στα μαγνητικά σφαιρίδια.
2. 3 πλύσεις με 300 μl διαλύματος λύσης παρουσία μαγνήτη.
3. Προσθήκη 40 μl διαλύματος Laemmli και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν συνδεθεί ειδικά με τα σφαιρίδια.
4. Συλλογή του εκλούσματος και αποθήκευση του στους -20°C.



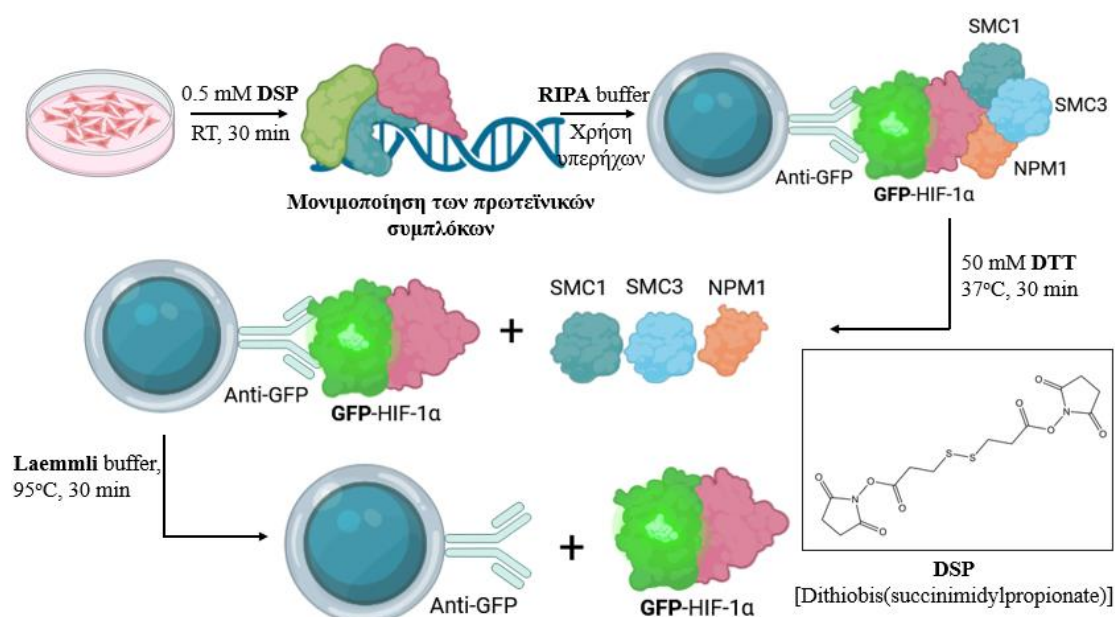
Εικόνα 3.2.2.6. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

3.2.2.10. Ανοσοκατακρήμνιση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο RECLIP.

Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη μέθοδο RECLIP (Reverse Cross-link Immunoprecipitation) περιλαμβάνει τη χρήση ενός παράγοντα μονιμοποίησης των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ο μονιμοποιητικός παράγοντας Δισθειοβισ-(σουκκινιμιδυλική προπιονάτη) [Dithiobis-(succinimidyl)propionate), DSP] ο οποίος αναπτύσσει ιμιδικούς δεσμούς με τις ε-αμινοομάδες των αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης των πρωτεϊνών, διασφαλίζοντας την

ακεραιότητα των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης κατά τη χρήση του έντονα αποδιατακτικού διαλύματος RIPA και την εφαρμογή υπερήχων. Η δράση του παράγοντα DSP αντιστρέφεται με την προσθήκη διθειοθρεϊτόλης (DTT) που ανάγει τη δισουλφιδική του γέφυρα επιτρέποντας την έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν συγκατακρημνιστεί με την πρωτεΐνη-δόλωμα. Η έκλυση του δολώματος γίνεται με διάλυμα Laemmli και θέρμανση στους 95°C. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου RECLIP είναι ότι επιτρέπει την κατακρήμνιση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν έμμεσα ή ασθενικά με την πρωτεΐνη-δόλωμα και την ταυτοποίηση αυτών με ανοσοαποτύπωση.



Εικόνα 3.2.2.7. Ανοσοκατακρήμνιση (RECLIP) του παράγοντα GFP-HIF-1α σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν στην υποξία την GFP και τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α (WT, IASΑ και SE). Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Υλικά

- ❖ 1X PBS
- ❖ 20 mM DSP σε διαλύτη DMSO
- ❖ Διάλυμα RIPA

Πίνακας 3.2.2.7.A) Σύσταση διαλύματος RIPA (Radioimmunoprecipitation assay).

RIPA buffer
0,5% w/v NP-40 (nonyl phenoxyethoxyethanol)
0,5% w/v NaDoc (Sodium Deoxycholate)
0,1% w/v SDS
20 mM Tris-Cl, pH 7.40
150 mM NaCl
1mM EDTA
0,2 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)

- ❖ Σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με αντισώματα-GFP (ProteinTech)
- ❖ 50 mM DTT
- ❖ 2X διαλύματος Laemmli
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Κατάλληλο εργαλείο για το ξύσιμο της επιφάνειας του τρυβλίου
- ❖ Σύριγγα ινσουλίνης
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Συσκευή ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Πειραματική διαδικασία

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τρυβλία 200 mm και 2 πλύσεις με PBS.
2. Προσθήκη 10 ml DSP (0,5 mM) αραιωμένου σε PBS και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
3. Προσθήκη 1 ml διαλύματος RIPA και συλλογή των κυτταρικών λυμάτων σε ένα σωληνάριο με τη βοήθεια κατάλληλου εργαλείου.
4. Το διάλυμα που περιέχει τα κυτταρικά λύματα αναρροφάται και εκροφάται με μία σύριγγα ινσουλίνης ώστε να επιτευχθεί η αποδέσμευση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης.
5. Εφαρμογή υπερήχων για 10 δευτερόλεπτα έντασης 40% στη συσκευή Vibra-cellTM για να επιτευχθεί η θραυσματοποίηση της χρωματίνης.
6. Φυγοκέντρηση σε 13000 g (4°C) για 15 λεπτά.
7. Μεταφορά του διαλυτού κλάσματος σε 40 μl εναιωρήματος σφαιριδίων αγαρόζης-αντισωμάτων-GFP και επώαση στους 4°C για 4 ώρες.
8. Φυγοκέντρηση σε 11000 g (4°C) για 5 λεπτά.
9. Απόρριψη του υπερκειμένου και 3 πλύσεις των σφαιριδίων με διάλυμα RIPA.

10. Προσθήκη 300 µl DTT και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
11. Φυγοκέντρωση σε 13000 g για 10 λεπτά, συλλογή του διαλυτού κλάσματος και αποθήκευση του στους -20°C.
12. Προσθήκη 50 µl διαλύματος Laemmli και θέρμανση στους 95°C για 30 λεπτά.
13. Φυγοκέντρωση σε 13000 g για 10 λεπτά, συλλογή του διαλυτού κλάσματος και αποθήκευση του στους -20°C.

3.2.2.10. Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών σε σταθερά διαμολυσμένα καρκινικά κύτταρα με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Υλικά

- ❖ Τρυβλία 60 mm
- ❖ DMEM (πλήρες)
- ❖ Καλυπτρίδες
- ❖ Λαβίδα
- ❖ Φλόγιστρο
- ❖ Επωαστήρας
- ❖ 1X PBS
- ❖ 3% v/v φορμαλδεΰδη
- ❖ 0,1% v/v Tween 20 σε PBS 1x (ή PBSt)
- ❖ 0,1% v/v Triton X-100 σε PBS 1x
- ❖ 3% w/v BSA σε PBSt
- ❖ 0,1% v/v Tween 20 σε TBS 1x (ή TBSt)
- ❖ Βελόνα
- ❖ Αντισώματα

Πίνακας 3.2.2.8. Πληροφορίες για τα πρώτα και δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντισώματα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Προέλευση
Anti-SMC1	Ποντίκι	1:500	Μονοκλωνικό	Cell Signaling
Anti-SMC3	Κουνέλι	1:500	Μονοκλωνικό	Cell Signaling
Anti-mouse	Άλογο	1:250	Μονοκλωνικό	Cell Signaling
Anti-rabbit	Κατσίκα	1:250	Μονοκλωνικό	Cell Signaling

- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Απιονισμένο H₂O

- ❖ Mowiol-DAPI (Sigma-Aldrich)
- ❖ Αντικειμενοφόρες πλάκες

Πειραματική διαδικασία

A) Προετοιμασία κυττάρων

1. Σε τρυβλίο 60 mm τοποθετούνται 4 αποστειρωμένες καλυπτρίδες και ακολούθως, προστίθενται 2 ml DMEM και 200 μ l εναιωρήματος κυττάρων.
2. Ανάδευση με σταυροειδείς κινήσεις.
3. Ολονύχτια επώαση στους 37°C και σε 5% CO₂.
4. Παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο, ώστε να επιβεβαιωθεί ο πολλαπλασιασμός τους.
5. Ανανέωση του DMEM με 4 ml νέου και τοποθέτηση των τρυβλίων στον υποξικό θάλαμο (1% O₂) για 24 ώρες.
6. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πλύση με PBS.

B) Μονιμοποίηση πρωτεϊνικών συμπλόκων χρωματίνης

1. Προσθήκη 2 ml φορμαλδεΰδης στο τρυβλίο.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Αφαίρεση του παράγοντα μονιμοποίησης και 2 πλύσεις με PBSt.

Γ) Διαπερατότητα κυττάρων

1. Προσθήκη 2 ml Triton X-100 για να γίνει διαπερατή η μεμβράνη των κυττάρων.
2. Επώαση στους 4°C για 15 λεπτά.
3. Απομάκρυνση του απορρυπαντικού και 2 πλύσεις με PBSt.

Δ) Κατάληψη μη ειδικών θέσεων

1. Προσθήκη 1 ml διαλύματος BSA και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση.
2. Απομάκρυνση της BSA και 3 πλύσεις με TBSt.

Ε) Αντισώματα

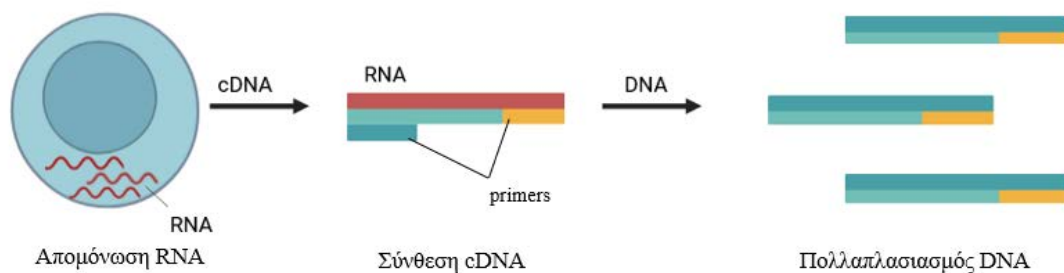
1. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε απορροφητικό χαρτί για δευτερόλεπτα.

2. Ακολουθώς, τοποθετούνται με την όψη όπου είναι προσκολλημένα τα κύτταρα επάνω σε μία σταγόνα 40 μl που περιέχει το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε BSA-TBSt (αραίωση 1:500).
3. Ολονύχτια επώαση στους 4°C.
4. 2 πλύσεις με TBSt και προσθήκη 100 μl από το δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο σε BSA-TBSt (αραίωση 1:250).
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
6. 3 πλύσεις κατά σειρά με TBSt, TBS και H₂O.
7. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων με την όψη όπου εντοπίζονται τα κύτταρα επάνω σε μία σταγόνα 10 μl Mowiol-DAPI που έχει τοποθετηθεί επάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα.
8. Μεταφορά των αντικειμενοφόρων πλακών σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά και αποθήκευση τους στους 4°C.

3.2.2.10. Σύνθεση cDNA από RNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής ή RT (Reverse Transcription)-PCR περιλαμβάνει τη σύνθεση cDNA από RNA και τον πολλαπλασιασμό του cDNA, ώστε να παραχθούν πολλά αντίγραφα DNA (**Εικόνα 3.2.2.9**). Η εν λόγω αντίδραση προϋποθέτει την απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων και στηρίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών: α) τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές (Random primers), β) εκκινητές πλούσιοι σε θυμιδίνες που υβριδίζουν με την πολύ(A)-ουρά των mRNAs (Oligo-dt primers) ή γ) εκκινητές που υβριδίζουν με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες επιλεγμένων γονιδίων (GSPs, Gene-specific primers). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, απομονώθηκε το ολικό RNA κυττάρων Huh7 στην νορμοξία και στην υποξία (1% O₂) παρουσία της SMC1A και μετά από την αποσιώπηση του γονιδίου της. Επίσης, για την διεξαγωγή της RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές.



Εικόνα 3.2.2.9. Απεικόνιση των επιμέρους σταδίων της RT-PCR. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Υλικά

- ❖ Εκμαγείο RNA
- ❖ High-Capacity cDNA Reverse Transcription κιτ (Applied Biosystems)
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 200 μl
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ❖ Πάγος
- ❖ Μικροφυγόκεντρος
- ❖ Θερμοκυκλοποιητής Eppendorf Mastercycler® gradient

Πειραματική διαδικασία

1. Παρασκευή μίγματος για την πραγματοποίηση RT-PCR και διαμοιρασμός του σε σωληνάρια όγκου 200 μl ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να ισούται με 20 μl συμπεριλαμβανομένου του RNA.

Πίνακας 3.2.2.9.Α) Σύσταση μίγματος για 1 αντίδραση ($V_{\text{τελικό}} = 20 \mu\text{l}$).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
10X RT buffer	4 μl
25X dNTP Mix (100 mM)	1,6 μl
10X Random Primers	4 μl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	2 μl
H ₂ O (Nuclease-free)	8,4 μl

2. Προσθήκη 2 μg RNA σε κάθε σωληνάριο και ήπια ανάδευση του περιεχομένου του με τη βοήθεια πιπέτας μέσω αναρρόφησης-εκρόφησης.
3. Παραγωγή μίας σύντομης φυγοκέντρωσης στη μικροφυγόκεντρο.

4. Τοποθέτηση των σωληναρίων στον θερμοκυκλοποιητή και ρύθμιση των συνθηκών της αντίδρασης.

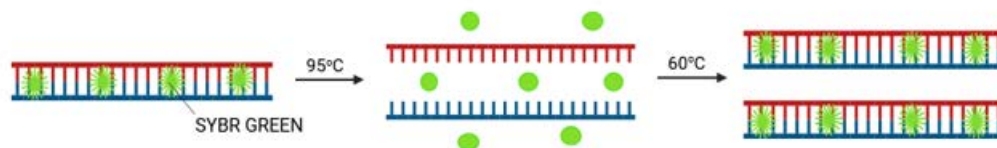
Πίνακας 3.2.2.9.Β) Τα επιμέρους στάδια της RT-PCR αντίδρασης.

Ρυθμίσεις	Βήμα 1	Βήμα 2	Βήμα 3	Βήμα 4
<u>Θερμοκρασία</u>	25°C	37°C	85°C	4°C
<u>Χρόνος</u>	10 λεπτά	120 λεπτά	5 λεπτά	∞

3.2.2.10. Real-time PCR (qPCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time ή qPCR) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση μορίων RNA και DNA. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης επαναλαμβάνονται κατά σειρά: α) η αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA, β) ο υβριδισμός των εκκινητών και γ) η σύνθεση των νέων κλώνων από την πολυμεράση του DNA. Για την παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής όπως μία φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται (μη ειδικά) στο δίκλωνο DNA ή ένα ολιγονουκλεοτίδιο που φθορίζει όταν υβριδίζει με το γονίδιο-στόχο (μοριακός φάρος). Τα δεδομένα συλλέγονται από την εκθετική φάση της αντίδρασης και η παράμετρος C_p , η τιμή της οποίας υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα, αποτελεί τη σημαντικότερη για την ποσοτικοποίηση. Συγκεκριμένα, η παράμετρος C_p αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο (ουδός ανίχνευσης) και ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου-στόχου εκείνη τη χρονική στιγμή υπολογίζονται από την πρότυπη καμπύλη. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της C_p τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA στο αρχικό δείγμα. Επομένως, δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου-στόχου έχουν μικρότερη C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα αυτού. Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση: $2^{-\Delta\Delta CT}$ όπου $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{δείγματος}} - \Delta CT_{\text{αναφοράς}}$ ($\Delta CT_{\text{δείγματος}}$: κανονικοποιημένη τιμή CT δείγματος και $\Delta CT_{\text{αναφοράς}}$: κανονικοποιημένη τιμή CT δείγματος αναφοράς). Στην προκειμένη περίπτωση, έγινε ποσοτικοποίηση των γονιδίων *LPIN1* και *PGK1* (γονίδιο αναφοράς: *ACTIN*) παρουσία της χρωστικής SYBR Green που φθορίζει όταν συνδέεται με το δίκλωνο DNA ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) (**Εικόνα 3.2.2.10**).



Εικόνα 3.2.2.10. Σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους σταδίων της qPCR αντίδρασης παρουσία της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

Υλικά

- ❖ cDNA εκμαγείο
- ❖ SYBRTM Green mix
- ❖ Εκκινητές
- ❖ Roche LightCycler®96
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια 200 µl
- ❖ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου

Πειραματική διαδικασία

1. Προετοιμασία μίγματος για την πραγματοποίηση qPCR και διαμοιρασμός του σε σωληνάρια όγκου 200 µl (9 µl μίγματος ανά σωληνάριο).

Πίνακας 3.2.2.10. Α) Σύσταση μίγματος για 1 αντίδραση ($V_{\text{τελικό}} = 10 \mu\text{l}$).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Εκκινητής 5'-3' 10 µM	0,55 µl
Εκκινητής 3'-5' 10 µM	0,55 µl
Sybr Green mix	5,5 µl
H ₂ O	3,3 µl

2. Προσθήκη 1 µl cDNA σε κάθε σωληνάριο.
3. Τοποθέτηση των σωληναρίων στον θερμοκυκλοποιητή Roche LightCycler®96 και προγραμματισμός των συνθηκών της αντίδρασης.

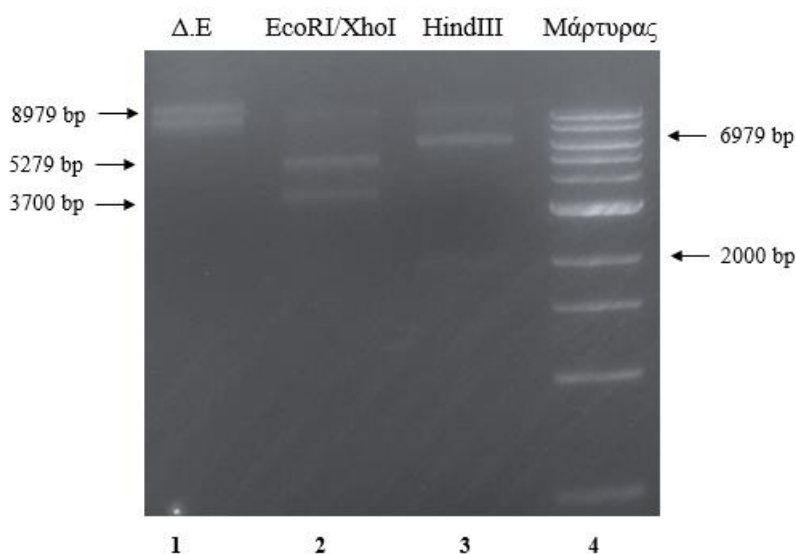
Πίνακας 3.2.2.10. Β) Οι συνθήκες (θερμοκρασία-χρόνος) των επιμέρους σταδίων της qPCR.

Στάδια qPCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)
Αποδιάταξη διπλής έλικας DNA	95	180
Υβριδισμός εκκινητών- Επιμήκυνση	60	30
Αποδιάταξη προϊόντων	65-95	70

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Έλεγχος ορθότητας του πλασμιδίου pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Αρχικά ελέγχθηκε η ορθότητα του πλασμιδίου pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Addgene. Το πλασμίδιο pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt μεγέθους 8979 bp υποβλήθηκε σε πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI οι οποίες αναγνωρίζουν αλληλουχίες εντός των θέσεων κλωνοποίησης του cDNA στον φορέα. Τα μεγέθη των θραυσμάτων DNA που παρήχθησαν, σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους, ήταν 3700 bp και 5279 bp και έγιναν ορατά υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Το θραύσμα των 3700 bp συνέπιπτε με το μέγεθος του cDNA του γονιδίου *SMC1A*, ενώ, το θραύσμα των 5279 bp συνέπιπτε με το μέγεθος του πλασμιδιακού φορέα (**Εικόνα 4.1**). Επίσης, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt με την ενδονουκλεάση HindIII κατά την οποία παρήχθησαν δύο θραύσματα DNA μεγέθους 2000 bp και 6979 bp (**Εικόνα 4.1**). Με τις παραπάνω πέψεις, επιβεβαιώθηκε ότι το πλασμίδιο pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt έφερε το προβλεπόμενο ένθεμα.

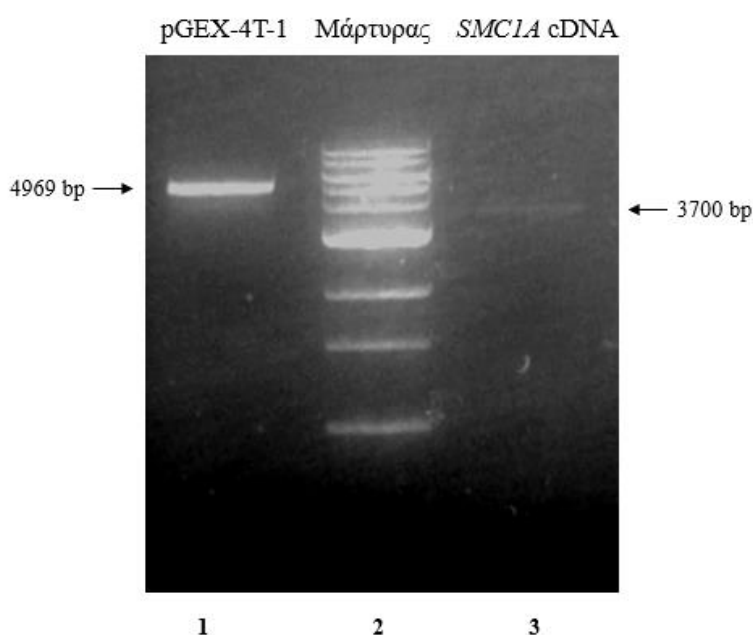


Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδίου pcDNA3-5'*cMyc-SMC1A*wt πριν την πέψη (διαδρομή 1) και των θραυσμάτων DNA που προκύπτουν μετά την πέψη του με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI/XhoI (διαδρομή 2) και HindIII (διαδρομή 3) σε 1% w/v πηκτώματος αгарόζης. Το άκοπο πλασμίδιο (Δείγμα Ελέγχου, Δ.Ε.) υφίσταται σε δύο διαμορφώσεις (υπερελικωμένη και μη), για τον λόγο αυτό, παρατηρούνται δύο ζώνες στην αντίστοιχη διαδρομή του πηκτώματος. Με βέλη υποδεικνύονται τα μεγέθη του άκοπου πλασμιδίου και των θραυσμάτων του μετά τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού.

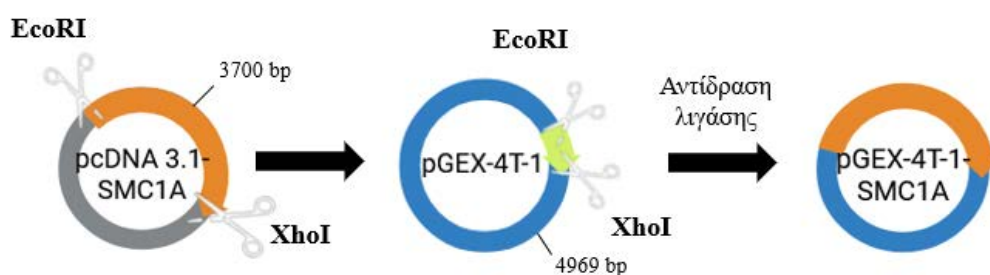
4.2. Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *SMC1A* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια pGEX-4T-1.

Για να επιτευχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης SMC1A σε βακτήρια ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση του *SMC1A* cDNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pcDNA3-5'cMyc-SMC1Awt και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης τους σε 1% w/v ηλεκτώματος αгарόζης (Εικόνα 4.2). Στη συνέχεια, το cDNA του γονιδίου *SMC1A* και ο φορέας pGEX-4T-1 απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή (Παράγραφος 3.2.1.3.) και η συγκέντρωσή τους βρέθηκε ίση με 0,0346 μg/μl ($C_{\text{cDNA } SMC1A}$) και 0,0361 μg/μl ($C_{\text{pGEX-4T-1}}$), αντίστοιχα. Ακολούθησε η σύνδεση των δύο θραυσμάτων DNA με αντίδραση λιγάσης σε αναλογία 3 *SMC1A* cDNA: 1 pGEX-4T-1.

A)



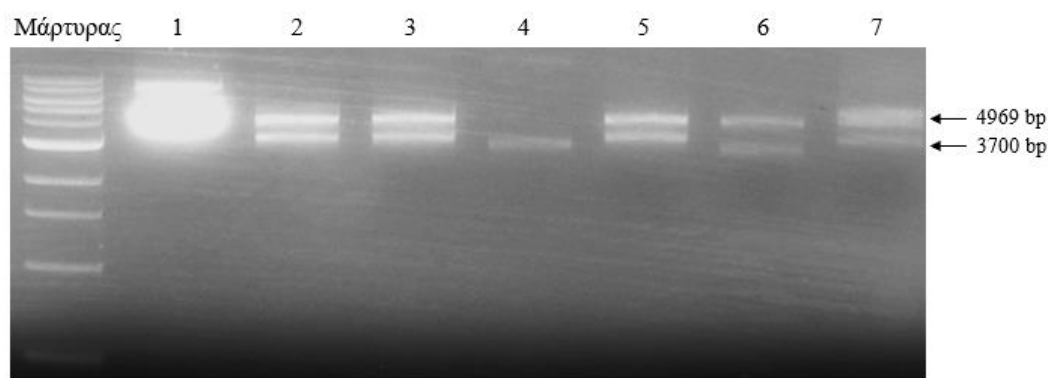
B)



Εικόνα 4.2. Ηλεκτροφόρηση του cDNA του γονιδίου *SMC1A* (διαδρομή 1) και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 (διαδρομή 3) σε 1% w/v πηκτώματος αгарόζης (A). Με βέλη υποδεικνύονται τα μεγέθη του φορέα και του ενθέματος, αντίστοιχα. Κλωνοποίηση του ενθέματος *SMC1A* cDNA του πλασμιδίου pcDNA3-5'cMyc-*SMC1A*wt στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 με τη βοήθεια των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRI και XhoI (B). Σχεδιάστηκε στο BioRender.com.

4.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* TOP10 με το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A και έλεγχος με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

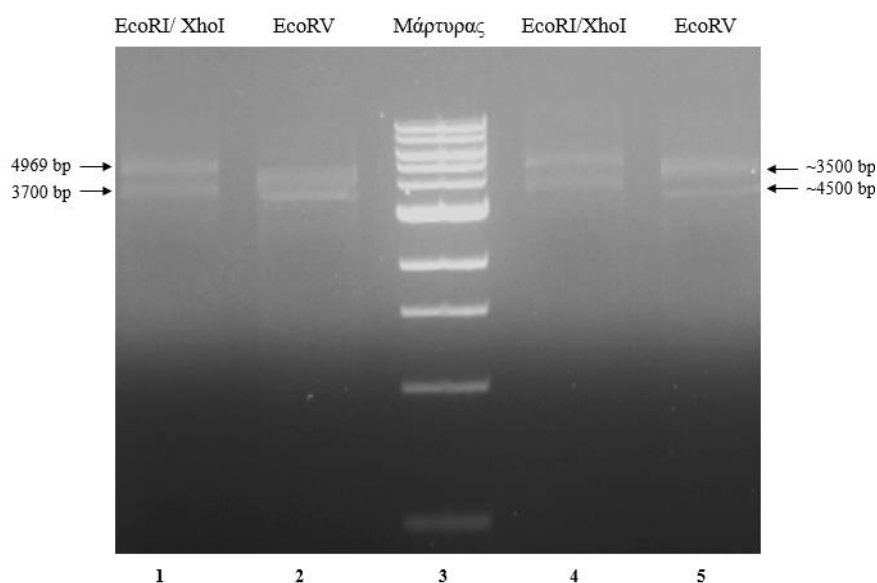
Μετά την κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *SMC1A* στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 δεκτικά βακτήρια *E.coli* TOP10 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για να προσλάβουν το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A (Παράγραφος 3.2.1.6.). Στη συνέχεια, τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό LB-άγαρ-αμπικιλίνη και ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C, ώστε τα βακτήρια να μεγαλώσουν και να σχηματίσουν αποικίες. Την επόμενη ημέρα, επιλέχθηκαν επτά αποικίες οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν ξεχωριστά σε επτά υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (3 ml LB-αμπικιλίνης 0,1 mg/ml) και έλαβε χώρα ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με αλκαλική λύση (Παράγραφος 3.2.1.8.) και ελέγχθηκε η παρουσία του *SMC1A* cDNA σε αυτό μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI. Από την **εικόνα 4.3** διαπιστώνεται ότι οι καλλιέργειες 2, 3 και 5 διέθεταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, διότι απέδωσαν δύο θραύσματα DNA μεγέθους 3700 bp και 4969 bp τα οποία ισούνται με το cDNA του γονιδίου *SMC1A* και τον φορέα pGEX-4T-1, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πλασμιδιακού DNA επτά υγρών καλλιεργειών μικρής κλίμακας με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI σε 1% w/v πηκτώματος αгарόζης. Με βέλη υποδεικνύονται τα μεγέθη του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 και του ενθέματος *SMC1A* cDNA.

4.4. Απομόνωση του πλασμιδίου pGEX-4T-1-SMC1A από υγρή καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας.

Μία μικρή ποσότητα των καλλιεργειών 2 και 3 που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A ενοφθαλμίστηκε ξεχωριστά σε δύο υγρές καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας (40 ml LB-αμπικιλίνης 0,1 mg/ml) και ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με κατάλληλο κιτ (**Παράγραφος 3.2.1.9.**) και υποβλήθηκε σε πέψεις με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI, XhoI και EcoRV για να ελεγχθεί η παρουσία του cDNA του γονιδίου *SMC1A* σε αυτό καθώς και ο προσανατολισμός του. Η πέψη με τις ενδονουκλεάσες EcoRI και XhoI απέδωσε δύο θραύσματα DNA μεγέθους 3700 bp και 4969 bp, γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία του cDNA στο πλασμίδιο (**Εικόνα 4.4**). Επίσης, η πέψη με την ενδονουκλεάση EcoRV απέδωσε δύο θραύσματα DNA μεγέθους ~3500 bp και ~4500 bp, επιβεβαιώνοντας ότι το cDNA έχει εντεθεί με τον σωστό προσανατολισμό στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1.

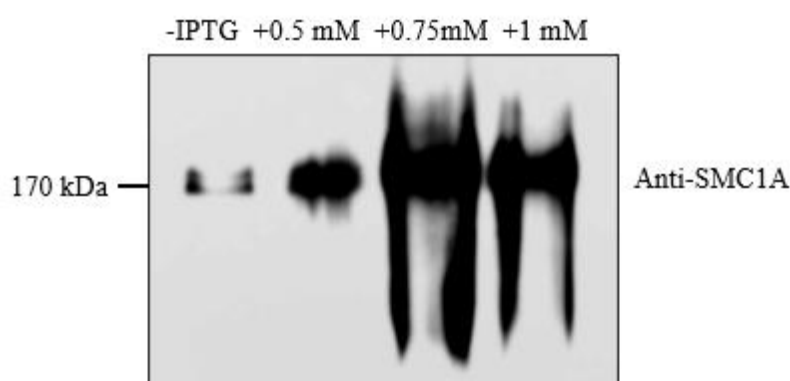


Εικόνα 4.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pGEX-4T-1-SMC1A με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI/-XhoI (διαδρομές 1 και 4) και EcoRV (διαδρομές 2 και 5) σε 1% w/v πηκτώματος αгарόζης. Με βέλη υποδεικνύονται τα μεγέθη των θραυσμάτων DNA του πλασμιδίου.

4.5. Δοκιμή υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A σε βακτήρια *E.coli* BL21-RIL με διαφορετικές συγκεντρώσεις του IPTG.

Για να παραχθεί η πρωτεΐνη GST-SMC1A σε ικανοποιητική ποσότητα, βακτήρια *E.coli* BL21-RIL, που χρησιμοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών,

μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A. Με σκοπό την εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης του IPTG που οδηγεί σε υπερέκφραση ικανής ποσότητας της GST-SMC1A έγινε επαγωγή της έκφρασης της με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του IPTG (0,5 mM, 0,75 mM και 1 mM) (**Παράγραφος 3.2.1.10.**). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε λύση των βακτηρίων, ηλεκτροφόρηση του ομογενοποιημένου σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου (8% w/v) και ανοσοανίχνευση της GST-SMC1A με αντίσωμα που αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης SMC1A. Από τα αποτελέσματα της δοκιμής (**Εικόνα 4.5**) προκύπτει ότι η συγκέντρωση των 0,75 mM IPTG είναι η ελάχιστη που οδηγεί σε μέγιστη υπερέκφραση της GST-SMC1A.



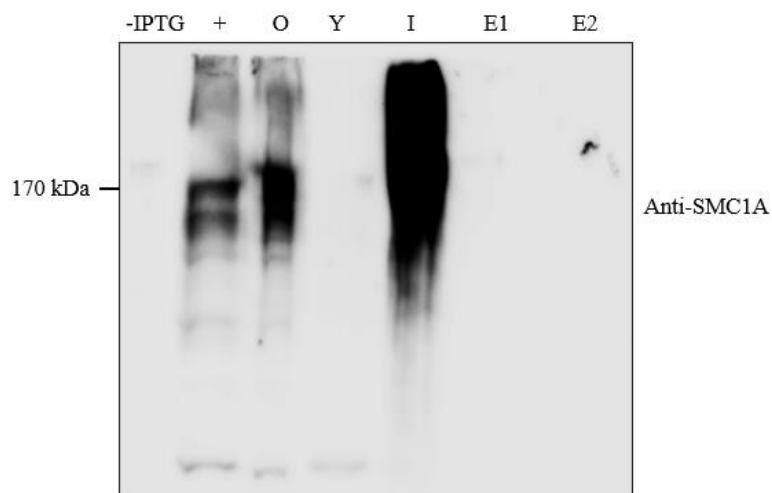
Εικόνα 4.5. Ανοσοαποτύπωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A μετά από ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων βακτηρίων *E.coli* BL21-RIL απουσία IPTG (-IPTG) και μετά την προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του IPTG (0,5 mM, 0,75 mM και 1 mM). Αναγράφεται το μέγεθος της GST-SMC1A.

4.6. Καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-SMC1A με χρωματογραφία αγκιστείας - απουσία και παρουσία DNAσης.

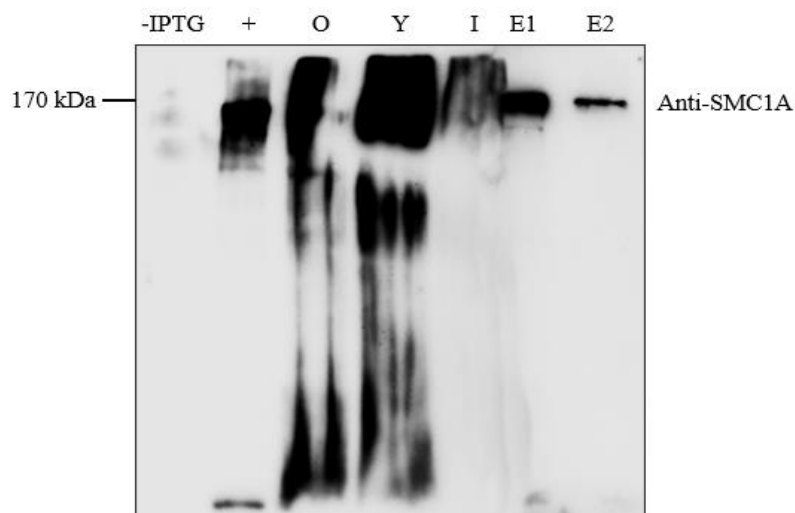
Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της παραπάνω δοκιμής, υγρή καλλιέργεια μεσαίας κλίμακας (400 ml LB-αμπικιλίνης 0,1 mg/ml) εμβολιάστηκε με μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pGEX-4T-1-SMC1A βακτήρια *E.coli* BL21-RIL με σκοπό την έκφραση της πρωτεΐνης GST-SMC1A σε ικανοποιητική ποσότητα. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε την τιμή 0,4 στα 600 nm έγινε προσθήκη του επαγωγέα IPTG ώστε η τελική συγκέντρωσή του να ισούται με 0,75 mM. Μετά από επώαση 3 ωρών στους 28°C, πραγματοποιήθηκαν κατά σειρά λύση των βακτηρίων, συλλογή του διαλυτού κλάσματος ή υπερκλειμένου και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A με σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα με γλουταθειόνη (**Παράγραφος 3.2.1.11.**). Χωρίς την προσθήκη DNAσης η πρωτεΐνη GST-SMC1A εγκλωβίστηκε στο

αδιάλυτο κλάσμα (ίζημα), το οποίο ήταν πολύ ιξώδες, πιθανότατα επειδή δεν έχασε τη συγγένεια της για τη χρωματίνη (**Εικόνα 4.6Α**). Το εμπόδιο αυτό ξεπεράστηκε με την προσθήκη 1 μg DNAσης στο ομογενοποίημα των βακτηρίων. Όπως διαπιστώνεται από τα σκέλη **Β**) και **Γ**) της **εικόνας 4.6** η GST-SMC1A εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο διαλυτό κλάσμα μετά την προσθήκη DNAσης και παραλαμβάνεται κατά την έκλουση με διάλυμα γλουταθειόνης αποδίδοντας 0,2 mg πρωτεΐνης ανά ml διαλύματος,

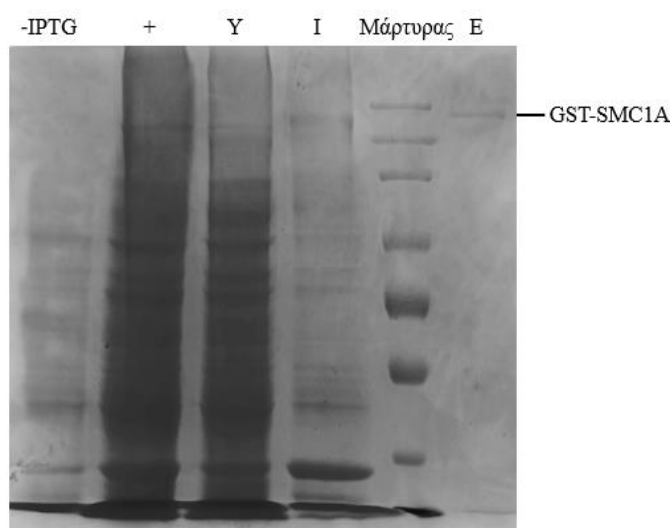
A)



B)



Γ)



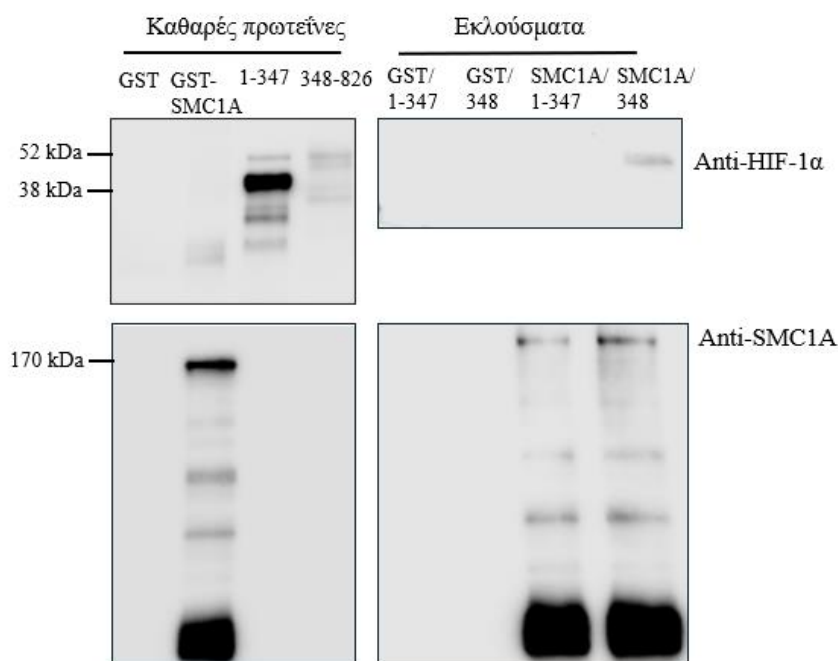
Εικόνα 4.6. Καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A χωρίς κατεργασία με DNAση και ανάλυση των κλασμάτων από την πορεία του καθαρισμού με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα απέναντι στην SMC1A (**A**). Επανάληψη του καθαρισμού της πρωτεΐνης GST-SMC1A μετά από κατεργασία με DNAση και ανάλυση των κλασμάτων με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα απέναντι στην SMC1A (**B**) και με χρώση με Coomassie Brilliant Blue (**Γ**). -IPTG: απουσία IPTG, +: παρουσία IPTG, Y: υπερκείμενο ή διαλυτό κλάσμα, I: ίζημα ή αδιάλυτο κλάσμα, Μάρτυρας: μάρτυρας μοριακών βαρών, E: έκλουσμα.

4.7. Δοκιμή αλληλεπίδρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A με καθαρισμένα τμήματα του HIF-1α *in vitro*.

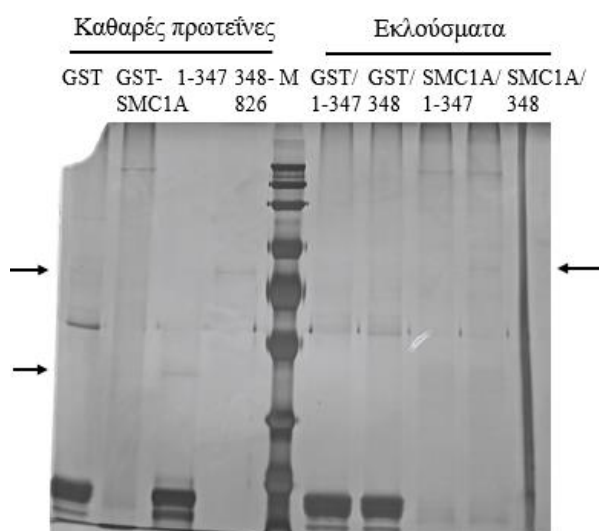
Η πρωτεΐνη GST-SMC1A παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή και στη συνέχεια, 5 μg αυτής καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης για να διαπιστωθεί εάν αλληλεπιδρά με τον HIF-1α *in vitro*. Για τον σκοπό αυτό, δύο θραύσματα του HIF-1α με τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-347 και 348-826, από τα οποία είχε αποκοπεί ο επίτοπος GST στο πλαίσιο προηγούμενης μελέτης του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Π.Θ. [53], προστέθηκαν στα σφαιρίδια αγαρόζης όπου ήταν καθηλωμένη η GST-SMC1A και σε ποσότητα 5 μg ανά θραύσμα. Αρνητικά δείγματα ελέγχου της δοκιμής αλληλεπίδρασης αποτέλεσαν σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης με καθηλωμένο το πεπτίδιο GST όπου προστέθηκε αντίστοιχη με τα παραπάνω ποσότητα από έκαστα τα θραύσματα του HIF-1α. Μετά από επώαση 16 ωρών στους 4 °C υπό κυκλική ανάδευση, έγινε έκλυση των πρωτεϊνών που ήταν συνδεδεμένες με τα σφαιρίδια αγαρόζης με διάλυμα Laemmli και ανάλυση αυτών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (9% w/v) και ανοσοαποτύπωση ή χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της δοκιμής, η GST-SMC1A αλληλεπιδρά με το θραύσμα του HIF-1α που περιέχει τα

αμινοξικά κατάλοιπα 348-826 και η αλληλεπίδραση τους είναι άμεση και ειδική καθώς δεν υπάρχει σήμα στο αντίστοιχο δείγμα ελέγχου (εικόνα 4.7).

A)



B)

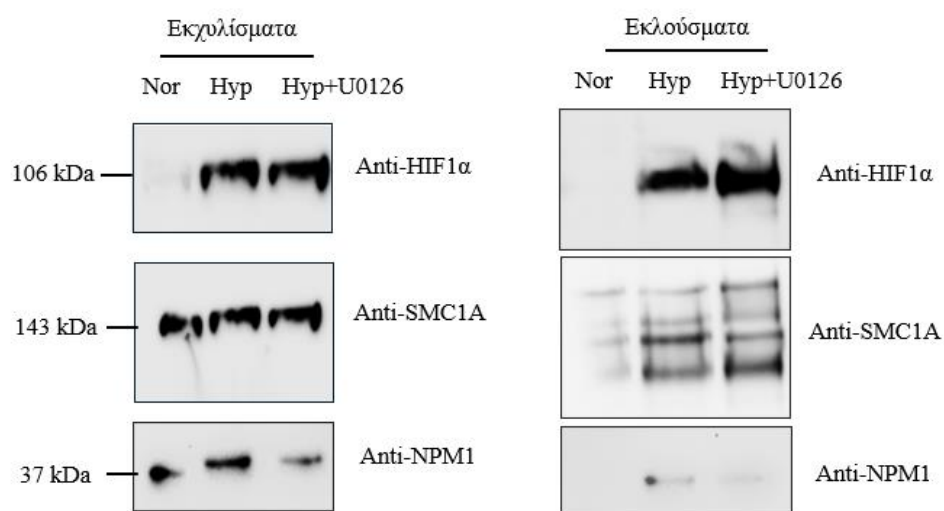


Εικόνα 4.7. Δοκιμή αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης GST-SMC1A με θραύσματα του HIF-1α *in vitro*. Ανάλυση των καθαρών πρωτεϊνών και των εκλουσμάτων με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα απέναντι στην SMC1A και στον HIF-1α (A) και μετά από χρώση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue (B). Στο αριστερό μέρος των εικόνων παρατίθενται οι καθαρές πρωτεΐνες: GST (δείγμα ελέγχου), GST-SMC1A και τα θραύσματα 1-347 και 348-826 του HIF-1α. Αντίστοιχα, στο δεξιό μέρος παρατίθενται τα εκλούσματα: GST + HIF-1α-1-347/ HIF-1α-348-826 και GST-SMC1A + HIF-1α-1-

347/ HIF-1α-348-826. Αναγράφονται τα μοριακά βάρη της πρωτεΐνης GST-SMC1A (170 kDa) και των θραυσμάτων 1-347 (38 kDa) και 348-826 (52 kDa) του HIF-1α. Με βέλη υποδεικνύονται οι ζώνες των θραυσμάτων του HIF-1α. (M: Μάρτυρας μοριακών βαρών).

4.8. Ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α από κύτταρα Huh7.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης SMC1A με τον HIF-1α *in vitro*, για να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση τους στο κύτταρο πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α κυττάρων Huh7. Για τη διεξαγωγή του πειράματος καλλιεργήθηκαν κύτταρα Huh7 σε τρεις συνθήκες: νορμοξία (21% O₂), υποξία (1% O₂) και υποξία (1% O₂) παρουσία 5 μM του αναστολέα U0126 των κινασών MEK (Mitogen-activated protein kinase). Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν και συλλέχθηκε το διαλυτό τους κλάσμα το οποίο εισήχθη σε 200 μl εναιωρήματος μαγνητικών σφαιριδίων συζευγμένων με την πρωτεΐνη A. Επιπλέον, προστέθηκε στο διάλυμα 1μg αντισωμάτων IgG που δεσμεύουν τον ενδογενή HIF-1α και ακολούθησε επώαση 16 ωρών στους 4°C υπό κυκλική ανάδευση. Η έκλυση του HIF-1α και των πρωτεϊνών που είχαν συγκατακρημνιστεί με αυτόν έγινε με διάλυμα Laemmli (Παράγραφος 3.2.2.6). Από την ανάλυση των εκλουσμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (9% w/v) και ανοσοαποτύπωση διαπιστώθηκε ότι με τον ενδογενή HIF-1α συγκατακρημνίζεται η πρωτεΐνη SMC1A και η ποσότητα αυτής ελαττώνεται παρουσία του αναστολέα U0126 (Εικόνα 4.8). Από την παρατήρηση αυτή προκύπτει το συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 πιθανότατα επηρεάζει την αλληλεπίδραση του με την SMC1A. Επίσης, η παρουσία πολλαπλών ζωνών πλησίον της ζώνης της SMC1A στο ανοσοαποτύπωμα της εικόνας 4.8 ερμηνεύεται από το γεγονός ότι ο βρασμός των δειγμάτων στους 95°C δεν διήρκεσε για επαρκές χρονικό διάστημα και πιθανότατα οι πολλαπλές ζώνες αντιστοιχούν σε αλυσίδες των αντισωμάτων IgG. Η ανοσοανίχνευση της νουκλεοφοσμίνης-1 (NPM1) αποτέλεσε το θετικό δείγμα ελέγχου γιατί είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τον φωσφορυλιωμένο HIF-1α στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643 και οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 [53].

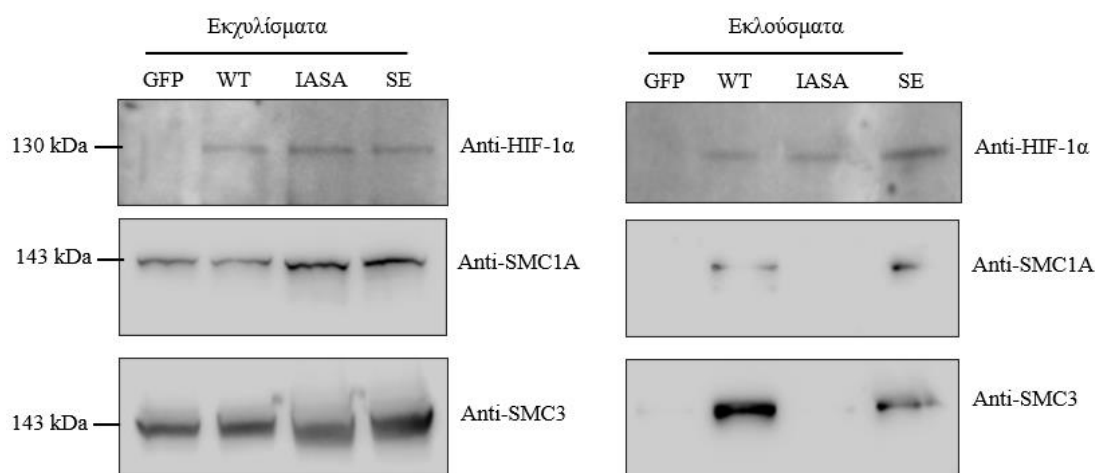


Εικόνα 4.8. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων κυττάρων Huh7 και των εκλουσμάτων που προκύπτουν μετά από ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), υποξίας (1% O₂) και υποξίας (1% O₂) παρουσία του αναστολέα U0126. Παρουσιάζονται τα αντισώματα με τα οποία έγινε η ανοσοαποτύπωση και το μοριακό μέγεθος όπου εντοπίζονται οι αντίστοιχες ζώνες.

4.9. Ανοσοκατακρήμνιση με τη μέθοδο RECLIP του GFP-HIF-1α από σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν στην υποξία τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α.

Σύμφωνα με παραπάνω αποτελέσματα, υπήρχε η ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη SMC1A εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-1α στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με την μέθοδο RECLIP της GFP, του αγρίου τύπου (WT) HIF-1α και των μεταλλαγμένων μορφών του, IASA και SE. Αναλυτικότερα, η IASA μορφή του HIF-1α φέρει αλανίνη στη θέση της σερίνης 641 (S641→A) και έχει καταργηθεί το υδρόφοβο σήμα εξόδου του από τον πυρήνα (ILI(637-639)→A), ενώ, η SE μορφή του HIF-1α φέρει γλουταμικό στη θέση της σερίνης 641 (S641→E), και επομένως, μιμείται την κατάσταση φωσφορυλίωσης του από τις ERK1/2. Οι παραπάνω μορφές του HIF-1α εκφράζονται σταθερά στην υποξία σε τροποποιημένες σειρές κυττάρων HeLa που δεν εκφράζουν τον ενδογενή HIF-1α [57]. Πριν τη λύση των κυττάρων έλαβε χώρα η μονιμοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης με τον παράγοντα μονιμοποίησης DSP, η δράση του οποίου αντιστρέφεται με την προσθήκη DTT (Παράγραφος 3.2.2.7.). Η ανοσοκατακρήμνιση του GFP-HIF-1α έγινε με σφαιρίδια

αγαρόζης ομοιοπολικά συνδεδεμένα με αντισώματα που αναγνωρίζουν τον επίτοπο GFP (GFP-trap). Τα κύτταρα που εκφράζουν την GFP (δείγμα ελέγχου) ή την GFP συζευγμένη με τις διάφορες μορφές του HIF-1α παρέμειναν για 24 ώρες στον υποξικό θάλαμο (1% O₂). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν κατά σειρά μονιμοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της χρωματίνης, λύση των κυττάρων και επώαση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τα σφαιρίδια αγαρόζης. Η έκλυση των συγκατακρημνισμένων με τον HIF-1α πρωτεϊνών έγινε με DTT και η έκλυση της GFP ή των διαφόρων GFP-HIF1α μορφών έγινε με διάλυμα Laemmli. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (9% w/v) και ανοσοαποτύπωση, και όπως διαπιστώνεται από την **εικόνα 4.9**, μόνο με τον αγρίου τύπου (WT) HIF-1α και την φωσφομιμητική του μορφή (SE) συγκατακρημνίζονται οι υπομονάδες SMC1A/3 του συμπλόκου των κοεζινών.



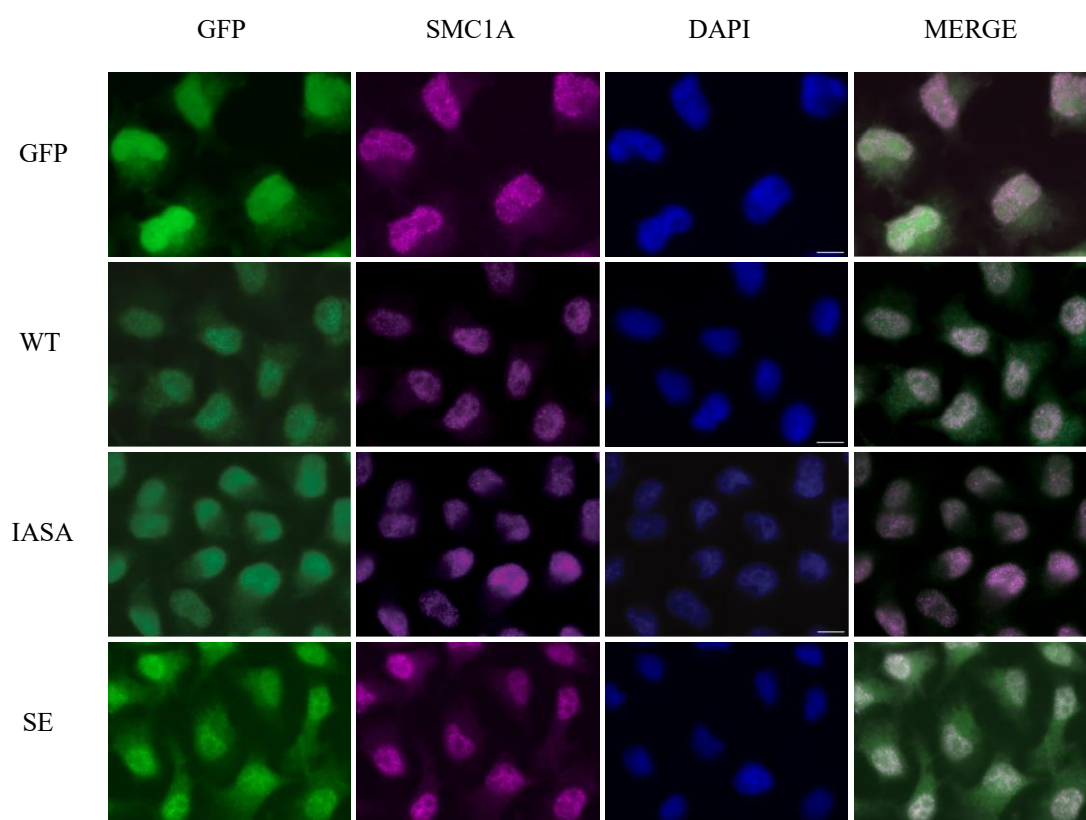
Εικόνα 4.9. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa που εκφράζουν σταθερά στην υποξία την GFP και τις WT, IASA και SE μορφές του GFP-HIF-1α και των εκλουσμάτων που προκύπτουν μετά από ανοσοκατακρήμνιση του GFP-HIF-1α με τη μέθοδο RECLIP. Αναγράφονται τα αντισώματα με τα οποία έγινε η ανοσοαποτύπωση και το μοριακό μέγεθος όπου εντοπίζονται οι αντίστοιχες ζώνες.

4.10. Έλεγχος του συνεντοπισμού των διαφόρων μορφών του GFP-HIF-1α με την πρωτεΐνη SMC1A με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.

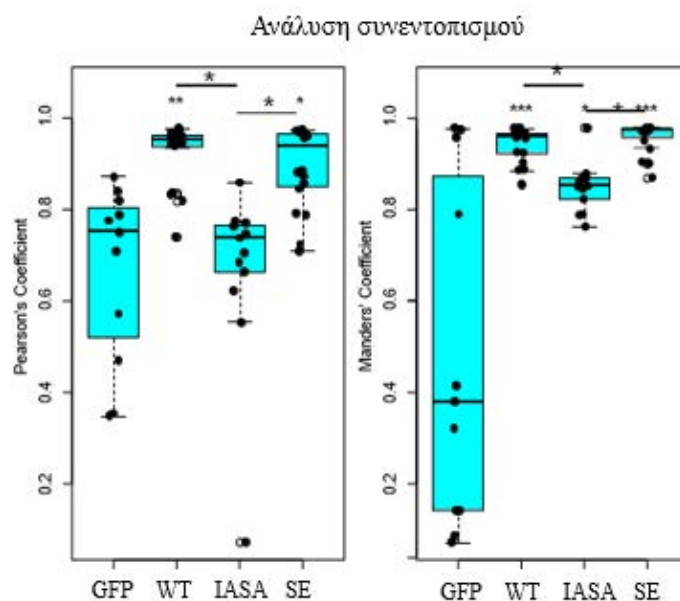
Δεδομένου ότι υφίσταται η αλληλεπίδραση του αγρίου τύπου (WT) HIF-1α και της φωσφομιμητικής του μορφής (SE) με την πρωτεΐνη SMC1A στο κύτταρο, ελέγξαμε τον συνεντοπισμό τους με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα HeLa που εκφράζουν στην υποξία την πρωτεΐνη GFP και τις WT, IASA και SE μορφές του GFP-HIF-1α καλλιεργήθηκαν επάνω σε καλυπτρίδες και εφαρμόστηκε

υποξία (1% O₂) για 24 ώρες. Στη συνέχεια, η μεμβράνη των κυττάρων έγινε διαπερατή με κατάλληλη κατεργασία (**Παράγραφος 3.2.2.8.**) ώστε το εσωτερικό τους να καταστεί προσβάσιμο στα αντισώματα. Στην **εικόνα 4.10A** με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται ο φθορισμός της GFP που είναι είτε ασύζευκτη (δείγμα ελέγχου) είτε συζευγμένη με τις διάφορες μορφές του HIF-1α, με μωβ χρώμα παρουσιάζεται ο ανοσοφθορισμός της SMC1A και με μπλε χρώμα σημαίνεται το DNA (χρωστική DAPI). Το λευκό χρώμα στο MERGE σημαίνει την αλληλοεπικάλυψη του πράσινου και του μωβ καναλιού, δηλαδή, την ταυτόχρονη παρουσία στο σημείο του πράσινου και του μωβ σήματος. Από την ανάλυση των εικόνων της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού με υπολογισμό των συντελεστών συσχέτισης Pearson's και Manders' του συνεντοπισμού των διαφόρων μορφών του GFP-HIF-1α με την SMC1A, προκύπτει ότι η SMC1A συνεντοπίζεται κυρίως με τις WT και SE μορφές του HIF-1α παρά με την IASA μορφή του HIF-1α (**Εικόνα 4.10B**).

A)



B)

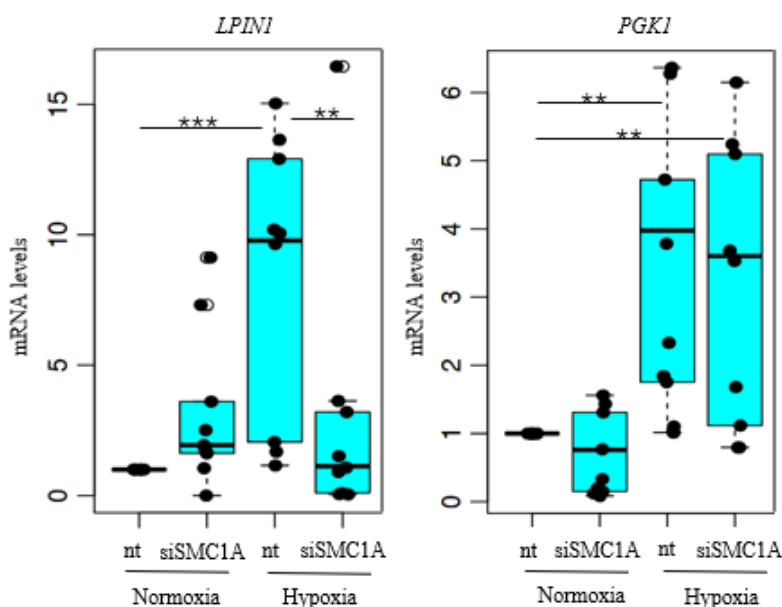


Εικόνα 4.10. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για την παρατήρηση του συνεντοπισμού των WT, IASA και SE μορφών του GFP-HIF-1α με την πρωτεΐνη SMC1A στην υποξία (1% O₂). Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η GFP η οποία είναι είτε ασύζευκτη (δείγμα ελέγχου) είτε συζευγμένη με τον HIF-1α, με μωβ χρώμα απεικονίζεται η SMC1A και με μπλε χρώμα απεικονίζεται το DNA (χρωστική DAPI) (Α). Αναλύσεις συνεντοπισμού με υπολογισμό των συντελεστών συσχέτισης Pearson's και Manders' των διαφόρων μορφών του GFP-HIF-1α με την SMC1A στην υποξία μετά από μέτρηση 100 περίπου κυττάρων ανά συνθήκη (κάθε μαύρο σημείο στο διάγραμμα αναπαριστά τον μέσο όρο των κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε εικόνα και η μαύρη γραμμή τον μέσο όρο του συντελεστή για κάθε πείραμα) (Β). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.11. Πραγματοποίηση RT-qPCR αντίδρασης (Reverse Transcription-quantitative PCR) για τα γονίδια *LPIN1* και *PGK1* σε κύτταρα Huh7 όπου έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου *SMC1A*.

Επιβεβαιώθηκε ότι η πρωτεΐνη SMC1A αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, και στη συνέχεια, διερευνήσαμε τον ρόλο της αλληλεπίδρασης αυτής σε λειτουργικό επίπεδο αποσιωπώντας το γονίδιο *SMC1A* σε κύτταρα Huh7 (Παράγραφος 3.2.2.4.). Μετά την πάροδο 24 ωρών από την αποσιώπηση, τα κύτταρα επωάστηκαν σε 21% ή 1% O₂ για 24 ώρες και απομονώθηκε το ολικό τους RNA (Παράγραφος 3.2.2.3.) ώστε να πραγματοποιηθεί RT-qPCR αντίδραση (Παράγραφοι 3.2.2.9. και 3.2.2.10.) για δύο γονίδια-στόχους του HIF-1, τα *LPIN1* και *PGK1*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν, αντίστοιχα, τα ένζυμα λιπίνη-1 και κινάση του φωσφογλυκερικού-1 που καταλύουν κατά σειρά τη μετατροπή του φωσφατιδικού οξέος (Phosphatidic acid, PA) σε

διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol, DAG) και του 1,3-φωσφογλυκερικού (1,3-Biphosphoglyceric acid, BPG) σε 3-φωσφογλυκερικό (3-Phosphoglyceric acid, PGA). Από την **εικόνα 4.11** διαπιστώνεται ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της *SMC1A* οδηγεί σε ελάττωση της μεταγραφής του γονιδίου *LPIN1* αλλά όχι του *PGK1* στην υποξία. Επομένως, η *SMC1A* είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή ενός υποσυνόλου από τα γονίδια-στόχους του HIF-1.

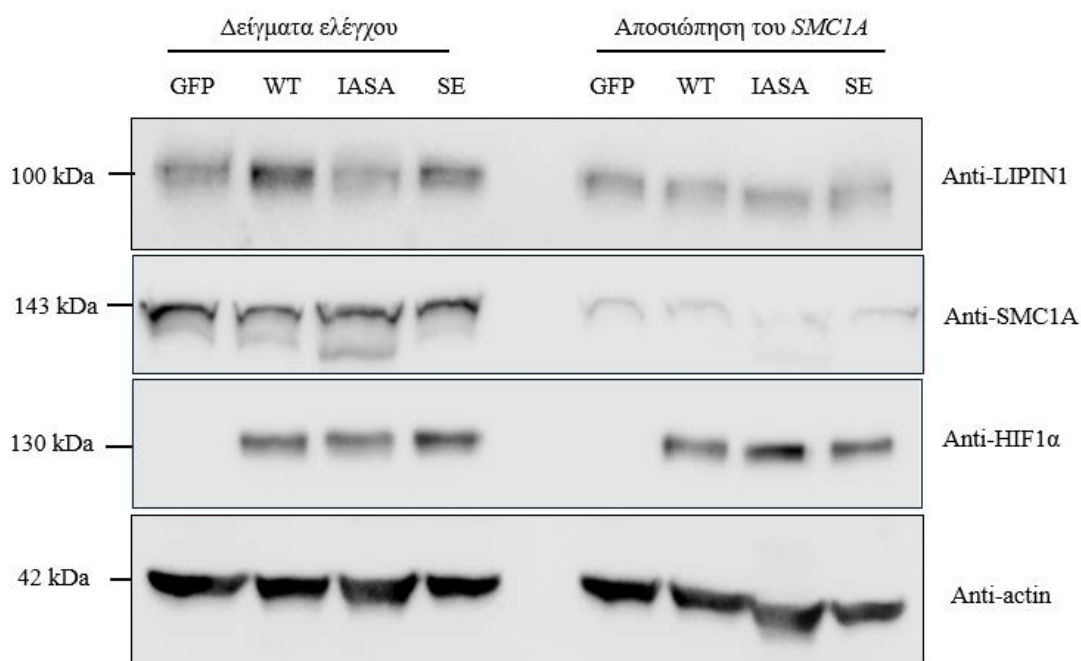


Εικόνα 4.11. Διαγράμματα που παρουσιάζουν τα επίπεδα mRNA δύο γονιδίων-στόχων του HIF-1, των *LPIN1* και *PGK1* σε κύτταρα Huh7 που αναπτύχθηκαν σε νορμοξία (21% O₂) και υποξία (1% O₂) μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *SMC1A*. Nt: Non-targeted siRNA, siSMC1A: *SMC1A*-targeted siRNA. ** p < 0,01, ***p < 0,001.

4.12. Μελέτη της έκφρασης της λιπίνης-1 σε κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν σταθερά στην υποξία τις διάφορες μορφές του HIF-1α μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *SMC1A*.

Για να επιβεβαιώσουμε το παραπάνω αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου *SMC1A* (**Παράγραφος 3.2.2.4.**) σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές HeLa που εκφράζουν στην υποξία την GFP και τις WT, IASA και SE μορφές του GFP-HIF-1α. Μετά την πάροδο 24 ωρών, εφαρμόστηκε υποξία (1% O₂) για 24 ώρες και στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (9% w/v) και ανοσοαποτύπωση για την παρακολούθηση της έκφρασης της λιπίνης-1 (LIPIN-1). Στο ανοσοαποτύπωμα της **εικόνας 4.12**, παρατηρούμε ότι παρουσία της πρωτεΐνης *SMC1A* η έκφραση της λιπίνης-1 είναι ισχυρότερη στα κύτταρα που εκφράζουν τον αγρίου

τύπου (WT) HIF-1α και την φωσφομιμητική του μορφή (SE) συγκριτικά με αυτά που εκφράζουν την IASA μορφή του HIF-1α και την πρωτεΐνη GFP. Μετά τη σίγαση του γονιδίου *SMC1A*, η έκφραση της λιπίνης-1 ελαττώνεται σημαντικά στα κύτταρα που εκφράζουν τον WT και την SE μορφή του HIF-1α και παραμένει αμετάβλητη στα κύτταρα που εκφράζουν την IASA μορφή του HIF-1α και στο GFP-δείγμα ελέγχου. Επομένως, η *SMC1A* συνεργάζεται με τον φωσφορυλιωμένο HIF-1α για να επάγει την έκφραση της λιπίνης-1.



Εικόνα 4.12. Ανοσοαποτύπωση της λιπίνης-1 (LIPIN-1), του HIF-1α και της *SMC1A* σε εκχυλίσματα σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών HeLa που εκφράζουν στην υποξία την GFP και τις WT, IASA και SE μορφές του GFP-HIF-1α παρουσία της πρωτεΐνης *SMC1A* (δείγματα ελέγχου) και κατά την αποσιώπηση του γονιδίου της. Η ανοσοανίχνευση της ακτίνης εξυπηρετεί τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Αναγράφονται τα αντισώματα με τα οποία έγινε η ανοσοαποτύπωση και τα μεγέθη των αντίστοιχων ζωνών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας και θεωρείται απαραίτητο για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των αερόβιων οργανισμών [1]. Η υποξία είναι η παρουσία χαμηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου από τις φυσιολογικές και αποτελεί χαρακτηριστικό φυσιολογικών καταστάσεων (εμβρυϊκή ανάπτυξη, παρουσία σε μεγάλο υψόμετρο, έντονη σωματική άσκηση) και παθολογικών (ισχαιμία, καρκίνος) [7]. Ο ταχύς πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων στους συμπαγείς όγκους καταναλώνει γρήγορα το διαθέσιμο οξυγόνο με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποξικών περιοχών στο εσωτερικό τους. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από ανθεκτικότητα στην ακτινο-/χημειοθεραπεία και κακή πρόγνωση του καρκίνου [3, 6].

Η υποξία ενεργοποιεί μία σειρά φυσιολογικών, μεταγραφικών, και μεταφραστικών αποκρίσεων που οδηγούν σε α) αύξηση του αναπνευστικού και του καρδιακού ρυθμού, β) προσωρινή παύση του κυτταρικού κύκλου, γ) ελάττωση του ρυθμού διεξαγωγής των ενεργειακά ακριβών διεργασιών, όπως η πρωτεϊνσύνθεση, δ) επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού, ε) βιοσύνθεση παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση (*EPO*, *VEGF*) και την κυτταρική επιβίωση [1, 4].

Σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία, διαδραματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) που ανακαλύφθηκε το 1992 από τους Wang και Semenza ως μία πρωτεΐνη που επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης [3, 6]. Ο HIF-1 συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia response elements, HREs) με τη συναινετική αλληλουχία 5'-RCGTG-3' για να ασκήσει τη μεταγραφική του δράση [8, 9]. Επιπλέον, αποτελείται από δύο υπομονάδες (HIF- α -HIF- β) που κατά κύριο λόγο διαφέρουν ως προς την παρουσία της επικράτειας οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (Oxygen-dependent degradation domain, ODDD) η οποία εντοπίζεται μόνο στην HIF- α υπομονάδα [10, 11]. Η HIF- α υπομονάδα υπάρχει σε τρεις ισομορφές (HIF-1 α , HIF-2 α και HIF-3 α) που αποτελούν προϊόντα διαφορετικών γονιδίων και η HIF-1 α αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Αποτελέσματα από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και φασματοσκοπίας μάζας (RIME) έδειξαν ότι ο HIF-1 α αλληλεπιδρά με την SMC1A υπομονάδα του συμπλόκου των κοεζινών. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτέλεσε η διερεύνηση και η κατανόηση του ρόλου της εν λόγω αλληλεπίδρασης για την προσαρμογή των

κυττάρων στην υποξία. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν (i) κλωνοποίηση του cDNA του *SMC1A* γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1, (ii) υπερέκφραση σε βακτήρια και καθαρισμός με χρωματογραφία αγκιστείας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-SMC1A, (iii) δοκιμές αλληλεπίδρασης της GST-SMC1A με δύο θραύσματα του HIF-1α *in vitro*, (iv) ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς HIF-1α από κύτταρα Huh7 και των WT, IASA και SE μορφών του GFP-HIF-1α από σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα HeLa εκφράζουν στην υποξία τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α, (v) μικροσκοπία ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο του συνεντοπισμού της πρωτεΐνης SMC1A με τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α και (vi) μέτρηση των επιπέδων mRNA δύο γονιδίων-στόχων του HIF-1, των *LPIN1* και *PGK1*, μετά την αποσιώπηση του γονιδίου της SMC1A σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O₂).

Από τις δοκιμές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης GST-SMC1A με τα θραύσματα 1-347 και 348-826 του HIF-1α προέκυψε ότι η SMC1A αλληλεπιδρά άμεσα και ειδικά με το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α που οριοθετείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 348 έως 826 και περιλαμβάνει τις θέσεις φωσφορυλίωσης του από τις κινάσες ERK1/2 και τις επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation domains, TADs) [9]. Επιπλέον, από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με τη μέθοδο RECLIP (Reverse cross-link immunoprecipitation) διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση των SMC1A-HIF-1α είναι ισχυρότερη για την αγρίου τύπου (WT) και την φωσφομιμητική μορφή (SE) του HIF-1α συγκριτικά με την IASA μορφή του. Άρα, η υπό μελέτη αλληλεπίδραση ενισχύεται παρουσία της φωσφορυλιωμένης σερίνης 641 του HIF-1α. Επίσης, από τον υπολογισμό των συντελεστών συσχέτισης του ενδοκυττάρου συνεντοπισμού των διαφόρων μορφών του GFP-HIF-1α με την πρωτεΐνη SMC1A κατά την ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού, επαληθεύτηκε ότι η SMC1A συνεντοπίζεται κυρίως με τις WT και SE μορφές του HIF-1α. Αξίζει να σημειωθεί ότι με αυτές τις μορφές του HIF-1α συγκατακρημνίζεται και η SMC3 υπομονάδα του συμπλόκου των κοεζινών, είναι πιθανό, λοιπόν, ότι όλο το σύμπλοκο των κοεζινών να αλληλεπιδρά με τον HIF-1.

Το σύμπλοκο των κοεζινών είναι γνωστό ότι κρατάει συνδεδεμένες τις αδελφές χρωματίδες εξασφαλίζοντας τον σωστό διαχωρισμό τους στην ανάφαση της μίτωσης. Επιπλέον, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA, στην επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων του με ομόλογο ανασυνδυασμό και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [66]. Ο καθαρισμός ικανοποιητικής ποσότητας της πρωτεΐνης GST-SMC1A

επετεύχθη μόνο μετά την προσθήκη DNAσης στο ομογενοποίημα των βακτηρίων, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή σύνδεση της και πιθανότατα ολόκληρου του συμπλόκου στη χρωματίνη. Έγινε ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA δύο γονιδίων-στόχων του HIF-1 στη νορμοξία και σε 1% υποξία μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *SMC1A* και διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη *SMC1A* είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή ενός υποσυνόλου από τα γονίδια-στόχους του HIF-1. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε η έκφραση των γονιδίων *LPIN1* και *PGK1* και βρέθηκε ότι η *SMC1A* διεγείρει τη μεταγραφή του *LPIN1* αλλά όχι του *PGK1* στην υποξία. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε κύτταρα Huh7 και σε σταθερά διαμολυσμένα με τις διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α κύτταρα HeLa. Αναλυτικότερα, τα γονίδια *LPIN1* και *PGK1* κωδικοποιούν τα ένζυμα λιπίνη-1 (LIPIN-1) και κινάση του φωσφογλυκερικού-1 που καταλύουν, αντίστοιχα, τη μετατροπή του φωσφατιδικού οξέος (PA) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και του 1,3-φωσφογλυκερικού (1,3-BPG) σε 3-φωσφογλυκερικό (3-PGA). Άρα, η πρωτεΐνη *SMC1A* μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον HIF-1α επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και συγκεκριμένα, στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων. Η δράση της αυτή στηρίζεται στην ικανότητα της να αναδιαμορφώνει τη χρωματίνη και να φέρνει σε εγγύτητα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος όπως υποκινητές και ενισχυτές ή αντίστοιχα, να τα απομακρύνει από την εμβέλεια δράσης των αποσιωπητών (insulators) [69]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην υποξία αναστέλλεται η β-οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και έτσι, αυτά σχηματίζουν τριγλυκερίδια που αποθηκεύονται σε λιποσταγονίδια του κυτταροπλάσματος για να αποφευχθεί η λιποτοξικότητα. Τα τριγλυκερίδια χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τη σύνθεση των μεμβρανών αλλά και την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων των κυττάρων σε συνθήκες επανοξυγόνωσης [4].

Ο προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του HIF-1 που επάγονται από την πρωτεΐνη *SMC1A* καθώς και ο μηχανισμός ενεργοποίησης της μεταγραφή τους βρίσκονται υπό διερεύνηση. Επιπλέον, στο άμεσο μέλλον επρόκειτο να πραγματοποιηθούν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης συνοδευόμενης από αλληλούχηση (Chromatin Immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq), μελέτης της διαμόρφωσης του DNA στον χώρο και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ συγκεκριμένων περιοχών του (Chromosome Conformation Capture, 3C) για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός επαγωγής του γονιδίου *LPIN1* από την *SMC1A*.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309.
2. Lee, J. W., Ko, J., Ju, C., & Eltzschig, H. K. (2019a). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(6), 1–13.
3. Shi, Y., & Gilkes, D. M. (2025a). HIF-1 and HIF-2 in cancer: Structure, regulation, and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 82(1).
4. Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020b). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(5), 268–283.
5. Devlin, C., Greco, S., Martelli, F., & Ivan, M. (2012). Cheminform Abstract: Mir-210: More than a silent player in hypoxia. *ChemInform*, 43(6).
6. Mylonis, I., Chachami, G., & Simos, G. (2021a). Specific inhibition of HIF activity: Can peptides lead the way? *Cancers*, 13(3), 410.
7. Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 771–794.
8. Liu, Z., Wu, Z., Fan, Y., & Fang, Y. (2020a). An overview of biological research on hypoxia-inducible factors (hifs). *Endokrynologia Polska*, 71(5), 432–440.
9. Jiang, B.-H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., & Semenza, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19253–19260.
10. Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., & Kim, K.-W. (2004a). Hypoxia-inducible factor (hif-1) α : Its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine*, 36(1), 1–12.
11. Befani, C., & Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9087–9098.
12. Mandl, M., & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (hif-1 β): Is it a rare exception? *Molecular Medicine*, 20(1), 215–220.
13. Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011a). Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes & Cancer*, 2(12), 1117–1133.
14. Semenza, G. L. (2012a). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408.
15. Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J.-M., Braliou, G. G., Görlich, D., & Simos, G. (2009). Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1A into the nucleus involves Importins 4 and 7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(2), 235–240.
16. Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378–389.

17. Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., & Wu, K.-J. (2008). Direct regulation of twist by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology*, 10(3), 295–305.
18. Semenza, G. L. (2009a). Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*, 114(10), 2015–2019.
19. Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2004). The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *International Review of Cytology*, 157–213.
20. Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual Review of Physiology*, 76(1), 39–56.
21. Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., He, J., & Liang, H. (2010). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(11), 1697–1707.
22. Semenza, G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3664–3671.
23. Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C. V., & Semenza, G. L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, 129(1), 111–122.
24. Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a hif-1 α -dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9030–9037.
25. Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., & Dewhirst, M. W. (2008b). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*.
26. Triantafyllou, E.-A., Georgatsou, E., Mylonis, I., Simos, G., & Paraskeva, E. (2018). Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(9), 1142–1152.
27. Mylonis, I., Sembongi, H., Befani, C., Liakos, P., Siniosoglou, S., & Simos, G. (2012). Hypoxia causes triglyceride accumulation via HIF-1-mediated stimulation of Lipin 1 expression. *Journal of Cell Science*.
28. Metallo, C., Gameiro, P., Heiden, M. V., Ilioupoulos, O., & Stephanopoulos, G. (2012). Abstract 1001: Reductive tricarboxylic acid metabolism of glutamine mediates lipogenesis under hypoxia. *Cancer Research*, 72(8_Supplement), 1001–1001.
29. Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovičová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J., & Pastoreková, S. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letters*, 577(3), 439–445.

30. Xu, L., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2002). Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway. mechanism of low pH-induced VEGF. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19242.
31. Kato, Y., Nakayama, Y., Umeda, M., & Miyazaki, K. (1992). Induction of 103-KDA gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11424–11430.
32. Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., Baek, J. H., & Semenza, G. L. (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of *E-cadherin* in von hippel-lindau tumor suppressor–null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Research*, 66(5), 2725–2731.
33. Li, Y., Sun, X.-X., Qian, D. Z., & Dai, M.-S. (2020). Molecular crosstalk between Myc and HIF in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
34. Abu-Hamad, S., Arbel, N., Calo, D., Arzoine, L., Israelson, A., Keinan, N., Ben-Romano, R., Friedman, O., & Shoshan-Barmatz, V. (2009). The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *Journal of Cell Science*, 122(11), 1906–1916.
35. Nussberger, S. (2009). Faculty opinions recommendation of the VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*.
36. Roberts, D. J., & Miyamoto, S. (2015). Erratum: Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and forcing to autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 22(2), 364–364.
37. Brahimi-Horn, M. C., Ben-Hail, D., Ilie, M., Gounon, P., Rouleau, M., Hofman, V., Doyen, J., Mari, B., Shoshan-Barmatz, V., Hofman, P., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2012). Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance. *Cancer Research*, 72(8), 2140–2150.
38. Chen, N., Chen, X., Huang, R., Zeng, H., Gong, J., Meng, W., Lu, Y., Zhao, F., Wang, L., & Zhou, Q. (2009). Bcl-XL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 10004–10012.
39. Ewings, K. E., Wiggins, C. M., & Cook, S. J. (2007). Bim and the pro-survival bcl-2 proteins: Opposites attract, Erk repels. *Cell Cycle*, 6(18), 2236–2240.
40. Yfantis, A., Mylonis, I., & Simos, G. (2023). Direct interaction between Mortalin and hif-1 α at the mitochondria inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax. *The FEBS Journal*, 290(15), 3764–3780.
41. Bakleh, M. Z., & Al Haj Zen, A. (2025). The distinct role of HIF-1 α and HIF-2 α in hypoxia and angiogenesis. *Cells*, 14(9), 673.
42. Acuña-Pilarte, K., & Koh, M. Y. (2025). The HIF axes in cancer: Angiogenesis, metabolism, and immune-modulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 50(8), 677–694.
43. Koh, M. Y., Spivak-Kroizman, T. R., & Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(11), 526–534.

44. FANDREY, J., GORR, T., & GASSMANN, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Research*, 71(4), 642–651.
45. Mylonis, I., Chachami, G., & Simos, G. (2021a). Specific inhibition of HIF activity: Can peptides lead the way? *Cancers*, 13(3), 410.
46. LANCASTER, D. E., McNEILL, L. A., McDONOUGH, M. A., APLIN, R. T., HEWITSON, K. S., PUGH, C. W., RATCLIFFE, P. J., & SCHOFIELD, C. J. (2004). Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochemical Journal*, 383(3), 429–437.
47. Déry, M.-A. C., Michaud, M. D., & Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3), 535–540.
48. Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2570–2581.
49. van Uden, P., Kenneth, N. S., & Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF-KB. *Biochemical Journal*, 412(3), 477–484.
50. Papadakis, A. I., Paraskeva, E., Peidis, P., Muaddi, H., Li, S., Raptis, L., Pantopoulos, K., Simos, G., & Koromilas, A. E. (2010). EIF2 α kinase PKR modulates the hypoxic response by STAT3-dependent transcriptional suppression of hif-1 α . *Cancer Research*, 70(20), 7820–7829.
51. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., & Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33095–33106.
52. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27620–27627.
53. Koukoulas, K., Giakountis, A., Karagiota, A., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G., & Mylonis, I. (2021). Erk signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through hif-1 α interaction with NPM1. *Molecular Oncology*, 15(12), 3468–3489.
54. Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., & Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14013–14019.
55. Mylonis, I., Kourti, M., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Simos, G. (2017). Mortalin-mediated and Erk-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *Journal of Cell Science*, 130(2), 466–479.
56. Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell Science*, 123(17), 2976–2986.

57. Arseni, C., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G., & Mylonis, I. (2024). Combinatorial regulation by ERK1/2 and CK1 Δ protein kinases leads to hif-1 α association with microtubules and facilitates its symmetrical distribution during mitosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81(1).
58. Brahimi-Horn, C., Mazure, N., & Pouyssegur, J. (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cellular Signalling*, 17(1), 1–9.
59. Lim, J.-H., Lee, Y.-M., Chun, Y.-S., Chen, J., Kim, J.-E., & Park, J.-W. (2010a). SIRTUIN 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular Cell*, 38(6), 864–878.
60. Tojo, M., Matsuzaki, K., Minami, T., Honda, Y., Yasuda, H., Chiba, T., Saya, H., Fujii-Kuriyama, Y., & Nakao, M. (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46576–46585.
61. Yasinska, I. M., & Sumbayev, V. V. (2003). *s*-nitrosation of cys-800 of hif-1 α protein activates its interaction with P300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Letters*, 549(1–3), 105–109.
62. Lin, J., Kato, M., Nagata, K., & Okuwaki, M. (2016). Efficient DNA binding of NF-KB requires the chaperone-like function of NPM1. *Nucleic Acids Research*.
63. Lu, W., Lee, N. P., Kaul, S. C., Lan, F., Poon, R. T. P., Wadhwa, R., & Luk, J. M. (2011a). Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. *International Journal of Cancer*, 129(8), 1806–1814.
64. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., & Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Development*, 14(1), 34–44.
65. Suzuki, H., Tomida, A., & Tsuruo, T. (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 α as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene*, 20(41), 5779–5788.
66. Yfantis, A., Mylonis, I., Chachami, G., Nikolaidis, M., Amoutzias, G. D., Paraskeva, E., & Simos, G. (2023a). Transcriptional response to hypoxia: The role of HIF-1-associated co-regulators. *Cells*, 12(5), 798.
67. Rittenhouse, N. L., & Downen, J. M. (2024a). Cohesin regulation and roles in chromosome structure and function. *Current Opinion in Genetics & Development*, 85, 102159.
68. Busslinger, G., Stocsits, R., van der Lelij, P. *et al.* Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature* **544**, 503–507 (2017).
69. Zhang, H., Shi, Z., Banigan, E. J., Kim, Y., Yu, H., Bai, X., & Finkelstein, I. J. (2023c). CTCF and R-loops are boundaries of cohesin-mediated DNA looping. *Molecular Cell*, 83(16).
70. Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., & Peters, J.-M. (2019). DNA loop extrusion by human cohesin. *Science*, 366(6471), 1338–1345.