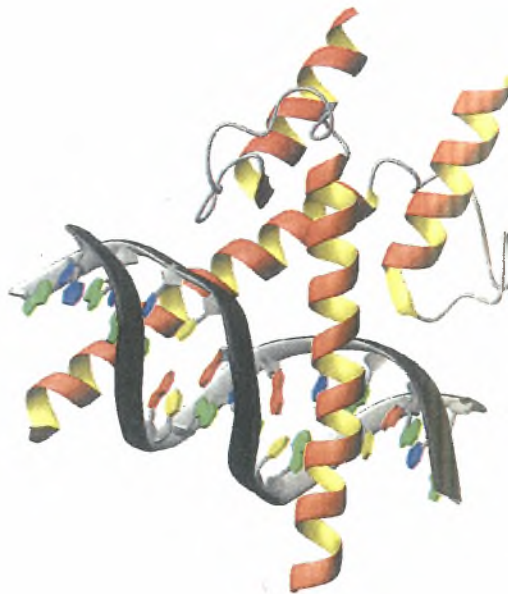




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ  
ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ 348-826 ΜΕ ΜΙΑ  
ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ S→E ΣΤΗ ΘΕΣΗ 641 ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ  
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΑΡΚΑΚΗ ΕΥΑ  
(ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Σ. ΩΝΑΣΗΣ)**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7655/1  
Ημερ. Εισ.: 24-11-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2009  
ΜΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087147

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Υπεύθυνος Καθηγητής:**

Κοντού Μαρία

Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

**Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

- Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Σίμος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Ιατρικής Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Π.Θ.

**Ευχαριστίες:** Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Κοντού Μαρία, υπό την επίβλεψη της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Σταματίνα Γιαννούλη και την Ζωή Καρούλια, υποψήφιες διδάκτορες του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>6</b>
1.1. Υποξία και HIF-1.....	6
1.2. Δομή του HIF-1.....	8
1.3. Ρύθμιση του HIF-1.....	10
1.4. Ρύθμιση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα.....	13
1.5. Κλινική σημασία του HIF-1α.....	16
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>18</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>20</b>
3.1. Υλικά.....	20
3.2. Μέθοδοι.....	23
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>39</b>
4.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> .....	39
4.2. Καθαρισμός πρωτεάσης TEV.....	41
4.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> .....	42
4.4. Δομική μελέτη της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> με τη χρήση Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.....	45
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>47</b>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1, αποτελεί σημείο κλειδί στην απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Ο HIF-1 αποτελείται από δυο υπομονάδες: την HIF-1α και HIF-1β, οι οποίες έχουν δυο χαρακτηριστικές περιοχές, μια περιοχή με μοτίβο έλικας- θηλιάς- έλικας (bHLH) καθώς και μια περιοχή PAS. Οι bHLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό των δυο υπομονάδων και την σύνδεση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, ενώ η περιοχή PAS εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών. Το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α περιέχει επίσης μια περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ODD) και δυο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, τις N- TAD και C- TAD, οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στη σύνδεση άλλων συν-ενεργοποιητών.

Υπο φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης από τις προλυλο-υδροξυλάσες και αυτό οδηγεί τον HIF-1α σε ουβικουτινίωση και αποικοδόμηση μέσω της 26S υπομονάδας του πρωτεασώματος. Επιπλέον, η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης από την πρωτεΐνη FIH- 1 εμποδίζει τη δέσμευση των μεταγραφικών συν- ενεργοποιητών στον HIF-1α και τον καθιστά μεταγραφικά ανενεργό. Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου, η δράση των προλυλο- υδροξυλασών εξασθενίζει , με αποτέλεσμα ο HIF-1α να μην αποικοδομείται. Ταυτόχρονα, σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται η δράση της πρωτεΐνης FIH- 1, με αποτέλεσμα το κατάλοιπο ασπαραγίνης να μην υδροξυλιώνεται και να παραμένει ελεύθερη για τη δέσμευση των μεταγραφικών συν- ενεργοποιητών στον HIF-1α. Ο σταθερός πλέον HIF-1α καθίσταται ικανός να εισέλθει στο πυρήνα και να διμεριστεί με τον ARNT, επάγοντας την έκφραση πλήθους γονιδίων.

Η ρύθμιση του HIF-1α συμβαίνει σε πολλαπλά επίπεδα όπως στην ενεργοποίηση του HIF-1α και σταθεροποίησή του, στην δημιουργία ετεροδιμερούς με τον HIF-1β και την επικείμενη επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, κ.α.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και απομόνωση του καρβοξυτελικού τμήματος του HIF-1α, 348-826 με μια μετάλλαξη S→E στη θέση 641 ώστε να μελετηθεί πως επηρεάζει αυτή η αντικατάσταση τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

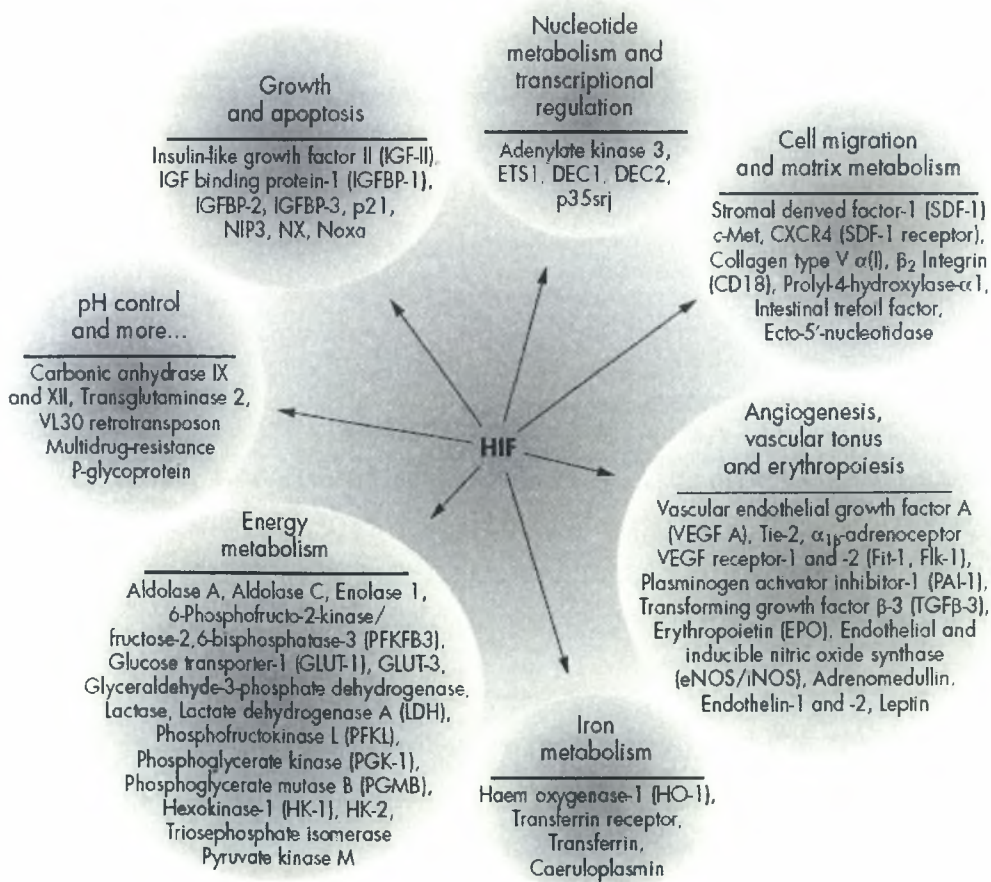
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Υποξία και HIF-1

Όλοι οι ανώτεροι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς για να διατηρούν το οξυγόνο των κυττάρων στα φυσιολογικά επίπεδα, μια και είναι απαραίτητο για την επιβίωση τους. Η ομοιόσταση του οξυγόνου, είναι πολύ σημαντική για τα κύτταρα εφόσον χρησιμοποιούν το οξυγόνο στις περισσότερες και βασικότερες μεταβολικές διεργασίες τους οπότε η έλλειψη του (υποξία) θα δημιουργούσε πολλά προβλήματα στην επιβίωση τους (Berra E. et al., 2008). Ωστόσο και η έκθεση σε υπερβολικά μεγάλες συγκεντρώσεις οξυγόνου είναι απαγορευτική για τα κύτταρα ,διότι σχηματίζονται δραστικές ρίζες οξυγόνου που είναι τοξικές. Στον έλεγχο των επιπέδων οξυγόνου στο κύτταρο παίρνουν μέρος πολλοί μηχανισμοι και μονοπάτια που δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως. Σύμφωνα με κάποιες έρευνές (Wang G.L. et al., 1995) , εικάζεται, πως σαν αισθητήρας οξυγόνου λειτουργεί μια αιμοπρωτεΐνη, η οποία όταν μειώνεται το οξυγόνο ενεργοποιεί ένα μονοπάτι που καταλήγει στην επαγωγή της πρόσδεσης του HIF-1 με το DNA και την μεταγραφή πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την υποξία, μεταξύ αυτών και η ερυθροποιητίνη (EPO) .Αυτό όμως ακόμη δεν έχει επιβεβαιωθεί και έτσι πρέπει να συνεχιστούν οι έρευνες πάνω σ' αυτόν τον τομέα.

Όταν το οξυγόνο δεν επαρκεί στα κύτταρα συμβαίνουν κάποιες αλλαγές ώστε να μειώσουν της επιπτώσεις της υποξίας. Αυτό γίνεται με την έκφραση κάποιων γονιδίων τα οποία προάγουν τον αναερόβιο μεταβολισμό ,το ρυθμό αναπνοής, την ερυθροποίηση ,την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση. Για να συμβούν όλα τα παραπάνω εκφράζονται γλυκολυτικά ένζυμα , ερυθροποιητίνη, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου(VEGF) και η συνθάση του οξειδίου του αζώτου.

Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι πρέπει να υπάρχει ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από την υποξία και οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης όλων των σχετιζόμενων με την υποξία γονιδίων, αυτός είναι ο HIF-1(hypoxia inducible factor 1). Τα γονίδια τα οποία στοχεύει ο HIF-1 είναι παρα πολλά ,ο αριθμός τους ξεπερνά τα 60, και εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Ενδεικτικά αναφέρονται τα εξής: γονίδια που ρυθμίζουν το pH στο κύτταρο (π.χ τρανσγλουταμινάση 2),που οδηγούν σε ερυθροποίηση και μεταφορά σιδήρου στους ιστους(π.χ τρανσφερίνη ),που προάγουν την παραγωγή ATP (π.χ αλδολάση A) και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τέλος γονίδια που αυξάνουν τον μεταβολισμό νουκλεοτιδίων (π.χ αδενυλική κυκλάση 3).



**Εικόνα 1.** Στόχοι του HIF-1α που εξαρτώνται από μεταγραφική ενεργοποίηση(Gaber T. et al., 2005).



Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των γονιδίων είναι πως περιέχουν μια αλληλουχία DNA 5 νουκλεοτιδίων((A/G)CGTG) στην οποία συνδέεται ο HIF-1 και ονομάζεται HBS(hypoxia binding site) .Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται συνήθως μέσα στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων.

## 1.2 Δομή του HIF-1

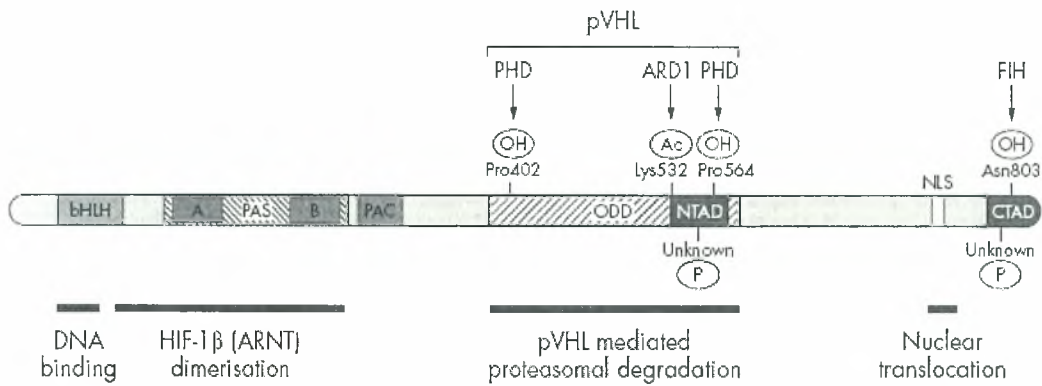
Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο βασικές πρωτεΐνες με μοτίβο έλικας-θηλιάς- έλικας (bHLH) ,την HIF $\alpha$  και την HIF $\beta$ . Οι δύο αυτές πρωτεΐνες περιέχουν και μια PAS περιοχή,η οποία πήρε το όνομά της από τα πρώτα μέλη της οικογένειας που ταυτοποιήθηκαν: τα γονίδια Per και Sim της Drosophila και AHR και ARNT των θηλαστικών(Gaber T. et al., 2005). Χάριν σε αυτές τις περιοχές ο HIF-1 μπορεί να διμερίζεται (PAS) και να συνδέεται στο DNA (bHLH).

### **HIF-1 $\alpha$**

Υπάρχουν πολλές υπομονάδες  $\alpha$  (1 $\alpha$  ,2 $\alpha$  ,3 $\alpha$  ) με σημαντικότερη την 1 $\alpha$  . Η HIF-1 $\alpha$  και η HIF-2 $\alpha$  ( γνωστή και ως EPAS-1) έχουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή και ρυθμίζονται με όμοιο τρόπο. Η HIF-3 $\alpha$  διαφέρει απ' αυτές μιας και δεν έχει C-TAD περιοχή και αναφέρεται ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF.

Εστιάζοντας στον HIF-1 $\alpha$  ,παρατηρούμε πως είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων με μέγεθος 120 kDa.Στο κέντρο περίπου του μορίου υπάρχει μια περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1 $\alpha$  σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ODD: oxygen dependent degradation domain). Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε προλίνες ,που έχουν μεγάλη σημασία για τη φυσιολογική ρύθμιση του HIF-1 $\alpha$ . Στο καρβοξυτελικό άκρο εδράζονται δύο περιοχές μεταγραφικής

ενεργοποίησης η N-TAD και η C-TAD ,οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στη σύνδεση άλλων συν-ενεργοποιητών ,όπως p300/CREB και p160(Gaber T. et al., 2005) . Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζονται η HLH και η PAS περιοχή. Τέλος ο HIF-1α περιέχει και δύο σηματοδοτικές αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού(NLS) το N-NLS και το C-NLS, με σημαντικότερο το τελευταίο.



**Εικόνα 2.** Δομή του HIF-1α και παράγοντες που αλληλεπιδρούν. Περιοχές : NLS( nuclear localization signal), bHLH( DNA binding and dimerisation), PAS, PAC( PAS associated C-terminal comain), NTAD,CTAD. Παράγοντες: PHD( HIF prolyl hydroxylase), FIH(factor inhibiting HIF), ARD1( ADP ribosylation factor domain), pVHL(Gaber T. et al., 2005).

## HIF-1β

Ο HIF-1β (γνωστός και ως ARNT) είναι απαραίτητος για το διμερισμό με τον HIF-1α και την μετέπειτα προσδεσή του στο DNA ώστε να επάγει τα σχετιζόμενα με την υποξία γονίδια. Ο HIF-1β μπορεί να διμεριστεί και με τον AHR. Περιέχει και αυτός HLH και PAS περιοχές καθώς και μια C-TAD στο καρβοξυτελικό άκρο. Ο HIF-1β δεν ρυθμίζεται από την υποξία και έτσι εκφράζεται συνεχώς , εν αντιθέσει με τον HIF-1α.

## 1.3 Ρύθμιση του HIF-1

### *1.3.1 Απενεργοποίηση του HIF-1α*

\_Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου ο HIF-1α αποικοδομείται ώστε να αποφευχθεί η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων – στόχων του. Για να συμβεί αυτό ο HIF-1α ουβικουιτινιώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Προκειμένου να ουβικουιτινωθεί πρέπει πρώτα να τροποποιηθεί κατάλληλα, δηλαδή απαιτείται η υδροξυλίωση των προλινών στις θέσεις 402 και 564(Schofield C.J. et al., 2004).

Η τροποποίηση αυτή καταλύεται από ειδικά ένζυμα τις HIF-1α πρόλυλο-υδροξυλάσες. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί 3 ισομορφές οι PHD1, PHD2 ,PHD3 .Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών που χρησιμοποιούν το οξυγόνο σαν επιπλέον υπόστρωμα, γεγονός που τους προσδίδει την ικανότητα να λειτουργούν σαν αισθητήρες οξυγόνου. Επιπλέον για να δράσουν απαιτούν 2-κετογλουταρικό και σίδηρο( $Fe^{2+}$ ). Σύμφωνα με έρευνες η PHD2 είναι το ένζυμο που ευθύνεται κυρίως για την υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου(Schofield C.J. et al., 2004).

Αφού δράσουν οι πρόλυλο-υδροξυλάσες, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel(pVHL) αναγνωρίζει τον υδροξυλιωμένο HIF-1α και προσδένεται στην ODD περιοχή του. Η pVHL είναι μέρος ενός ενζυμικού συστήματος που ονομάζεται σύμπλεγμα της E3 λιγάσης , το οποίο τελικά ουβικουιτινιώνει και αποικοδομεί τον HIF-1α[40]. Η pVHL σχετίζεται με το σύνδρομο Von Hippel- Lindau ,μια κληρονομήσιμη μορφή καρκίνου. Επιπροσθέτως στην

αναγνώριση του υδροξυλιωμένου HIF-1α από την pVHL, φαίνεται να διαδραματίζει μεγάλο ρόλο και η λυσίνη στη θέση 532 όταν ακετυλιωθεί από την N-ακετυλοτρανσφεράση ARD1.

Τέλος, ακόμα μια τροποποίηση αρνητικής ρύθμισης λαμβάνει χώρα στον HIF-1α. Η υδροξυλίωση μιας συντηρημένης ασπαραγίνης στην CAD περιοχή από τον FIH (factor inhibiting HIF-1) έχει σαν συνέπεια να εμποδίζεται η δέσμευση της p300 στον HIF-1α έτσι ώστε να μένει μεταγραφικά ανενεργός. Ωστόσο η αντικατάσταση της ασπαραγίνης από αλανίνη καθιστά τον HIF-1α ισχυρά μεταγραφικά ενεργό[30]. Ο παράγοντας FIH καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α και με ακόμη έναν τρόπο: επιστρατεύει τις αποακετυλάσες των ιστόνων, γεγονός που δεν επιτρέπει στη χρωματίνη να «ξεδιπλωθεί» (Gaber T. et al., 2005).

### ***1.3.2 Ενεργοποίηση του HIF-1α***

Όταν επικρατούν συνθήκες υποξίας, ο HIF-1 ενεργοποιείται. Για να συμβεί αυτό όμως πρέπει να σταθεροποιηθεί ο HIF-1α, να εισαχθεί στον πυρήνα και έπειτα να διμεριστεί με τον HIF-1β ώστε να προσδεθούν στο DNA στις ειδικές περιοχές HRE.

### **Σταθεροποίηση του HIF-1α**

Όταν τα επίπεδα οξυγόνου κυμαίνονται κάτω από τα φυσιολογικά όρια, τότε η δράση των πρόλυλο-υδροξυλασών αναστέλλεται ούτως ώστε να αποφευχθεί η υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η pVHL να μη δεσμεύεται στον HIF-1α και άρα να καταστέλλεται η αποικοδόμησή του. Συν τοις άλλοις σε συνθήκες υποξίας, η ασπαραγίνη στην περιοχή CAD δεν υδροξυλιώνεται οπότε η p300 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, γεγονός που τον καθιστά μεταγραφικά ενεργό.

Παρόλα αυτά, ενώ τα σηματοδοτικά μονοπάτια που παίρνουν μέρος στη σταθεροποίηση του HIF-1α είναι γνωστά, τα μονοπάτια και οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την

εξασθένιση της δράσης των πρόλυλο-υδροξυλασών ακόμη δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

### **Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα**

Η μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα είναι απαραίτητη προκειμένου να ετεροδιμεριστεί με τον ARNT και να ενεργοποιηθεί. Ωστόσο ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο εισάγεται στον πυρήνα αλλά υπάρχουν αρκετές θεωρίες βασισμένες σε μελέτες. Εικάζεται πως η ύπαρξη των αλληλουχιών NLS διαδραματίζει μεγάλο ρόλο, εφόσον αλληλεπιδρούν με τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς μεταφοράς, τις ιμπορτίνες. Όμως τέτοια αλληλεπίδραση δεν έχει βρεθεί ακόμα. Επιπλέον πιθανολογείται πως η μεταβίβαση του HIF-1α στον πυρήνα ελέγχεται από την υποξία ,αν και υπάρχει και αντίθετη άποψη ,σύμφωνα με την οποία η μεταφορά είναι συνεχής και ανεξάρτητη από τα επίπεδα οξυγόνου. Τα ερωτήματα είναι πολλά και γι' αυτό το θέμα χρήζει περισσότερης μελέτης .

### **Ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT και δέσμευση στο DNA**

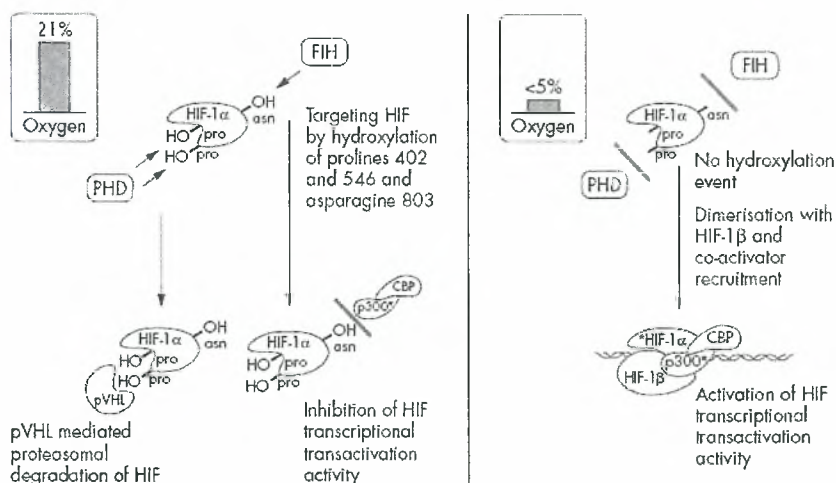
Για να γίνει μεταγραφικά ενεργός ο HIF-1α πρέπει να ετεροδιμεριστεί με τον ARNT δημιουργώντας έτσι ένα μεταγραφικά ενεργό σύμπλοκο. Στο διμερισμό σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν οι περιοχές bHLH και PAS. Επιπροσθέτως ,μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ ,η Hsp90, λαμβάνει μέρος στο διμερισμό. Η Hsp90 δεσμεύεται αρχικά στον HIF-1α, δινοντάς του έτσι μια ειδική στερεοδιαμόρφωση και έπειτα αντικαθίσταται από τον ARNT(Gaber T. et al., 2005). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου.

Επομένως μετά από τον ετεροδιμερισμό, ο HIF-1 μπορεί να συνδεθεί στο DNA για επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Η σύνδεση στο DNA γίνεται μέσω των αλληλουχιών HBS((A/G)CGTG) . Το HBS ,που είναι η ελάχιστη αλληλουχία που απαιτείται για τη σύνδεση,είναι

κομμάτι μιας ευρύτερης περιοχής που ονομάζεται HRE (hypoxia response elements). Στα περισσότερα γονίδια στόχους του HIF-1, στην περιοχή HRE εντοπίζεται ακόμα μια χαρακτηριστική αλληλουχία που λέγεται HAS (HIF-1 ancillary sequence), η οποία είναι αναγκαία για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων από τον HIF-1 (Gaber T. et al., 2005).

### 1.4 Ρύθμιση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα

Εκτός από την υποξία, ο HIF-1α φαίνεται να ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες όπως το μηχανικό στρες, τα ιόντα κοβαλτίου, οι χηλικοί παράγοντες, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες. Τα παραπάνω, λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές του HIF-1α, που τον σταθεροποιούν και προάγουν την μεταγραφική του ενεργότητα (Gaber T. et al., 2005).



Εικόνα 3. Oxygen dependent HIF regulation. HIF $\alpha$  targeting for proteasomal degradation under normoxic conditions (left side); hypoxic stabilisation of HIF $\alpha$  and recruitment of transcriptional coactivators (right side). FIH, factor inhibiting HIF-1.

## Μηχανικό στρες

Σύμφωνα με έρευνες σχετικά με το μηχανικό στρες στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ,έχει παρατηρηθεί πως μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RAF/MEK/MAPK ενεργοποιείται μεταγραφικά ο HIF-1. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της φωσφορυλίωσης της CTAD περιοχής του HIF-1 και των συνενεργοποιητών του.

### **Κοβάλτιο και χηλικοί παράγοντες**

Οι χηλικοί παράγοντες ,όπως η δεσφεριοξαμίνη ,δεσμεύουν το  $Fe^{2+}$ ,τον οποίο όπως είναι γνωστό οι προλυλο-υδροξυλάσες απαιτούν για να δράσουν(Berra E. et al., 2008) . Κατ'αυτό τον τρόπο λοιπόν, αναστέλλεται η δράση τους, επομένως ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται και άρα δεν αποικοδομείται. Έτσι παρουσία χηλικών παραγόντων ο HIF-1α επάγεται ,ακόμη και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου.

Επίσης , δισθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο, το νικέλιο και το μαγγάνιο φαίνεται να προκαλούν επαγωγή του HIF-1α με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμη σαφής .

### **Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS)**

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και η επίδραση τους στους οργανισμούς αποτελούν αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια. Οι ROS επιδρούν και στον HIF-1α. Όπως έχει παρατηρηθεί , τα μιτοχόνδρια σε συνθήκες υποξίας αυξάνουν την παραγωγή ROS και αυτό έχει σαν επακόλουθο την επαγωγή του HIF-1α μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών(Chandel et al., 2000). Η ακτινοβολία , η υπερέκφραση της NADPH οξειδάσης-1 και ουσίες όπως το  $H_2O_2$  οδηγούν σε μεγάλη παραγωγή ROS και προκαλούν στα κύτταρα την σταθεροποίηση του HIF-1α ,ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου.

### **Ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες**

Εξετάζοντας την επίδραση κάποιων αυξητικών παραγόντων ,όπως οι IGF-1, EGF και PDGF(Hellwing-Burgel et al., 1999), αγγειακών ορμονών, όπως η αγγειοτενσίνη και κυτοκινών ,όπως ο TNFα στα κύτταρα παρατηρούμε πως προκαλούν

επαγωγή και ενεργοποίηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. (Gaber T. et al., 2005) Ωστόσο δεν καταστέλλουν την αποικοδόμησή του HIF-1α αλλά προάγουν την σύνθεση και την μετάφραση του mRNA του. Σύμφωνα με μελέτες στην αύξηση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α εμπλέκεται η PI-3K (κινάση της φωσφορικής ινοσιτόλης). Επιπλέον η PI-3K επάγει την ενεργοποίηση του HIF-1α αυξάνοντας την έκφραση της Hsp90 που είναι αναγκαία για τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT.

Τέλος έρευνες έχουν δείξει πως οι αυξητικοί παράγοντες ,ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης LPS και οι αγγειακές ορμόνες ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών, γεγονός που οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα μένουν αμετάβλητα(Gaber T. et al., 2005).

### **Αποακετυλάσες ιστόνων (HDACs)**

Οι HDACs είναι τα ενζυμικά μέλη ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο οδηγούμενο από κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες στοχεύει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Ο ρόλος τους είναι να αφαιρούν ακετυλικά κατάλοιπα από τους νουκλεοσωμικούς ιστόνες, οδηγώντας στην συμπύκνωση της δομής της χρωματίνης. Σύμφωνα με μελέτες οι HDAC 1 και 3 προσδέονται στην ODD περιοχή του HIF-1α και αποτελούν θετικούς ρυθμιστές του, οι οποίοι αυξάνουν την σταθεροποίηση και τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT ,με σκοπό την ενεργοποίηση του. Επίσης θεωρείται πως οι HDACs μπορεί να παίζουν ρόλο στην επαγόμενη από τον HIF-1 αγγειογένεση σε καρκινικούς όγκους(Folkman J., 1992 ,Semenza G.L., 2002).

### **Αρνητικοί ρυθμιστές του HIF-1α**

Εκτός από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες ,την VHL και τον FHL-1 που αναφέρθηκαν παραπάνω υπάρχουν και άλλοι αρνητικοί ρυθμιστές του HIF-1α, που δρουν και σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες υποξίας.



Όπως έχει παρατηρηθεί, το νιτρικό οξύ (NO) και προάγει και καταστέλλει την λειτουργία του HIF-1. Σε υψηλές συγκεντρώσεις NO (> 1μM) ο HIF-1α σταθεροποιείται σε όλες τις συγκεντρώσεις οξυγόνου. Αντιθέτως σε χαμηλές συγκεντρώσεις NO (<400nM) μειώνεται η σταθεροποίηση και η συσσώρευση του HIF-1α στα κύτταρα ακόμα και σε συνθήκες υποξίας (Brune B. et al., 2003). Εικάζεται πως η σταθεροποίηση του HIF-1α σε υψηλές συγκεντρώσεις NO εμπλέκεται σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, ενώ η καταστολή του σε χαμηλές συγκεντρώσεις NO φαίνεται να συμβαίνει σε φυσιολογικές συνθήκες.

Επιπλέον, αρνητικά ρυθμίζει τον HIF-1α και η CITED2, η οποία συνδέεται με την p300 και έτσι δεν την αφήνει να αλληλεπιδράσει με τον HIF-1α. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας (Freedman S.J. et al., 2003). Τέλος, η υπερέκφραση του PTEN φαίνεται να αναστέλλει το μονοπάτι PI-3K, που έχει ως επακόλουθο την μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α.

### **1.5 HIF-1α και καρκίνος**

Η διαδικασία με την οποία ο καρκινικός όγκος εξαπλώνεται χαρακτηρίζεται από ταχύτατη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ανασταλτικός παράγοντας σε αυτή την ανάπτυξη είναι το κυτταρικό μικροπεριβάλλον, το οποίο δημιουργείται λόγω αδυναμίας του τοπικού αγγειακού συστήματος να μεταφέρει αρκετό οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα ταχύτατα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα. Επομένως κοινό χαρακτηριστικό όλων των αυξανόμενων όγκων είναι η υποξία. Για το λόγο αυτό παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα HIF-1α στα περισσότερα είδη όγκων. Η ενεργοποίηση του HIF-1α οδηγεί στην αγγειογένεση και στην μετάβαση από τον αερόβιο στον αναερόβιο μεταβολισμό. Αυτό έχει σαν συνέπεια την καλύτερη αιμάτωση και την προσαρμογή των όγκων σε υποξικό περιβάλλον ούτως ώστε να συνεχίσουν να αναπτύσσονται.

Συμπερασματικά, ο HIF-1α είναι απαραίτητος στην ανάπτυξη των όγκων και άρα αποτελεί σημαντικό στόχο της αντικαρκινικής θεραπείας. Εκτός από τους αρνητικούς ρυθμιστές του HIF-1α που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες ουσίες που τον αναστέλλουν και μπορούν να αποτελέσουν τη βάση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι ουσίες αυτές είναι οι εξής:

- **YC-1**

Ο YC-1 είναι ένας νέος αγγειακός παράγοντας, ο οποίος όπως έχει βρεθεί καταστέλλει την αγγειογένεση και την μεταγραφή δύο γονιδίων στόχων του HIF-1, της EPO και του VEGF in vitro. Παράλληλα ο YC-1 αναστέλλει την έκφραση του HIF-1α στο μετα-μεταγραφικό στάδιο, με έναν μηχανισμό που δεν είναι ακόμα γνωστός. Καταλήγοντας λοιπόν, ο YC-1 εμπλέκεται στην παρεμπόδιση της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου, γεγονός που του δίνει τη δυνατότητα να αποτελέσει στο μέλλον ένα βασικό φάρμακο ενάντια στον καρκίνο (Gaber T. et al., 2005).

- **Κυκλοσπορίνη Α, ινδομετασίνη, ιβουπροφαίνη και NS-398 (COX-2 specific inhibitor)**

Οι ουσίες αυτές παρεμποδίζουν την μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την υποξία και προάγουν την αποικοδόμηση του HIF-1α ευνοώντας την υδροξυλίωση των προλινών του στις θέσεις 402 και 564.

- **Βορτμανίνη και LY294002**

Οι ουσίες αυτές δρουν σαν αναστολείς του μονοπατιού PI-3K που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α.

- **PX-478, TX-402, 17-AAG(Hsp90 inhibitor) και HDACIs( histone deacetylase inhibitors: TSA, SB, Apicidin, VPA)**

Οι ουσίες αυτές μειώνουν τα επίπεδα του HIF-1α καθώς και την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.

## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο HIF-1 ,όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επάγεται από την υποξία και η ρύθμιση του διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη σωστή απόκριση του οργανισμού σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Η ρύθμιση αυτή συμβαίνει σε πολλά στάδια όπως στη σταθεροποίηση του HIF-1α, στη δημιουργία του ετεροδιμερούς με τον ARNT , στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του, στην αλληλεπίδραση του με άλλες πρωτεΐνες , κ.α . Επιπλέον ο HIF-1α φαίνεται να σχετίζεται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες ,όπως ο καρκίνος. Για όλους τους παραπάνω λόγους, η μελέτη των μοριακών μηχανισμών ενεργοποίησης του HIF-1α έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών, όχι μόνο για την απόκτηση περεταίρω γνώσης αλλά και για την εύρεση νέων φαρμακευτικών μέσων. Το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α είναι αυτό που έχει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση του μιας και εκεί εντοπίζονται οι περιοχές ODD, C-NLS, C-TAD και N-TAD οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές διεργασίες.

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί το τμήμα 348-826 με μια αντικατάσταση σερίνης από γλουταμινικό ( S→E) για να παρατηρήσουμε τι αλλαγές επιφέρει στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Η περιοχή 616-658, που είναι στόχος φωσφορυλίωσης από τις MAPK, περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού(NLS) το οποίο όπως έχει αποδειχθεί αλληλεπιδρά με το CRM1 με έναν ευαίσθητο στη φωσφορυλίωση τρόπο. Αν αντικατασταθεί το κατάλοιπο σερίνης στη θέση 641 από γλουταμινικό αυτό το σήμα διακόπτεται , έτσι αποκαθίσταται η τοποθέτηση του HIF1α στον πυρήνα και η δραστηριότητα του

μη-φωσφορυλιωμένου HIF1α, γεγονός που τον καθιστά περισσότερο ανθεκτικό στην αναστολή από τις MAPK. Το τμήμα με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη φαίνεται να είναι συνεχώς ενεργοποιημένο, ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου στα κύτταρα .

Αρχικός στόχος της εργασίας ήταν η υπερέκφραση και η απομόνωση του καρβοξυτελικού τμήματος 348-826<sub>S→E</sub> του HIF-1α το οποίο βρίσκεται σε σύντηξη με την ετικέτα σήμανσης GST. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αγκιστείας με επίτοπο GST (GSH- beads, glutathione- Sepharose 4B, Amersham). Στη συνέχεια, στόχος της εργασίας ήταν η απομάκρυνση της ετικέτας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της TEV πρωτεάσης, η οποία αναγνωρίζει ειδικά ένα επταπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται μεταξύ της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> και της GST, προκαλώντας την πρωτεόλυση του GST από αυτήν. Για το σκοπό αυτό, έγιναν προσπάθειες υπερέκφρασης και απομόνωσης της TEV πρωτεάσης με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED. Έπειτα, αφού επώαστηκε η πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με την TEV πρωτεάση για την πλήρη αποκοπή των GST, επιχειρήθηκε η απομάκρυνση των GST ετικετών και της TEV πρωτεάσης από την HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>, με στήλη GSH και Ni<sup>2+</sup> TED αντίστοιχα. Τελικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με βιοφυσικές μεθόδους και σύγκριση της με τη φυσιολογική, η οποία έχει μελετηθεί στο τμήμα μας .

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Υλικά**

##### ***3.1.1. Αντιδραστήρια***

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε δις- απεσταγμένο νερό για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν από τις εταιρείες SIGMA, Merck, Scharlau, Research Organics, New England Biolabs, Fluka, Serva, Panreac, AppliChem, Fermentas, Lennox και Riedel-de Haen. Για τις συμπυκνώσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε Polyethylene glycol, PEG 40000 της εταιρείας Serva. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BIOQUANT (Bradford reagent) της εταιρείας Merck.

##### ***3.1.2. Κύτταρα και πλασμιδιακοί φορείς***

Η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεάση TEV και την πρωτεΐνη HIF1 $\alpha$  348-826<sub>S→E</sub> που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία καθώς και η επίστρωση τρυβλίων με μετασχηματισμένα κύτταρα με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς για την κάθε πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε από την Χαχάμη Γεωργία στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- Κύτταρα BL21 και Rosetta μετασχηματισμένα με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα, pET-24d, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση TEV, επιστρωμένα σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό LB agar. Τα κύτταρα BL21 περιείχαν 100μg/ml χλωραμφαινικόλη και 30μg/ml καναμυκίνη, ενώ τα κύτταρα Rosetta περιείχαν 30μg/ml καναμυκίνη. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-24d φέρει, εκτός των χαρακτηριστικών εκείνων που εξυπηρετούν την παραγωγή της πρωτεάσης TEV σε μεγάλες ποσότητες και μια αλληλουχία, η οποία κωδικοποιεί έξι συνεχόμενες ιστιδίνες.
- Κύτταρα BL21 (RIL) μετασχηματισμένα με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα, pGEX-4T-1, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> επιστρωμένα σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό LB agar, το οποίο περιείχε 100μg/ml αμπικιλίνη και 100μg/ml χλωραμφενικόλη. Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας, φέρει κατάλληλους προαγωγείς που επιτρέπουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή.

### 3.1.3. Υλικά χρωματογραφίας

Στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED (Protino® Ni-TED Resin) (MN, Macherey- Nagel) και στήλη αγκιστείας με επίτοπο GST, τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSH- beads, glutathione-Sepharose 4B, Amersham) .

### 3.1.4. Θρεπτικά μέσα

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth)

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το μέσο LB Broth σε μορφή σκόνης, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στο πίνακα 1.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τυπική αναλογία (g/l)</i>
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0
NaCl	10,0

Πίνακας 1. Σύσταση θρεπτικού μέσου(LB Broth).

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Broth 25gr
- ddH<sub>2</sub>O 1L

Ακολουθεί αποστείρωση πρίν τη χρήση του.

### 3.1.5. Αντιβιοτικά

Για την παρασκευή stock χλωραμφαινικόλης 34mg/ml, 34mg χλωραμφαινικόλης (Sigma) διαλύονται σε 1ml απόλυτη ethanol, ενώ για την δημιουργία stock καναμυκίνης 100mg/ml ή αμπικιλίνης 100mg/ml, 100mg από την αντίστοιχη ουσία διαλύονται σε 1ml αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O (water for injections). Σε όλα τα αντιβιοτικά, ακολουθεί διήθηση μέσω ειδικού φίλτρου και φυλάσσονται στους -20°C.

### 3.1.6. Όργανα

Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R eppendorf, μινι-φυγόκεντρος τύπου eppendorf centrifuge 5415D, συσκευή

ηλεκτροφόρησης (BioRad), φωτόμετρο (Spectronic Instruments, Spectronic® 20 Genesys), φωτόμετρο UV (Spectronic Unicam Genesys 10UV), Vortex (MS2 Minishaker, IKA®), αναδευτήρας τύπου GFL 3015, πεχάμετρο (744 pH Meter, Ω. Metrohm) και ζυγός (KERN, Ew).

## **3.2. Μέθοδοι**

### ***3.2.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>***

Τα γονίδια της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> που πρόκειται να εκφραστούν κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει κατάλληλους προαγωγείς που επιτρέπουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με στήλη αγκιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη).

#### ***3.2.1.1. Διαδικασία υπερέκφρασης της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>***

Σε 5ml LB Broth με αμπικιλίνη (100μg/ml) και χλωραμφαινικόλη (100μg/ml), ενοφθαλμίζονται κύτταρα που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και επωάζονται για 14-16h στους 37°C υπό ανάδευση στις 225 rpm.

Ακολουθεί μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από την O/N καλλιέργεια (περίπου 5ml) σε 500ml φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD<sub>600</sub>). Η νέα καλλιέργεια πρέπει να ξεκινάει από OD<sub>600</sub> ~ 0,05- 0,07. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση στις 225 rpm, έως ότου η OD<sub>600</sub> φτάσει



περίπου 0,4. Η συνέχεια της επώασης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) υπό ανάδευση έως ότου OD<sub>600</sub> ~ 0,6.

Ακολουθεί προσθήκη IPTG (1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 1 mM και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3h υπό ανάδευση στις 225 rpm. Τέλος, φυγοκεντρώνονται οι καλλιέργειες στις 4000 rpm για 15 min στους 4°C και αποχύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml ddH<sub>2</sub>O και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Με το ξέπλυμα αυτό απομακρύνονται τα υπολείμματα του θρεπτικού μέσου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα λύεται αμέσως ή φυλάσσεται στους -80°C.

### **3.2.1.2. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>**

#### **➤ Λύση κυττάρων με υπερήχους**

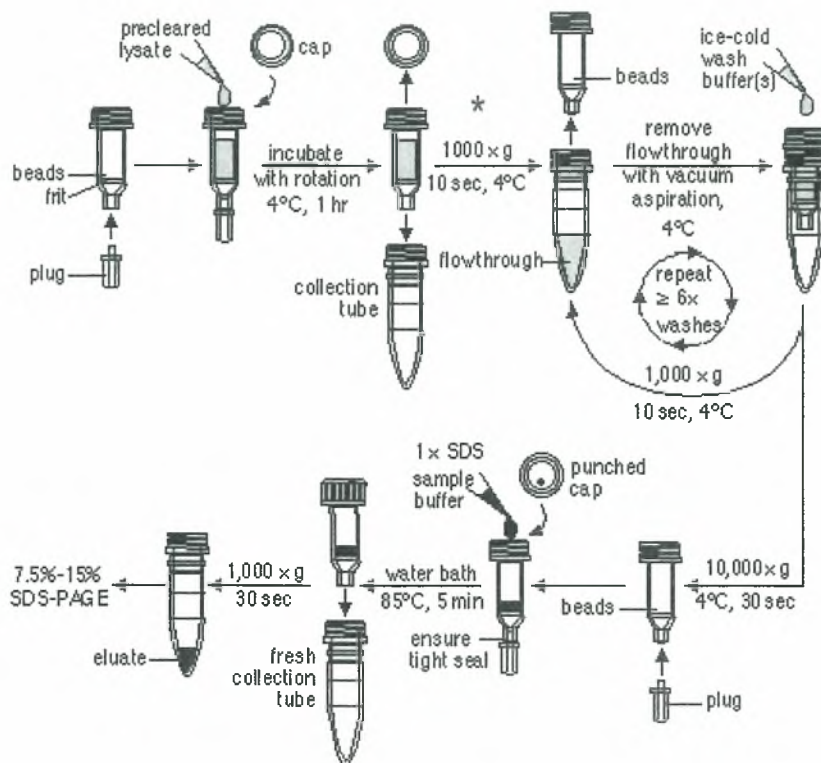
Το ίζημα των κυττάρων στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>, επαναιωρείται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM DTT, 0,1% Tween 20) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (2mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin). Η διάλυση του ιζήματος πραγματοποιείται σε αναλογία 10 ml διαλύματος λύσης ανά ίζημα κυττάρων από 1L αρχικής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία σπασίματος των κυττάρων με υπερήχους (sonicator, εικόνα 4), 10 φορές ανά 10sec με ενδιάμεσες παύσεις των 10sec. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στις 12000 rpm, για 60 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα και χρησιμοποιείται για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με στήλη GSH.



Εικόνα4. Sonicator

➤ **Καθαρισμός πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με επίτοπο GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης)**

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη(εικόνα 5) καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη) . Η συγγένεια των σφαιριδίων γλουταθειόνης με το τμήμα της τρανσφεράσης της S- γλουταθειόνης που βρίσκεται στη πρωτεΐνη επιτρέπει την πρόσδεσή της στα σφαιρίδια. Έτσι, γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με τη προσθήκη διαλύματος ελεύθερης ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια, η οποία δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με την προσδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη, αποδεσμεύοντας την πρωτεΐνη από αυτά. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη και έχει το πλεονέκτημα ότι πραγματοποιείται σε πολύ ήπιες συνθήκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλαγών στη δομή και τη δράση της πρωτεΐνης σύντηξης.



Εικόνα 5. Στήλη GSH

Αρχικά, πριν τη χρήση των σφαιριδίων (GSH- beads, Amersham) για τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826, είναι απαραίτητη η εξισορρόπηση των σφαιριδίων με το κατάλληλο διάλυμα (διάλυμα 1, πίνακας 2) επί 3 φορές. Σε κάθε ξέπλυμα ακολουθεί φυγοκέντρηση των σφαιριδίων στις 1000- 3000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή.

Στη συνέχεια, στα σφαιρίδια GSH (500μl σφαιριδίων για κάθε 1L αρχικής καλλιέργειας) προστίθεται το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων) και αφήνεται για 1-2 ώρες στους 4°C υπό ελαφριά ανάδευση. Με την ανάδευση έρχεται σε επαφή η πρωτεΐνη GST- HIF1α 348-826 με τα σφαιρίδια της στήλης και συνεπώς μπορεί να δεσμευτεί στη γλουταθειόνη της στήλης. Έπειτα, η στήλη φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 1000- 3000 rpm και στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται με προσοχή (flow through). Το υπερκείμενο αυτό περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη. Ακολουθούν τρεις πλύσεις της στήλης με 10ml διαλύματος 1

(πίνακας 2) η κάθε πλύση και δύο πλύσεις με 10ml διαλύματος 2 (πίνακας 2) η κάθε πλύση. Σε κάθε πλύση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 1000- 3000 rpm και στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Με τις πλύσεις αυτές απομακρύνονται πρωτεΐνες που δεν μας ενδιαφέρουν και μπορεί να έχουν κατακρατηθεί ασθενώς στη στήλη.

Τέλος, στα σφαιρίδια GSH προστίθεται διάλυμα γλουταθειόνης σε περίσσεια (διάλυμα 3, πίνακας 2) για την έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Με την προσθήκη της γλουταθειόνης το διάλυμα γίνεται αρκετά όξινο για αυτό το λόγο προστίθενται μερικές σταγόνες NaOH 1M, έως ότου το pH γίνει 8. Στη στήλη πραγματοποιούνται συνεχόμενες εκλούσεις των 500μl με το διάλυμα 3. Σε κάθε έκλυση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 1000- 3000 rpm και στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέγεται.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>		
	<i>Διάλυμα 1 (lysis buffer)</i>	<i>Διάλυμα 2 (lysis buffer χωρίς Tween)</i>	<i>Διάλυμα 3 (elution buffer)</i>
Tris-HCl pH 7,6	20mM	20mM	20mM
NaCl	137mM	137mM	137mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM	5mM	5mM
Glycerol	5%	5%	5%
DTT	5mM	5mM	5mM
Tween 20	0,1%	-	-
PMSF	2mM	2mM	1mM
Aprotinin	10μg/ml	10μg/ml	10μg/ml
Leupeptin	1μg/ml	1μg/ml	1μg/ml
Γλουταθειόνη	-	-	10mM

**Πίνακας 2.** Σύσταση διαλυμάτων για καθαρισμό πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>

Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ή 12%. Τέλος, τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20°C, ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>).

### **3.2.2. Καθαρισμός πρωτεάσης TEV**

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση TEV είναι κλωνοποιημένο σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει εκτός των χαρακτηριστικών εκείνων που εξυπηρετούν την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες και μια αλληλουχία η οποία κωδικοποιεί έξι συνεχόμενες ιστιδίνες. Έτσι, η πρωτεΐνη εκφράζεται με μια «ουρά» έξι ιστιδινών στο ένα της άκρο. Η μικρή αυτή αλληλουχία εξυπηρετεί τον εύκολο καθαρισμό της πρωτεΐνης με μια στήλη νικελίου.

#### **3.2.2.1. Διαδικασία υπερέκφρασης της πρωτεάσης TEV**

Σε 5ml LB Broth (πίνακας 1) με καναμυκίνη (30μg/ml), ενοφθαλμίζονται κύτταρα Rosetta που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και επωάζονται για 12-14h (O/N) στους 37°C υπό ανάδευση στις 210 rpm.

Ακολουθεί μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από την O/N καλλιέργεια (περίπου 5ml) σε 500ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με καναμυκίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD<sub>600</sub>). Η νέα καλλιέργεια πρέπει να ξεκινάει από OD<sub>600</sub> ~ 0,05. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση στις 210 rpm. Μετά τη πάροδο του χρόνου επαγωγής της έκφρασης, οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται στις 12000 rpm για 20 min στους 4°C, αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα λύεται αμέσως ή φυλάσσεται στους -80°C.

#### **3.2.2.2. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεάσης TEV**

### ➤ Λύση κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων Rossetta, στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση της TEV, επαναιωρείται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT, 0,1mM PMSF, 10mg/ml Lysozyme). Η διάλυση του ιζήματος πραγματοποιείται σε αναλογία 5 ml διαλύματος λύσης ανά 1g ιζήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία σπασίματος των κυττάρων με υπερήχους (sonicator), 10 φορές ανα 10sec με ενδιάμεσες παύσεις των 10sec. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στις 12000 rpm, για 50 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα και χρησιμοποιείται για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με στήλη Ni<sup>2+</sup> TED.

### ➤ Στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED

Για περαιτέρω καθαρισμό και απομόνωση μόνο της επιθυμητής πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται στήλη νικελίου (Ni<sup>2+</sup> TED), η οποία κατακρατά την TEV μέσω σύνδεσης των ιστοιδινών που περιέχει με τα άτομα του νικελίου και αφήνει τις υπόλοιπες πρωτεΐνες να τη διαπεράσουν. Η έκλουση της TEV από τη στήλη πραγματοποιείται με τη διαβίβαση υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Ουσιαστικά, το ιμιδαζόλιο δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και ανταγωνίζεται τις his- tagged πρωτεΐνες στη δέσμευση.

Συγκεκριμένα, αφού το υπερκείμενο χρησιμοποιηθεί στη στήλη νικελίου, συλλέγονται κλάσματα (wash) με τη προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες διαφορετικές της TEV, οι οποίες κατακρατούνται ασθενώς στη στήλη. Στη συνέχεια, για την ανάκτηση της TEV από την στήλη χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (από 80mM έως 400mM) για την εύρεση των

βέλτιστων συνθηκών έκλουσης της TEV από την στήλη. Τα κλάσματα που συλλέγονται (flow through, wash και elution) ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% για τον καθορισμό του βαθμού καθαρότητας της TEV μετά τη στήλη νικελίου. Στη συνέχεια, απαραίτητη είναι η απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από τη πρωτεάση TEV, για αυτό τα κλάσματα με την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και υφίστανται διαπίδυση O/N στους 4°C σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol). Τέλος, η πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

### 3.2.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της ετικέτας σήμανσης GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) από αυτήν. Η GST είναι μια 26kDa πρωτεΐνη που βρίσκεται προσδεσμένη στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης HIF1α. Μεταξύ της GST και της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> μεσολαβεί ένα επταπεπτίδιο, το οποίο αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση TEV που το πρωτεολύει. Έτσι, με τη χρήση της TEV πρωτεάσης διαχωρίζεται η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> από την ετικέτα σήμανσης GST. Αυτό συμβαίνει με επώαση του HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με την TEV πρωτεάση στους 25°C O/N.

#### 3.2.3.1. Διαδικασία καθαρισμού πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>

##### ➤ Απομάκρυνση TEV πρωτεάσης από τη πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> - Στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED

Αφού πραγματοποιηθεί επώαση της TEV πρωτεάσης με την πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> στις βέλτιστες συνθήκες, το επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση της TEV πρωτεάσης από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η διαβίβαση της πρωτεΐνης από στήλη νικελίου. Με

τη διαβίβαση αυτή, η στήλη δεσμεύει την TEV πρωτεάση, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 δεν δεσμεύεται (flow through). Στη συνέχεια, η στήλη πλένεται με διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) και συλλέγονται κλάσματα. Η πιθανότητα ύπαρξης πρωτεΐνης HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> μέσα σε αυτά τα κλάσματα διαπιστώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη ενώνονται με το flow through, και περνάνε στο επόμενο στάδιο καθαρισμού που είναι η στήλη GSH, για την απομάκρυνση των ετικετών σήμανσης GST.

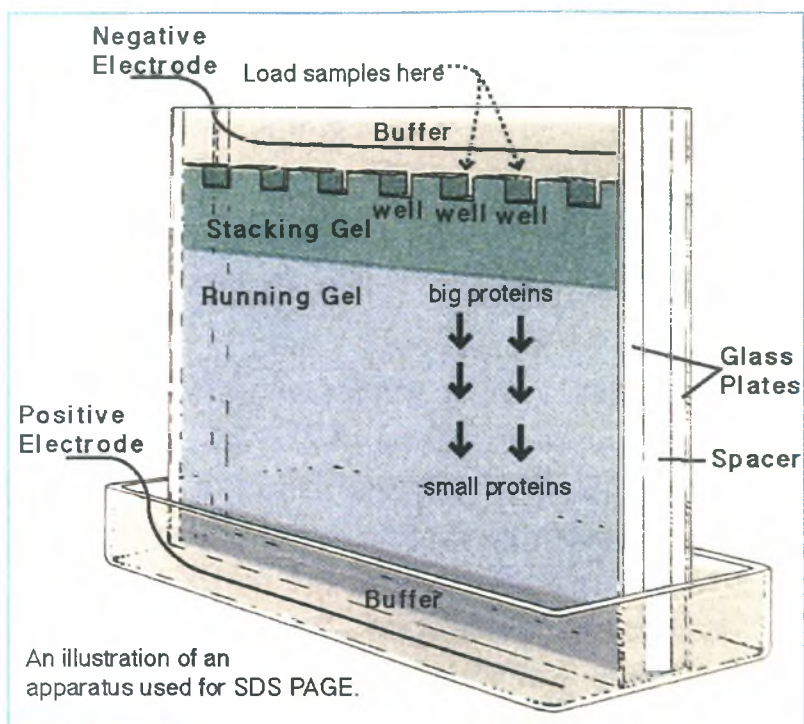
#### ➤ Απομάκρυνση ετικέτας σήμανσης GST από τη πρωτεΐνη HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub>

Για τον πλήρη καθαρισμό της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των ετικετών σήμανσης GST, που προήλθαν από την πρωτεόλυσή τους από την TEV πρωτεάση. Το τμήμα της τρανσφεράσης της S- γλουταθειόνης που έχει αποκοπεί από την πρωτεΐνη προσδένεται στα σφαιρίδια, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> παραμένει αδέσμευτη. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.1.2. Στη προκειμένη περίπτωση, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 <sub>S→E</sub> εντοπίζεται στο flow through. Τα αποτελέσματα διαπιστώνονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και η καθαρή πλέον πρωτεΐνη HIF1α 348-826 φυλάσσεται στους -20°C.

#### 3.2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS- PAGE)

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου(εικόνα 6), παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS).





Εικόνα 6. Συσκευή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου

### • Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δυο επιμέρους μέρη. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), όπου τα δείγματα των πρωτεϊνών πακετάρονται με σταθερή τάση 120V. Η πηκτή αυτή έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμιδίου (5%), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών (πίνακας 3).

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος (ml)</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	0,83
Tris-HCl 1,0M (pH 6,8)	0,63
SDS 10%	0,05
ddH <sub>2</sub> O	3,4
TEMED	0,005
APS 10%	0,05

Πίνακας 3. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης συγκέντρωσης 5%.

Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από τη πηκτική διαχωρισμού (separating gel, running gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (πίνακας 4).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση 8%	Συγκέντρωση 10%	Συγκέντρωση 12%	Συγκέντρωση 15%
	Όγκος (ml)			
Ακρυλαμίδιο 30%	5,3	6,7	8,0	10,0
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	5,0	5,0	5,0	5,0
SDS 10%	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,012	0,008	0,008	0,008
APS 10%	0,2	0,2	0,2	0,2
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20ml	Up to 20ml	Up to 20ml	Up to 20ml

**Πίνακας 4.** Σύσταση πηκτικής διαχωρισμού ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμίδης.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

- **Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων**

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτική περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer, 3x) (πίνακας 5) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 5 λεπτά.

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα/ Συγκέντρωση
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	62,5mM

SDS 10%	2%
Γλυκερόλη	10%
β- Μερκαπτοαιθανόλη	2%
Bromophenol blue	0,02%

**Πίνακας 5.** Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer, 3x).

- **Διαδικασία ηλεκτροφόρησης**

Αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στις ειδικές αύλακες της πηκτής. Τέλος, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (πίνακας 6) , έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 120V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοίβαξης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Γλυκίνη	72g
Trizma base	15g
SDS	5g
ddH <sub>2</sub> O	Έως 1L

**Πίνακας 6.** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

- **Χρώση με κυανό του Coomasie**

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution: 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,1gr Coomasie Brilliant Blue για 100ml διαλύματος) για 45 λεπτά υπό

ανάδευση, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution: 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους .

- **Χρώση με Νιτρικό Άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ )**

Αρχικά η πηκτή τοποθετείται σε στερεωτικό διάλυμα (fixation buffer: 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ) για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Έπειτα αφού αφαιρεθεί το διάλυμα σταθεροποίησης, η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα που περιέχει 50% μεθανόλη και 50% ddH<sub>2</sub>O για 10 λεπτά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια η πηκτή εναποτίθεται σε ddH<sub>2</sub>O O/N υπό ανάδευση, ώστε να απομακρυνθεί η μεθανόλη.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των διαλυμάτων ευαισθητοποίησης (sensitize buffer: 0,155gr Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> για 500ml διαλύματος), νιτρικού αργύρου ( 0,5 gr AgNO<sub>3</sub> για 500 ml νερού), εμφάνισης (developer buffer :10 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 200μl φορμαλδεΐδης σε 500 ml νερού ) και σταθεροποίησης(25 μl οξικό οξύ σε 500 ml νερού).

Κατόπιν η πηκτή εμβαπτίζεται στο διάλυμα ευαισθητοποίησης για 20-30 δευτερόλεπτα και αφού ξεπλυθεί καλά με νερό τοποθετείται στο διάλυμα νιτρικού αργύρου για 20 λεπτά. Τέλος η πηκτή εναποτίθεται στο διάλυμα εμφάνισης και ανακινείται ελαφρά μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Όταν εμφανιστούν το διάλυμα εμφάνισης αποχύνεται και προστίθεται το διάλυμα σταθεροποίησης.

### **3.2.5. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford**

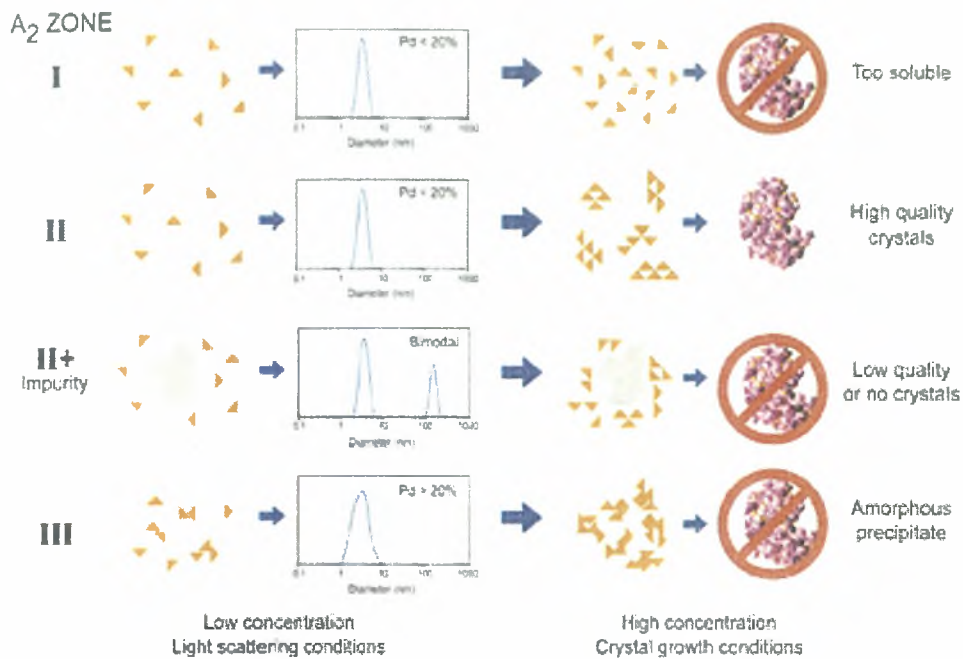
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford και με τη

χρήση του αντιδραστηρίου BIOQUANT της MERCK. Η προς μέτρηση πρωτεΐνη αντιδρά με το αντιδραστήριο σε περίσσεια προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης. Σε ορισμένο εύρος συγκεντρώσεων η ποσότητα της σχηματιζόμενης έγχρωμης ένωσης είναι ανάλογη της ποσότητας της αρχικής ουσίας. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος με τη μέθοδο αυτή, είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Αρχικά, μετράται η απορρόφηση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin) στα 595nm. Συγκεκριμένα, σε 20μl από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0,2- 1,4 mg/ml) προστίθεται 1ml διαλύματος Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 595nm έπειτα από 5 λεπτά. Ακολούθως, μετράται η απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος και με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

### **3.2.6 Μέθοδος δυναμικής σκέδασης φωτός, DLS( dynamic light scattering)**

Η DLS(εικόνα 7) μετρά τις διακυμάνσεις που υφίσταται η σκεδαζόμενη ένταση του φωτός κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος και καταγράφει τις χρονικές στιγμές που συμβαίνουν οι μέγιστες διακυμάνσεις . Ο σκοπός των πειραμάτων ήταν να εξαχθούν μερικές φυσικοχημικές παράμετροι για το βιολογικό μακρομόριο. Με την DLS μελετάται , με βάση το μοριακό βάρος που προκύπτει ,εάν μια πρωτεΐνη δημιουργεί συσσωματώματα. Ένας από αυτούς είναι η γυροσκοπική ακτίνα ( $R_g$ ) που είναι η απόσταση που συνδέει το κέντρο μάζας του μακρομορίου με το εξώτατο άκρο του . Η υδροδυναμική ακτίνα ( $R_h$ ) είναι ένα εξίσου χρήσιμο μέγεθος . Θεωρώντας ότι κάθε μόριο διαλυμένης ουσίας περιστοιχίζεται από πολλά μόρια διαλύτη , σχηματίζεται τελικά μια φουσαλίδα (blob) που έχει πάντοτε σφαιρικό σχήμα και ακτίνα  $R_h$ .



Εικόνα 7. Αποτελέσματα DLS

### Βασική αρχή της μεθόδου:

Με την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός μετράται η χρονική εξέλιξη της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας  $I(t)$  (εικόνα 8). Στη συνέχεια με τη βοήθεια ψηφιακού συσχετιστή δημιουργείται η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της έντασης του σκεδαζόμενου από το αιώρημα φωτός:

$$g_2(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle$$

Όπου  $\tau$  είναι ο χρόνος καθυστέρησης μεταξύ των δυο σημάτων. Στη συνέχεια ορίζεται η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης  $g_1(\tau)$  του ηλεκτρικού πεδίου του σκεδαζόμενου φωτός, η οποία συνδέεται με την  $g_2(\tau)$  με την σχέση:

$$g_2(\tau) = A + B \cdot [g_1(\tau)]^2$$

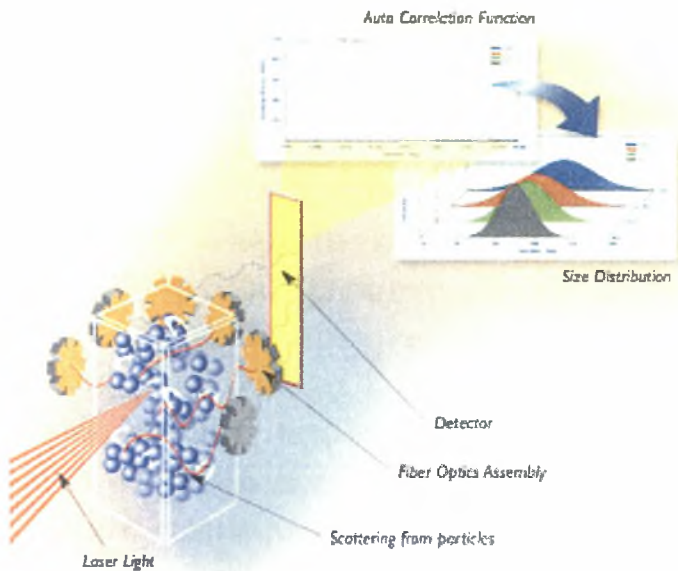
Οι σταθερές  $A$  και  $B$  εξαρτώνται από την οπτική διάταξη του συστήματος. Στην περίπτωση ύπαρξης πολυδιασποράς στα υπό εξέταση σωματίδια το  $g_1(\tau)$  δίνεται από την σχέση:

$$g_1(\tau) = \frac{1}{I(q)} \cdot \sum_{M=1}^{\infty} N(M) \cdot M^2 \cdot S(qR_g) \cdot P(aq) \cdot \exp(-\Gamma \cdot \tau)$$

$$\text{όπου } \Gamma = q^2 \cdot D$$

D είναι ο συντελεστής διάχυσης των σωματιδίων με υδροδυναμική ακτίνα  $R_H$ . Ο συντελεστής διάχυσης δίνεται από την εξίσωση Einstein-Stokes :

$$D = k_B T / (6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_H)$$



Εικόνα 8 . Μέθοδος DLS

Στην παρούσα εργασία με τη χρήση DLS διερευνήθηκε την ικανότητα του HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> να δημιουργεί διμερή.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>**

Για την έκφραση της πρωτεΐνης σε βακτήρια χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί το τμήμα του γονιδίου της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων και η επίστρωση τρυβλίων πραγματοποιήθηκε με την Χαχάμη Γεωργία στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

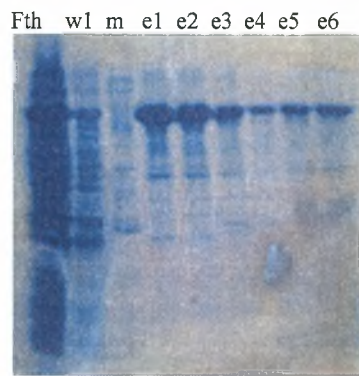
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία υπερέκφρασης της GST-HIF1α 348-826 σύμφωνα με τις συνθήκες καλλιέργειας που περιγράφηκαν στην ενότητα 3.2.1.1. Μετά την επαγωγή έκφρασης της GST- HIF1α 348-826, το παραχθέν πλέον πρωτεϊνικό τμήμα βρίσκεται εντός των κυττάρων. Τα κύτταρα από τις καλλιέργειες συλλέχθησαν με φυγοκέντρηση και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα λύσης (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM DTT, 0,1% Tween 20) παρουσία αναστολέα πρωτεασών (2mM PMSF). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων και διαχωρισμός των διαλυτών και αδιάλυτων συστατικών με φυγοκέντρηση.

Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη αγκιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη), και μετέπειτα με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αρχικά, το διαλυτό κλάσμα του εκχυλίσματος κυττάρων στα οποία εκφράστηκε ο GST- HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>, διαβιβάστηκε σε στήλη αγκιστείας που περιέχει γλουταθειόνη (GSH- beads, Amersham). Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 30ml διαλύματος (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM DTT, 0,1% Tween 20, 2mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin) για να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που δεν μας ενδιαφέρουν και μπορεί να έχουν



κατακρατηθεί ασθενώς στη στήλη και τέλος πραγματοποιήθηκε έκλουση της GST- HIF1 $\alpha$  348-826  $S \rightarrow E$  με τη προσθήκη γλουταθειόνης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της πρωτεΐνης GST-HIF1 $\alpha$  348-826 και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 .



*Εικόνα 9.* Υπερέκφραση και καθαρισμός GST-HIF1 $\alpha$  348-826  $S \rightarrow E$  με στήλη GSH. Όπου fth: flowthrough στήλης, w1: wash 1, m: marker, e=elution.

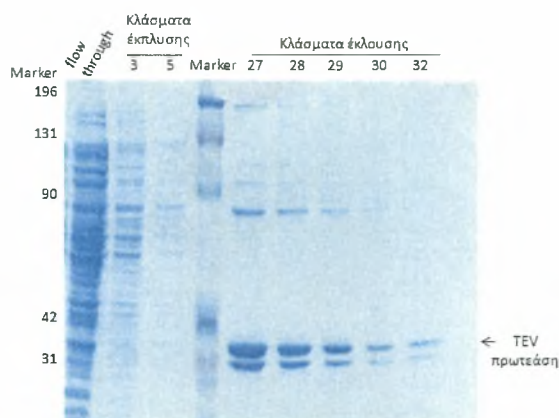
Η πρωτεΐνη σύντηξης GST-HIF1 $\alpha$  348-826  $S \rightarrow E$  εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~120 και τα κλάσματα που την περιέχουν είναι τα κλάσματα 16-28. Επίσης, διαπιστώθηκε η ύπαρξη διαφόρων ζωνών εκτός της επιθυμητής πρωτεΐνης, που αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης της GST-HIF1 $\alpha$  348-826 καθώς και διάφορες προσμίξεις από την κυτταροκαλλιέργεια. Τα πιο καθαρά κλάσματα έκλουσης ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν στο 9ml με τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,161 mg/ml (1,45 gr πρωτεΐνης) , ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 3mM MgCl $_2$ ). Η καθαρότητα αυτή θεωρείται ικανοποιητική, ώστε ο HIF1 $\alpha$  348-826  $S \rightarrow E$  να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για μελέτη των δομικών του χαρακτηριστικών.

## 4.2 Καθαρισμός TEV πρωτεάσης

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων Rosetta με τον πλασμιδιακό φορέα pET-24d, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την TEV πρωτεάση και η επίστρωση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε από την Χαχάμη Γεωργία στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό θρεπτικού υλικού σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.1.

Μετά την επαγωγή έκφρασης της TEV πρωτεάσης, με την προσθήκη 0,5mM IPTG και επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου, το παραχθέν πλέον πρωτεϊνικό τμήμα βρίσκεται εντός των κυττάρων. Τα κύτταρα από τις καλλιέργειες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε λύση αυτών με χρήση υπερήχων και διαχωρισμός των διαλυτών και αδιάλυτων συστατικών με φυγοκέντρηση. Ακολούθησε απομόνωση της πρωτεΐνης με στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup>TED. Η έκλυση της TEV πρωτεάσης από τη στήλη νικελίου πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) παρουσία ιμιδαζολίου 400mM. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Η TEV πρωτεάση εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~30.

Τα κλάσματα που φαίνεται ότι περιέχουν την πρωτεάση (27-32), ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα).



**Εικόνα 10.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν το flow through καθώς και τα αντιπροσωπευτικά κλάσματα έκπλυσης (wash 3 και 5) και κλάσματα έκλουσης (elution 27-32) της TEV πρωτεάσης από τη στήλη Ni<sup>2+</sup>TED.

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα έκλουσης περιέχουν την TEV πρωτεάση σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν στο 0,5ml με τελική συγκέντρωση 0,78μg/ml, ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol). Η καθαρότητα αυτή θεωρείται ικανοποιητική, ώστε η TEV πρωτεάση να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω .

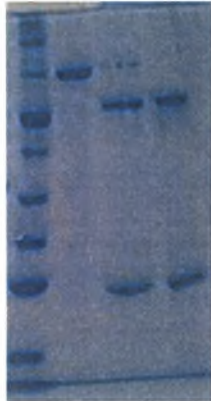
### **4.3 Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>**

#### **4.3.1 Αποκοπή της ετικέτας σήμανσης GST**

Η TEV πρωτεάση αναγνωρίζει ειδικά ένα επταπεπτίδιο, το οποίο μεσολαβεί μεταξύ της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> και της ετικέτας σήμανσης GST. Για να απομακρυνθεί η ετικέτα GST από τον HIF1α θα πρέπει να επωαστεί με κατάλληλη συγκέντρωση TEV πρωτεάσης. Έχει βρεθεί πως η επώαση με TEV σε θερμοκρασία δωματίου για 14 ώρες έχει τη βέλτιστη απόδοση, ενώ δεν παρατηρείται αύξηση της πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης .Επίσης η TEV πρωτεάση προστίθεται στον HIF1α με αναλογία 1:20 ή 1:10, δηλαδή για 20mg HIF1α βάζουμε 1 mg TEV πρωτεάση ή για 10 mg HIF1α βάζουμε 1mg TEV

αντίστοιχα. Τέλος για την επώαση HIF1α-TEV προστίθεται και 1mM DTT που βοηθά στο άνοιγμα των δισουλφιδικών δεσμών .

m Ak 20:1 10:1



**Εικόνα 11.** Κόψιμο GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με TEV . ‘Οπου m= marker, ακ= άκοπος GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>, 20:1= αναλογία HIF1α: TEV και 10:1= αναλογία HIF1α: TEV.

Η πρωτεΐνη σύντηξης GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~120, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με μοριακό βάρος ~92, ενώ το τμήμα GST με ~26.

#### 4.3.2 Αποτελέσματα καθαρισμού πρωτεΐνης HIF1α 348-826

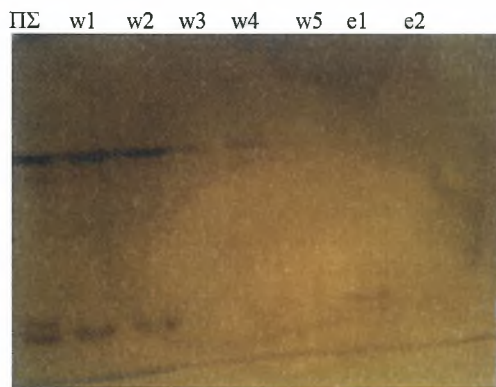
*S→E*

Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε αποκοπή των ετικετών σήμανσης GST στις βέλτιστες συνθήκες επώασης, η πρωτεΐνη διαβιβάστηκε από στήλη νικελίου Ni<sup>2+</sup>TED ώστε να απομακρυνθεί η TEV πρωτεάση από αυτήν. Η στήλη δεσμεύει την TEV πρωτεάση, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> και οι GST δεν δεσμεύονται (flow through). Έπειτα, ακολούθησε έκπλυση της στήλης (κλάσματα 1-6) με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) .Στη συνέχεια στη στήλη προστέθηκε διάλυμα με ιμιδαζόλιο 400mM για την έκλυση της TEV πρωτεάσης και για διαπίστωση ύπαρξης πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> .Τα κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% και το αποτέλεσμα ταυτοποιήθηκε μετά από βαφή της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250.

Από την ηλεκτροφόρηση είδαμε πως ο HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> δεσμεύεται στη στήλη νικελίου λόγω των ιστιδινών του και έτσι προσθέσαμε στο διάλυμα έκπλυσης 5 mM ιμιδαζόλιο.

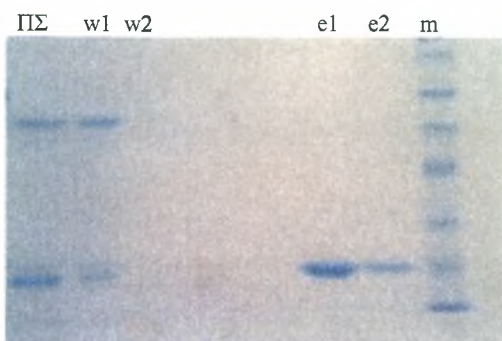
Για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> χρησιμοποιήθηκε στήλη αγχιστείας GSH. Η στήλη δεσμεύει την GST, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> δεν δεσμεύεται (flow through). Έτσι, η πρωτεΐνη διαβιβάστηκε από τη στήλη GSH και ακολούθησε έκπλυση (κλάσματα 1-4) με ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM DTT). Τέλος, στα σφαιρίδια GSH προστέθηκε διάλυμα γλουταθειόνης σε περίσσεια (κλάσματα 5-12) για την έκλουση των τμημάτων GST και για διαπίστωση ύπαρξης πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>.

Λόγω της ύπαρξης ιμιδαζολίου τα παραπάνω βήματα καθαρισμού έγιναν αντίστροφα, δηλαδή πρώτα περνάει ο HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> από τη στήλη GSH και έπειτα αφού ενωθούν τα κλάσματα που τον περιείχαν, διαβιβάζονται από στήλη νικελίου. Έπειτα τα κλάσματα έκπλυσης και έκλουσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής.



Εικόνα 12. Στήλη νικελίου μετά από κόψιμο με χρώση νιτρικού αργύρου. Όπου ΠΣ= πριν τη στήλη νικελίου, w=wash, e=elution.

Τέλος, το κλάσμα με την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 (flow through), ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) συμπυκνώθηκε στα 2,5ml και δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής.



Εικόνα 13. Στήλη GSH μετά από κόψιμο. Όπου ΠΣ= πριν τη στήλη GSH, w=wash, e=elution.

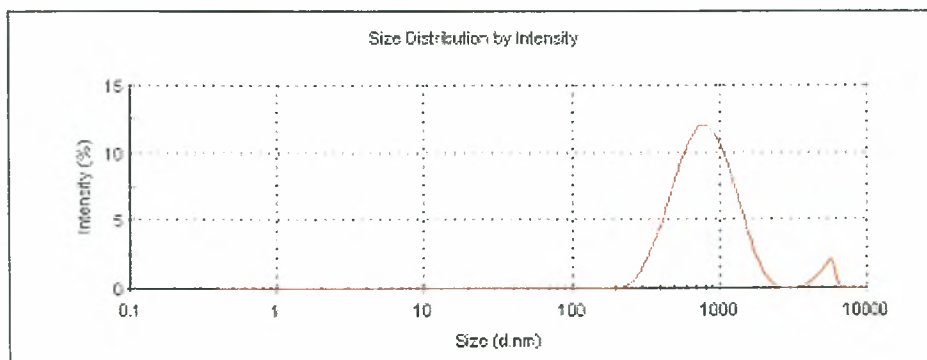
Σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> είναι σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρή και καθίσταται δυνατή η χρήση της για μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της. Η απόδοση αυτού του βήματος είναι 0,25mg/ml HIF1α 348-826<sub>S→E</sub>.

#### 4.4 Δομική μελέτη της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 με τη χρήση DLS(dynamic light scattering)

Η μέτρηση DLS πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Pasteur με τη βοήθεια του κύριου Γκιάστα.

Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει την πρώτη μέτρηση:

Cumulant Results		Distribution Results			
Count Rate (kcps):	216,7	Size (d.nm):	% Int.	Est. MW (kDa)	%Pd
Z-Average (d.nm):	669,3	Peak 1:	98,0	4632292,2	43,3
PdI:	0,990	Peak 2:	4,0	31455616,0	10,8
% Polydispersity:	62,4	Peak 3:	0,0	,0	0
Est. Mol. Wt. (kDa):	2600277,6				

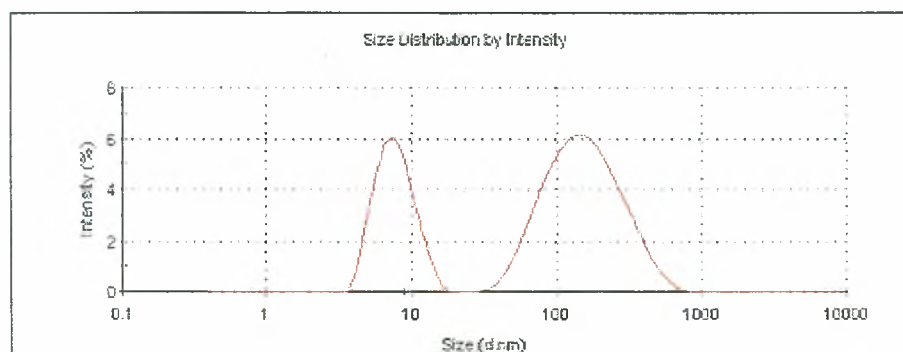


Εικόνα 14. DLS

Όλα τα σκεδαζόμενα φωτόνια προέρχονταν από τεράστια συσσωματώματα, μέσου μεγέθους 840nm (το οποίο, εάν η πρωτεΐνη ήταν globular, θα αντιστοιχούσε σε μόριο μοριακού βάρους 4632292 kDa). Αυτό μάλλον οφείλεται στην αναμονή της πρωτεΐνης μέχρι τη μέτρηση.

Το δείγμα πέρασε από φίλτρο 0.22μm και επαναλήφθηκε η μέτρηση. Τα αποτελέσματα δεν ήταν καλά γι' αυτό και γι' αυτό φυγοκεντρήθηκε το φιλτραρισμένο δείγμα στις 16000g, 4°C, 30 min και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο διάλυμα .Η τελική μέτρηση απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα:

Cumulant Results		Distribution Results			
Count Rate (kcps):	117,5	Size (d.nm):	% Int.	Est. MW (kDa)	%Pd
Z-Average (d.nm):	23,18	Peak 1:	66,8	120026,1	62,0
PDI:	0,943	Peak 2:	33,2	82,8	30,1
% Polydispersity:	87,1	Peak 3:	0,0	,0	0
Est. Mol. Wt. (kDa):	1040,2				



Εικόνα 15. Τελική μέτρηση

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι το αρχικό μόριο είναι μάλλον μεγέθους 7.46nm που αντιστοιχεί σε globular πρωτεΐνη MW 73 kDa. Σημειώνεται ότι όσο περισσότερο απέχει το σχήμα της πρωτεΐνης από το σφαιρικό, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση (υπερεκτίμηση) του μοριακού βάρους.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η πρωτεΐνη μας δεν διμερίζεται σε αντίθεση με τη μη μεταλλαγμένη , η οποία διμερίζεται.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε ο HIF1α αποτελεί σημείο κλειδί στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία. Ο παράγοντας αυτός είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργοποίηση πολλών γονιδίων ώστε να προαχθεί η αγγειογένεση, ο αναερόβιος μεταβολισμός, η ερυθροποίηση, η μεταφορά σιδήρου και η ρύθμιση του pH. Μια πολύ σημαντική περιοχή του HIF1α, που φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αλλά και στην μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του, είναι το καρβοξυτελικό τμήμα του. Στο τμήμα αυτό εδράζονται περιοχές υψηλής σημασίας, όπως η ODD, η C-NLS, η C-TAD, η N-TAD.

Αρχικά στόχος της εργασίας μας ήταν η υπερέκφραση του HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> μαζί με την GST σε μια συντηγμένη πρωτεΐνη. Έπειτα η πρωτεΐνη μας απομονώθηκε από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες με τη χρήση στήλης αγκιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σεφαρόζη. Έχει παρατηρηθεί πως η πρωτεΐνη HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> - GST είναι ευαίσθητη σε πρωτεόλυση, έτσι για να επιτύχουμε καλύτερο καθαρισμό χρησιμοποιήσαμε υψηλή ποσότητα αναστολέων πρωτεασών κατά τη διαδικασία καθαρισμού.

Το επόμενο βήμα ήταν η αποκοπή της ετικέτας GST από τον HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με τη χρήση της TEV πρωτεάσης, η οποία αναγνωρίζει ειδικά ένα επταπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται μεταξύ της πρωτεΐνης HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> και της GST, προκαλώντας την πρωτεόλυση του GST από αυτήν. Για το σκοπό αυτό, έγιναν προσπάθειες υπερέκφρασης και απομόνωσης της TEV πρωτεάσης με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED.

Έπειτα έγινε καθαρισμός του HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> με στήλη GSH και ακολούθως με στήλη νικελίου. Επειδή είδαμε πως ο HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> δεσμεύεται στη στήλη νικελίου προσθέσαμε 5 mM ιμιδαζόλιο στο διάλυμα έκπλυσης και έτσι είχαμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Αυτή η μη αναμενόμενη πρόσδεση του HIF1α 348-826<sub>S→E</sub> στη στήλη οφείλεται μάλλον



στην ύπαρξη 7 και πάνω καταλοίπων ιστιδίνης σε σειρά στην αλληλουχία του. Συμπερασματικά βλέπουμε λοιπόν πως αυτή η μετάλλαξη S→E μέσα στην αλληλουχία του HIF1α 348-826 S→E επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη στερεοδιάταξη του συγκριτικά με το φυσιολογικό τμήμα 348-826.

Παρόλες τις διαφορές στα στάδια καθαρισμού που εμφανίζει συγκρινόμενη με τη μη μεταλλαγμένη, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 S→E λαμβάνεται σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρή, ώστε να επιτευχθεί κρυστάλλωση της και μετέπειτα μελέτη της με τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και κυκλικού διχρωισμού(CD). Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης και παρατηρήθηκε πως δεν διμερίζεται σε αντίθεση με τη μη μεταλλαγμένη.

Η μελέτη του HIF1α είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή επιπλέον γνώσης για τις κυτταρικές λειτουργίες και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα εκεί. Κυρίως όμως η διερεύνηση της δομής του HIF1α μπορεί να θέσει το υπόβαθρο για την παραγωγή αποτελεσματικής φαρμακευτικής θεραπείας με βάση τη δομή. Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι ο HIF-1α φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε πολλές σοβαρές ανθρώπινες ασθένειες όπως ο καρκίνος.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Spectroscopic study of a protein from *Chlorobium Teridum* with laser scattering , *Σαμόλης Παναγιώτης*  
*Α. Σ. Κυριακίδης, Σ. Γ. Γιάντσος και Α. Ι. Καράμπελας*  
*Εργαστήριο Τεχνολογίας Χημικών Εγκαταστάσεων, Τμήμα Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ., Παν. Θυρίδα 455, Θεσ/νίκη 54006 και Ερευνητικό Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών*
- 2.
3. Bardos J.I., Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1755 (2): p.107-120.
4. Becker C.M., Rohwer N., Funakoshi T., Cramer T., Bernhardt W., Birsner A., Folkman J., D'Amato R.J. 2-Methoxyestradiol Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Suppresses Growth of Lesions in a Mouse Model of Endometriosis. *Amer J Pathology*. 2008, 172: p.534-544.
5. Berra E., Benizri E., Ginouvès A., Volmat V., Roux D., Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J*. 2003, 22(16): p.4082–4090.
6. Bonicalzi M.E., Groulx I., de Paulsen N., Lee S. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 2001, 276(2): p.1407-1416.
7. Brahimi-Horn C., Mazure N., Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal*. 2005, 17(1): p.1-9.
8. Bruick R.K., McKnight S.L. A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science*. 2001, 294 (5545): p.1337-1340.
9. Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *G Denelop*. 2003, 17: p.2614-2623.
10. Brüne B., Zhou J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Curr Med Chem*. 2003, 10(10): p.845-55.
11. Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*. 1996, 76(3): p.839-85.
12. Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia. *J. Biol. Chem*. 2000, 275 (33), p. 25130–25138.
13. D'Angio C.T., Finkelstein J.N. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab*. 2000, 71(1-2): p.371-80.
14. Fandrey J., Gorr T.A., Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res*. 2006, 71(4): p.642-51.
15. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999, 59(16): p.3915-8.

16. Fisher T.S., Etages S.D., Hayes L., Crimin K., Li B. Analysis of ARD1 Function in Hypoxia Response Using Retroviral RNA Interference. *J. Biol. Chem.* 2005, 280(18): p.17749-17757.
17. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 1992, 3(2): p.65-71.
18. Freedman S.J., Sun Z.Y., Kung A.L., France D.S., Wagner G., Eck M.J. Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by CITED2. *Nat Struc Biol.* 2003, 10: p. 504 – 512.
19. Goldberg M.A., Dunning S.P., Bunn H.F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 1988, 242 (4884): p. 1412-1415.
20. Groulx I., Lee S. Oxygen-Dependent Ubiquitination and Degradation of Hypoxia-Inducible Factor Requires Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol.* 2002, 22 (15): p.5319-5336.
21. Haddad J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res.* 2002, 3(1): p.26.
22. Hellwig-Bürgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999, 94(5): p.1561-7.
23. Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1998, 95(14): p.7987-7992.
24. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara JM., Lane WS., Kaelin WG Jr. HIF $\alpha$  Targeted for VHL-mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> Sensing. *Science.* 2001, 292: p.464 -468.
25. Jeong J.W., Bae M.K., Ahn M.Y., Kim S.H., Sohn T.K., Bae M.H., Yoo M.A., Song E.J., Lee K.J., Kim K.W. Regulation and Destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell.* 2002, 111: p.709-720.
26. Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H., Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J.* 1998, 17(22): p.6573-86.
27. Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999, 274(10): p. 6519-6525.
28. Kietzmann T., Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol.* 2005, 16(4-5): p.474-86.

29. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch. *Science*. 2002, 295 (5556): p. 858-861.
30. Luo J.C., Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$ ). *Oncogene*. 2001, 20(12): p.1435-44.
31. Metzzen E., Ratcliffe P.J. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem*. 2004, 385(3-4): p.223-30.
32. Metzzen E., Berchner-Pfannschmidt U., Stengel P., Marxsen J.H., Stolze I., Klinger M., Huang W.Q., Wotzlaw C., Hellwig-Bürigel T., Jelkmann W., Acker H., Fandrey J. Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*. 2003, 116: p. 1319-1326.
33. Michiels C., Minet E., Mottet D., Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF- $\kappa$ B and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med*. 2002, 33: p. 1231-1242.
34. Minet E., Arnould T., Michel G., Roland I., Mottet D., Raes M., Remacle J., Michiels C. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*. 2000, 468(1): p.53-8.
35. Mylonis I., Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G., Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S., Simos G. Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem*. 2006, 281(44): p. 33095-33106.
36. O'Rourke J.F., Dachs G.U., Gleadle J.M., Maxwell P.H., Pugh C.W., Stratford I.J., Wood S.M., Ratcliffe P.J. Hypoxia response elements. *Oncol Res*. 1997, 9(6-7): p.327-32.
37. Pugh C.W., O'Rourke J.F., Nagao M., Gleadle J.M., Ratcliffe P.J. Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the alpha Subunit. *J Biol Chem*. 1997, 272(17): p. 11205-11214.
38. Ratcliffe P.J., O'Rourke J.F., Maxwell P.H., Pugh C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol*. 1998, 201(8): p.1153-62.
39. Ravi R., Mookerjee B., Bhujwala Z.M., Sutter C.H., Artemov D., Zeng Q., Dillehay L.E., Madan A., Semenza G.L., Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev*. 2000, 14(1): p.34-44.
40. Richard D.E., Berra E., Gothié E., Roux D., Pouyssegur J. p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 1999, 274(46): p.32631-32637.
41. Roland H. Wenger. Mammalian oxygen sensing, Signalling and gene regulation. *J Exp Biol*. 2000, 203: p.1253- 1263.
42. Sang N., Stiehl D.P., Bohensky J., Leshchinsky I., Srinivas V., Caro J. MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300. *J. Biol. Chem*. 2003, 278(16): p. 14013-14019.

43. Schofield C.J., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5(5): p.343-54.
44. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res.* 2001 May, 49(5): p.614-7.
45. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3(10): p.721-32.
46. Semenza G.L, Jiang BH, Leung SW. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A genes contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996, 271: p.32529-32537.
47. Semenza G.L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002, 8(4): p.62-7.
48. Srinivas V., Leshchinsky I., Sang N., King MP., Minchenko A., Caro J. Oxygen Sensing and HIF-1 Activation Does Not Require an Active Mitochondrial Respiratory Chain Electron-transfer Pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (25): p.21995-21998.
49. Wang G.L., Jiang B., Rue EA., Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O<sub>2</sub> Tension. *Proc Natl Acad Sci.* 1995a, 92: p. 5510-5514.
50. Yasinska I.M., Sumbayev V.V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 $\alpha$  protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003, 549 (3) : p. 105-9.
51. Zhu H., Bunn H.F. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes. *Respir Physiol.* 1999, 115(2): p.239-47.
52. T Gaber, R Dziurla, R Tripmacher, G R Burmester, F Buttgereit, *Ann Rheum Dis* 2005;64:971–980. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O<sub>2</sub>. See what HIF can do!
53. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways  
Jes'us MATEO\*1, Marta GARC'IA-LECEA\*, Susana CADENAS\*, Carlos HERN'ANDEZ\* and Salvador MONCADA†

