



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ  
ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ  
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ  
ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ HIF-2 $\alpha$**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΓΚΟΤΙΝΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **Λιάκος Παναγιώτης**

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Κοντού Μαρία**

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Μπαλατσός Νικόλαος**

Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2009- Σεπτέμβριος 2009, στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου και πραγματοποιήθηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Λιάκο Παναγιώτη, που δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κα. Κοντού Μαρία, Λέκτορα Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σίμο Γεώργιο, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κ. Μυλωνή Ηλία, Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρ Μπεφάνη Χριστίνα για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά της. Σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τη χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά της. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ και φίλη μου Αλκμήνη Καλούση για την βοήθεια και τη στήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία στα αρχικά αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-2α είναι η ρυθμιστική υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 (Hypoxia Inducible Factor 2). HIF-2α εκφράζεται κυρίως στο ενδοθήλιο, στο συκώτι, την καρδιά, τους πνεύμονες και τον πλακούντα.

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2 (HIF-2) αποτελεί ένα ετεροδιμερή μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων, που σχετίζονται με τη γλυκόλυση, την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση, τον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική διαφοροποίηση, σαν απόκριση στην υποξία. Ο HIF-2α ρυθμίζει τη δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο εμβρυϊκός μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 (Pou5f1, Oct-3/4), κυκλίνη D1, TWIST1, ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-α (TGF-α), και η ερυθροποιητίνη (EPO) σε συνθήκες υποξίας. Μια ομάδα γονιδίων, που συμπεριλαμβάνει τον αγγειακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), και τον μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT-1) ρυθμίζονται τόσο από τον HIF-2α όσο και από τον HIF-1α. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση και την ενεργότητα της επαγόμενης υπομονάδας του, του HIF-2α, δεν έχουν ακόμα μελετηθεί επαρκώς.

Αυτή η μελέτη είχε στόχο την κλωνοποίηση και απομόνωση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης HIF-2α. Για το σκοπό αυτό, cDNA που κωδικοποιεί τον πλήρους μεγέθους HIF-2α κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T-1, ώστε να εκφραστούν βακτηριακά οι σχετικές GST-συνσημασμένες πρωτεΐνες. Η πλήρους μεγέθους GST-HIF-2α πρωτεΐνη εκφράστηκε για πρώτη φορά σε βακτήρια. Έπειτα καθαρές GST και GST-HIF-2α πρωτεΐνες δεσμεύτηκαν πάνω σε στήλες γλουταθειόνης -σεφαρόζης και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συγκατακρίμνησης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa και Huh7. Μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 150 kDa από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα Huh7 και τρεις άλλες πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 250-300 kDa, 120 kDa και 150 kDa βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με την HIF-2α υπομονάδα.

Στο μέλλον, θα γίνει προσπάθεια ταυτοποίησης αυτών των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας.

## **ABSTRACT**

HIF-2 $\alpha$  is the regulatory subunit of the transcription factor HIF-2 (Hypoxia Inducible Factor 2). HIF-2 $\alpha$  is predominantly located in endothelium, liver, heart, lungs and placenta.

Hypoxia inducible factor 2 (HIF-2) is a heterodimeric transcription factor that controls the expression of a large group of genes, related to glycolysis, angiogenesis, erythropoiesis, cell death and differentiation, in response to hypoxia. HIF-2 $\alpha$  upregulates specifically transcription factors such as Oct-4 (Pou5f1, Oct-3/4), CYCLIN D1, TWIST1, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), and erythropoietin (EPO) under hypoxia. An other group of genes, including vascular endothelial growth factor (VEGF), and glucose transporter 1 (GLUT-1) are regulated both by HIF-2 $\alpha$  and HIF-1 $\alpha$  subunits. The molecular mechanisms that regulate the expression and activity of its inducible subunit HIF-2 $\alpha$  have not been studied sufficiently.

This study aimed to the cloning and isolation of full length HIF-2 $\alpha$  protein. To this end, cDNAs coding for full length HIF-2 $\alpha$  fragment were subcloned to pGEX-4T-1 expression vector in order to bacterially express the relevant GST-tagged proteins. The full length GST-HIF-2 $\alpha$  was for the first time successfully expressed in bacteria. In addition, purified GST and GST-HIF-2 $\alpha$  were bound onto glutathione-sepharose beads and used in pull-down assays with HeLa and Huh7 protein extracts. One protein with apparent molecular weight 150 kDa from Huh7 protein extracts and other three proteins from HeLa protein extracts with apparent molecular weight 250-300 kDa, 120kDa and 150kDa were found to interact with HIF-2 $\alpha$  subunit.

In the future, we shall investigate the identification of these proteins by mass spectrometry.

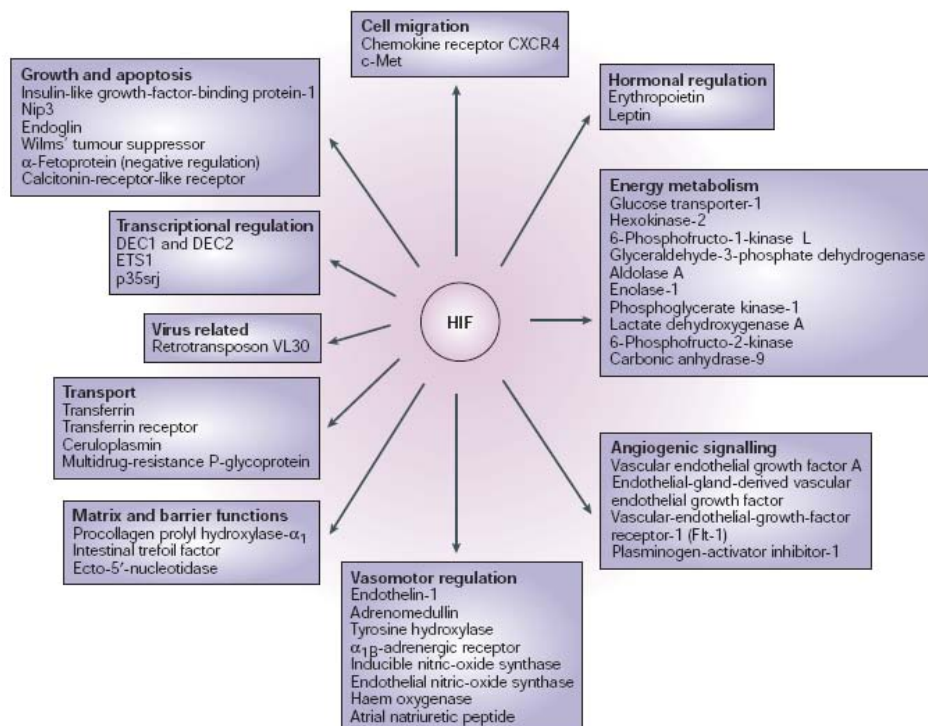
# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	2
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	3
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>1.1 Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων HIF</b>	8
<b>1.2 Έκφραση και κατανομή του HIF-2α</b>	9
<b>1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α</b>	10
1.3.1 Δομή	10
1.3.2 Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση	11
1.3.3 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	12
1.3.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μεταγραφικών συνενεργοποιητών	12
1.3.5 Μεταγραφικοί στόχοι	13
<b>1.4 Φαινότυποι με απώλεια λειτουργίας του HIF-2α</b>	14
<b>1.5 HIF-2α και καρκίνος</b>	17
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	19
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
<b>2.1 Υλικά</b>	20
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη	20
2.1.2 Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)	20
2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια	21
2.1.4 Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας	21
2.1.5 Αντισώματα	21
<b>2.2 Μέθοδοι</b>	22
2.2.1 Ενίσχυση αλληλουχίας του HIF-2α με PCR	22
2.2.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction:	23
2.2.3 Πέψη του HIF-2α και του πλασμιδίου pGEX-4T1 με ένζυμο περιορισμού <i>Bam</i> HI, αντίδραση με αλκαλική φωσφατάση (CIP) και ανάκτησή τους από παρασκευαστική πηκτή (preparative gel)	24
2.2.4 Ποσοτικοποίηση και αντίδραση λιγάσης	25

2.2.5 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασηματισμό (competent) και μετασηματισμός <i>E. coli</i> Top10 και <i>E. coli</i> BL21RIL26	26
2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)	26
2.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)	27
2.2.8 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουλεάσες	27
2.2.9 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GST-HIF-2α σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21RIL με IPTG	28
2.2.10 Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος	29
2.2.11 Καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-HIF-2α με χρωματογραφία αγκιστείας σε στήλη GSH-Sepharose	29
2.2.12 Διαπίδυση	30
2.2.13 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	30
2.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	30
2.2.15 Βαφή της πηκτής πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue	31
2.2.16 Μεταφορά υγρής φάσης και ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	32
2.2.17 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa	33
2.2.18 Πειράματα συγκατακρήμνισης (pulldown assays) πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa με τις πρωτεΐνες GST και GST-HIF-2α	34
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>3.1 Κατασκευή του τμήματος του πλήρους μεγέθους HIF-2α (1-874)</b>	36
<b>3.2 Ενίσχυση του πλήρους μεγέθους HIF-2α με PCR</b>	36
<b>3.3 Κλωνοποίηση του πλήρους μεγέθους HIF-2α στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1</b>	37
<b>3.4 Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης HIF-2α σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21RIL</b>	40
<b>3.5 Συγκατακρήμνιση (pulldown assay) πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa και Huh7 με GST-HIF-2α</b>	43
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	46
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	48

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παροχή οξυγόνου στους ιστούς είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των κυττάρων. Η ανεπάρκεια οξυγόνου στους ιστούς είναι χαρακτηριστικό ενός μεγάλου αριθμού παθοφυσιολογικών καταστάσεων όπου η αιματική ροή είναι ελλιπής για να παρέχει καλή οξυγόνωση. Το υποξικό περιβάλλον (χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου) των ιστών ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην επαγωγή ή αναστολή της μεταγραφής μιας πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως αγγειογένεση, μεταβολισμός της γλυκόζης, κυτταρική επιβίωση και απόπτωση (Schofield 2004 et al., Semenza et al., 2003). Το κλειδί της μεταγραφικής απόκρισης στην υποξία βρίσκεται σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες HIF.

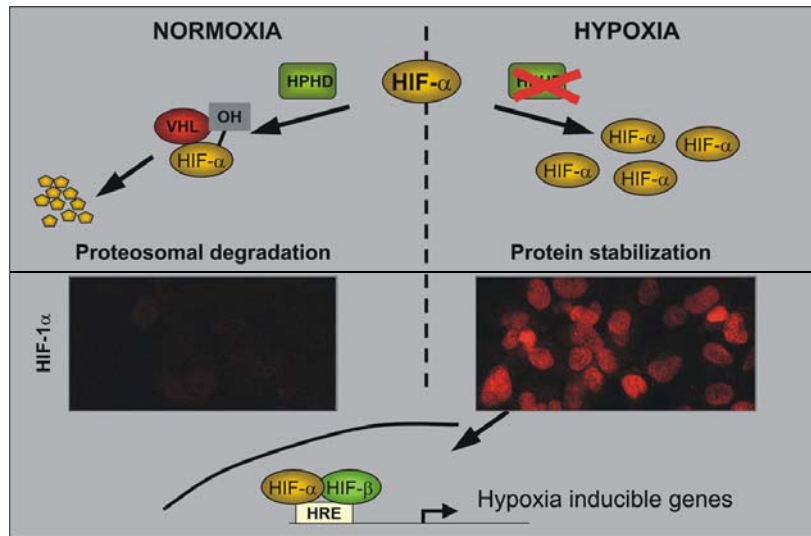


**Εικόνα 1:** Γονίδια στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας HIF. Οι HIF ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τον ενεργειακό μεταβολισμό, την ορμονική ρύθμιση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μεταγραφική ρύθμιση, τη μετάσταση κ.α. Από Schofield, Nature RMCB 2004



### **1.1 Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων HIF**

Οι επαγόμενοι από την υποξία HIFs είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με δομή έλικας-στροφής- έλικας, helix- loop- helix (bHLH)/ Per- ARNT- Sim (PAS). Αποτελούνται από μια ευαίσθητη στο οξυγόνο α υπομονάδα, η οποία σχηματίζει ένα ενεργό σύμπλοκο με τον HIF-1β/ ARNT. (Gu YZ *et al.*, 2000). Υπάρχουν περισσότερες από μια α υπομονάδες, όπως ο HIF-1α, ο HIF-2α και ο HIF-3α. Κάτω από συνθήκες νορμοξίας ,(φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου), οι HIF- α υπομονάδες υδροξυλιώνονται σε κατάλοιπα προλίνης. Αυτό επιτρέπει την αναγνώρισή τους από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel- Lindau (pVHL). Η υδροξυλίωση καταλοίπων προλίνης των HIF-α υπομονάδων από υδροξυλάσες προλίνης (Proline Hydroxylase Domain, PHD) κάνει δυνατή την πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau, pVHL) που οδηγεί στην αποικοδόμησή τους στο πρωτεόσωμα. Έτσι, παρουσία οξυγόνου και μέσα σε 5 λεπτά από τη σύνθεσή του, οι HIF-α υπομονάδες υδροξυλιώνονται, ουβικουιτινυλιώνονται και αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα. Κατά τη διάρκεια υποξίας οι HIF-α υπομονάδες οδηγούνται στον πυρήνα, μέσω των ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη, τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Οι HIF-α υπομονάδες αλληλεπιδρούν με τον ARNT σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia responsive elements HRE) των γονιδίων στόχων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία όπως για παράδειγμα με την αύξηση της μεταφοράς της γλυκόζης και της μεταβολικής δραστηριότητας, καθώς και την ερυθροποίηση ή την αγγειογένεση.



Εικόνα 2: Ενεργοποίηση και αποικοδόμηση του HIF-2 $\alpha$

## 1.2 Έκφραση και κατανομή του HIF-2 $\alpha$

Ο HIF-2 $\alpha$  επίσης γνωστός ως EPAS-1, MOP2, HLF και HRF εκφράζεται κυρίως στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον πλακούντα και η δράση του στους παραπάνω ιστούς φαίνεται να υπερέχει έναντι του HIF-1 $\alpha$ . (Tian et al., 1998).

Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκε η σταθεροποίηση του HIF-2 $\alpha$  σε ηπατοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του δωδεκαδάκτυλου, νεφρικά κύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και αστροκύτταρα όταν αυτά υποβάλλονται σε συστηματική υποξία. Παρόλο που περιγράφεται στη βιβλιογραφία ότι ο HIF-2 $\alpha$  σταθεροποιείται σε υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου από τον HIF-1 $\alpha$  in vitro, ο HIF-2 $\alpha$  δεν παρατηρήθηκε στα όργανα που εξετάστηκαν κάτω από συνθήκες νορμοξίας. Η συσσώρευση του HIF-2 $\alpha$  οφείλεται κυρίως σε μετα-μεταφραστικές ρυθμίσεις καθώς τα επίπεδα mRNA δεν επάγονται σημαντικά κάτω από συνθήκες υποξίας (Gort et al., 2007). Τα επίπεδα του mRNA του HIF-2 $\alpha$  είναι υψηλά στους ιστούς που είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά οξυγόνου, όπως στον πνεύμονα, την καρδιά και το ενδοθήλιο (Tian H et al., 1997). Στον πνεύμονα, η πρωτεΐνη του HIF-2 $\alpha$  σταθεροποιείται σε πνευμονοκύτταρα τύπου II και σε ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα ως απάντηση στην υποξία, ενώ ο HIF-1 $\alpha$  δεν εντοπίζεται. Τα επίπεδα των μεταγράφων του HIF-2 $\alpha$ , ρυθμίζονται σταδιακά στον πνεύμονα, με επαγωγή στο mRNA κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ανάπτυξης. Κύτταρα της νευρικής κορυφής, τα οποία συνθέτουν ορμόνες σημαντικές για τη ρύθμιση του καρδιακού τόνου, επίσης

εκφράζουν HIF-2α. Πιο συγκεκριμένα, στο όργανο του Zuckerkandl, σημαντικό για τη σύνθεση των κατεχολαμινών κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Ανάλυση των HIF-α σε ισχαιμικό μυοκάρδιο, έδειξε ότι επαγωγή των HIFα συμβαίνει στην περιοχή του αλλοιωμένου ιστού του εμφράγματος, συμπεριλαμβάνοντας καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. Τα παραπάνω χωρο-χρονικά πρότυπα έκφρασης των HIFα υποδηλώνουν ότι οι δυο α υπομονάδες (HIF-1α και HIF-2α) έχουν μοναδικούς και συμπληρωματικούς ρόλους στην προσαρμογή των ιστών στην υποξία.

### **1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α**

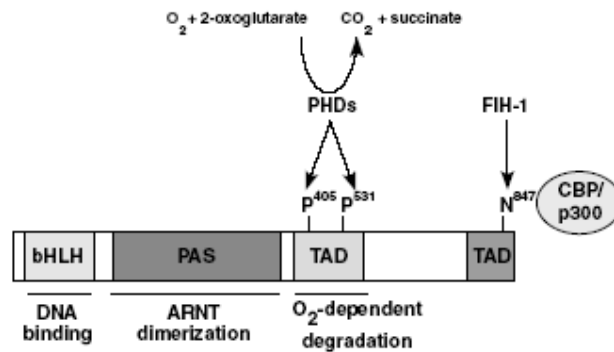
#### **1.3.1 Δομή και λειτουργία**

Ο HIF-2α παρουσιάζει τον υψηλότερο βαθμό ομολογίας με την αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α στα μοτίβα α) bHLH (basic Helix-Loop-Helix χαρακτηριστική των μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με DNA)(85%), β) PAS-A (PER-ARNT-SIM) (68%) και γ) PAS-B (PER-ARNT-SIM) (73%), που συμμετέχουν στο διμερισμό με τον ARNT (*Tian H et al., 1997*). Επίσης ο HIF-2α διαθέτει δυο περιοχές υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους (Trans Activation Domains, TADs), μια αμινο-τελική, την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και μια καρβοξυ-τελική, την C-TAD (αμινοξέα 830-870) που εντοπίζονται στην καρβοξυ-τελική επικράτεια του συνόλου του HIF-2α. Η N-TAD περιοχή του HIF-2α είναι εκείνη που απονέμει την εξειδίκευση για τα γονίδια στόχους και η αντικατάστασή της από την αντίστοιχη του HIF-1α έχει δείξει ότι μεταβάλλει την εξειδίκευση του HIF-2 (*Hu CJ et al., 2007*). Η C-TAD περιοχή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300 με οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση. Σε συνθήκες νορμοξίας το συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn 847) στη C-TAD περιοχή υδροξυλιώνεται από τον παράγοντα αναστολής του FIH-1 (Factor Inhibiting HIF, FIH-1) και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP και p300.

### 1.3.2 Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση

Τα επίπεδα οξυγόνου ρυθμίζουν την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF-2α. Κατά τη νορμοξία είναι γενικά αποδεκτό ότι υδροξυλιώνονται οι προλίνες 405 και 531 του HIF-2α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη VHL που αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης. Η ουβικουιτινίωση του HIF-2α οδηγεί την πρωτεΐνη για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεόσωμα. Εκτός από οξυγόνο οι PHDs απαιτούν ως συν-υπόστρωμα α- κετογλουταρικό και σαν συμπαραγόντες  $Fe^{2+}$  και ασκορβικό. Εφόσον το 2-OG είναι μεταβολίτης του κύκλου του Krebs, η ενεργότητά των PHDs ρυθμίζεται από τη λειτουργία του κύκλου. Το ηλεκτρικό οξύ που παράγεται κατά την υδροξυλίωση και από τον κύκλο του Krebs δρα σαν αναστολέας των PHDs (*Schofield CJ et al., 2005*).

Η υποξία αυξάνει τα επίπεδα του HIF-2α κυρίως επειδή εμποδίζει την αποικοδόμησή του στο πρωτεόσωμα. Έτσι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ο HIF-2α μεταφέρεται στο πυρήνα όπου διμερίζεται με την HIF-1β υπομονάδα (ή ARNT) και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων μετά από πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία, HREs με αλληλουχία 5'RCGTG3' τα οποία βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών (*Semenza et al., 1997*).



**Εικόνα 3:** Δομή του HIF-2α, συμπεριλαμβάνοντας την bHLH DNA-binding περιοχή, PAS περιοχή, και την περιοχή απενεργοποίησης (TAD). Προλυλουδροξυλάσες (PHDs) υδροξυλιώνουν τις προλίνες 405 και 531 κατά την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση (ODD) του HIF-2α κάτω από συνθήκες νορμοξίας, στοχεύοντάς τον για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα. Επιπλέον, η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 847 στη C-τελική TAD περιοχή από ανασταλτικούς παράγοντες HIF (FIH-1) εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 (Patel SA and MC Simon 2008)

### **1.3.3 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων**

Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, η μελέτη της επίδρασης των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων έχει επικεντρωθεί σχεδόν στον HIF-1α. Έτσι, ο HIF-2α είναι λιγότερο μελετημένος μιας και στον HIF-1α αποδίδονταν η ρύθμιση των γονιδίων που επάγονται από την υποξία. Ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνεται από την CK2 καζεϊνική κινάση 2 (Mottet et al., 2005), την GSK3β (Sodhiet et al., 2001) και από τις MAPK (Mylonis et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης από τις MAPK είναι να εμποδίζει την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα, εξουδετερώνοντας την αναγνώριση από την εξπορτίνη CRM1 (Mylonis et al., 2008). Επίσης, ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι μπορεί να υποστεί και άλλες τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, S- νιτροζυλίωση και σουμοϋλίωση. Η φωσφορυλίωση του HIF-2α δεν έχει επαρκώς διαλευκανθεί. Η βιβλιογραφία περιγράφει ότι χρησιμοποιώντας τον αναστολέα των MAPK, PD98059, αναστέλλεται η μεταγραφική ενεργότητα του υπερεκφρασμένου HIF-2α ενώ υποστηρίζεται ότι δεν φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν οι MAP κινάσες να φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες συνενεργοποιητές που συμμετέχουν στην μεταγραφική δραστικότητα του HIF-2 α (Conrad PW et al., 1999 JBC). Επίσης μελέτες τροποποίησης του HIF-2α έχουν προσδιοριστεί στην φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο θρεονίνης (Thr-324) την έκφραση του επιδιορθωτικού γονιδίου του DNA NBS1 (To et al., 2006) και στη φωσφορυλίωση του καταλοίπου θρεονίνης (Thr-844) στην C-TAD περιοχή του HIF-2 (Gradin et al., 2002) που πιθανόν συμμετέχει στη αλληλεπίδραση με τον CBP. Έχει δειχθεί ότι ο CBP αλληλεπιδρά πιθανόν με τον HIF-2 α και τον ρυθμίζει θετικά (Ema M et al 1999 EMBO, Arany, Z. et al, 1996 PNAS). Ενώ οι Janknecht *et al.* έδειξαν ότι τα καρβοξυτελικά άκρα του CBP αποτελούν στόχο φωσφορυλίωσης των MAPK *in vitro* (Janknecht *et al.*, 1996 BBRC). Ωστόσο ο μηχανισμός αυτός ενεργοποίησης του HIF-2 α και άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις δεν έχουν μελετηθεί.

### **1.3.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω μεταγραφικών συνενεργοποιητών**

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως χρειάζεται η συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την μέγιστη και την ιστοειδική επαγωγή γονιδίων στόχων των HIF. Πολλά μέλη της οικογένειας των Ets μεταγραφικών παραγόντων συνεργάζονται με τον HIF-2α. Για παράδειγμα ο Elk συνεργάζεται με τον HIF-2α για την επαγωγή της έκφρασης του υποδοχέα 2 του VEGF (Flk-1). Ο Elk, ένα άλλο

μέλος της οικογένειας των Ets, συνδέεται με τον HIF-2α αλλά και συνεργάζεται με αυτόν με την πρόσδεσή του σε γειτονικές θέσεις (Ets binding sites) των HRE γονιδίων στόχοι όπως ο CITED 2, EPO, IGFBP3 και PAI1 (*Hu CJ et al., 2007*). Η φυσική αλληλεπίδραση του γίνεται στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α (*Elvert G JBC 2003*).

Ένας άλλος μεταγραφικός συνενεργοποιητής που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-2α με μελέτη διπλού υβριδισμού είναι ο NEMO (NF-κB essential modulator). Με πειράματα ανοσοκατακρίμησης και in vitro αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών δείχθηκε ότι συνδέεται ειδικά στον HIF-2α, και όχι στον HIF-1α, επάγοντας σε νορμοξία την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α και βοηθά στην καλύτερη στρατολόγηση του CBP/p300 στον HIF-2α (*Bracken C et al., 2005 JBC*). Η στρατολόγηση των συνενεργοποιητών όπως ο CBP, p300 είναι απαραίτητη για την επαγωγή των γονιδίων που εξαρτώνται από τους HIF. Οι CBP (**CREB-binding protein** ή **cAMP-response element-binding protein**) και p300 είναι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί συνενεργοποιητές που ενοποιούν πολλαπλά σηματοδοτικά μηνύματα ως πλαίσιο στήριξης που συναρμολογεί τα σύμπλοκα της μεταγραφικής ενεργοποίησης.

### **1.3.5 Μεταγραφικοί στόχοι**

Η C-TAD στρατολογεί τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές Creb-binding protein CBP/p300 με οξυγονοεξαρτούμενο τρόπο. Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγίνης στην C-TAD περιοχή υδροξυλιώνεται από τον ανασταλτικό παράγοντα HIF-1α (FIH-1), εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους CBP/p300.

Και οι δυο HIF-α υπομονάδες διμερίζονται με τον ARNT και αναγνωρίζουν τις ίδιες DNA αλληλουχίες (5' - CGTG – 3') οι οποίες βρίσκονται στους προαγωγούς ή τους ενισχυτές των γονιδίων στόχων και ονομάζονται στοιχεία απάντησης στην υποξία (HREs hypoxia response elements). Παρόλο που έχουν αυτές τις ομοιότητες, μελέτες γύρω από την έκφραση και τη λειτουργικότητα αποκάλυψαν ότι οι HIF-α υπομονάδες ρυθμίζουν και κοινά και διαφορετικά γονίδια στόχους. Για παράδειγμα, η HIF-1α υπομονάδα είναι η μόνη που ενεργοποιεί την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων, όπως κινάση του φωσφογλυκερικού και η γαλακτική αφυδρογονάση A, η καρβονική ανυδράση-9 (CA9), και το προαποπτωτικό γονίδιο BNIP-3. Αντίθετα, ο

εμβρυϊκός μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 (Pou5f1, Oct-3/4), κυκλίνη D1, TWIST1, μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-α (TGF-α) και η ερυθροποιητίνη (EPO) ρυθμίζονται κάτω από συνθήκες υποξίας από την HIF-2α υπομονάδα (Gruber Met al., 2007). Μια τρίτη ομάδα γονιδίων, που συμπεριλαμβάνει τον αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), μεταφορέας της γλυκόζης 1 (GLUT-1) ρυθμίζονται και από τις δυο υπομονάδες (Wamecke C et al., 2004).

Η συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να απαιτείται για τη βέλτιστη και κυτταροειδική ρύθμιση των HIF γονιδίων στόχων. Πολλαπλοί μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας Ets μπορούν να συνεργαστούν με την HIF-2α υπομονάδα για την ενεργοποίηση γονιδίων σε συνθήκες υποξίας. Για παράδειγμα ο Ets-1 και η HIF-2α υπομονάδα συνεργάζονται για την ενεργοποίηση της έκφρασης του VEGF υποδοχέα-2 (VEGFR-2 ή Flk-1). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του Ets και της HIF-2α υπομονάδας μεσολαβείται από την C- τελική περιοχή του HIF-2α. Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας Ets, ο Ets-1, συνεργάζεται με τον HIF-2α για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων CITED-2, EPO, insulin- like growth factor- binding protein-3 (IGFBP3) και PAI-1 (Aprelikova O et al., 2006). Σε MCF7 καρκινικά κύτταρα του μαστού, κάποια γονίδια που ρυθμίζονται από την HIF-2α υπομονάδα, παρουσιάζουν Ets δεσμευτικές περιοχές παρακείμενες στις HREs. Αυτός μπορεί να είναι κάποιος μηχανισμός ρύθμισης γονιδίων στόχων ειδικά από τον HIF-2α. Ο NF-κB essential modulator (NEMO) επίσης αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον HIF-2α. Ο NEMO αλληλεπιδρά ειδικά μόνο με τον HIF-2α και όχι με τον HIF-1α, και ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α.

#### **1.4 Φαινότυποι με απώλεια της λειτουργίας του HIF-2α**

Η στοχευμένη απαλοιφή του HIF-2α οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα μεταξύ των E9.5 και E13.5, με ποικίλους φαινότυπους ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο των ποντικών (πίνακας 1). Οι (Tian et al., 1998) διαπίστωσαν ότι τα ποντίκια που στερούνται τον HIF-2α πέθαναν κατά τη διάρκεια της κύησης από βραδυκαρδία και χαμηλά επίπεδα νοραδρεναλίνης, και υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες υποξίας ο HIF-2α ρυθμίζει την εμβρυική σύνθεση των κατεχολαμινών. Πράγματι, ο HIF-2α εκφράζεται στα κύτταρα της νευρικής κορυφής που συνθέτουν κατεχολαμίνες και την υδροξυλάση της τυροσίνης, ένα σημαντικό ένζυμο για τη σύνθεση των

κατεχολαμινών που επάγεται από την υποξία (Norris ML et al., 1995). Τα ομόζυγα νεογνά πέθαναν σύντομα μετά από τη γέννησή τους λόγω της ατελούς εμβρυϊκής ωρίμανσης των πνευμόνων. Η αναστολή της σηματοδότησης του VEGF υποδοχέα με τη χρήση των αντι-Flk-1 αντισωμάτων επανόρθωσε το φαινότυπο πνευμόνων των ποντικών που στερούνται HIF-2α και η ενδοαμνιακή χορήγηση VEGF βελτίωσε τη λειτουργία των πνευμόνων και την επιβίωση των νεογέννητων ποντικών.

Ακόμη, σε ένα άλλο μοντέλο ποντικών με απαλοιφή του HIF-2α, παρατηρήθηκαν αγγειακές ατέλειες στον εμβρυικό ασκό όπου ο HIF-2α φαίνεται επίσης να διαδραματίζει έναν ρόλο στη ρύθμιση της δυναμικής αιμοφόρων αγγείων κατά τη διάρκεια των παθολογικών καταστάσεων. Πιθανόν, η ετεροζυγωτία για τον HIF-2α να είναι προστατευτική ενάντια στην πνευμονική υπέρταση και την κοιλιακή υπερτροφία που προκαλείται από χρόνια υποξία. Μπορεί να προκαλείται από την υποξική απορύθμιση της ενδοθηλίνης T (ET-1) η οποία προκαλεί πνευμονική αγγειοσυστολή. Μελέτες σε HIF-2α ετεροζυγωτικά ποντίκια επιβεβαίωσαν ότι η ET-1 δεν απορρυθμίζεται και δεν αυξάνεται η κυκλοφορία κατεχολαμινών ως απάντηση στην υποξία (Brusselmans K et al., 2003).

Διασταυρώνοντας ποντίκια με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, οι (Scortegagna M et al., 2003) κατάφεραν να αποκτήσουν έναν μικρό αριθμό βιώσιμων ενήλικων HIF-2α<sup>-/-</sup> ποντικών. Αυτά τα ποντίκια παρουσίασαν δυσλειτουργίες σε πολλά ζωτικά όργανα όπως πανκυτταροπενία (απουσία κυττάρων ερυθράς και λευκής σειράς), ηπατική στεάτωση, υπερτροφία της καρδιάς και ρετινοπάθεια, που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό stress. Η μελέτη αυτή προσδίδει στον HIF-2α ένα νέο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η γλουταθειόνη του υπεροξειδίου. Επιπλέον πειράματα σε αυτά τα ποντίκια με μοσχεύματα μυελού των οστών κατέδειξαν ότι η πανκυτταροπενία και η αιμοποίηση αποκαταστάθηκαν, προτείνοντας ότι ο φαινότυπος δημιουργείται από το μικροπεριβάλλον. Τα HIF-2α<sup>-/-</sup> ποντίκια επίσης είχαν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα νεφρικής ερυθροποιητίνης προτείνοντας ότι η μείωση της παραγωγής της Epo ήταν υπεύθυνη για τα προβλήματα στην αιμοποίηση.

Λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω ανόμοιους φαινότυπους μετά από αποσιώπηση του HIF-2α, οι διαφορετικές λειτουργίες των α υπομονάδων του HIF κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης παραμένουν ασαφείς.



Χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιζόμενο σύστημα αποσιώπησης, μελετήθηκε ο ρόλος του HIF-2α μετά τη γέννηση ανεξάρτητα από τις απαιτήσεις για HIF-2α κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Η έντονη αποσιώπηση του HIF-2α οδηγεί σε αναιμία που συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα Epo, που καταδεικνύει ότι ο HIF-2α είναι ο φυσιολογικός ρυθμιστής της παραγωγής Epo στα ενήλικα ποντίκια. Επιπλέον, η τοπική σύνθεση Epo από τα αστροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα εμφανίζεται επίσης να ρυθμίζεται από τον HIF-2α και μπορεί να είναι σημαντικός για την επιβίωση των νευρώνων κατά τη διάρκεια ισχαιμίας (Scotergagna M et al., 2005).

Η μεταφορά οξυγόνου από τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεσολαβείται από αναστρέψιμη δέσμευση σιδήρου στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Επομένως, οι οργανισμοί πρέπει να συντονίζουν την ερυθροποίηση με τη διαθεσιμότητα του σιδήρου. Οι HIFs ρυθμίζουν την έκφραση διάφορων γονιδίων σχετικών με την ομοιοστάση του σιδήρου, όπως η τρανσφερίνη (Rolf A et al., 1997). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του σιδήρου (IRPs), αφ' ετέρου, ελέγχουν το μεταβολισμό του σιδήρου μέσω μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των mRNAs. Οι IRPs ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των mRNAs με τη δέσμευσή τους στα στοιχεία απόκρισης σιδήρου (iron response elements IREs) που βρίσκονται στις μη μεταγραφόμενες περιοχές (UTRs) των mRNA. Μια συντηρημένη IRE προσδιορίστηκε πρόσφατα στην 5' UTR περιοχή του HIF-2α. Αυτό το στοιχείο προάγει την πρωτεϊνική μετάφραση του HIF-2α κάτω από αυξημένη διαθεσιμότητα σιδήρου. Το εύρημα αυτό συνδέει την ερυθροποίηση με την ομοιοστασία του σιδήρου.

**Table 1** Summary of HIF-2 $\alpha$  knockout phenotypes

Study	Phenotype
Tian et al. <sup>15</sup>	Bradycardia, reduced noradrenaline, partial rescue with metabolic intermediate
Peng et al. <sup>39</sup>	Vascular defects in yolk sac and embryo
Compagnolle et al. <sup>19</sup>	Reduced surfactant production, respiratory distress syndrome
Scotergagna et al. <sup>40</sup>	Pancytopenia, hepatic steatosis, cardiac hypertrophy, retinopathy, increased oxidative stress
Gruber et al. <sup>31</sup>	Global postnatal deletion, anemia rescued by exogenous Epo

**Πίνακας 1:** Ανακεφαλαιωτικός πίνακας φαινοτύπων με απαλοιφή των γονιδίων του HIF-2α

### 1.5 Ο ρόλος του HIF-2α σε ασθένειες

Η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α πρωτεϊνών εντοπίζεται στην πλειοψηφία των ανθρώπινων τύπων όγκων, όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη και των νεφρών, ενώ οι φυσιολογικοί ιστοί ήταν αρνητικοί και για τους δυο HIFs, με εξαίρεση τα μακροφάγα του μυελού των οστών (bone marrow) όπου εκφράζεται ο HIF-2α, (*Talks KL et al., 2000*). Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1α παρουσιάζει μια πιο περιορισμένη έκφραση στις περινεκρωτικές περιοχές των όγκων από τον HIF-2α. Η υπερέκφραση αυτή της HIF-2α πρωτεΐνης, ή mRNA έχει καταδειχτεί σε περίπου είκοσι διαφορετικούς τύπους όγκων. Το πρότυπο έκφρασης της HIF-2α πρωτεΐνης φαίνεται να είναι τόσο πυρηνικό όσο και κυτταροπλασματικό.

Σαν προγνωστικός δείκτης, τα υψηλά επίπεδα HIF-2α συνδέονται με προχωρημένα στάδια και κακή πρόγνωση σε πολλές μορφές όγκων. Ανάμεσα σε αυτούς είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, της κύστης, του εντέρου και το νευροβλάστωμα. Ενώ υπάρχουν πολλές μελέτες σε κυτταρικές σειρές και μοντέλα ποντικών όπου δείχνουν αδιαμφισβήτητα το ρόλο του HIF-2α στη νόσο VHL και στο RCC, ωστόσο αμφισβητείται σε μελέτες που περιλαμβάνουν κλινικές δοκιμές σε ασθενείς. Τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α υπερεκφράζονται σε μερικά RCCs, με πιο έντονη την έκφραση του HIF-2α σε πιο προχωρημένες αλλοιώσεις, ενώ τα υψηλά επίπεδα HIF-1α σε κάποιες περιπτώσεις συνδέονται με αυξημένη επιβίωση του ασθενούς.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο HIF-2α εκφράζεται σε πρώιμα στάδια αιμαγγειοβλαστώματος. Καθώς τα αιμαγγειοβλαστώματα είναι πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο HIF-2α παίζει έναν άμεσο ρόλο στην αγγειογένεση και κατά συνέπεια στην ογκογένεση μέσω της επαγωγής του VEGF από τον HIF-2α. Ο ρόλος της υποξίας και των HIFs στην πρόοδο του όγκου στο αστροκυτταρικό γλοίωμα, έχει μελετηθεί και πρόσφατη εργασία από τους Haapasalo et al δείχνουν στενή σχέση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης CA9, γνωστός στόχος των HIF, και με καθόλου ευνοϊκά κλινικά αποτελέσματα στο γλοίωμα.

Επίσης, ο HIF-2α έχει συσχετιστεί άμεσα με την CA9 και τα μη ευνοϊκά αποτελέσματα στον καρκίνο του λαιμού και της κεφαλής. Με τη χρήση

μικροσυστοιχιών, οι (Khatua S et al., 2003) δείξανε ότι το αστροκύτωμα προχωρημένου επιπέδου στην παιδική ηλικία υπερεκφράζει τον HIF-2α.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κλωνοποίηση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1, η έκφρασή του σε βακτηριακά κύτταρα και η απομόνωσή του σαν πρωτεΐνη σύντηξης με GST, έπειτα από χρωματογραφία αγγιστείας. Στη συνέχεια, θα ακολουθήσει μια πρώτη προσέγγιση για τη μελέτη αλληλεπίδρασης της χμαιοτικής πρωτεΐνης GST-HIF-2α με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κυτταρικές σειρές HeLa και Huh7 ώστε να διαπιστωθεί αν η υπομονάδα αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες.

# ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Υλικά

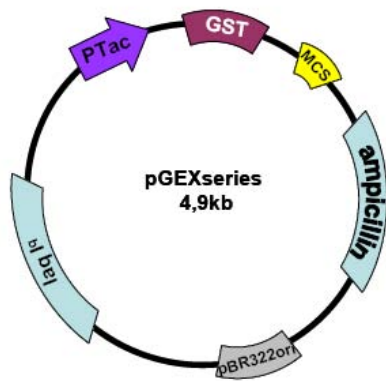
### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

TOP10 (InVitrogen) : Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

BL21 RIL (Stratagene): Τα συγκεκριμένα *E.coli* κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Από τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν οι Lon και OmpT πρωτεάσες. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αυτά των αργινίνης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του RIL πλασμιδίου.

- 2.1.2 Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)



**Εικόνα 4: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1** : Φαίνονται σχηματικά ο υποκινητής του πλασμιδίου, η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ori), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, το γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI, η περιοχή κωδικοποίησης της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση ολόκληρου του HIF-2α στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, η οποία βρίσκεται μέσα στην MCS περιοχή και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη GST. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev έχει μέγεθος 4,9 kb, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του

lac οπερονίου lacI και τον υποκινητή PTac.

### **2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια**

Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικής καθαρότητας έγινε από την εταιρία: Sigma (St. Louis, USA).

Τα ακτινογραφικά φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν για τις αυτοραδιογραφίες είναι του τύπου Kodak-X-Omat S film, της εταιρίας Kodak και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των ακτινογραφικών φιλμ ήταν αντίστοιχα: X-Ray developer και X-Ray fixer της ίδιας εταιρίας.

### **2.1.4 Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας**

Τα ένζυμα μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

### **2.1.5 Αντισώματα**

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Αντι-GST αντίσωμα από ορό κατσίκας της εταιρίας Amersham Biosciences, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα.
2. Αντι-HIF-2α αντίσωμα από ορό κουνελιού της εταιρίας Abcam, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα.
3. Αντί-IgG συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα από ποντικό έναντι της IgG κατσίκας της εταιρίας Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα.
4. Αντί-IgG συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα από κατσίκα έναντι της IgG κουνελιού της εταιρίας Cell Signaling το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Ενίσχυση αλληλουχίας του HIF-2α με PCR

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ενισχύθηκαν η πλήρης αλληλουχία του HIF-2α.

Οι αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

*HIF-2α F*: 5'- TTTT**GGATCC**ATGACAGCTGACAAGGAGAAG - 3'

Οι αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

*HIF-2α R*: 5'- TTTT**GGATCC**GTCAGGTGGCCTG -3'

Με υπογράμμιση έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI (GGATCC) ,ενώ με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (ATG και TCA αντίστοιχα).

Πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις PCR και χρησιμοποιήθηκε Vent πολυμεράση λόγω της μεγάλης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

Αντίδραση	1	2
pcDNA3-HIF-2α (μl)	1	1
Buffer 10x (μl)	5	5
dNTPs 2mM each (μl)	1	1
Vent 2u/μl (μl)	0.5	0.5
F primer	2	2
R primer	2	2
DMSO	5	5
MgSO <sub>4</sub>	1.5	0.5
H <sub>2</sub> O (μl)	31.5	32.5
Σύνολο (μl)	50	50

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν

- 30 sec → 94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec → 45°C στάδιο υβριδοποίησης
- 2 min30 sec → 72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 35

Αρχική αποδιάταξη 5 min → 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min → 72°C

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (Tm) Oligo Calculator.

Στο τέλος 5 µl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE 1x (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA) και βρωμιούχο αιθίδιο (σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml).

### **2.2.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction:**

Στο συνολικό όγκο της αντίδρασης της PCR με Vent πολυμεράση προστέθηκαν 3 όγκοι διαλύματος QG, κατόπιν προστέθηκε ένας όγκος ισοπροπανόλης και έγινε επώαση στους 50°C με συνεχείς αναδεύσεις για 10 min (μέχρι να διαλυθεί το gel). Το περιεχόμενο από το σωληνάκι τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα σωληνάκι συλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 1 min, απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 rpm για 1 min, απορρίφθηκε το αδέσμευτο κλάσμα και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Τέλος κάτω από τη στήλη τοποθετήθηκε καθαρό σωληνάκι και το DNA εκλούστηκε με προσθήκη 30 µl H<sub>2</sub>O και φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 1 min.



### **2.2.3 Πέψη του HIF-2α και του πλασμιδίου pGEX-4T1 με ένζυμο περιορισμού BamHI, αντίδραση με αλκαλική φωσφατάση (CIP) και ανάκτησή τους από παρασκευαστική πηκτή (preparative gel)**

Ο HIF-2α που καθαρίστηκε στο προηγούμενο στάδιο καθώς και το πλασμίδιο pGEX-4T1 όπου πρόκειται να εισαχθούν υφίστανται πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI για 2h στους 37° C. Το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 25μl DNA του HIF-2α
- 6μl Buffer *BamHI* 10x
- 2μl *BamHI* 5u/μl
- 27μl H<sub>2</sub>O

Για το πλασμίδιο pGEX-4T1 το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 5 μg (10μl) pGEX-4T1
- 5 μl Buffer *BamHI* 10x
- 2 μl *BamHI* 5u/μl
- H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 50μl

Στο τέλος της πέψης έγινε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του pGEX-4T1 για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι προστέθηκαν 2 μl ενζύμου CIP για 30 min στους 37°C.

Όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστική πηκτή (1% αγαρόζης σε 1x TAE, 1:20.000 βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml). Ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα των δειγμάτων στα 90V και με το τέλος της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκαν οι ζώνες από την πηκτή με τη βοήθεια λυχνίας UV(364nm) και ακολούθησε ανάκτηση από την πηκτή με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction:

Τα τμήματα της πηκτής με το DNA τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια, ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 3 όγκοι διαλύματος QG σε ένα όγκο της πηκτής (100 mg~100 μl) και επώαστηκαν για 10 min στους 50°C έτσι ώστε να λιώσει η πηκτή. Το περιεχόμενο από το σωληνάκι τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα σωληνάκι συλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 17.900 g (13000 rpm) για 1 min, απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 17.900 g (13000 rpm) για 1 min,

απορρίφθηκε το αδέσμευτο κλάσμα και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Τέλος κάτω από τη στήλη τοποθετήθηκε καθαρό σωληνάκι και το DNA εκλούστηκε με προσθήκη 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  και φυγοκέντρωση στις 17.900 g (13000 rpm) για 1 min.

#### **2.2.4 Ποσοτικοποίηση και αντίδραση λιγάσης**

Για την ποσοτικοποίηση των κομματιών του DNA που θα χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση λιγάσης ηλεκτροφορήθηκαν γνωστοί όγκοι και από τις υποψήφιες ενθέσεις (inserts) καθώς και του πλασμιδίου φορέα. Ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης με μείγμα αντίδρασης ως εξής:

	Ligation 1:1	Ligation 1:3	Ligation 1:5
<b>pGEX4T1 (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	2	2	2
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	1	2.2	3.6
Buffer 10x ( $\mu\text{l}$ )	1	1	1
T4 DNA ligase ( $\mu\text{l}$ )	1	1	1
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	5	3.8	2.4
Σύνολο ( $\mu\text{l}$ )	10	10	10

#### **2.2.5 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός *E. coli* Top10 και *E. coli* BL21RIL**

Σε στελέχη *E. coli* Top10 και BL21RIL έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου pGEX-4T1-HIF-2 $\alpha$ . Πρώτα παρασκευάστηκαν κύτταρα *E. coli* Top10 και *E. coli* BL21RIL δεκτικά για μετασχηματισμό (competent). Εμβολιάστηκαν καλλιέργειες 3ml θρεπτικού TYM με αποικίες από πιάτο με stock καλλιέργειες Top10 και BL21RIL αντίστοιχα και έγινε επώαση O/N (overnight) στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραιώση των καλλιεργειών 1:200 και επώασή τους στους 37°C μέχρι  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.350-0.400$ . Τότε οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 1811 g για 5 min στους 4°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25ml διαλύματος TFB-I και επώαστηκε για 10 min στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 3220 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml διαλύματος TFB-II. Έγινε επώαση στον πάγο για 60 min και τέλος μοιράστηκαν σε σωληνάκια από 100 $\mu\text{l}$  διαλύματος από την προηγούμενη επαναιώρηση.

Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 0.5μl του πλασμιδίου pGEX-4T1-HIF-2α (0,5~1μg/μl) ή 10μl από αντίδραση λιγάζης σε διαφορετικά σωληνάκια με κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min. Έπειτα έγινε θερμικό σοκ στους 42°C για 3 min και αμέσως μετά τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον πάγο για άλλα 5 min. Μετά προστέθηκαν 900μl θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικά και επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος επιστρώθηκαν 100 μl κυττάρων σε πιάτα LB<sub>amp</sub> για τα Top10 και LB<sub>amp/chi</sub> για τα BL21RIL.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

**TYM** :2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0.1M NaCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>

**TFB-I**: 30mM CH<sub>3</sub>COOK, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol, pH 7.0

**TFB-II** :10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 20% Glycerol, pH 7.0

**LB** :1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl

**τροβλία LB<sub>amp</sub>** :1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin

**τροβλία LB<sub>amp/chi</sub>** :1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin, chloramphenicol 34 μg/μl

### **2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)**

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες 3 ml θρεπτικού υλικού LB<sub>amp</sub> εμβολιάστηκαν αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10 με το πλασμίδιο pGEX-4T1-HIF-2α και επώαστηκαν O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Την άλλη μέρα συλλέχθηκε η καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε στα 12000 rpm για 12 sec. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 300μl διαλύματος TENS και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν έγινε προσθήκη 150μl CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 5.2 και ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min στα 20.800 g και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι. Έπειτα προστέθηκε 1ml αιθανόλης 100%, ανάδευση και τοποθέτηση στους -20°C για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 10 min και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου. Έγινε ξέπλυμα με 1ml 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 20μl αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

**TENS** :0.1N NaCl, 0.5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7.5

### **2.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)**

Από O/N καλλιέργειες *E.coli* Top10 σε 100ml θρεπτικού LB<sub>amp</sub> στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση με το πλασμίδιο pGEX-4T1-HIF-2α φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στα 3220 g για 15 min στους 4°C. Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το midi kit της Qiagen.

Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν 4ml Buffer P<sub>1</sub> (Resuspension Buffer + RNase) από το kit της Qiagen και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν προστέθηκαν 4ml Buffer P<sub>2</sub> (Lysis Buffer) από το kit της Qiagen και έμειναν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου αφού έγινε καλή ανάμιξη. Προστέθηκαν 4 ml Buffer P<sub>3</sub> (Neutralization Buffer), έγινε ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min. Έπειτα έγινε φυγοκέντρωση στα 3220 g για 30 min, το υπερκείμενο αποχύθηκε σε νέο Falcon αφού διηθήθηκε μέσα από γάζα. Πρώτα η στήλη ξεπλύθηκε με λίγα ml Buffer QBT. Έπειτα το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αποχύθηκε στη στήλη, ακολούθησε ξέπλυμα 2 φορές από 10ml Buffer QC, έκλουση του DNA με 5 ml Buffer QF που μοιράστηκαν σε σωληνάκια τύπου corex των 10 ml. Προστέθηκαν 3,5 ml ισοπροπανόλης αναμίχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 g για 30 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν άλλα 2ml από αιθανόλη 70%, φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 10.000 g στους 4°C. Τέλος το ίζημα ξηράνθηκε και αναδιαλύθηκε σε 100 μl ddH<sub>2</sub>O.

### **2.2.8 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουλεάσες**

Το πλασμίδιο pGEX-4T1-HIF-2α υπέστη πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και EcoRI. Το μείγμα κάθε πέψης περιείχε: 1μg DNA από κάθε πλασμίδιο, 2 μl buffer 10x κατάλληλο για το ένζυμο που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση, 0,5 μl από το ένζυμο περιορισμού και H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Οι συνθήκες των πέψεων ήταν 37°C για 1με 2 ώρες. Ο έλεγχος των πέψεων έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

Παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1x με βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία 1:20000 (από διάλυμα 10 mg/ml). Τα δείγματα της πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ηλεκτροφορήθηκαν στα 80V.

### **2.2.9 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GST-HIF-2α σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με IPTG**

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής: Μια αποικία από τρυβλίο που περιείχε κύτταρα με τα μετασχηματισμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες (overnight) στους 37°C. Με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάστηκε 1lt LB (με αντιβιοτικά) και επώαστηκε υπό ανακίνηση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε στα 0.4-0.5 (μέτρηση στα 600 nm). Στην καλλιέργεια προστέθηκε 0.5 mM IPTG και η επώαση συνεχίστηκε στους 21° C. Μετά την πάροδο 3 ωρών έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 4000 x g. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με H<sub>2</sub>O και αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

### **2.2.10 Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος**

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (10 ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 500 ml αρχικής καλλιέργειας). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (40 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων) και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10000xg για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αχιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιείχε 20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 5% γλυκερόλη, 0,1 % Tween 20, και 5 mM DTT.

#### **2.2.11 Καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-HIF-2α με χρωματογραφία αγγιστείας σε στήλη GSH-Sepharose**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST). Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στα σφαιρίδια είναι το τριπεπτιδίο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη.

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά) που φέρουν το γονίδιο της μεταφοράς της γλουταθειόνης (συνήθως από το *Schistosoma japonicum*) πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χμαιοκινικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν από τις υπόλοιπες με τον παραπάνω τρόπο. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια καθαρής γλουταθειόνης η οποία ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των σφαιριδίων της στήλης για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον συγκεκριμένο τρόπο απομόνωσης ήταν η εξής:

Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εξέφραζαν τις χμαιοκινικές GST-πρωτεΐνες επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (300 με 400 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 1 lt καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 1min και κρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια (flow through). Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 10min της στήλης με 10 ml διαλύματος λύσης. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με επώαση των σφαιριδίων με 3x 0,5 ml διαλύματος 10mM γλουταθειόνης, 25mM Tris pH 9 για 5 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του κλάσματος.

### **2.2.12 Διαπίδυση**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει αλλαγή των μικρομοριακών συστατικών του διαλύματος μιας πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO 6000-8000 της Spectrum). Η μεμβράνη με το δείγμα εισήχθη στη συνέχεια στο διάλυμα διαπίδυσης (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδυσης) και ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4°C. Μετά το πέρας των 16 ωρών το δείγμα συλλέχθηκε από το εσωτερικό της μεμβράνης και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 10000xg και στους 4°C για την απομάκρυνση ιζήματος που πιθανόν δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

### **2.2.13 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H<sub>2</sub>O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρείται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

### **2.2.14 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE**

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS

εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel) (3,33 ml 30% acrylamide, 2.5 ml 4x Separating Buffer, 4,15 ml ddH<sub>2</sub>O, 40μl 10% APS και 20μl TEMED) αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτική επιστοιβάξη (stacking gel) (1.2 ml 30% acrylamide, 2.0 ml 4x stacking buffer, 4.7 ml ddH<sub>2</sub>O, 50μl 10% APS, 50μl TEMED). Πάνω από την πηκτική επιστοιβάξη τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτική έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα με τη βοήθεια της πιπέτας Hamilton και το gel ηλεκτροφορήθηκε στα 150V.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

**Stock 4x Sample Buffer:** 250mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2% SDS, 40% glycerol, 0.2% Bromophenol Blue, 100mM DTT (προστίθεται λίγο πριν τη χρήση)

**4x Separating Buffer:** 1.5M Tris, 8mM EDTA, 0.4% SDS, pH 8.8

**4x stacking buffer:** 0.5M Tris, 8mM EDTA, 0.4% SDS, pH 8.8

**5x Διαλύματος ηλεκτροφόρησης:** 0.25M Tris, 1.92M glycine, 10mM EDTA, 0.5% SDS

### **2.2.15 Βαφή της πηκτής πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτική βάφεται με διάλυμα Coomassie 0,1%, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η πηκτική αποχρωματίζεται με επώαση σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 10% αιθανόλης για 2 με 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή



ανάδευση. Τέλος γίνεται ενυδάτωση της πηκτής με αφαίρεση του διαλύματος αποχρωματισμού με επώαση σε νερό για 20 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.

#### **2.2.16 Μεταφορά υγρής φάσης και ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)**

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτική αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer), δηλαδή για μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν με τη σειρά 3 χαρτιά Wattman, η νιτροκυτταρίνη, η πηκτική πολυακρυλαμίδιου και τέλος άλλα 3 χαρτιά Wattman (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς [transfer buffer]. Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτική και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική συσκευή τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά με τη νιτροκυτταρίνη να είναι προς τον θετικό πόλο. Η μεταφορά έγινε στα 400mA για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα και δούμε ότι όντως έγινε μεταφορά πρωτεϊνών. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer) (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-Tween 20) για 1 ώρα, ξέπλυμα 3 φορές με PBS-Tween (15 min, 5 min, 5 min). Έπειτα έγινε επώαση με το πρώτο αντίσωμα goat anti-GST σε αραιώση 1:3000 σε PBS-Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη για τουλάχιστον 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min). Ακολούθως έγινε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα mouse anti-goat (ορός ποντικίου ενάντια των IgG κατσίκας) σε αραιώση 1:5000, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS-Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min).

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών, προστίθεται στη μεμβράνη αντιδραστήριο ECL για 1 λεπτό και ακολουθεί εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Το αντιδραστήριο ECL περιέχει 10ml λουμινόλη (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5), 100μl κουμαρικό οξύ (6,8mM σε DMSO) και 30μl υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου η ραφανιδική υπεροξειδάση οξειδώνει τη λουμινόλη με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, η ένταση του οποίου αυξάνει κατά

1000 φορές με την παρουσία του κουμαρικού οξέος. Η εκπομπή φωτός αποτυπώνεται από τη μεμβράνη σε φωτογραφικό φιλμ. Το φιλμ εμφανίζεται για 3 λεπτά στο διάλυμα ανάπτυξης και το σήμα σταθεροποιείται με παραμονή 3 λεπτών στο διάλυμα σταθεροποίησης.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

**Διάλυμα μεταφοράς:** 48mM Tris, 39mM glycine, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, pH 9.2

**Ponceau S 0.2%:** 2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10

**PBS Phosphate Buffer Saline:** 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl

**PBS-Tween 20:** 0.1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

### **2.2.17 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa**

Σε τρυβλίο με καλλιεργημένα κύτταρα HeLa, αφού έχει γίνει αφαίρεση του θρεπτικού, προστίθεται 1,5 ml διαλύματος PBS 1x και γίνεται απόξεση των κυττάρων από τον πάτο του τρυβλίου. Τα αποκολλημένα κύτταρα σε PBS τοποθετούνται σε σωληνάκι των 1,5 ml και φυγοκεντρείται το περιεχόμενό του για 12 sec στα 12.000g. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 400 μl υποτονικού διαλύματος A. Ακολουθεί ανάδευση για 10 sec σε κυκλικό αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 15 min. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 12 sec στα 12.000g. Αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο και αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl διαλύματος B. Ακολουθεί ανάδευση για 10 sec σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 20 min. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 12 sec στα 12.000g και το υπερκείμενο που αποτελεί το πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και φυλάσσεται στους -20°C.

**Διάλυμα A:** 10mM Hepes pH 7.5, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DDT, 0,2mM PMSF

**Διάλυμα B:** 20mM Hepes pH 7.5, 25% γλυκερόλη, 420mM NaCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM DDT, 0,2mM PMSF

### **2.2.18 Δοκιμασία in vitro αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών πάνω σε σφαιρίδια αγγιστείας (pulldown assay)**

Τα πειράματα συγκατακρήμνισης συνιστούν μία μέθοδο, η οποία επιτρέπει τη διερεύνηση της δυνατότητας των διαφόρων πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μας δίνει επίσης και μία πρώτη εκτίμηση για το πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση αυτή.

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη δυνατότητα καθήλωσης διαφόρων πρωτεϊνών σύντηξης (π.χ με GST) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων στηλών χρωματογραφίας (γλουταθειόνη-σεφαρόζη) με τις οποίες παρουσιάζουν αγγιστεία. Οι καθηλωμένες αυτές πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες οι οποίες είτε βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είτε περιέχονται σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και με τις οποίες παρουσιάζουν αγγιστεία. Η διαδικασία γίνεται παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων ή/και απορρυπαντικών ώστε να αποφεύγονται τυχαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, και οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Στην παρούσα εργασία ως μέσο καθήλωσης χρησιμοποιήθηκε, κατά κύριο λόγο, η στήλη σεφαρόζης-γλουταθειόνης για τη δέσμευση πρωτεϊνών που είχαν εκφραστεί ως πρωτεΐνες σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Στα πειράματα αναφοράς έγινε δέσμευση σκέτης GST στα σφαιρίδια.

Αναλυτικά τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι τα παρακάτω: Αρχικά τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπούνται με τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία, στους 4° C, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBST. Η δέσμευση της πρωτεΐνης σύντηξης με την GST (ή της σκέτης GST) στα σφαιρίδια της στήλης γίνεται παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4° C για 1 ώρα. Χρησιμοποιούνται περίπου 20 μg πρωτεΐνης σε κάθε αντίδραση. Το υπερκείμενο της στήλης απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 x g και τα σφαιρίδια της στήλης πλένονται 2 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα TNMT (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100) για 10 λεπτά στους 4° C. Στη συνέχεια μία συγκεκριμένη ποσότητα (~100 μg) από τις πρωτεΐνες των οποίων η αλληλεπίδραση πρόκειται να ελεγχθεί (πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa) αραιώνεται στο ρυθμιστικό TNMT και επωάζεται με τα σφαιρίδια της στήλης, όπου είναι καθηλωμένη η GST-πρωτεΐνη, υπό ανακίνηση για 1 ώρα στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 x g και απομάκρυνση του υπερκειμένου, ακολουθούν 3

πλύσεις των σφαιριδίων των 10 λεπτών η κάθε μία, στους 4° C, στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

Τα δείγματα προετοιμάζονται για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η πηκτή βάφεται με Coomassie Brilliant Blue, αποχρωματίζεται και ξηραίνεται.

**PBST:** 8.0 gr/l NaCl, 0.2 gr/l KCl, 1.15 gr/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 gr/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1mM PMSF

**TNMT:** 150mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF

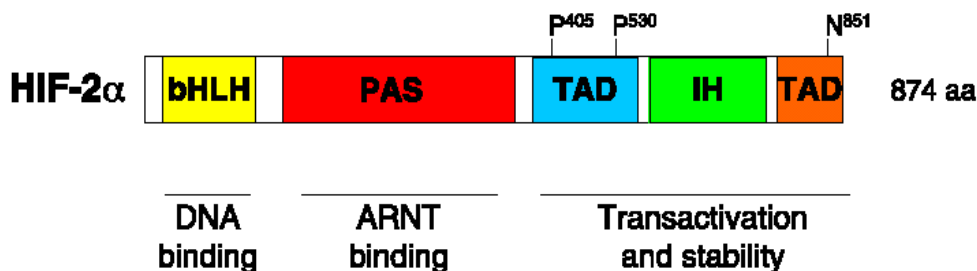
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Κατασκευή του τμήματος του πλήρους μεγέθους HIF-2α (1-874)

Ο HIF-2α περιλαμβάνει τις περιοχές bHLH (basic Helix-Loop-Helix), PAS (PER-ARNT-SIM) και TAD. Η περιοχή bHLH είναι χαρακτηριστική των μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται στο DNA. Η περιοχή PAS συμμετέχει στον διμερισμό με τον ARNT. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ρυθμιστική περιοχή (IH, Inhibitory Domain) η οποία καταστέλλει την δράση των TADs ειδικά σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου.

### 3.2 Ενίσχυση του πλήρους μεγέθους HIF-2α με PCR

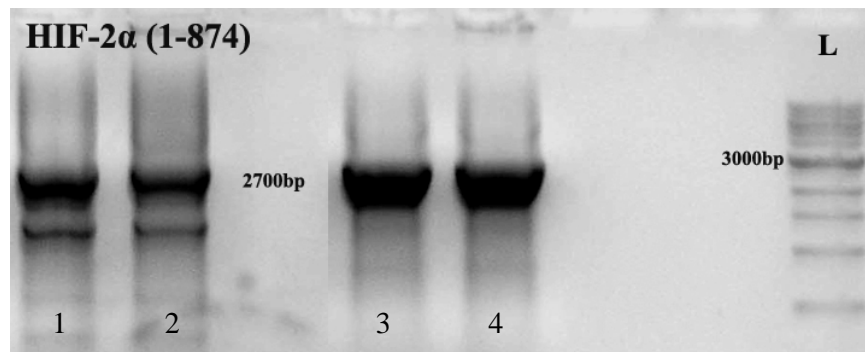
Σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν στην ενίσχυση του πλήρους μεγέθους HIF-2α (1-874) και αναμένεται να δώσουν προϊόν 2700 bp. Επιπλέον προκειμένου να κλωνοποιηθεί το προϊόν σε πλασμίδιο pGex 4T1, στους εκκινητές εισαγάγαμε την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BamH1.



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση του τμήματος του πλήρους HIF-2α που κατασκευάστηκε. Πάνω, απεικονίζεται ο πλήρους μήκους HIF-2α (874 aa) με σημειωμένες τις διάφορες δομικές περιοχές του. (αρίθμηση σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία).

Η ενίσχυση του παραπάνω του HIF-2α έγινε με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας την Vent πολυμεράση και παρήχθησαν τα προϊόντα που φαίνονται στην Εικόνα 6. Στην προσπάθεια να προτυπώσουμε τις συνθήκες της PCR μεταβάλλαμε τις συγκεντρώσεις MgSO<sub>4</sub> ώστε να έχουμε ένα καθαρό προϊόν του

προβλεπόμενου μοριακού βάρους (Εικόνα 6). Τελικά η PCR μας έδωσε καθαρό προϊόν μοριακού βάρους 2700bp χρησιμοποιώντας  $MgSO_4$  σε συγκέντρωση 5mM.



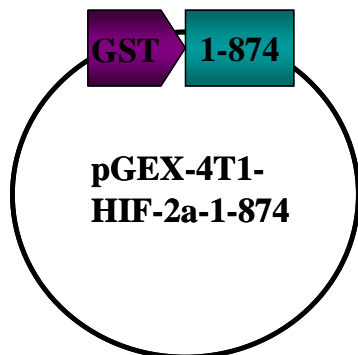
**Εικόνα 6: Ενίσχυση του πλήρους μεγέθους HIF-2α (1-874) με PCR.**

Ο πλήρους μεγέθους HIF-2α (1-874) δίνει προϊόν PCR 2700 bp. Στις διαδρομές 1 και 2 βλέπουμε το προϊόν της αντίδρασης με συγκέντρωση  $MgSO_4$  3mM ενώ στις 3 και 4 με συγκέντρωση 5mM

### 3.3 Κλωνοποίηση του πλήρους μεγέθους HIF-2α στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1

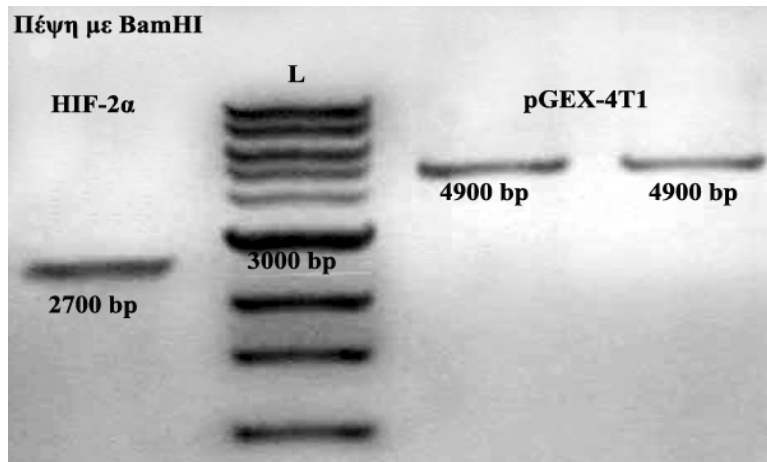
Επιλέξαμε τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 που περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Το ένθεμα στον φορέα αυτό εισάγεται αμέσως μετά την αλληλουχία για την GST οπότε και κατά την έκφραση δημιουργούνται GST-χμμαιρικές πρωτεΐνες (GST- HIF-2α), οι οποίες μπορούν να απομονωθούν ευκολότερα. γλουταθειόνης-σεφαρόζης

Στη συνέχεια, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T1.



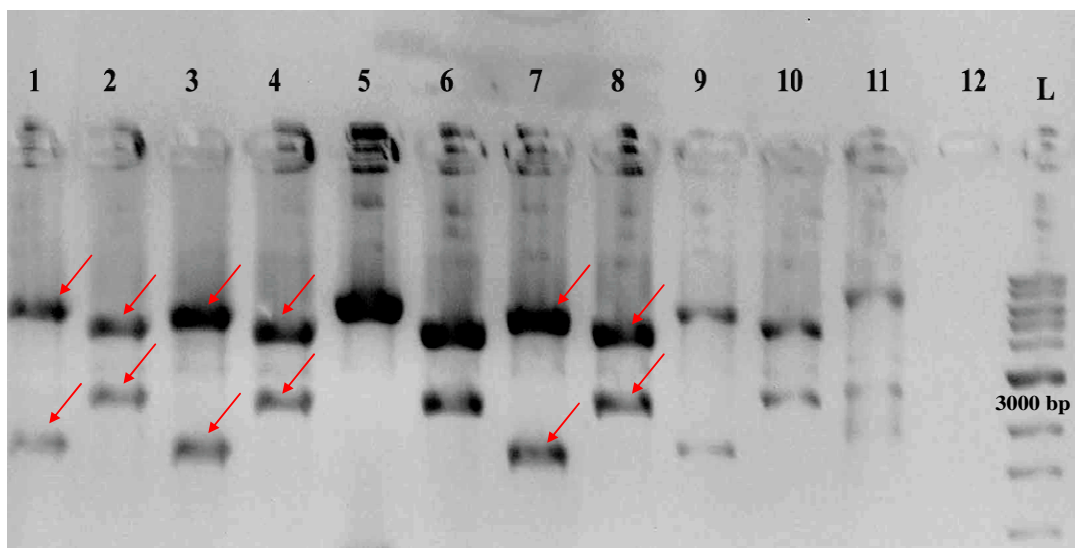
**Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της νέας πλασμιδιακής κατασκευής με ένθεμα το τμήμα που ενισχύθηκε με PCR.**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε επιγραμματικά ήταν: πέψη των PCR προϊόντων και του pGEX-4T1 με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI και ένωσή τους με αντίδραση λιγάσης.



**Εικόνα 8:** Πέψη των PCR προϊόντων και του pGEX-4T1 με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI

Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης μετασχηματίστηκαν σε επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* TOP10, από τα οποία και αναζητήθηκαν οι κλώνοι με την επιθυμητή ένθεση. Στη συνέχεια τα πλασμιδία με την επιθυμητή ένθεση πολλαπλασιάστηκαν και απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή (midi preparation). Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης ένθεσης στο φορέα αλλά και του σωστού προσανατολισμού εισαγωγής του, έγινε πέψη των κλωνοποιημένων πλασμιδίων με ένζυμο περιορισμού που κάθε φορά έδωσαν το προ-υπολογισμένο μοριακό βάρος των προϊόντων πέψης (Εικόνα), πίνακας. Χρησιμοποιήσαμε δυο περιοριστικά ένζυμα: τον *Bam*HI για να ελέγξουμε την εισαγωγή του ενθέματος και το *Eco*RI για τον έλεγχο του προσανατολισμού.



**Εικόνα 9:** Κλωνοποίηση του τμήματος του HIF-2α 1874 σε pGEX-4T1 και έλεγχος της εισαγωγής των ενθέσεων με πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

Ακολούθησε πέψη και με τα ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* για τα πλασμίδια με HIF-2α για τον έλεγχο του σωστού προσανατολισμού του ενθέματος.

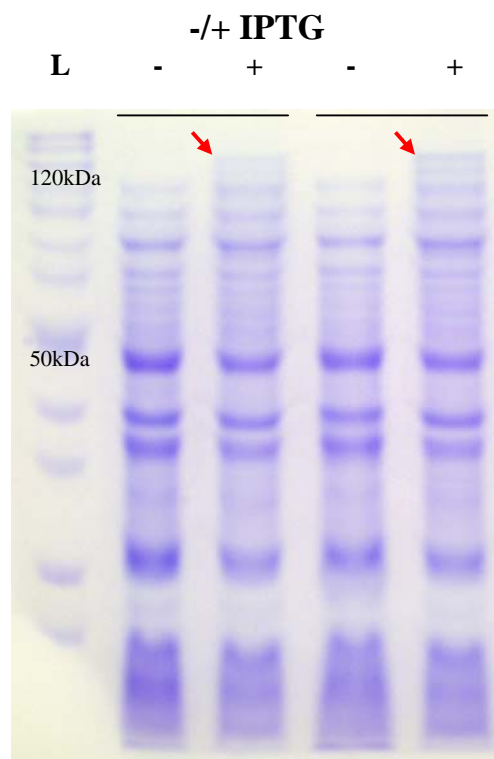
Κλώνος	Διαδρομή	Πέψη	Μέγεθος τμημάτων	Έλεγχος ένθεσης	Έλεγχος προσανατολισμού
<b>1</b>	1	<i>EcoRI</i>	1870bp 5730bp		+
	2	<i>BamHI</i>	2700bp 4900bp	+	
<b>2</b>	3	<i>EcoRI</i>	1870bp 5730bp		+
	4	<i>BamHI</i>	2700bp 4900bp	+	
<b>3</b>	5	<i>EcoRI</i>	-		-
	6	<i>BamHI</i>	2700bp 4900bp	+	
<b>4</b>	7	<i>EcoRI</i>	1870bp 5730bp		+
	8	<i>BamHI</i>	2700bp 4900bp	+	
<b>5</b>	9	<i>EcoRI</i>	-		-
	10	<i>BamHI</i>	2700bp 4900bp	+	
<b>6</b>	11	<i>EcoRI</i>	-		-
	12	<i>BamHI</i>	-	-	

Ο προσανατολισμός των ενθεμάτων ήταν σύμφωνος με τα τμήματα που προβλέπονταν λαμβάνοντας υπόψη την αλληλουχία του πλασμιδίου και του HIF-2α στις πέψεις των κλώνων **1, 2** και **4**.



### 3.4 Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης HIF-2α σε κύτταρα E.coli BL21RIL

Στη συνέχεια ακολούθησε εισαγωγή της πλασμιδιακής κατασκευής σε κύτταρα E.coli BL21RIL με μετασχηματισμό με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης των χμαιορικών πρωτεϊνών σε καλλιέργειες 1lt αυτών των κυττάρων. Συνοπτικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε λογαριθμική φάση ( $OD_{600nm} \sim 0.5$  A) και τότε προστέθηκε στις καλλιέργειες ο επαγωγέας IPTG για χρονικό διάστημα 3 ωρών σε θερμοκρασία 21°C. Μετά το πέρας των 3 ωρών συλλέχθηκαν τα κύτταρα, υπέστησαν λύση με υπερήχους και τελικά απομονώθηκε το διαλυτό κλάσμα, το οποίο και πέρασε από στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης για την απομόνωση των GST-πρωτεϊνών μας.



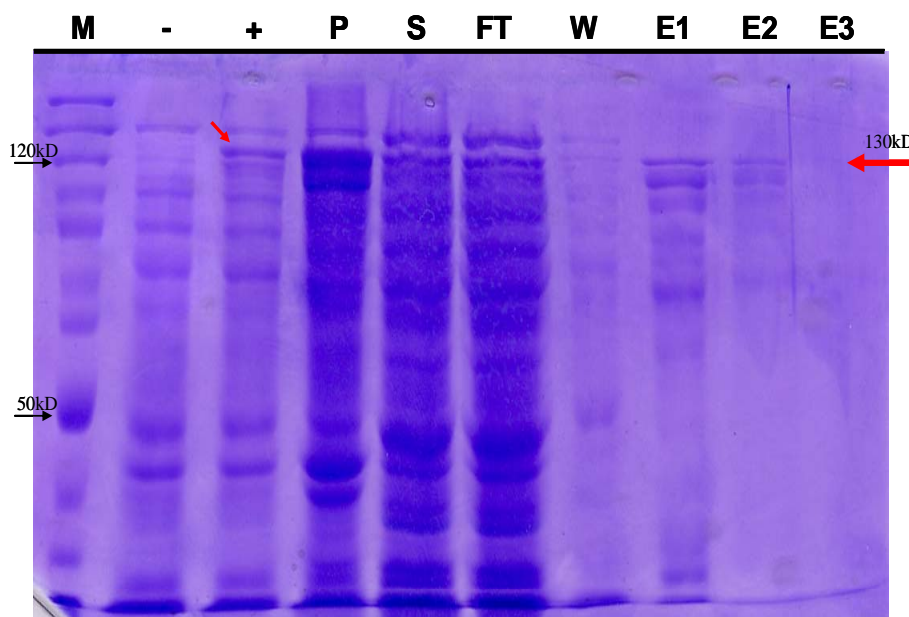
**Εικόνα 10: Επαγωγή της έκφρασης των κλώνων 1 και 2 με IPTG.** Ηλεκτροφορήθηκαν εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων με τα κατάλληλα πλασμίδια βακτηριακών κυττάρων πριν και μετά την προσθήκη IPTG. Στις στήλες όπου στα κύτταρα έχει προστεθεί IPTG (+) παρατηρήθηκε η επαγωγή της έκφρασης για τους κλώνους 1 και 2 αντίστοιχα.

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης των GST-πρωτεϊνών ληφθήκαν δείγματα από κάθε στάδιο. Πιο συγκεκριμένα λήφθηκαν δείγματα πριν και μετά την προσθήκη IPTG , από το ίζημα (pellet, P), το υπερκείμενο (supernatant, S),

το αδέσμευτο κλάσμα της στήλης (flow through, FT), το τελευταίο πλύσιμο (wash, W) και από τα 3 εκλούσματα (elution, E) (Εικόνα).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 10, με την προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια παρατηρείται έκφραση των πρωτεϊνών των οποίων η αλληλουχία είχε εισαχθεί στα κύτταρα *E.coli* με τα κατάλληλα πλασμίδια. Συγκεκριμένα φαίνονται με κόκκινα βέλη οι επαγόμενες πρωτεΐνες GST-HIF-2α και σε μοριακό βάρος των 130kD. Οι ζώνες αυτές δεν εμφανίζονται απουσία IPTG.

Έπειτα από τον καθαρισμό των πρωτεϊνών GST-HIF-2α με στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης Εικόνα 11 παρατηρήθηκε η απομόνωσή της σε σχετικά καθαρή μορφή στα εκλούσματα (η ζώνη της πρωτεΐνης σημειώνεται με κόκκινο βέλος). Ωστόσο, η απόδοση σε πρωτεΐνη στα εκλούσματα είναι πολύ μικρή.

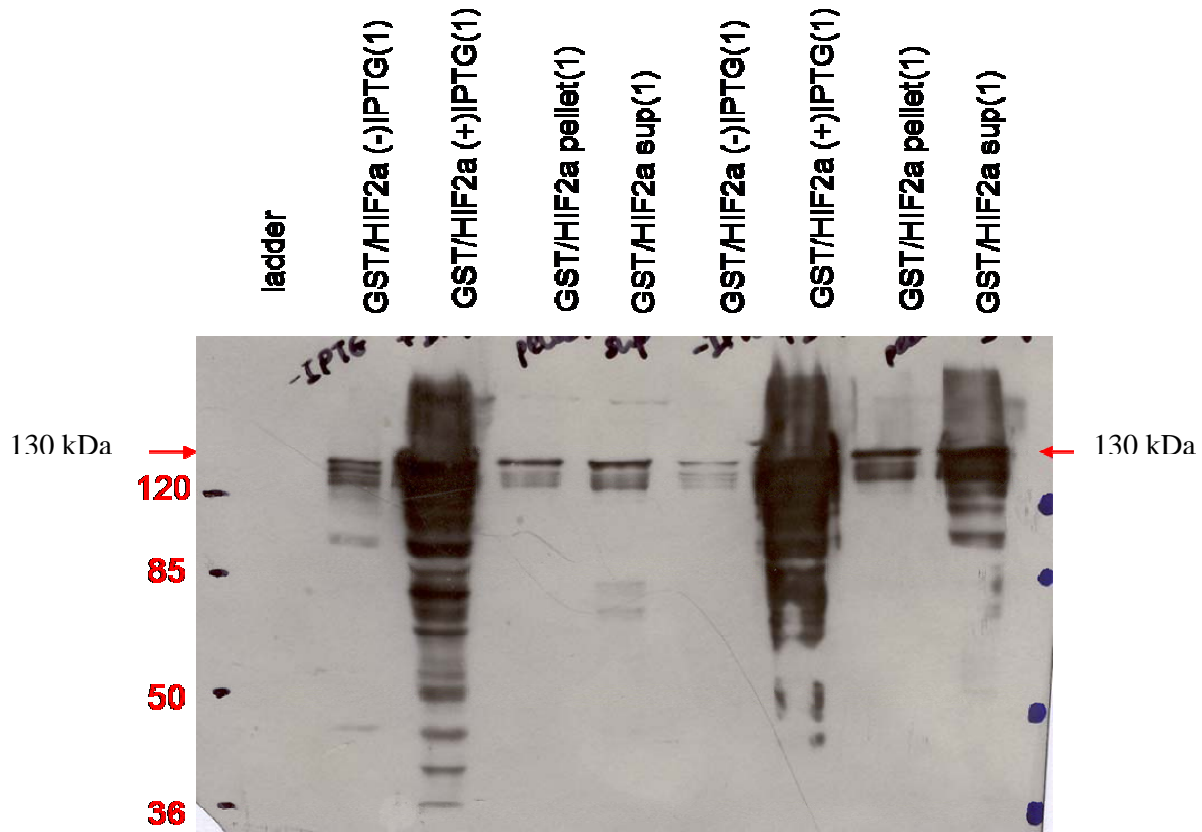


**Εικόνα 11:** Υπερέκφραση της πρωτεΐνης GST-HIF-α και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης – σεφαρόζης. Διαδρομές : M: μάρτυρας, P: ίζημα(pellet), S: υπερκείμενο (supernatant), FT : αδέσμευτο κλάσμα της στήλης (flow through), W: δείγμα τελευταίας πλύσης (wash), E1, E2, E3 : δείγματα εκλούσεων (elution).

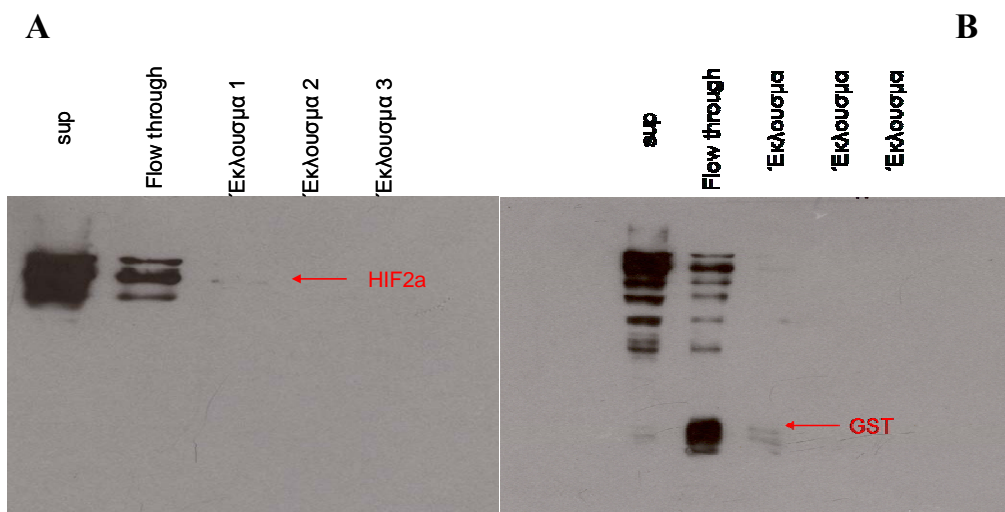
Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν παρατηρήσουμε ότι μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών μένει στο ίζημα, δηλαδή είναι σε μικρό βαθμό υδατοδιαλυτή. Μια άλλη εξήγηση για τη μικρή απόδοση σε πρωτεΐνη είναι η μη ικανοποιητική λύση των κυττάρων για την απελευθέρωση των επιθυμητών πρωτεϊνών στο διάλυμα.

Στη συνέχεια τα 3 εκλούσματα ενώθηκαν, υπέστησαν διαπίδυση σε ειδική μεμβράνη με πόρους που συγκρατούν την πρωτεΐνη μας αλλά αποκλείουν μικρού μοριακού βάρους ανεπιθύμητες ενώσεις όπως η γλουταθειόνη και άλατα.

Για επιβεβαίωση του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες μας είναι αυτές που περιμένουμε και όχι ένα μη ειδικό προϊόν, έγινε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι στην πρωτεΐνη GST Εικόνα12. Πράγματι οι πρωτεΐνες που πήραμε καθαρές από τη στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης είναι οι ίδιες που εμφανίζονται και στην ανοσοαποτύπωση και στα ίδια μοριακά βάρη για την κάθε μία. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών GST-HIF-2α οι ζώνες που εμφανίζονται κάτω από τη ζώνη της πρωτεΐνης αποτελούν πιθανότατα προϊόντα πρωτεόλυσης αυτών.



**Εικόνα 12:** Ανοσοαποτύπωση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης GST- HIF-2α με αντίσωμα έναντι του HIF-2α.

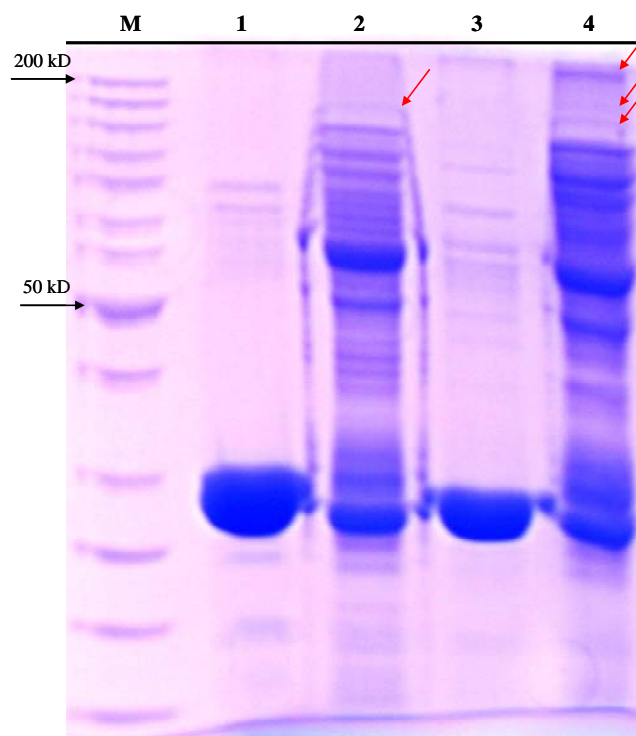


**Εικόνα 13:** Α) Ανοσοαποτύπωση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης GST- HIF-2α με αντίσωμα έναντι του HIF-2α.

Β) Ανοσοαποτύπωση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης GST- HIF-2α με αντίσωμα έναντι του GST.

### 3.5 Αλληλεπιδράσεις σε σφαιρίδια αγγιστείας γλουταθειόνης- σεφαρόζης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa και HUH με τις πρωτεΐνες GST και GST- HIF-2α

Τα πειράματα συγκατακρήμνισης δίνουν τη δυνατότητα μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών αλλά μπορούν επίσης να δώσουν πληροφορίες για το πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση αυτή. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε συγκατακρήμνιση πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa και HUH7 με την πρωτεΐνη GST-HIF-2α. Συνοπτικά, η διαδικασία περιλαμβάνει πρόσδεση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-HIF-2α σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και επώασή τους με πυρηνικό εκχύλισμα από κύτταρα HeLa και HUH. Στο τέλος της επώασης και αφού ξεπλυθούν καλά τα σφαιρίδια για αφαίρεση όλων των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών προστίθεται ειδικό διάλυμα έκλουσης. Το έκλουσμα από κάθε αντίδραση ηλεκτροφορείται και μέσω βαφής της πηκτής με Coomassie μπορούν να ελεγχθούν τα αποτελέσματα.



**Εικόνα 14:** Δοκιμή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας (pull-down assay)

Διαδρομή	Κυτταρικό εκχύλισμα	
1	HUH	GST
2	HUH	GST-HIF-2α
3	HeLa	GST
4	HeLa	GST-HIF-2α

Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήσαμε ζώνες που εμφανίζονται αποκλειστικά στο έκλουσμα της GST-HIF-2α και όχι στα εκλούσματα της GST. Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε πως οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες των κυττάρων HUH και HeLa που αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με τον HIF-2α Εικόνα 14. η δοκιμή με τα εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 έδειξε πως εντοπίζουμε μια (1) πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 150kDa. Ενώ η δοκιμή με τα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa έδειξε μια έντονη αλληλεπίδραση με μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 250-300kDa και δύο πιο ασθενείς αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες μοριακού βάρους 120 και 150kDa. Από τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών και λαμβάνοντας υπόψη όσα γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία σχετικά με τον HIF-1α, υποθέτουμε πως μπορεί να είναι οι πρωτεΐνες CBP και p300. Ωστόσο, χρειάζεται επανάληψη του

πειράματος και περαιτέρω μελέτη για την ταυτοποίηση των πιθανών νέων πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-2α, επίσης γνωστός ως EPAS-1, MOP2, HLF και HRF εκφράζεται πιο ισχυρά στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον πλακούντα και η δράση του στους παραπάνω ιστούς φαίνεται να υπερέχει έναντι του HIF-1α.

Ο HIF-2α είναι το δεύτερο μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία και έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του κυττάρου. Για τη ρύθμιση των αποκρίσεων του HIF-2, είναι υπεύθυνη η ρυθμιστική HIF-2α υπομονάδα. Μετά από στοχευμένη αποσιώπηση του HIF-2α σε ποντίκια διαπιστώθηκε ότι εκείνα που στερούνται τον HIF-2α πεθαίνουν λόγω ατελούς εμβρυϊκής ωρίμανσης των πνευμόνων, των αγγείων και από βραδυκαρδία, ενώ τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε διαδοχικές μεταλλάξεις και επέζησαν, έδειξαν υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών στο ήπαρ. Σαν προγνωστικός δείκτης, τα υψηλά επίπεδα HIF-2α συνδέονται με προχωρημένα στάδια καρκίνου. Ανάμεσα σε αυτούς είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, της κύστης, του εντέρου και το νευροβλάστωμα. Ωστόσο ο βιολογικός ρόλος του δεν έχει πλήρως διερευνηθεί.

Η ρύθμιση της έκφρασης του HIF-2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας συχνά θεωρείται ότι είναι παρόμοια με εκείνη του HIF-1α. Έτσι, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-2α ελαττώνονται μέσω πρωτεόλυσης. Η πρωτεόλυση του HIF-2α οφείλεται στην αλληλεπίδραση και πολυουβικιτινυλίωση του από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (VHL) που ελέγχεται με την υδροξυλίωση δύο καταλοίπων προλίνης στην ODD περιοχή του. Όταν τα επίπεδα του οξυγόνου είναι χαμηλά, η υδροξυλίωση αναστέλλεται, ο HIF-2α σταθεροποιείται, μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου και διμερίζεται με τον ARNT και προσδέεται στο DNA επάγοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων της υποξίας.

Ο HIF-2α έχει αλληλουχική ομοιότητα με τον HIF-1α περίπου 48%. Ο HIF-2α περιέχει μία περιοχή οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (Oxygen Dependent Degradation domain, ODD) και δύο περιοχές υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους (Trans Activation Domains, TADs), μια αμινο-τελική, την N-TAD και μια καρβοξυ-τελική, την C-TAD. Επίσης, ο HIF-2α περιέχει στην αμινοτελική του επικράτεια περιοχές ετεροδιμερισμού και δέσμευσης στο DNA (bHLH-PAS), όπου αναγνωρίζουν ειδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες (στοιχεία

απόκρισης στην υποξία, hypoxia response elements-HRE) που βρίσκονται στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων στόχων των HIF.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια απομόνωσης της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης HIF-2α. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά ο HIF-2α να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T1, να εκφραστεί σε βακτηριακά κύτταρα και να απομονωθεί σαν πρωτεΐνες σύντηξης με GST έπειτα από χρωματογραφία αγκιστείας. Ακολουθήσαμε μια σειρά πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι στην πρωτεΐνη GST-HIF-2α και επιβεβαιώσαμε ότι οι πρωτεΐνες που είχαμε καθαρές από τη στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης είναι οι ίδιες που εμφανίζονται και στην ανοσοαποτύπωση και στα ίδια μοριακά βάρη για την κάθε μία. **Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε για πρώτη φορά η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη HIF-2α.**

Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας ενεργοποίησης και δράσης του, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες προκειμένου να επιτελέσει την επαγωγή των γονιδίων στόχων του και η μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων έχει συμβάλει στην κατανόηση του πολυδιάστατου ρόλου του. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με άλλες πρωτεΐνες δεν έχει λεπτομερώς μελετηθεί και δεν έχουν ταυτοποιηθεί πρωτεΐνες που συστρατεύονται. Στην προσπάθεια της αναζήτησης πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-2α, και διαθέτοντας την πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη προχωρήσαμε στη δοκιμή αλληλεπίδραση της HIF-2α με πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa και Huh7. Η δοκιμή μας με τα εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 έδειξε πως εντοπίζουμε μια (1) πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 150kDa. Ενώ η δοκιμή με τα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa έδειξε μια έντονη αλληλεπίδραση με μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 250-300kDa και δύο πιο ασθενείς αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες μοριακού βάρους 120 και 150kDa. Από τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών και λαμβάνοντας υπόψη όσα γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία σχετικά με τον HIF-1α, υποθέτουμε πως μπορεί να είναι οι πρωτεΐνες CBP και p300. Ωστόσο, χρειάζεται επανάληψη του πειράματος και περαιτέρω μελέτη για την ταυτοποίηση των πιθανών νέων πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας.

Μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν οι λειτουργίες και η ρύθμιση του HIF-2α. Πιο συγκεκριμένα να μελετηθούν πιθανές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-2α όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, S-νιτροσυλίωση και σουμοϋλίωση και πως αυτές ρυθμίζουν τη λειτουργία του.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, Fukumura D, Moreno-Murciano MP, Herbert JM, Burger A, Riedel J, Elvert G, Flamme I, Maxwell PH, Collen D, Dewerchin M, Jain RK, Plate KH, Carmeliet P. Genetic evidence for a tumor suppressor role of *HIF-2a*. *Cancer Cell* 2005;8:131-41.
- Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res* 2006; **66**: 5641-5647.
- Baba M, Hirai S, Yamada-Okabe H, Hamada K, Tabuchi H, Kobayashi K *et al.* Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through hypoxia-inducible factor. *Oncogene* 2003; **22**: 2728-2738.
- Brat DJ, Mapstone TB. Malignant glioma physiology: Cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* 2003; 138:659-68.
- Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; **294**: 1337-1340.
- Brusselmans K, Compernelle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D *et al.* Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1519-1527.
- Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006; **26**: 9471-9481.
- Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H *et al.* Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002; **8**: 702-710.
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ *et al.* HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; **20**: 557-570.
- Covello KL, Simon MC, Keith B. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res* 2005; **65**: 2277-2286.
- Covello KL, Simon MC. HIFs, hypoxia, and vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2004; **62**: 37-54.
- Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T *et al.* Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 2003; **278**: 7520-7530.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR *et al.* *C.elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; **107**: 43-54.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia inducible factor 1a and 2a in operable non-small

- cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 2001; 85:881-90.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ (HIF-2 $\alpha$ ) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14:78-82.
  - Gort EH, van Haften G, Verlaan I, Groot AJ, Plasterk RH, Shvarts A *et al.* The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ . *Oncogene* 2007 .
  - Grabmaier K, de Weijert MCA, Verhaegh GW, Schalken JA, Oosterwijk E. Strict regulation of CAIX(G250[*sol*]MN) by HIF-1 $\alpha$  in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2004; **23**: 5624.
  - Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2 $\alpha$  results in anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 2301|2306.
  - Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**: 519|561.
  - Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA *et al.* Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor- $\alpha$ epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHLrenal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44966.
  - Haapasalo JA, Nordfors KM, Hilvo M, Rantala IJ, Soini Y, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Parkkila SM, Haapasalo HK. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12:473-7.
  - Harris AL. Hypoxia a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 3847.
  - Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg Å, Gradin K, Poellinger L, Pålman S. Recruitment of *HIF-1* and *HIF-2* to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10:413-23.
  - Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H *et al.* Recruitment of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 $\alpha$  promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; **10**: 413.
  - Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in stem cells. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3526.
  - Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 4528.
  - Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 9361.

- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ *et al.* Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**: 468.
- Jensen RL. Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures. *Neurosurg Focus* 2006; 20:E24.
- Ji P, Xuan JW, Onita T, Sakai H, Kanetake H, Gabril MY, Sun Y, Moussa M, Chin JL. Correlation study showing no concordance between EPAS-1/HIF-2 $\alpha$ mRNA and protein expression in transitional cellcancer of the bladder. *Urology* 2003; 61:851-7.
- Kabuubi P, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Kobylecki C, Stratford IJ, West CM. No relationship between thymidine phosphorylase (TP, PD-ECGF) expression and hypoxia in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 2006; 94:115-20.
- Khatua S, Peterson KM, Brown KM, Lawlor C, Santi MR, LaFleur B, Dressman D, Stephan DA, MacDonald TJ. Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2 $\alpha$  pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer Res* 2003; 63:1865-70.
- Knowles H, Leek R, Harris AL. Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy. *Novartis Found Symp* 2004; 256:189-200, (discussion -4, 59-69).
- Kojima H, Shijubo N, Abe S. Thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in patients with Stage I lung adenocarcinoma. *Cancer* 2002; 94:1083-93.
- Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin Jr WG. Inhibition of HIF2 $\alpha$  is sufficient to suppress *pVHL*-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003; 1:E83.
- Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin Jr WG. Inhibition of *HIF* is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002; 1:237-46.
- Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, Dische S, Sivridis E, Harris AL. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 $\alpha$  and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J Clin Oncol* 2006; 24:727-35.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; **16**: 1466.
- Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer* 2007; **96**: 1284.
- Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (*HIF*-2 $\alpha$ ) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1326-9.
- Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1129-35.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; **15**: 2686.

- Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002; 1:459-68.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**: 275.
- Norris ML, Millhorn DE. Hypoxia-induced protein binding to O<sub>2</sub>-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23774.
- Onita T, Ji PG, Xuan JW, Sakai H, Kanetake H, Maxwell PH, Fong GH, Gabril MY, Moussa M, Chin JL. Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial Per-ARNT-Sim domain protein-1/hypoxia-inducible factor-2 correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:471-80.
- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2060.
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8386.
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS *et al.* Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin *in vivo*. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1068.
- Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL *et al.* Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5675.
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20055.
- Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ *et al.* Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1<sup>−/−</sup> mice. *Nat Genet* 2003; **35**: 331–340.
- Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M *et al.* HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 2005; **105**: 3133.
- Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 2003; **102**: 1634.
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Association of hypoxia-inducible factors 1a and 2 with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002; 95:1055-63.
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1a and HIF-2 in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157:411-21.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and

- protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998; **12**: 3320.
- Tian H, Mcknight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; **11**: 72.
  - Turner KJ, Moore JW, Jones A, Taylor CF, Cuthbert-Heavens D, Han C, Leek RD, Gatter KC, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Cranston D, Harris AL. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: Relationship to angiogenesis and to the *von Hippel-Lindau* gene mutation. *Cancer Res* 2002; **62**:2957-61.
  - Vortmeyer AO, Tran MG, Zeng W, Glasker S, Riley C, Tsokos M, Ikejiri B, Merrill MJ, Raffeld M, Zhuang Z, Lonser RR, Maxwell PH, Oldfield EH. Evolution of *VHL* tumorigenesis in nerve root tissue. *J Pathol* 2006; **210**:374-82.
  - Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 3299|.
  - Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M *et al.* Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004; **18**: 1462.
  - Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005; **2005**: re12. Tian H, Mcknight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; **11**: 72.
  - Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; **17**: 271.
  - Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL *et al.* Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 1998; **92**: 22602268.
  - Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, Kinugasa S, Tachibana M, Nagasue N. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1a and 2 in colorectal cancer patients: Correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:8554-60.
  - Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9630.

