



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α  
ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΠΑΛΛΑ ΗΛΙΑΝΑ**

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΣΙΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

Ευχαριστώ θερμά:

Τον κ.Σίμο Γεώργιο, Αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τον κ. Μυλωνή Ηλία, Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής Θεσσαλίας που με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθειά τους

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

- κ.Σίμο Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- κα.Ευφροσύνη Παρασκευά, Επίκουρο Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας
- κ.Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογία

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>8</b>
1.1 Οξυγόνο.....	8
1.2 Υποξία .....	9
1.3 Ο HIF-1α.....	10
1.4 Δομή του HIF-1α.....	11
1.5 Δράσεις του HIF-1α .....	12
1.6 Ρύθμιση του HIF-1α.....	14
1.6.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη.....	14
1.6.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α.....	19
1.7 Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις .....	22
1.8 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση.....	25
1.9 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α.....	27
1.10 HIF-1α και νόσος .....	29
1.11 HIF-1α και καρκίνος.....	31
1.11.1 Υποξία και καρκίνος.....	31
1.11.2 Ο HIF-1α στον καρκίνο .....	33
1.11.3 Ρύθμιση του HIF-1α στον καρκίνο.....	33
1.11.4 Δράση του HIF-1α στον καρκίνο .....	36
1.11.5 Ο HIF-1α ως θεραπευτικός στόχος στον καρκίνο.....	37
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>39</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>40</b>
3.1 Υλικά.....	40
3.1.1. Βακτηριακά στελέχη .....	40

3.1.2. Κυτταρικές σειρές.....	40
3.1.3. Χημικά αντιδραστήρια .....	40
3.1.4 Αντισώματα .....	41
3.1.5. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)...	41
3.1.6. Μάρτυρες μοριακών βαρών .....	42
3.2. Μέθοδοι .....	43
3.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	43
3.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	45
3.2.3. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος για την αντίδραση σύνδεσης .....	45
3.2.4. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης με χρήση kit της Qiagen για gel Extraction.....	46
3.2.5. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης) .....	47
3.2.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> TOP 10 και BL21RIL .....	48
3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση	48
3.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση του Qiagen Midi Kit .....	49
3.2.9. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	50
3.2.10. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών GST-HIF-1α-348-826 wt, GST-HIF-1α-348-826 S→A και GST-HIF-1α-348-826 S→E σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21RIL με IPTG .....	51
3.2.11. Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος.....	52
3.2.12. Καθαρισμός πρωτεΐνης με επίτοπο GST.....	52
3.2.13. Διαπίδυση .....	53
3.2.14. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης .....	54
3.2.15. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE .....	54
3.2.16. Μεταφορά υγρής φάσης και ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	55

3.2.17. Χρώση με <i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i> .....	57
3.2.18. Χρώση με νιτρικό άργυρο ( <i>AgNO<sub>3</sub></i> ).....	57
3.2.19. Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων <i>HeLa</i> .....	58
3.2.20. Δοκιμή <i>in vitro</i> αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε στήλες αγκιστείας ( <i>pull down assays</i> ).....	59
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>61</b>
4.1 Κλωνοποίηση τμήματος του HIF-1α που φέρει την φωσφομιμητική μετάλλαξη (S641→E) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 (HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E).....	61
4.2. Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E.....	62
4.3 Ενίσχυση του τμήματος HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E με PCR.....	62
4.4 Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX-4T-HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E και έλεγχος με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	62
4.5 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E.....	65
4.6 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-HIF-1α <sup>348-826</sup> wt, GST-HIF-1α <sup>348-826</sup> S→A και GST-HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E σε BL21RIL και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης.....	66
4.7 Δοκιμή αλληλεπίδρασης πυρηνικών πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας ( <i>HeLa</i> ) με τις πρωτεΐνες GST και GST-HIF <sup>348-826</sup> wt, τGST-HIF <sup>348-826</sup> S→A και GST-HIF <sup>348-826</sup> S→E με πειράματα συγκατακρήμνισης ( <i>pull down assays</i> ).....	70
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>73</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>77</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (HIF-1) είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση 70 και πλέον γονιδίων σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Στους μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της επαγόμενης από την υποξία υπομονάδας του (HIF-1α) περιλαμβάνονται οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως είναι η υδροξυλίωση, η ακετυλίωση και η φωσφορυλίωση.

Προκειμένου να προσδιοριστούν νέες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α που να σχετίζονται με την φωσφορυλίωσή του από την P42/44 MAPK κατασκευάστηκαν τμήματα του HIF-1α (aa 348-826) συζευγμένα με GST που φέρουν διάφορες μεταλλάξεις. Εκτός από την αγρίου τύπου μορφή (wild type, wt) του HIF-1α<sup>348-826</sup> χρησιμοποιήθηκαν επίσης αντίστοιχα τμήματα που φέρουν είτε μια φωσφομιμητική μετάλλαξη (Ser641→Glu, SE) είτε μια μετάλλαξη που αναστέλλει τη φωσφορυλίωση (Ser641→A/Ser643→A, SA). Τα τμήματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συγκατακρίμνησης με εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει τουλάχιστον μία πρωτεΐνη των HeLa που αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την αγρίου τύπου μορφή του HIF-1α<sup>348-826</sup>. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης απέκλεισαν την πιθανότητα η πρωτεΐνη αυτή να αντιστοιχεί σε τμήματα της GST ή του HIF-1α.

## ABSTRACT

Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor that regulates the expression of more than 70 genes under hypoxia. There are several molecular mechanisms that regulate its inducible subunit (HIF-1 $\alpha$ ). These mechanisms include protein interactions and posttranslational modifications like hydroxylation, acetylation and phosphorylation.

In order to identify novel protein interactions that depend on phosphorylation of HIF-1 $\alpha$  by the P42/44 MAPK we constructed GST tagged HIF-1 $\alpha$  fragments (aa 348-826) carrying different mutations. Apart from wild type (wt) HIF-1 $\alpha$  fragment, we used a phosphorylation deficient mutant (Ser641 $\rightarrow$ A/Ser643 $\rightarrow$ A, SA) and a phosphomimetic mutant (Ser641 $\rightarrow$ Glu, SE). By using those constructs in pull down assays with HeLa extract we demonstrated that there is at least one protein that specifically interacts with the wild type GST-HIF-1 $\alpha$ <sup>348-826</sup> fusion. Immunoblotting experiments eliminated the possibility that this protein corresponds to fragments of GST or HIF-1 $\alpha$ .

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Οξυγόνο

Μέχρι πριν από 2,7 τρισεκατομμύρια χρόνια, η Γη κατοικούταν κυρίως από μικροοργανισμούς που παρήγαγαν μεθάνιο το οποίο αποτελούσε το κύριο συστατικό της ατμόσφαιρας. Τότε, λόγω γεωλογικών μεταβολών, ελαττώθηκαν τα αποθέματα νικελίου, στοιχείο το οποίο ήταν απαραίτητο για το μεταβολισμό των οργανισμών αυτών. Έτσι, άρχισαν να εξαφανίζονται οι μικροοργανισμοί αυτοί και να αναπτύσσονται περισσότερο τα κυανοβακτήρια τα οποία παράγουν οξυγόνο. Τελικά, 2,5 τρισεκατομμύρια χρόνια πριν, συνέβη το φαινόμενο της «Μεγάλης Οξειδωσης» και το οξυγόνο έγινε ένα από τα βασικότερα στοιχεία της ατμόσφαιρας της Γης με σημερινή αναλογία 21% (Konhauser et al., 2004).

Συνεπώς, σε όλη αυτή τη διάρκεια οι οργανισμοί έπρεπε να αναπτύξουν μηχανισμούς προσαρμογής στις μεταβολές της συγκέντρωσης του οξυγόνου (Brüick, 2003).

Σήμερα, η επιβίωση των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών εξαρτάται απόλυτα από τη συνεχή παροχή οξυγόνου (Semenza et al., 2008). Αυτό συμβαίνει επειδή, σε κυτταρικό επίπεδο, οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν τον οξειδωτικό μεταβολισμό μακρομορίων (κυρίως της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων) για τη δημιουργία κατάλληλης ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης που οδηγεί στη δημιουργία ενώσεων υψηλής ενέργειας (ATP) απαραίτητων για την επιτέλεση όλων των βασικών κυτταρικών λειτουργιών τους (Semenza et al., 2004).

Είναι φανερό λοιπόν πως η διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι κεφαλαιώδους σημασίας. Έτσι, έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς που αφορούν στην πρόσληψη και τη διανομή του οξυγόνου στα κύτταρα, ενώ χαρακτηριστικό είναι ότι σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζονται οξυγόνο-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτό φαίνεται να αποσκοπεί στην ικανότητα του κυττάρου να προσαρμόζεται σε καταστάσεις είτε αυξημένης (υπεροξία) είτε ελαττωμένης (υποξία) παροχής οξυγόνου (Brüick, 2003).



## 1.2 Υποξία

Ο όρος υποξία περιγράφει την κατάσταση χαμηλής οξυγόνωσης ενός ιστού και όσον αφορά στις κυτταροκαλλιέργειες θεωρείται ότι έχει επιτευχθεί υποξία σε μια συγκέντρωση οξυγόνου ~1% (Wang et al., 1995).

Παρόλα αυτά είναι φανερό πως σε ζωντανούς οργανισμούς η υποξία είναι δύσκολο να οριστεί περαιτέρω αφού δεν διαθέτουν όλοι οι ιστοί την ίδια οξυγόνωση ακόμη και σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε κάθε περίπτωση, είναι πλέον γνωστό πως η υποξία (η κατάσταση χαμηλότερης του φυσιολογικού οξυγόνωσης) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βιολογικό ερέθισμα σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες αλλά και παθολογικές καταστάσεις. Όσον αφορά στις φυσιολογικές διεργασίες η υποξία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, την αύξηση του οργανισμού αλλά και την προσαρμογή του στις μεταβολές του υψομέτρου, την κολύμβηση, κ.α. (Chen et al., 1999, Krishnan et al., 2008, Stone et al., 1995).

Οι παθολογικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται η υποξία είναι πολλές. Ορισμένες, όπως η αναιμία, η αιμορραγία και αρκετές λοιμώξεις, εμφανίζονται τόσο συχνά στο ανθρώπινο είδος από εμφάνισέως του ώστε με την πίεση της φυσικής επιλογής να έχουν δημιουργηθεί προσαρμοστικοί μηχανισμοί στην υποξία που προκαλούν. Παρόλα αυτά, ο σύγχρονος άνθρωπος έχει να αντιμετωπίσει πλέον παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκληρωτική νόσος των αγγείων και ο καρκίνος οι οποίες αποτελούν τις κυριότερες αιτίες θανάτου για τον ενήλικο πληθυσμό στον δυτικό κόσμο. Οι νοσολογικές αυτές οντότητες φαίνεται να σχετίζονται με τις αλλαγές στον τρόπο ζωής (διατροφή, κάπνισμα, περιβάλλον) καθώς και με την παράταση του μέσου όρου επιβίωσης του σύγχρονου ανθρώπου και είναι πιθανό η απουσία προσαρμοστικών μηχανισμών του οργανισμού να οφείλεται στην πρόσφατη εμφάνισή τους, σύμφωνα με την εξελικτική θεωρία των ειδών. Πάντως, η υποξία φαίνεται πως διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των νόσων αυτών και είναι δυνατόν να εμφανίζεται είτε ως συνεχής είτε ως διακοπτόμενη με οξεία ή χρόνια διάρκεια (Semenza et al., 2008). Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως ενώ η χρόνια συνεχής υποξία

εμφανίζεται σε φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις (Yu et al., 1999), η χρόνια διακοπτόμενη παρατηρείται αποκλειστικά σε παθολογικές καταστάσεις (Leshke et al. 1997) και είναι πιθανό η διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών απαντήσεων του οργανισμού στην υποξία να αποσαφηνίσει περεταίρω την παθοφυσιολογία σημαντικών ανθρωπίνων νόσων.

Σε κυτταρικό επίπεδο, ο κυριότερος ρυθμιστής σε καταστάσεις υποξίας είναι ο παράγοντας που επάγεται από την υποξία HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) ο οποίος επάγει γονίδια-στόχους που εξυπηρετούν την προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης. Τα τελευταία 15 χρόνια από την ανακάλυψή του το ενδιαφέρον αλλά και η γνώση σχετικά με τον HIF-1 διαρκώς αυξάνεται αφού είναι πλέον γνωστό ότι η υποξία διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην κυτταρική βιολογία, στη φυσιολογία των θηλαστικών αλλά και στην παθογένεια σημαντικών νόσων του ανθρώπου (Semenza GL, 2000).

### 1.3 O HIF-1α

Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος αποτελείται από μία α και μία β υπομονάδα. Σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης η α υπομονάδα συνδέεται με την ουβικιτίνη και αποδομείται από το πρωτεάσωμα (Salceda et al., 1997). Αντίθετα, σε υποξικές συνθήκες, η ουβικιτινίωση και η ακόλουθη αποδόμηση του HIF-1α αναστέλλεται και ο τελευταίος εισέρχεται στον πυρήνα (Sutter et al., 2000). Επιπλέον, η ενεργότητα των περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής του HIF-1α επάγεται από την υποξία. Έτσι, η α και η β υπομονάδα (η οποία εκφράζεται συνεχώς στο κύτταρο) διμερίζονται στον πυρήνα και συγκροτούν την πρωτεΐνη HIF-1 που δρα ως παράγοντας της μεταγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 τότε προσδένεται στην αλληλουχία 5'-RCGTG-3' των γονιδίων-στόχων του και με την συσσώρευση άλλων παραγόντων δημιουργείται το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής με τελικό αποτέλεσμα την έκφραση πρωτεϊνών με λειτουργικό ρόλο την προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας (Jiang et al., Pugh et al., 1997).

Η ανακάλυψη του HIF-1α ξεκίνησε αρχικά μέσω των HRE (Hypoxia Response Elements) περιοχών στον ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (Semenza et al., 1991). Η ερυθροποιητίνη είναι μια γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως ορμόνη που παράγεται από τους νεφρούς και επισπεύδει την ωρίμανση των πρόδρομων μορφών των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών, τα οποία ως γνωστόν μεταφέρουν το οξυγόνο στους ιστούς. Σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα της ορμόνης αυτής αυξάνονται έως και 100 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά (Goldberg et al., 1988). Το 1992 οι Semenza και Wang μίλησαν για τη σύνθεση ενός παράγοντα του πυρήνα που επάγεται από την υποξία και προσδένεται στο γονίδιο της ερυθροποιητίνης. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η περιοχή πρόσδεσης αυτού του παράγοντα που δεν ήταν άλλη από την περιοχή HRE και με τη χρήση συμπληρωματικού DNA για την περιοχή αυτή απομονώθηκε ο παράγοντας HIF-1 προσδεμένος στην HRE αλληλουχία (Wang et al., 1995). Ο παράγοντας αυτός βρέθηκε ότι αποτελείται από δύο υπομονάδες, μια α και μια β (ήδη γνωστή ως ARNT, Aryl hydrocarbon nuclear translocator) (Wang et al., 1995). Και οι δύο αποτελούν μέλη της bHLH/PAS οικογένειας πρωτεϊνών (basic Helix-Loop-Helix/Per ARNT Sim). (Reyes et al., 1992, Wang et al., 1995). Στη συνέχεια απομονώθηκαν οι παράγοντες HIF-2α, HIF-3α (οι οποίοι επίσης δυνατόν να διμερίζονται με τον HIF-1β και προσδένονται στις HRE περιοχές) και οι HIF-2β και HIF-3β (Tian et al., 1997, Ema et al., 1997, Gu et al., 1998). Από τότε οι γνώσεις σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του HIF-1α έχουν αυξηθεί δραματικά.

#### 1.4 Δομή του HIF-1α

Όπως αναφέρθηκε, ο HIF-1α είναι η μία από τις δύο υπομονάδες του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1. Αποτελείται από 826 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLH/PAS. Διαθέτει έξι περιοχές: μια bHLH περιοχή (αμινοξέα 31-71) για την πρόσδεση στο DNA, μια PAS (αμινοξέα 85-298) περιοχή για το διμερισμό της με τον ARNT1, μια ODDD (αμινοξέα 401-603) περιοχή (Oxygen-Dependent Degradation Domain) που σχετίζεται με την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα, μια ανασταλτική περιοχή ID (αμινοξέα 604-786) (Inhibitory Domain) και δύο

περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής NTAD (αμινοξέα 531-575) και CTAD (αμινοξέα 786-826) (N-terminal, C-terminal transactivation domains) (Wang et al., 1995). Ακόμη διακρίνονται δύο σήματα πυρηνικής εισόδου, ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει τον κυριότερο ρόλο για την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα (Kallio et al., 1998). Τέλος, ο HIF-1α διαθέτει δύο PEST μοτίβα (περιοχές πλούσιες σε προλίνη P, γλουταμινικό E, σερίνη S, θρεονίνη T) (Wang et al., 1995). Τα μοτίβα PEST παρατηρούνται σε πρωτεΐνες με χρόνο ημιζωής λιγότερο από δύο ώρες και πράγματι ο HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας έχει χρόνο ημιζωής περίπου δέκα λεπτά (Yang et al., 2002). Οι διάφορες περιοχές του HIF-1α απεικονίζονται στην εικόνα 1.



**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του HIF-1α. **bHLH:** θέση πρόσδεσης στο DNA, **PAS:** θέση διμερισμού με τον ARNT1, **ODDD:** σχετίζεται με την οξυγονοεξαρτώμενη αποδόμηση από το πρωτεάσωμα, **N-TAD:** περιοχή ενεργοποίησης μεταγραφής, περιλαμβάνει μια θέση υδροξυλίωσης από τις PHDs, **C-TAD:** περιοχή ενεργοποίησης μεταγραφής, περιλαμβάνει μια θέση υδροξυλίωσης από τη FIH, **NLS:** σήμα πυρηνικής εισόδου. (Jong-Wan Park et al., 2004)

Ο HIF-1β έχει παρόμοια δομή με την α υπομονάδα, αλλά αποτελείται από 789 αμινοξέα και δεν διαθέτει ODDD και NTAD περιοχές (Qingdong et al., 2006).

### 1.5 Δράσεις του HIF-1α

Ο HIF-1α ως γνωστόν επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που αποσκοπούν στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διεργασιών που οδηγούν κυρίως στην ερυθροποίηση, τη νεοαγγειογένεση, την προσαρμογή του μεταβολισμού και τον πολλαπλασιασμό, κ.α (Semenza et al., 2008).

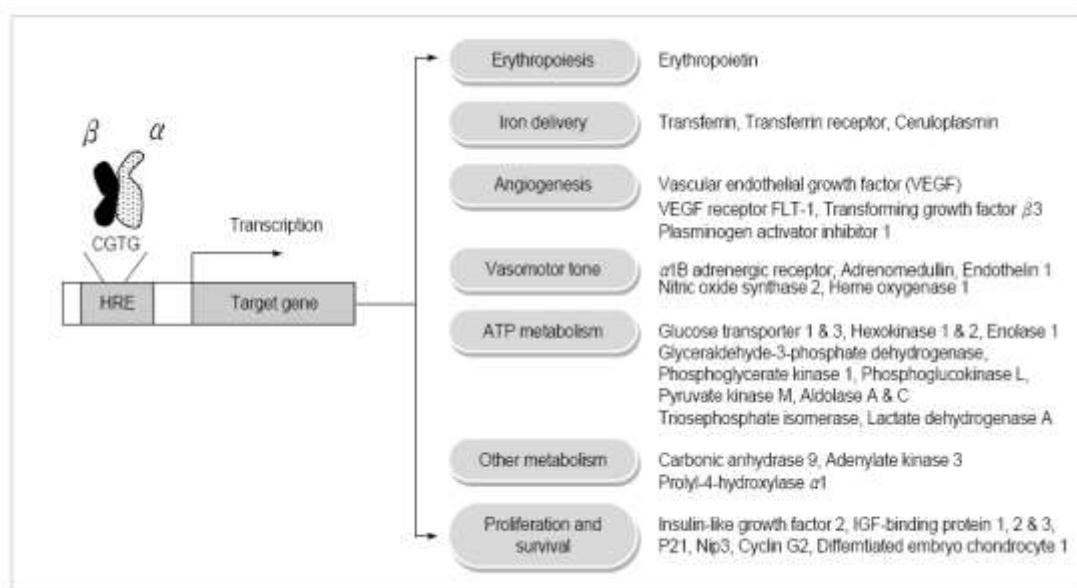
Όσον αφορά στην ερυθροποίηση, επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) –όπως και του υποδοχέα αυτής- η οποία επάγει την ωρίμανση των άωρων μορφών των ερυθροκυττάρων (Jelkmann et al., 2007, Manalo et al., 2005), αλλά και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την κυτταρική απορρόφηση και τη διανομή του σιδήρου στο μυελό των οστών και για τη σύνθεση της αίμης όπως η τρανσφερρίνη και ο υποδοχέας της, η σερούλοπλασμίνη, και η εψιδίνη (Rofls et al., 1997, Lok et al., 1999, Mukhopadhyay et al., 2000, Peyssoriinaux et al., 2007).

Επιπλέον, ο HIF-1α επάγει τη νεοαγγειογένεση, προωθώντας τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Forsythe et al., 1996), ο SDF-1 (Stromal cell Derived Factor-1) (Ceradini et al., 2004), ο PLGF (Placental Growth Factor) (και του CXCR4 υποδοχέα των VEGF και PLGF) (Staler et al., 2003), ο PDGFB (Platelet Derived Growth Factor B) (Kelly et al., 2003) και η αγγειοποιητίνη 1 και 2 (Simon et al., 2008). Αυτοί οι παράγοντες προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στα αγγειακά ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά, τα μεσεγχυματικά και άλλα προγονικά κύτταρα διεγείροντας την αγγειογένεση. Ακόμη, επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεασών (MMPs) για την ανακατασκευή του συνδετικού ιστού ώστε να προωθείται η αγγειογένεση (Yequan et al., 2011).

Όσον αφορά στην προσαρμογή του μεταβολισμού ο HIF-1α επάγει την έκφραση της LON μιτοχονδριακής πρωτεάσης η οποία αποδομεί την COX4-1 ρυθμιστική υπομονάδα της οξειδάσης του κυττοχρώματος c, όπως επίσης και την έκφραση της COX4-2 (Cytochrome c Oxidase 4-2) η οποία έχει μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο σε υποξικές συνθήκες (Fukuda et al., 2007). Επιπλέον, επάγει τη μεταγραφή σχεδόν όλων των γλυκολυτικών ενζύμων, ενώ επάγει ακόμη, την έκφραση μεταφορέων γλυκόζης GLUT1 και GLUT3 (Glucose transporter 1 και 3) για την αύξηση της εισόδου γλυκόζης στα κύτταρα. Λόγω της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος μέσω της γλυκόλυσης παρατηρείται ελάττωση του pH (Chen et al., 2001).

Ο HIF-1α επάγει την έκφραση της μεμβρανικής καρβονικής ανυδράσης για τη ρύθμιση του pH (Potter et al., 2004), όπως επίσης και την

έκφραση αυξητικών παραγόντων όπως ο IGF2 (Insulin-like Growth Factor) και ο TGF $\alpha$  (Transforming Growth factor) στοχεύοντας στην κυτταρική επιβίωση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Feldser et al., 1999, Krishnamachary et al., 2003). Αυτές είναι μερικές από τις βασικότερες δράσεις του HIF-1 $\alpha$ . Ενδεικτικά στην εικόνα 2 συνοψίζονται οι κυριότερες δράσεις του και τα υπεύθυνα γονίδια αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που επάγονται από τον HIF και των επακόλουθων κυτταρικών λειτουργιών (Yang-Sook et al., 2002).

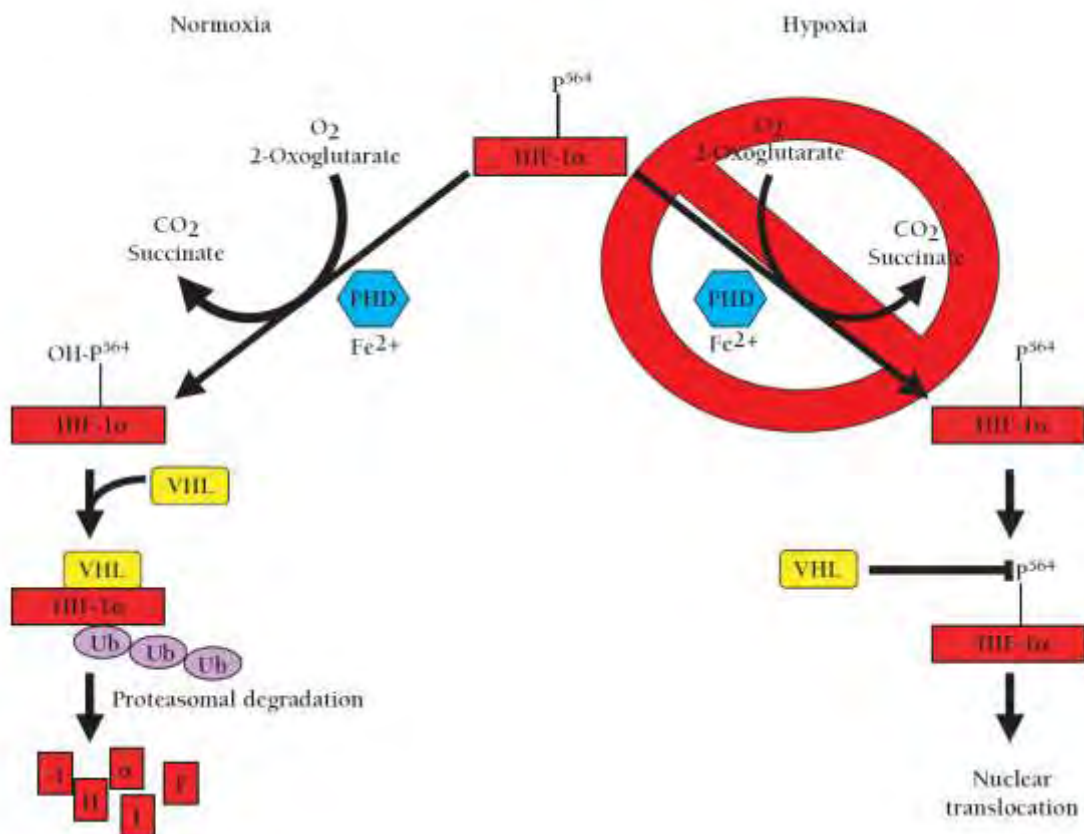
## 1.6 Ρύθμιση του HIF-1 $\alpha$

### 1.6.1 Οξυγόνο-εξαρτώμενη

Ο κυριότερος ρυθμιστικός παράγοντας του HIF-1 $\alpha$  είναι το οξυγόνο. Σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης οι υδροξυλάσες PHD (Prolyl Hydroxylase Domain)–κυρίως η PHD2-υδροξυλιώνουν δύο κατάλοιπα προλίνης (402 και 564) στην ODDD περιοχή του HIF-1 $\alpha$  χρησιμοποιώντας ως συν-υποστρώματα δισθενή σίδηρο (Fe<sup>2+</sup>), οξυγόνο και  $\alpha$ -κετογλουταρικό οξύ για να καταλύσουν την αντίδραση διοξυγενάσης όπου το ένα άτομο οξυγόνου προσφέρεται στη θέση υδροξυλίωσης και το άλλο στο κετογλουταρικό οξύ για να προκύψει ηλεκτρικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (Kaelin et al., 2008,

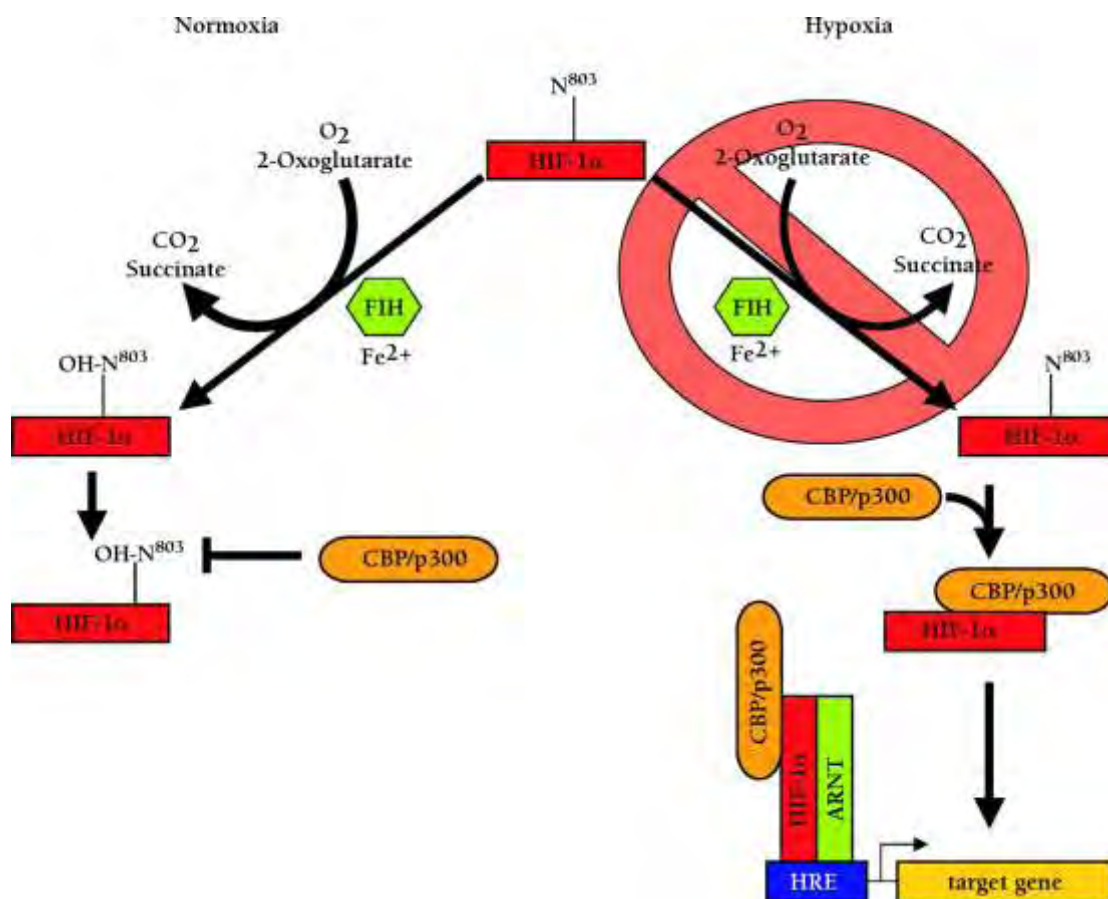
Chowdhury et al., 2008). Η υδροξυλίωση των καταλοίπων προλίνης επιτρέπει τη σύνδεση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL (Von Hippel Lindau), η οποία συμμετέχει στην συγκρότηση του συμπλόκου E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Έτσι, ο HIF-1α πολυουβικιτινιώνεται και οδηγείται σε αποδόμηση από το πρωτεάσωμα (Jaakkola et al., 2001, Ivan et al., 2001). Επιπλέον, σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης, η υδροξυλάση FIH-1 (Factor Inhibiting HIF) υδροξυλιώνει μία θέση ασπαραγίνης (803) στην CTAD περιοχή του HIF-1α. Όπως και οι PHDs, ο FIH χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο, δισθενή σίδηρο και α-κετογλουταρικό οξύ ως συν-υποστρώματα της αντίδρασης και επιπλέον απαιτείται η παρουσία της βιταμίνης C, ώστε να διατηρείται ο σίδηρος στη δισθενή του μορφή. Η υδροξυλίωση του HIF-1α από τον FIH-1 αναστέλλει την πρόσδεση του συμπαραγόντα της μεταγραφής CBP/p300 (Creb Binding Protein/protein 300) (Lando et al., 2002, Hewitson et al., 2002).

Σε συνθήκες υποξίας η δράση των υδροξυλασών PHD και FIH-1 αναστέλλονται, αφού το κυρίως υπόστρωμά τους δηλαδή το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) δεν είναι διαθέσιμο. Έτσι, ο HIF-1α σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα, διμερίζεται με τον ARNT (ο οποίος εκφράζεται διαρκώς) και αφού προσδεθούν και οι λοιποί συμπαραγόντες της μεταγραφής (CBP/p300) είναι δυνατόν να αρχίσει η έκφραση των γονιδίων-στόχων του (Semenza et al., 2008) (Εικόνες 3, 4).



**Εικόνα 3.** Στα αριστερά απεικονίζονται σε συνθήκες νορμοξίας (21% συγκέντρωση οξυγόνου) οι PHDs να υδροξυλιώνουν τον HIF -1α σε δύο θέσεις προλίνης (402 και 564), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μοριακό οξυγόνο και α-κετογλουταρικό οξύ παρουσία δισθενούς σιδήρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του με τον pVHL και την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Αντίθετα, στα δεξιά απεικονίζεται σε συνθήκες υποξίας (<5% συγκέντρωση οξυγόνου) η δράση των υδροξυλασών αυτών (PHDs) να αναστέλλεται με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α την είσοδό του στον πυρήνα όπου διμερίζεται με τον ARNT. (Anthony et al., 2002)

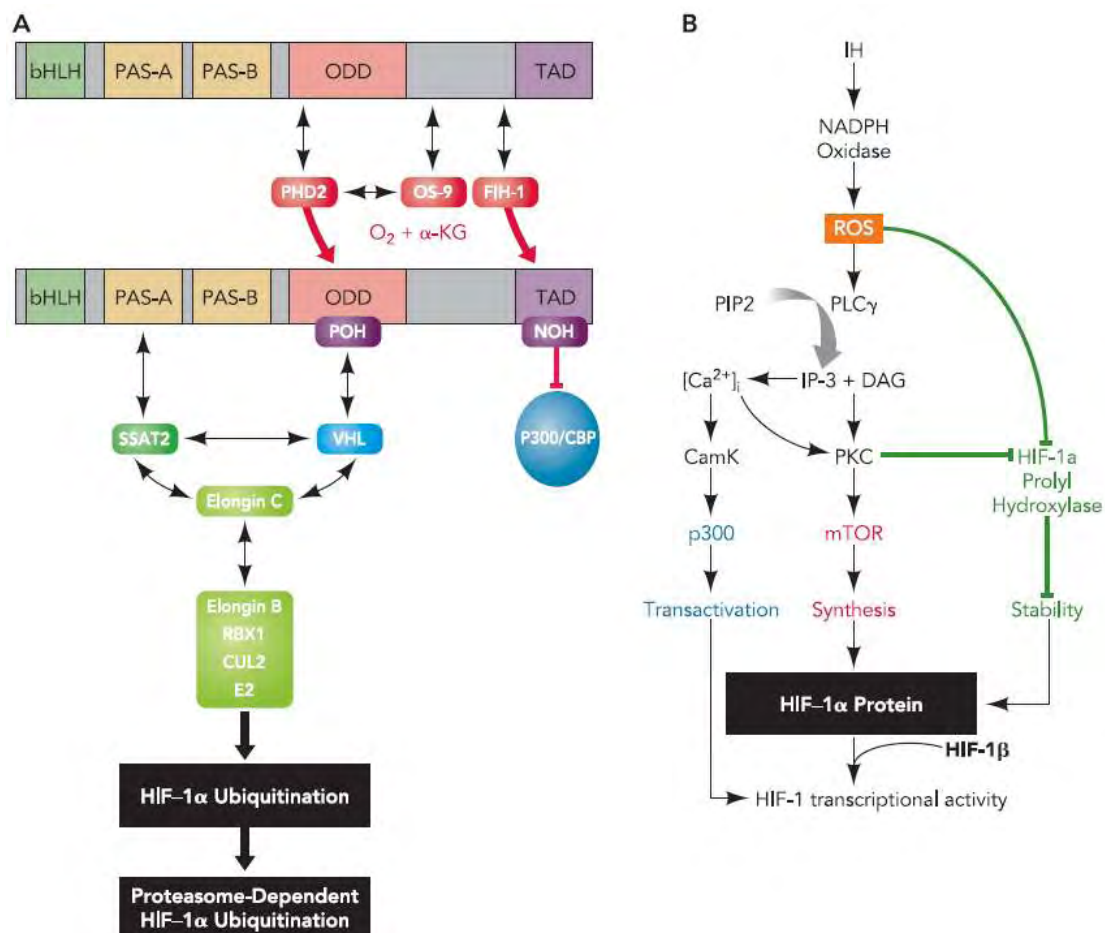




**Εικόνα 4.** Στη νορμοξία ο FIH υδροξυλιώνει τον HIF-1α σε μια θέση ασπαραγίνης (803) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μοριακό οξυγόνο και α-κετογλουταρικό οξύ παρουσία δισθενούς σιδήρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται σύνδεσή του με τον CBP/P300 και κατά συνέπεια η μεταγραφική δράση του HIF-1α. Αντίθετα, στα δεξιά απεικονίζεται σε συνθήκες υποξίας (<5% συγκέντρωση οξυγόνου) η δράση της υδροξυλάσης αυτής (FIH) να αναστέλλεται με αποτέλεσμα τη σύνδεσή του με τον CBP/p300 και την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του. (Anthony et al., 2002)

Επιπλέον, σε συνθήκες διαλείπουσας υποξίας ο HIF-1α επάγεται με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν της συνεχόμενης υποξίας. Κύτταρα που απομονώθηκαν από φαιοχρωμοκύττωμα (όγκος των επινεφριδίων) ποντικού εκτέθηκαν σε 1,5% συγκέντρωση οξυγόνου για 30 δευτερόλεπτα και ακολούθως σε συγκέντρωση 20% για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 120 ακόμη κύκλους υποξίας-νορμοξίας και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του HIF-1α (Yuang et al., 2005). Η διαλείπουσα υποξία φάνηκε πως ήταν το ερέθισμα για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (από την NADPH οξειδάση) οι οποίες επάγουν τη δράση της PCγ (Phospholipase Cγ) οδηγώντας στη δημιουργία 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και

διακυλογλυκερόλης (DAG). Η IP3 προκαλεί απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα και τα ιόντα αυτά ενεργοποιούν την κινάση της καλμοδουλίνης (CamK). Η κινάση αυτή μαζί με την DAG επάγουν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία φαίνεται πως προκάλεσε ενεργοποίηση του HIF-1α μέσω του mTOR (mammalian Target of Rapamycin) μονοπατιού και απενεργοποίησε την PHD2-εξαρτώμενη αποδόμηση του HIF-1α. Η CamK φωσφορυλιώνει τον p300 και με αυτόν τον τρόπο προωθεί τη σύνδεσή του με τον HIF-1α. Άρα σε συνθήκες διαλείπουσας υποξίας ο HIF-1α παραμένει ενεργός ακόμη και κατά τις περιόδους φυσιολογικής οξυγόνωσης εξαιτίας της ενεργοποίησης του mTOR (Yuang et al., 2008) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Αριστερά απεικονίζονται οι δομικές περιοχές του HIF-1α και τα αποτελέσματα της υδροξυλίωσής του από τις PHDs και τη FIH. Δεξιά απεικονίζονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων η διαλείπουσα υποξία επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση (κόκκινο), την σταθερότητα (πράσινο) και την ενεργοποίηση της δράσης (μπλε) του HIF-1α σε συνθήκες διαλείπουσας υποξίας. (Semenza et al., 2008)

### 1.6.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

Εκτός από το οξυγόνο που είναι ο κυριότερος παράγοντας ρύθμισης του HIF-1α, και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα από αυτό φαίνεται να συμμετέχουν στη ρύθμισή του. Τα κυριότερα ανεξάρτητα από το οξυγόνο μονοπάτια ρύθμισής του είναι αυτά των MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) και της PI3K. Οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτταροκίνες και άλλα εξωκυττάρια σήματα προσδένονται σε υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης ή συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες, οι οποίοι ενεργοποιούν τα μονοπάτια αυτά με τελικό αποτέλεσμα την επιβίωση, την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Treins et al., 2002, Fukuda et al., 2002).

Πολλοί αυξητικοί παράγοντες αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α άσχετα από την υποξία και είναι δυνατόν αυτή η αύξηση να υπερτερεί της φυσιολογικής αποδόμησης που συμβαίνει σε νορμοξία με τελικό αποτέλεσμα την ανίχνευση ικανοποιητικών επιπέδων του HIF-1α (Ji-Won Lee et al., 2004). Παράγοντες όπως η IL-1β (Interleukin-1β) και ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) επάγουν την έκφραση του mRNA του HIF-1α μέσω επαγωγής του μονοπατιού της PI3K (Yequan et al., 2011). Επίσης, η πρωτεΐνη heregulin επάγει την σύνθεση του HIF-1α σε συγκεκριμένα κύτταρα καρκίνου του μαστού (Laughner et al., 2001). Η πρωτεΐνη αυτή έχει βρεθεί ότι προσδένεται στους υποδοχείς HER2 και HER3 (μέλη της υπερικογενείας των υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων), ενεργοποιεί την PI3K, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Akt (πρωτεϊνική κινάση B). Η ενεργοποιημένη πλέον Akt φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την mTOR και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης p70S6 και αναστέλλει την eIF-4EBP1 (eIF-4 Binding Protein) (αναστολέας της eIF-4E). Τελικά, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 και ενεργοποιείται η δράση της eIF-4E (ο κύριος ρυθμιστής της cap μεταγραφής) με αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA διαφόρων πρωτεϊνών (Hay et al., 2004, Fukuda et al., 2007).

Όσον αφορά στο μονοπάτι των MAPK, η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στον μεμβρανικό υποδοχέα ενεργοποιεί τη Ras και αυτή τις κινάσες MEK/ERK. Η ERK, στην συνέχεια, φωσφορυλιώνει τον p300 αυξάνοντας την ικανότητα σύνδεσής του με τον HIF-1α (Ji-Won Lee et al.,

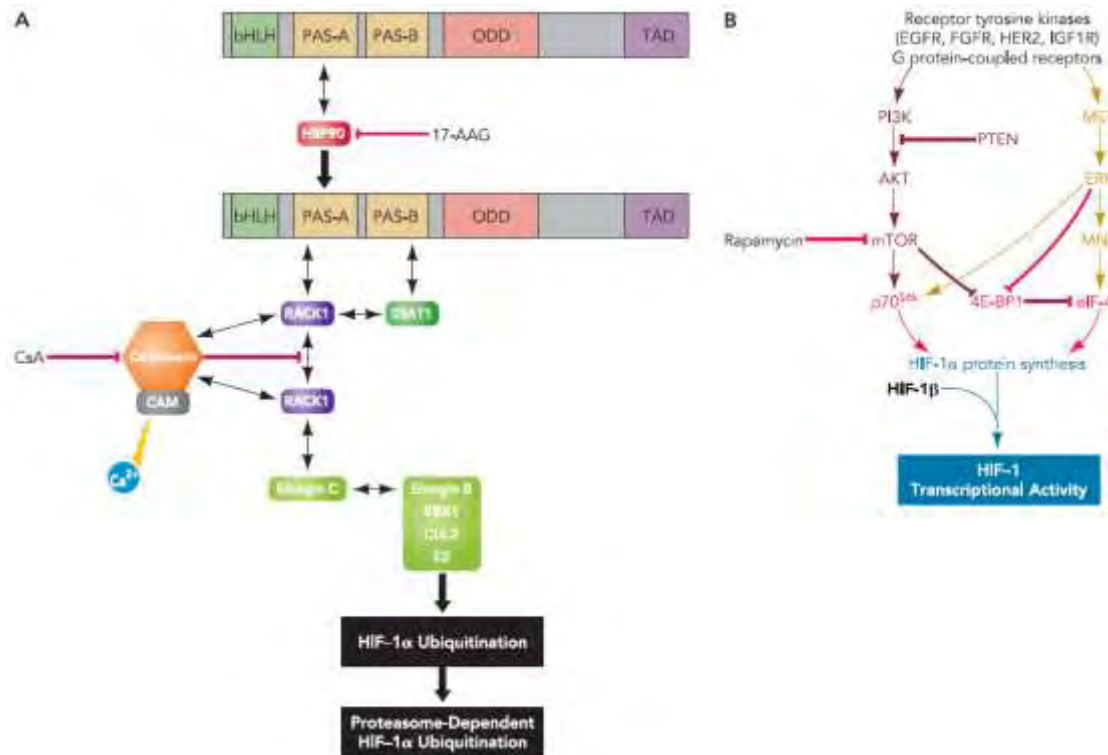
2004). Ακόμη, η p42/44 MAPK επάγει τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα (Mylonis et al., 2008).

Η πρωτεΐνη RACK1, (Receptor for Activated Protein Kinase 1) επίσης, είναι δυνατόν να συνδέεται με τον HIF-1α και με την πρωτεΐνη Elongin C, η οποία συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου E3 λιγάση της ουβικουιλίνης. Έτσι, οδηγεί τον HIF-1α σε αποδόμηση από το πρωτεάσωμα. Η φωσφορυλίωση της RACK1 είναι απαραίτητη για τη δράση της και αναστέλλεται από την καλσινευρίνη. Η Hsp90 (Heat shock protein 90) είναι μια άλλη πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με τον HIF-1α σταθεροποιώντας τον και η σύνδεση αυτή αναστέλλεται από ειδικούς αναστολείς. Η δράση δηλαδή των Hsp90 και RACK1 είναι ανταγωνιστική και φαίνεται, ακόμη, πως η ικανότητα των ειδικών αναστολέων της Hsp90 να επάγουν την αποδόμηση του HIF-1α εξαρτάται από τη έκφραση της RACK1(Liu et al., 2007).

Επιπλέον, το ασβέστιο είναι πιθανό να επάγει άμεσα τον HIF-1α, αφού παρατηρήθηκε ότι η ιονομυκίνη, ένα ιοντοφόρο που μεταφέρει ασβέστιο, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του σε νεφρικά καρκινικά κύτταρα ακόμη και σε έλλειψη της pVHL (Liu et al., 2007).

Ακόμη, η SSAT1 (Spermidin/Spermin N1 Acetyltransferase 1) επάγει την αποδόμηση του HIF-1α σταθεροποιώντας τη σύνδεσή του με την RACK1 (Baek et al., 2007), ενώ η SSAT2 επάγει επίσης το ίδιο αποτέλεσμα, με μηχανισμό όμοιο με αυτόν της RACK1 (Baek et al., 2007).

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιγράφηκαν είναι οι πιο σημαντικοί μη οξυγόνο-εξαρτώμενοι παράγοντες ρύθμισης του HIF-1α και δίνονται σχηματικά στην εικόνα 6.



**Εικόνα 6.** Αριστερά απεικονίζεται η ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1α από τη RACK-1. Η σύνδεση με τη RACK-1 επάγεται είτε από αναστολείς της Hsp90 (17AAG) είτε από αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη A). Η σύνδεση του ασβεστίου με την καλμοδουλίνη ενεργοποιεί την φωσφατάση της καλσινευρίνης, η οποία αναστέλλει το διμερισμό με την RACK1. Δεξιά απεικονίζεται η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης από τα μονοπάτια PI3K/Akt/mTOR (μωβ) και MAPK (πορτοκαλί), τα οποία οδηγούν στην φωσφορυλίωση σημαντικών ρυθμιστών της μετάφρασης. (Semenza et al., 2008)

Παρόλα αυτά πολλοί άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στη ρύθμιση του HIF-1α, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου. Ακόμη και η υδροξυλάση FIH, ο ρόλος της οποίας έχει αναλυθεί εκτενώς σε συνθήκες υποξίας, δυνατόν να συνδέεται με την pVHL ανεξάρτητα από τη δράση της ως υδροξυλάση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της HDAC (Histone Deacetylase) η οποία αλληλεπιδρά με τις ενεργοποιητικές περιοχές του HIF-1α (Mahon et al., 2001).

Επιπλέον οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (είτε εξωγενείς είτε μετά από διέγερση του κυττάρου με θρομβίνη) φαίνεται πως επάγουν την έκφραση του HIF-1α διεγείροντας τη μεταγραφή του γονιδίου του από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor kappa B) (Bonello et al., 2007). Ακόμη, το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide, NO) επάγει τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας αναστέλλοντας τις

PHDs ενώ σε συνθήκες υποξίας επάγει την αποδόμησή του από τις PHDs πιθανόν γιατί ανταγωνίζεται με το οξυγόνο για την οξειδάση του κυτοχρώματος στο μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση των PHD (Metzen et al. 2003).

Το κοβάλτιο και το νικέλιο αλλά και το μονοξειδίο του άνθρακα ανταγωνίζονται με τον σίδηρο για τις PHDs αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους (Huang et al., 1999, Salnikow et al., 1999). Παρόμοια βιολογική δράση ασκούν και οι χηλικές ενώσεις του σιδήρου (π.χ. δεσφερριτοξαμίνη) (Kyung et al., 2006). Επιπλέον, η βιταμίνη E φαίνεται να επάγει την έκφραση του HIF-1α (Zhang et al., 2004) ενώ η ορμόνη 2-μεθοξυοιστραδιόλη αναστέλλει τη δράση του μέσω της αναστολής της πρόσδεσής του στο DNA (Ricker et al., 2004).

Τέλος, ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση πως από μόνο του το μηχανικό stress μπορεί προκαλέσει σταθεροποίηση του HIF-1α σε μυοκαρδιακά κύτταρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K (Kuwahara et al., 2002). Όλοι αυτοί οι παράγοντες που αναφέρονται να συμμετέχουν στη ρύθμιση του HIF-1α υπενθυμίζουν απλώς την πολυπλοκότητα της σύνθετης αυτής κυτταρικής σηματοδότησης.

### 1.7 Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις

Η μεταγραφική ενεργότητα, η πρωτεϊνική σταθερότητα, οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και ο κυτταρικός εντοπισμός του HIF-1α ρυθμίζονται κυρίως από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου του όπως είναι η υδροξυλίωση, η ακετυλίωση, η S-νιτροζυλίωση, η σουμοϋλίωση και η φωσφορυλίωση.

Οι υδροξυλάσες προλίνης PHD, όπως ήδη έχει αναπτυχθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, υδροξυλιώνουν δύο θέσεις προλίνης στο μόριο του HIF-1α προάγοντας τη σύνδεσή του με την pVHL και την ακόλουθη αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα, ενώ η υδροξυλάση FIH-1 υδροξυλιώνει μια θέση ασπαραγίνης, αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή του με τον μεταγραφικό παράγοντα CBP/p300. Σε συνθήκες υποξίας η δράση των υδροξυλάσων αναστέλεται, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση και την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα, το διμερισμό του με τον ARNT (Aryl hydrocarbon

Receptor Nuclear Translocator) και την αλληλεπίδρασή του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ώστε να αρχίσει η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-1α.

Οι υδροξυλάσες PHD χρησιμοποιούν οξυγόνο και α-κετογλουταρικό ως υποστρώματα, ενώ για την αντίδραση της υδροξυλίωσης απαιτούνται επιπλέον ο δισθενής σίδηρος και το ασκορβικό οξύ. Υπάρχουν τρεις υδροξυλάσες PHD (1,2 και 3) και η PHD2 φαίνεται πως διαδραματίζει τον σπουδαιότερο ρόλο *in vivo*, ακολουθούμενη από τις PHD3 και PHD1 κατά σειρά δραστηριότητας (Berra et al., 2003). Η PHD2 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, η PHD1 κυρίως στον πυρήνα, ενώ η PHD3 και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα (Metzen et al., 2003). Εμφανίζουν, ακόμη, ιστοειδική έκφραση με την PHD2 να υπερτερεί στον λιπώδη ιστό, την PHD1 στους όρχεις και την PHD3 στην καρδιά και στον πλακούντα (Lieb et al., 2002, Oehme et al., 2002). Επιπλέον, σε υποξία, η PHD2 και το mRNA της βρέθηκαν αυξημένα, ενώ τα mRNA των PHD3 και PHD1 βρέθηκαν αυξημένα και ελαττωμένα αντίστοιχα, γεγονός που πιθανόν να σημαίνει την ικανότητα αυτορρύθμισης της έκφρασης του HIF-1α (Metzen et al., 2003). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι υπόκεινται σε ρύθμιση από τις Siah 1 και 2, δύο ειδικές E3 λιγάσες των PHD 1 και 3 που επάγονται από την υποξία (Nakayama et al., 2004).

Μια ακόμη σημαντική μετά-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-1α είναι η ακετυλίωση της λυσίνης 532 που βρίσκεται στην ODDD περιοχή του μορίου του από τον ARD1 (Arrest Defective protein 1). Η ακετυλίωση αυτή ευνοεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την pVHL και έτσι, τον αποσταθεροποιεί. Ενώ όμως η δράση αυτή του ARD1 είναι ανεξάρτητη από το οξυγόνο, τα επίπεδα του mRNA του και της πρωτεΐνης του ελαττώνονται στην υποξία (Jeong et al., 2002).

Η S-νιτροζυλίωση επηρεάζει τόσο την σταθερότητα όσο και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) φαίνεται να αυξάνει ή να μειώνει την σταθεροποίηση του HIF-1α ανάλογα με την συγκέντρωσή του και το είδος των κυττάρων, ενώ φαίνεται πως αποσταθεροποιεί τον HIF-1α σε υποξία. Επιπλέον έχει αποδειχθεί πως ο HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στην κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του, τροποποίηση ευοδωτική για την αλληλεπίδραση του HIF-1α

με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP/p300. (*Yasinska and Sumbayev, 2003*)

Ακόμη, βρέθηκε πως ο HIF-1α υφίσταται σουμοϋλίωση (Berta et al., 2004). Ο HIF-1α περιέχει 3 αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, σε τρία κατάλοιπα λυσίνης στις θέσεις 391, 477 και 532. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 (Ran Binding Protein 2) E3 λιγάση της ουβικιτίνης η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην σταθεροποίηση ή μη του HIF-1α δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί καθώς τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν συγκλίνουν (Bae et al., 2004, Brahimi-Horn et al., 2005, Berta et al., 2007, Carbia-Nagashima, 2007).

Όσον αφορά στην φωσφορυλίωση, είναι γνωστό πως ο HIF-1 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη (Wang και Semenza, 1993). Η αναστολή των κινασών σερίνης/θρεονίνης και κινασών τυροσίνης αναστέλλει την πρόσδεση του HIF στο DNA και μειώνει τη σταθερότητά του κάτω από υποξικές συνθήκες (Wang et al., 1995), ενώ αναστολή των MAPK φαίνεται να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. (Salceda, S et al., 1997)

Μια κινάση η οποία φαίνεται να επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι η κινάση καζεΐνης 2 (Casein Kinase2, CK2) (Mottet et al., 2005). Η CK2 φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη θρεονίνη 796 (Cho et al., 2007). Ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής δεν είναι ακόμη γνωστός αν και φαίνεται πως παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της FIH-1 με τον HIF-1α, αναστέλλοντας έτσι την υδροξυλίωση του στην Asn803 της αμινοξικής του αλληλουχίας (Lancaster et al., 2004). Ακόμη, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (Glycogen Synthase Kinase-3, GSK-3) φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον HIF-1α σε τρία αμινοξικά κατάλοιπα της N-TAD περιοχής (Ser551, Thr555 και Ser589) προκαλώντας την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το οξυγόνο και την pVHL (Flugel et al., 2007), γεγονός που συνάδει με τη γνωστή ενεργοποίηση του HIF-1α από το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt (η GSK-3 αποτελεί στόχο της πρωτεϊνικής κινάσης β ή Akt). Επιπλέον, πρόσφατα αναφέρθηκε η φωσφορυλίωση του HIF-1α και στο αμινοτελικό του τμήμα από μια άγνωστη μέχρι τότε κινάση πρωτεϊνών (Mylonis et al., 2006). Ακόμη πιο πρόσφατα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του

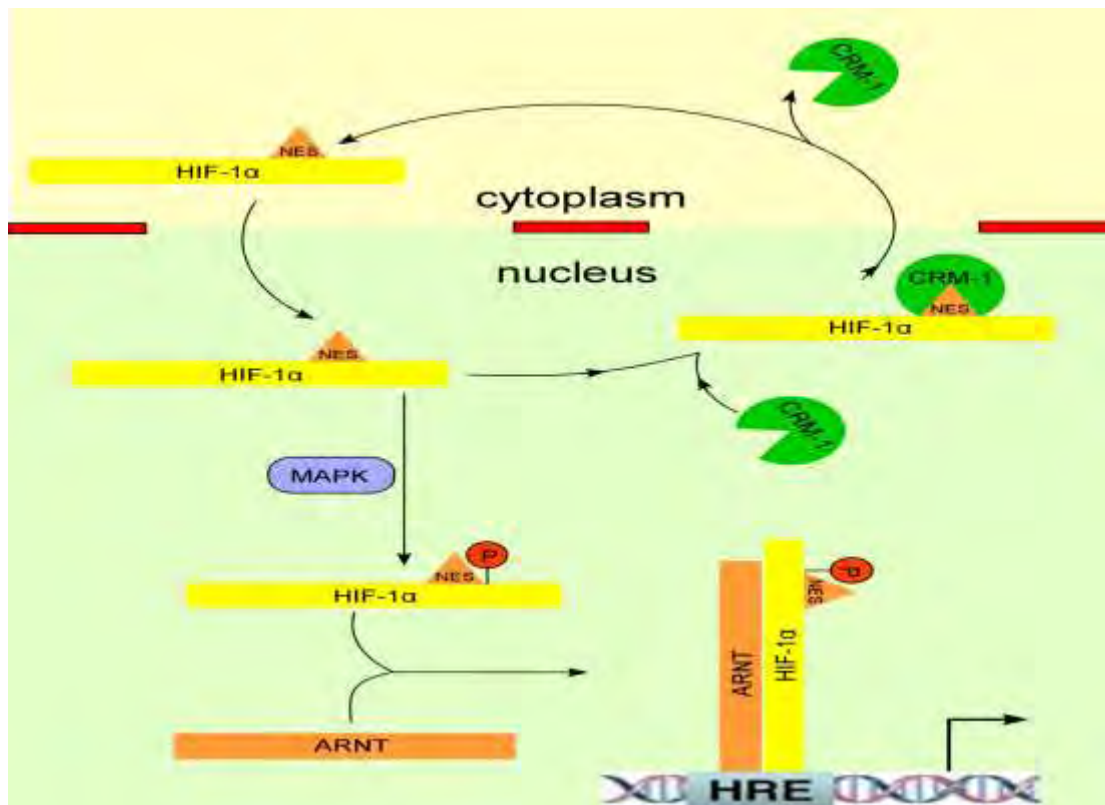


Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έδειξαν ότι η κινάση αυτή είναι η CK1δ/ε (Casein Kinase 1δ/ε) και η θέση που φωσφορυλιώνει είναι η Ser 247. Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, παρεμποδίζοντας τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT (Kalousi et al 2010). Η πρωτεΐνη ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), επίσης, βρέθηκε πρόσφατα ότι φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην σερίνη 696, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTORC1 σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού σε συνθήκες stress. Ακόμη, η PKR (Protein Kinase R) (κινάση του eIF2α) φαίνεται να αναστέλλει τη δράση του HIF-1α μέσω της Stat3 (Papadakis et al, 2010), ενώ η κινάση Plk3 (Polo-like kinase 3) βρέθηκε ότι αυξάνει την σταθερότητα του μορίου του, φωσφορυλιώνοντάς τον σε δύο θέσεις σερίνης (Xu et al, 2010). Τέλος, ο HIF-1α βρέθηκε ότι φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK στις σερίνες 641 και 643 (Mylonis et al., 2006) και ο βιολογικός ρόλος αυτής της φωσφορυλίωσης είναι να αναστέλλει την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα αποκρύπτοντας ένα υδρόφοβο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα NES (Nuclear Export Signal) που αναγνωρίζει η εξπορτίνη CRM1 (Chromosome Region Maintenance) (Mylonis et al., 2008).

### 1.8 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση

Αν και η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση είναι εδώ και καιρό γνωστή, μόλις πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν οι θέσεις της φωσφορυλίωσης σε δύο κατάλοιπα σερίνης (641 και 643) (Mylonis et al., 2006). Δείχθηκε επίσης, πως η αναστολή της φωσφορυλίωσης (μέσω μεταλλαξιγένεσης, με χρήση αναστολέων των MAPK ή με κατεργασία με φλαβονοειδή) αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα αλλά και τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα (Mylonis et al., 2006, Triantafyllou et al. 2008). Η συσσώρευση στον πυρήνα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τους σχετικούς ρυθμούς εισαγωγής και εξαγωγής της (Pemberton et al, 2005). Ένα μη τυπικό, υδρόφοβο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα NES εντοπίστηκε στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 631-639 του HIF-1α, σε γεινίαση δηλαδή, με τις θέσεις φωσφορυλίωσης από την p44/42 MAP κινάση. Όπως αποδείχθηκε με πειράματα ελέγχου του υποκυτταρικού εντοπισμού με χρήση

μικροσκοπίας φθορισμού καθώς και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, το NES αλληλεπιδρά με την εξπορτίνη CRM1 όταν τα γειτονικά κατάλοιπα Ser641-Ser643 δεν είναι φωσφορυλιωμένα (Mylonis et al, 2008) με αποτέλεσμα την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα αφού σταθεροποιηθεί και εξέρχεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την εξπορτίνη CRM1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK προκαλεί φωσφορυλίωση του HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 μέσω των p42/44 MAPK και αναστολή της εξόδου του από τον πυρήνα. Έτσι ο HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στα HREs των γονιδίων-στόχων και διεγείρει τη μεταγραφή τους μέσω των συνενεργοποιητών CBP/p300. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 ενισχύεται περαιτέρω μέσω φωσφορυλίωσης από τις MAPK.

Έτσι προτάθηκε ένας ακόμη ανεξάρτητος από το οξυγόνο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α που εμπλέκει τη ρυθμιζόμενη εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 'κρύβει' το γειτονικό σήμα πυρηνικής εξόδου (NES) από την εξπορτίνη CRM1 με αποτέλεσμα την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT

και την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του (Εικόνα 7). Όπως φαίνεται και από μελέτες με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Zhang et al. 2001, Lee et al. 2002, Ikuta et al. 2004 Sasaki et al. 2006), η αναστολή της εξαγωγής από τον πυρήνα μέσω φωσφορυλίωσης είναι πιθανόν να αποτελεί έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο για να επιτευχθεί η πλήρης ενεργοποίηση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α.

Παρόλα αυτά, η φωσφορυλίωση από την p44/42 MAPK φαίνεται να επηρεάζει και με κάποιον επιπρόσθετο τρόπο τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (όπως για παράδειγμα την αλληλεπίδρασή του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής) καθώς σε πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού και μεταγραφικής ενεργότητας με χρήση του PD98059 (αναστολέας των MAPK) η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του αγρίου τύπου HIF-1α ήταν δυσανάλογη της μείωσης της πυρηνικής συσσώρευσής του. Ακόμη, σε πειράματα ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε συσσώρευση στον πυρήνα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GFP-MTD και FLAG-MTD (MTD-MAPK Target Domain, αμινοξέα 616-658 της αλληλουχίας του HIF-1α ) παρόλο που το μικρό τους μέγεθος επιτρέπει την ελεύθερη διάχυσή τους διαμέσω των πυρηνικών πόρων. Έτσι, είναι πολύ πιθανό το τμήμα MTD να περιλαμβάνει εκτός του NES και των θέσεων φωσφορυλίωσης και μια αλληλουχία που συνδέεται, μετά από την φωσφορυλίωση του, με μια άγνωστη πυρηνική πρωτεΐνη, απαραίτητη για τη βέλτιστη λειτουργία του HIF-1α (Mylonis et al., 2008).

### 1.9 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α

Ο HIF-1α σε όλα τα στάδια της ρύθμισης και δράσης του αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες και πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις έχουν αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενα κεφάλαια. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α είναι δυνατόν να επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα (π.χ ARNT, CBP/p300) ή τη σταθερότητα του (π.χ. pVHL, Hsp90, RACK1) ή ακόμη και να τροποποιούν το μόριό του (PHDs, FIH, οι διάφορες κινάσες, ARD1, SUMO).

Ο CBP p300/ είναι ο γενικός συμπαράγοντας της μεταγραφής και έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α για την ενεργοποίηση της

μεταγραφής των γονιδίων στόχων του (Elbert et al.1998, Arany et al. 1996). Άλλοι συμπαραγοντες της μεταγραφής που ενεργοποιούν τη δράση του HIF-1α είναι οι SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1) και TIF-2 (Transcription Intermediary Factor-2) που ανήκουν στην οικογένεια των συνενεργοποιητών p160 (Carrero et al. 2000), όπως επίσης και ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) που συνδέεται με την περιοχή bHLH/PAS του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, αλληλεπίδραση η οποία φαίνεται να απαραίτητη για την ενεργοποίηση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (Zhang et al., 1999)

Η απακετυλάση HDAC7 φαίνεται να είναι η μόνη από την οικογένεια των HDACs (Histone Deacetylases) που αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-1α και αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητά του (Kato et al., 2004). Μια ακόμη πρωτεΐνη που φαίνεται να επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι η β-κατενίνη, η οποία βρέθηκε ότι συνδέεται με τον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου (Kaidi, et al.2007).

Μια αλληλεπίδραση που αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι με την MgcRacGAP, μια πρωτεΐνη με δράση GTPασης που ρυθμίζει τις Rho πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Lyberopoulou et al., 2007).

Ο HIF-1α, ακόμη, μέσω της MDM2 (Murine Double Minute 2), η οποία ανήκει στο σύμπλεγμα E3 λιγάση της ουβικιτίνης, συνδέεται με το προϊόν του ογκογονιδίου p53 σε συνθήκες υποξίας. Η σύνδεση αυτή προωθεί την ουβικιτινίωση και αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα (Ravi, R., et al 2000, Fels, D.R. and C. Koumenis 2005). Τη σύνδεση του HIF-1α με την p53 ανταγωνίζεται η πρωτεΐνη Jab1 (ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής των c-Jun και του Jun-D) η οποία σταθεροποιεί τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (Bae, 2002, Larsen, 2005). Μια επιπλέον αλληλεπίδραση του HIF-1α που διευκολύνει την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμησή του είναι αυτή με την πρωτεΐνη OS-9 (Osteosarcoma 9), που εκφράζεται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η OS-9 συνδέεται τόσο με τον HIF-1α όσο και με τις PHDs προωθώντας με αυτόν τον τρόπο την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποδόμηση του HIF-1α (Baek et al., 2005).

Στην ανεξάρτητη του οξυγόνου αποικοδόμηση του HIF-1α φαίνεται πως παίζει ρόλο και η πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού sept9-v1 η οποία

δεσμευόμενη στην περιοχή bHLH του HIF-1α αποτρέπει την αποδόμηση που εξαρτάται από τη RACK1 (Amir et al., 2009).

Τέλος, η πρωτεΐνη HAF φαίνεται να αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με τον HIF-1α (και όχι με τον HIF-2α) οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, αφού λειτουργεί ως E3 λιγάση της ουβικουΐνης (Mei Yee Koh et al., 2009).

Άλλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α περιλαμβάνουν τον ARD1 (Jeong et al., 2002) και τις κινάσες που έχουν ήδη αναφερθεί, αλλά και άλλες πρωτεΐνες. Η πληθώρα των αλληλεπιδράσεων αυτών καταδεικνύει την σπουδαιότητά τους όσον αφορά στη ρύθμισή του.

### 1.10 HIF-1α και νόσος

Ο HIF-1α συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία που παρατηρείται σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η επούλωση του τραύματος, η μεταβολή του υψόμετρου και η κολύμβηση. Η ανίχνευσή του ανοσοϊστοχημικά σε κύτταρα φυσιολογικών ιστών (εγκέφαλος, ήπαρ, νεφρός, μυοκάρδιο) σε νορμοξία υποδεικνύει την πιθανότητα να είναι απαραίτητος ώστε να διατηρείται η έκφραση βασικών γονιδίων στόχων του. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο και στην παθοφυσιολογία διαφόρων πολύ συχνών παθολογικών καταστάσεων αγγειακών, μεταβολικών, φλεγμονωδών και άλλων (π.χ αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια, προεκλαμψία) αλλά και πολλών καρκίνων.

Οι σημαντικότερες κλινικά αγγειακές νόσοι είναι η ισχαιμική νόσος του μοκαρδίου (INM), το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (IAEE), η αγγειακή υπέρταση (AY) και η πνευμονική υπέρταση (ΠΥ) και ο HIF-1α βρέθηκε ότι εμπλέκεται και στις τρεις αυτές καταστάσεις. Προκλινικές μελέτες δείχνουν πως ο HIF-1α επάγεται σε βιώσιμα εγκεφαλικά κύτταρα ισχαιμικών περιοχών του εγκεφάλου (Shi et al., 2009). Ακόμη, επάγεται και στο ανθρώπινο ισχαιμικό μυοκάρδιο όπως φαίνεται σε δείγματα βιοψιών (Lee et al., 2000) . Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι επάγεται και στο γειτονικό φυσιολογικό μυοκάρδιο μέσω υποδοχέων πίεσης που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/FRAP (Kim et al., 2002). Με παρόμοιο

μηχανισμό φαίνεται ότι επάγεται και στην ΑΥ (Kuwahara et al., 2002) (Εικόνα 8). Τέλος, η εξάλειψη του γονιδίου του φαίνεται πως ελαττώνει την αλλαγή της δομής των πνευμονικών αγγείων η οποία συμβαίνει κατά την ΠΥ (Yu et al., 1999).



**Εικόνα 8.** Η ισχαιμία και η διάταση του μυοκαρδίου, η αρτηριακή υπέρταση και ο υποαερισμός οδηγούν σε αναδιαμόρφωση του καρδιαγγειακού συστήματος επάγοντας τον HIF-1α. (Jong-Wan Park et al., 2004)

Το συχνότερο μεταβολικό νόσημα είναι ο σακχαρώδης διαβήτης και ο HIF-1α φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νόσο (ειδικά στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2). Φαίνεται, λοιπόν, ότι φυσιολογικά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα β κύτταρα του παγκρέατος και η εξάλειψη του γονιδίου του σε ποντίκια προκαλεί δυσανεξία στη γλυκόζη. Επιπλέον, η δράση του αναστέλλεται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, ενώ ο ρόλος του στην επούλωση των επίμονων διαβητικών ελκών είναι επιβαρυντικός, αφού επάγοντας τον VEGF οδηγεί στη νεοαγγειογένεση και τη δημιουργία δύσμορφων και μερικώς λειτουργικών αγγείων (Cheng et al., 2010).

Όσον αφορά στη φλεγμονή, είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλλον της εκτός από υποξικό, χαρακτηρίζεται ακόμη και από τις υψηλές συγκεντρώσεις φλεγμονωδών μεσολαβητών και μεταβολιτών και από χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επάγουν τον HIF σε διάφορα επίπεδα.

Συνοπτικά, φαίνεται πως η επαγωγή του σε μεταγραφικό επίπεδο εμπλέκεται περισσότερο στην προετοιμασία των κυττάρων ώστε να μπορούν αργότερα να δράσουν στο υποξικό περιβάλλον της φλεγμονής. Αντίθετα, η επαγωγή του στο μεταφραστικό και στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο επιβεβαιώνει την άμεση και κατάλληλη απάντηση των κυττάρων ως απάντηση σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους. Η δράση του στα κύτταρα της φλεγμονής ποικίλλει και σε γενικές γραμμές μπορεί να ειπωθεί ότι στα κύτταρα της μυελικής σειράς δρα προάγοντας την επιβίωση, το μεταβολισμό, τη διήθηση των ιστών και γενικότερα τη φλεγμονώδη δράση τους. Αντίθετα, στα κύτταρα της λεμφικής σειράς φαίνεται να είναι έμμεσος ρυθμιστής, προστατεύοντας τα από διάφορες δυσλειτουργίες και κυρίως από την αυτοανοσία.

Εντούτοις, ρόλος του HIF-1α στις φλεγμονώδεις νόσους φαίνεται να ποικίλλει ανάλογα με τη νόσο και περιπλέκεται ακόμη περισσότερο από την αλληλεπίδραση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στη φλεγμονή ή την υποξία. Για παράδειγμα φαίνεται πως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι μάλλον επιβαρυντικός ο ρόλος του, ενώ στην ιδιοπαθή νόσο του εντέρου είναι προστατευτικός.

Πάντως, εκτός από την ευεργετική του δράση στα κύτταρα, ο HIF-1α (όταν επάγεται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα) είναι δυνατόν να οδηγήσει στην επιβίωση ανώμαλων κυττάρων. Ο κίνδυνος αυτός υφίσταται σε καταστάσεις χρόνιας υποξίας όπως είναι οι χρόνιες φλεγμονές, η χρόνια ισχαιμία, οι ισχαιμικοί όγκοι (Dehn et al., 2009).

## 1.11 HIF-1α και καρκίνος

### 1.11.1 Υποξία και καρκίνος

Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει μια πληθώρα γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην εμφάνιση των ειδικών λειτουργικών χαρακτηριστικών του καρκίνου, τα οποία είναι η συνεχής διέγερση μέσω αυξητικών σημάτων και η απευαισθητοποίηση ως προς τα αντιαυξητικά σήματα, η αποφυγή της απόπτωσης, η απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, η νεοαγγειογένεση, η διήθηση και η μετάσταση (Hanahan et al., 2000). Το 1956

ο Otto Warburg επισήμανε ένα ακόμη πολύ κοινό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Διαπίστωσε πως ακόμη και παρουσία οξυγόνου τα καρκινικά κύτταρα μεταβολίζουν τη γλυκόζη κυρίως μέσω της γλυκόλυσης και λιγότερο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Warburg effect). Εκτός όμως από τη γλυκόζη, το καρκινικό κύτταρο φαίνεται πως καλύπτει τις μεταβολικές του ανάγκες χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη γλουταμίνη και λιπαρά οξέα (DeBerardinis et al., 2008). Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων φαίνεται πως συμβάλλει στην εμφάνιση των λειτουργικών χαρακτηριστικών του καρκίνου και είναι γνωστό πως (όσον αφορά τους συμπαγείς όγκους) είναι υποξικό. Η υποξία προκύπτει κατά την αύξηση του όγκου, η οποία ελαττώνει την ικανότητα διάχυσης του αίματος από τα αγγεία σε απομακρυσμένες περιοχές. Ακόμη και με τη νεοαγγειογένεση, η διάχυση δεν αποκαθίσταται πλήρως, αφού τα αγγεία αυτά είναι δύσμορφα και μερικώς λειτουργικά και, έτσι, η οξυγόνωση του όγκου ποικίλλει σημαντικά χωρικά αλλά και χρονικά μέσα στον ίδιο όγκο, δίνοντας πλεονέκτημα στα κύτταρα αυτά που προσαρμόζονται στη υποξία (Gatenby et al. 2004).

Τα κύτταρα που εκτίθενται σε υποξία διατρέχουν τον κίνδυνο της οξειδωτικής βλάβης του DNA και της συσσώρευσης γενετικών βλαβών, οι οποίες δυνατόν να παρεμποδίζουν την κυτταρική αύξηση ή ακόμη και να οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Παρόλα αυτά, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν διάφορες γενετικές αλλαγές οι οποίες βελτιώνουν την επιβίωσή τους και επιτρέπουν την προσαρμογή τους σε συνθήκες υποξίας. Έτσι, τα υποξικά καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, διαθέτουν φαινότυπο που σχετίζεται με μεγάλη διηθητική και μεταστατική ικανότητα και είναι συνήθως ανθεκτικά στις συμβατικές θεραπείες (ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία). Ο κυριότερος παράγοντας της κυτταρικής σηματοδότησης σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης είναι ο HIF (και ιδιαίτερα η  $\alpha$ , επαγόμενη από την υποξία, υπομονάδα του) ο οποίος συμμετέχει ουσιαστικά τόσο στην ενεργοποίηση των κυττάρων από την υποξία όσο και στην απάντησή τους σε αυτήν (Poon et al., 2009).



### 1.11.2 Ο HIF-1α στον καρκίνο

Η υπερέκφραση του HIF-1α σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο παγκρεατικός (Miyake et al., 2008), ο νεφρικός (Klatte et al. 2007), ο καρκίνος του μαστού (Bos et al., 2003, Gruber et al. 2004) και των ωοθηκών (Osada et al. 2007) υποδεικνύει την ενεργό συμμετοχή του στην παθοφυσιολογία της καρκινογένεσης

Ακόμη, σε πολλές μελέτες έχει σημειωθεί συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του HIF-1α και της κακής πρόγνωσης του ασθενούς και της αντιστάσης στη θεραπεία (Miyake et al. 2008, Winter et al 2006). Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός πως η υπερέκφραση του HIF-1α προσφέρει ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα για τις συνθήκες υποξίας που παρατηρούνται στους όγκους.

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με βελτίωση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις καρκίνου του θόλου του φάρυγγα (Fillis et al.). Επιπλέον, σε καρκινικά νεφρικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση του HIF-1α σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση (Klatte et al.). Αυτή η διαφορά είναι πιθανό να υποδεικνύει ένα διπλό ρόλο για HIF-1α όσον αφορά στην καρκινογένεση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι από τη μια προωθεί τη νεοαγγειογένεση και συμβάλλει στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία και από την άλλη διαμεσολαβεί τον κυτταρικό θάνατο συνεργαζόμενος με τον αποπτωτικό μηχανισμό του κυττάρου ως απόκριση στο κυτταρικό stress (Sumiyoshi et al., 2006). Πιθανόν η δράση του να ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων ή ακόμη και με το στάδιο της καρκινογένεσης και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνισή της.

### 1.11.3 Ρύθμιση του HIF-1α στον καρκίνο

Εκτός από την υποξία και άλλοι παράγοντες του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος συμβάλλουν στη ρύθμιση του HIF-1α. Τέτοιοι είναι η απώλεια της λειτουργικότητας ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, οι μεταλλάξεις μιτοχονδριακών ενζύμων και η

ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που επαγουν τον HIF-1α (Semenza et al., 2009).

Η απώλεια λειτουργικότητας διάφορων ογκοκατασταλτικών γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό απόκρισης στην υποξία έχει αναφερθεί πως συμβάλλει στην υπερέκφραση του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα στο VHL σύνδρομο κληρονομικής καρκινογένεσης, μια μετάλλαξη που προκαλεί απώλεια της λειτουργικότητας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης VHL έχει σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα (καρκίνου του νεφρού, αιμαγγειοβλαστώματος, κ.α.) (Maxwell et. Al, 1999). Επιπλέον, η πρωτεΐνη p53 (η δράση της σχετίζεται με την απόπτωση σε συνθήκες υποξίας), σε υψηλά επίπεδα, φαίνεται πως αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο HIF-p300 αναστέλλοντας τη δράση του HIF (Mikhail et al., 1998) μέσω της HDM2 (Human Double Minute 2 oncogene) η οποία αποτελεί τμήμα της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (Ravi et al., 2000). Απώλεια της p53 μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα του HIF-1α και έκφραση γονιδίων μέσω του HIF, (Zundel et al., 2000, Bardos et al. 2004). Επιπλέον, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p14<sup>ARF</sup> (alternative reading frame product of the INK4A locus) έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει τη μεταγραφική δράση του HIF-1α απομονώνοντας τον μέσα στον πυρήνα (Karoly et al., 2001), πιθανόν μέσω σουμοϋλίωσης (Rizos et al., 2005).

Η c-Myc είναι μια πρωτεΐνη-μεταγραφικός παράγοντας, προϊόν ογκογονιδίου η οποία μαζί με τον HIF-1 και την p53 ρυθμίζουν την μετάπτωση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση (Warburg effect) (Yeung et al., 2008). Ρυθμίζεται από τη β-κατενίνη και αυτή με τη σειρά της από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη APC (Adenomatous Polyposis Coli) μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt (Wingless) και Frizzled (Kaidi et al, 2007). Δυνατόν να διμερίζεται με την πρωτεΐνη MAX και να μεταγράφει τα γονίδια-στόχους, ενώ η πρωτεΐνη MXL-1 δρα ως αναστολέας της MAX. Η δράση της c-Myc απορυθμίζεται συχνά στα καρκινικά κύτταρα. Ο HIF-1α προωθεί τη σύνδεση της MXL-1 με τη MAX, ενώ επίσης εκτοπίζει τη c-Myc από τους προαγωγείς των γονιδίων στόχων της που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης και για τις δύο πρωτεΐνες (Huang et al, 2008). Ακόμη, η τυροσινική κινάση (προϊόν ογκογονιδίου) v-Src φαίνεται πως επάγει την έκφραση του HIF-1α

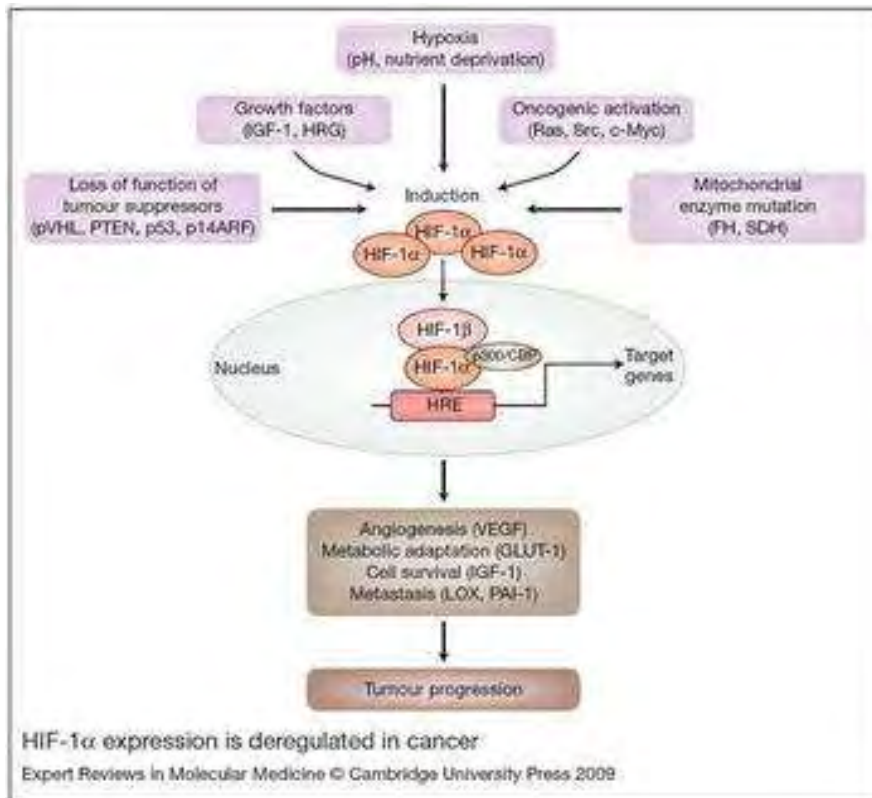
(Bing Hua Jiang et al., 1997), ενώ η οι κινάσες c-Src και ABL1 συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της c-Myc.

Μεταλλάξεις των μεταβολικών ενζύμων SDH (Succinate Dehydrogenase) και FH (Fumarate Hydratase) αναστέλλουν τις υδροξυλάσες προλίνης PHDs, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF1-α και την ακόλουθη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του σε διάφορους τύπους καρκίνου (Briere et al, 2006, Pollard et al. 2005)

Η απορύθμιση βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών συμβάλλει επίσης στην υπερέκφραση του HIF-1α στον καρκίνο. Καρκινικά κύτταρα στα οποία τα μονοπάτια Ras (προϊόν ογκογονιδίου)-MAPK ή PI3-AKT εκφράζονται συνεχώς παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του HIF-1α (Berra et. Al 2000, Karni et al 2002). Απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως της PTEN που αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι P13-AKT/mTOR επάγουν τον HIF-1α (Jiang et al., 1997).

Τέλος, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-1α στον καρκίνο διαδραματίζει η αυτοκρινική και παρακρινική δράση παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος όπως είναι οι EGF, FGF2, IGF1/IGF2/IGF1R (Feldser et al., 1999), πολλοί από τους οποίους επάγονται από τον ίδιο.

Στην εικόνα 9 συνοψίζονται οι παράγοντες που χαρακτηρίζουν το μικροπεριβάλλον του καρκίνου και συμβάλλουν στη ρύθμιση του HIF-1α.



**Εικόνα 9.** Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου εκτός από την υποξία, χαρακτηρίζεται και από μεταβολές όπως είναι η παρουσία αυξητικών παραγόντων, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η απώλεια της λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και οι μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών ενζύμων. Οι παράγοντες αυτοί επάγουν τον HIF-1α, με αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του η οποία οδηγεί σε κυτταρικές διαδικασίες που καταλήγουν στην πρόοδο του όγκου. (Poon et al., 2009)

#### 1.11.4 Δράση του HIF-1α στον καρκίνο

Οι δεκάδες των γονιδίων-στόχων του HIF-1α κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ουσιαστικό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου και δράσεις όπως η προσαρμογή του μεταβολισμού και η ρύθμιση του pH (επιβίωση του όγκου), η κυτταρική επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός (αύξηση του όγκου), η κίνηση των κυττάρων, η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και της εξωκυττάριας ουσίας (διηθητική ικανότητα του όγκου), η νεοαγγειογένεση και η κυτταρική ικανότητα προσκόλλησης (μετάσταση), η αντίσταση στη θεραπεία, κ.α., όπως συνοψίζονται στον πίνακα (Ji-Won Lee et al., 2004).

**Πίνακας 1.** Σύνοψη των κυτταρικών λειτουργιών που επάγει ο HIF-1α στα κύτταρα μέσω των αντίστοιχων υπεύθυνων πρωτεϊνών (Ji-Won Lee et al., 2004).

Function	Genes
Cell proliferation	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1, TGF-α, TGF-β3
Cell survival	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF-α, VEGF
Apoptosis	NIP3, NIX, RTP801
Motility	AMF/GPI, α-MET, LRP1, TGF-α
Cytoskeletal structure	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Cell adhesion	MIC2
Erythropoiesis	EPO
Angiogenesis	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF-β3, VEGF
Vascular tone	α <sub>1B</sub> -adrenergic receptor, ADM, ET1, Haem oxygenase-1, NOS2
Transcriptional regulation	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
pH regulation	Carbonic anhydrase 9
Regulation of HIF-1 activity	P35 <sup>srη</sup>
Epithelial homeostasis	Intestinal trefoil factor
Drug resistance	MDR1
Nucleotide metabolism	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
Iron metabolism	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin receptor
Glucose metabolism	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKFB3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC
Extracellular-matrix metabolism	CATHD, Collagen type V (α1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase α (1), UPAR
Energy metabolism	LEP
Amino-Acid metabolism	Transglutaminase 2

### 1.11.5 Ο HIF-1α ως θεραπευτικός στόχος στον καρκίνο

Ο ρόλος του HIF-1α στους περισσότερους τύπους καρκίνου φαίνεται πως είναι επιβαρυντικός. Συνεπώς η χρήση αναστολέων του σηματοδοτικού του μονοπατιού συνιστά έναν πιθανό νέο θεραπευτικό στόχο. Η αναστολή αυτή μπορεί να λαμβάνει χώρα σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης, αποδόμησης, πρόσδεσης στο DNA και μεταγραφικής ενεργότητας (Onnis et al., 2009).

Σε επίπεδο μεταγραφής, μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση που είναι δυνατόν να παρέχει εξειδικευμένη αναστολή του είναι η δημιουργία συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών του, όπως είναι το EZN-2968. Το EZN-2968 αναστέλει με μεγάλη ειδικότητα τον HIF-1α *in vitro* και *in vivo* (Greenberger et al., 2008). Επιπλέον, το φλαβονοειδές AF (Amino flavone) που συνδέεται με τον AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) αναστέλλοντας τον διμερισμό των δυο υπομονάδων του HIF βρίσκεται ήδη σε κλινική μελέτη φάσης 1 (Terzuoli et al.).

Παρόλο που οι μηχανισμοί που διέπουν τη μετάφραση του HIF-1α στην υποξία δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αρκετοί παράγοντες έχουν αναφερθεί να επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεσή του, όπως αναστολείς της τοποισομεράσης I και II, κινάσες (Tyrosine kinases, TRKs και Cyclin-Dependent Kinases, CDKs), σηματοδοτικά μονοπάτια (mTOR), ενεργοποιητές του p53, αναστολείς των μικροσωληνίσκων, κ.α. (Onnis et al., 2009). Ο αναστολέας της τοποισομεράσης I τοποτεκάνη που χρησιμοποιείται ήδη ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο των ωοθηκών βρέθηκε ότι αναστέλλει τη μετάφραση του HIF-1α (Rapisarda et al., 2004). Επειδή όμως έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής κατασκευάστηκε ο φαρμακευτικός παράγοντας δεύτερης γενιάς EZN-2208 ο οποίος βρίσκεται σε μελέτη φάσης 1. Με άγνωστο μηχανισμό βρέθηκε ότι αναστέλλει τη μετάφραση του HIF-1α και το γνωστό αντιαρρυθμικό φάρμακο διγοξίνη (Sapra et al., 2008). Ακόμη, σε κλινική μελέτη φάσης 1 βρίσκεται και ο αναστολέας του p53, PX-478 (Welsh et al., 2004). Επίσης, οι αναστολείς του mTOR, temsirolimus και everolimus, φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματικοί όσον αφορά στην χημειοθεραπεία του νεφρικού καρκίνου και βρίσκονται σε κλινική μελέτη φάσης 3 (Majumder et al., 2004).

Όσον αφορά στην αποδόμηση από το πρωτεάσωμα, βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές οι πρώτοι αναστολείς της Hsp90, AAG (Alpha1-Acid Glycoprotein) και DMAG (Dimethylaminoethylamino Demethoxy-Geldanamycin) (Neckers et al., 2006).

Οι ανθρακυκλίνες έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν τη δράση του HIF-1 με διάφορους μηχανισμούς εκ των οποίων ο ένας είναι η αναστολή της πρόσδεσής του στο DNA. Η doxorubicin και η daunorubicin αναστέλλουν την πρόδεσή του στις HRE περιοχές των γονιδίων-στόχων του (Lee et al., 2009).

Τέλος, ο φαρμακευτικός παράγοντας YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl indazole] βρέθηκε ότι αναστέλλει τη νεοαγγειογένεση που επάγεται μέσω του HIF-1α (Yeo et al., 2003).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης (από την p44/42 MAPK) μορφής του HIF-1α με πρωτεΐνες του πυρήνα. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η κατασκευή μικρότερου τμήματος του HIF-1-α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641→Glu, του HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E. Η χρήση του τμήματος αυτού έγινε σε συνδυασμό με το αντίστοιχο τμήμα αγρίου τύπου (Wild Type, wt) και το τμήμα που φέρει τη μετάλλαξη Ser641→A/Ser643→A (SA), η οποία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση, σε δοκιμές συγκατακρήμνισης με εκχύλισμα κυττάρων HeLa (pull down assays).

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1. 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 αμινοξέων που είναι σπάνια στα βακτήρια (αργινίνη, ισολευκίνη και λευκίνη) μέσω του RIL πλασμιδίου.

##### 3.1.2. Κυτταρικές σειρές

Για την παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων HeLa, τα οποία είναι ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) το οποίο περιέχει 10% ορό (Fetal Calf Serum, FCS).

##### 3.1.3. Χημικά αντιδραστήρια

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

Τα ακτινογραφικά φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν για τη χημειοφωταύγεια και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των ακτινογραφικών φιλμ είναι αντίστοιχα: X-Ray developer και X-Ray fixer είναι της εταιρίας Kodak.



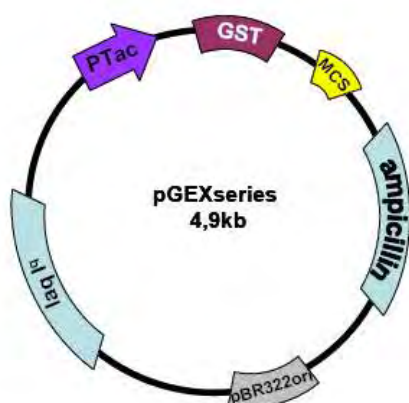
### 3.1.4 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Anti-GST αντίσωμα από ορό κασίκας της εταιρίας Amersham Biosciences, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα.
2. Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα από ορό κουνελιού (Lyberopoulou et al., 2006) σε αραιώση 1:3000.
3. Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα έναντι της IgG από κασίκα της εταιρίας Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

### 3.1.5. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)

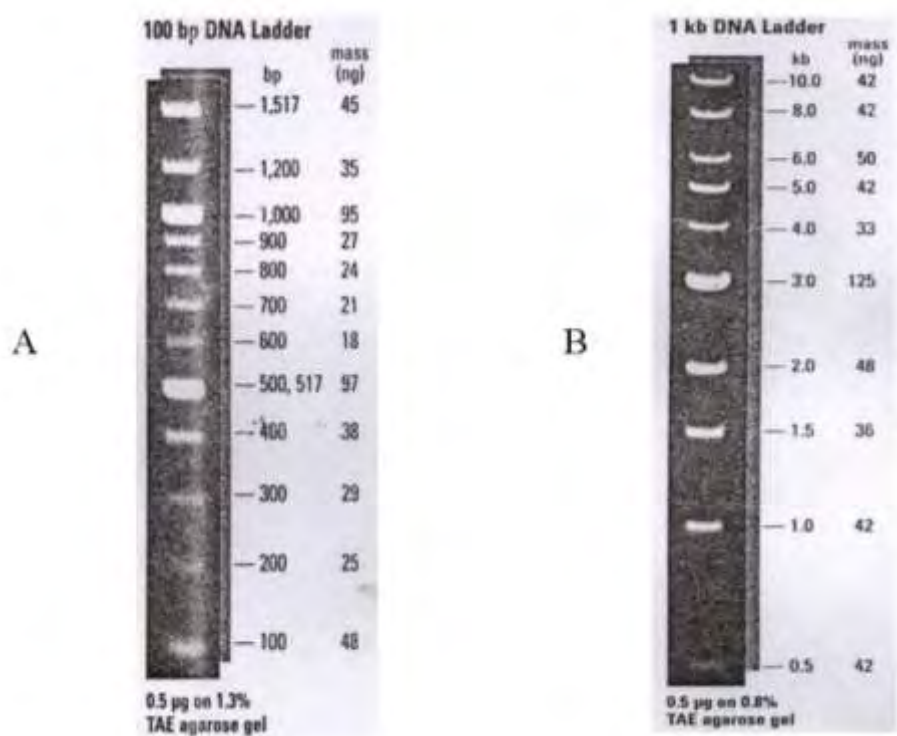
Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του τμήματος του HIF-1α (S641→E) 348-826 στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, 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.



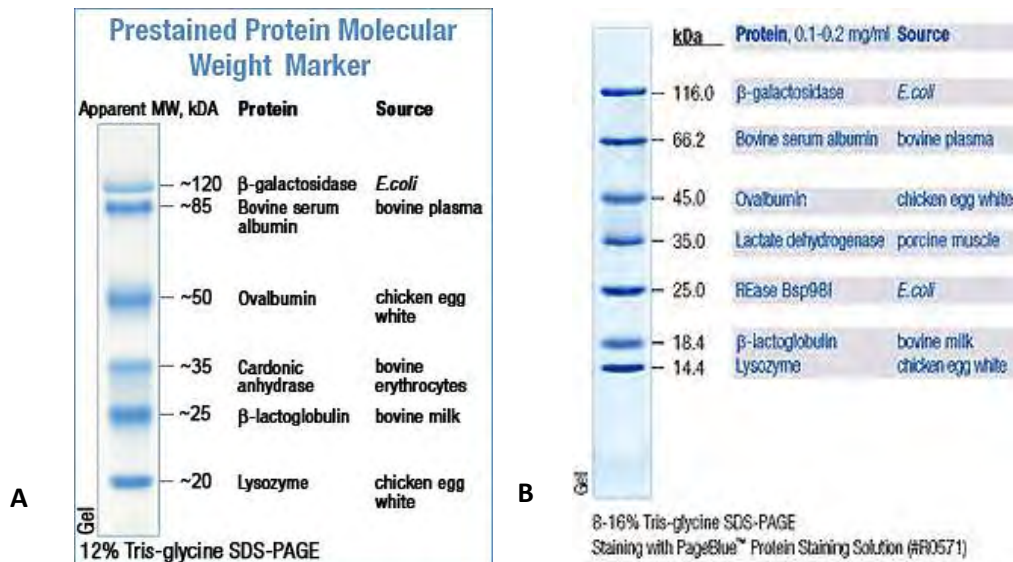
**Εικόνα 10.** Απεικονίζεται ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1. Φαίνονται σχηματικά ο υποκινητής του πλασμιδίου, η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*ori*), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, το γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου *lacI*, η περιοχή κωδικοποίησης της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

### 3.1.6. Μάρτυρες μοριακών βαρών

Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων του DNA ήταν της εταιρίας New England Biolabs ενώ οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεγέθους των πρωτεϊνών ήταν της εταιρίας Fermentas και παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 11. Μάρτυρες μοριακών βαρών 100bp (A) και 1kb (B) της New England Biolabs



**Εικόνα 12.** Μάρτυρες πρωτεϊνικών μοριακών βαρών της Fermentas. A) Prestained B) Unstained.

### 3.2. Μέθοδοι

#### 3.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) δίνει τη δυνατότητα της ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA από μικρές ποσότητες ενός DNA εκμαγείου με χρήση θερμοάντοχων πολυμερασών, κατάλληλων εκκινητών και δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Η μέθοδος περιλαμβάνει την επανάληψη κύκλων (συνήθως 30) συνθηκών αποδιάταξης του DNA εκμαγείου (91-94 °C για 30 δευτερόλεπτα-5λεπτά), υβριδοποίησης του με τους εκκινητές (40°-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα) και επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας (70 °C, χρόνος ανάλογος του μήκους του τμήματος που ενισχύεται).

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε ενίσχυση του τμήματος που κωδικοποιεί το τμήμα 348-826 της μορφής του HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (S641→E) με χρήση του πλασμιδίου GFP-HIF-1α S→E ως εκμαγείου.

Η αλληλουχία του πρόσθιου εκκινητή είναι η εξής:

H348F: 5'-TTTTTGGATCCATGCACGACTTGATTTTCTCCCTTC-3'

Η αλληλουχία του ανάστροφου εκκινητή είναι οι εξής:

HIF-C-B: 5'- TTT TTGGATCCT**C**AGTTAACTTGATCCAAA GC – 3'

Με υπογράμμιση έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *BamHI* (GGATCC), ενώ με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων λήξης της μετάφρασης (TCA).

Χρησιμοποιήθηκε η Vent πολυμεράση λόγω της μεγαλύτερης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στις ίδιες συνθήκες από την Taq πολυμεράση.

Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

Δείγμα	Control (μl)	HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E (μl)
GFP-HIF SE (template)	-	1
Buffer Vent (10x)	5	5
dNTPs 2mM each	5	5
Vent 20u/μl	1	1
H348F	0,5	0,5
HIF-C-B	0,5	0,5
dd H <sub>2</sub> O	38	37
Τελικός όγκος	50	50

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 30 sec → 95°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec → 52°C στάδιο υβριδοποίησης
- 2 min → 72° στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min → 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min → 72°C

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5μl της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ακολούθησε κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση του DNA σε 30μl ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών με τήξη της αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το μέγεθος και η διαμόρφωση των τμημάτων του DNA, η συγκέντρωση της αγαρόζης, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04 M Tris-οξικό, 0.001 M EDTA pH 8.0), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτική.

### 3.2.3. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος για την αντίδραση σύνδεσης

Το κομμάτι του HIF-1α που ενισχύθηκε με την PCR καθώς και το πλασμίδιο pGEX-4T1 όπου πρόκειται να εισαχθούν υφίστανται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα για την αντίδραση σύνδεσης.

Το μείγμα της πέψης του τμήματος του HIF-1α περιείχε:

- 20µl DNA HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E

- 5μl Buffer *Bam*HI 10x
- 2μl *Bam*HI 5u/μl
- 23μl H<sub>2</sub>O

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

- 33μl (3,3μg) μg pGEX-4T1
- 5 μl Buffer *Bam*HI 10x
- 2 μl *Bam*HI 5u/μl
- 10μl H<sub>2</sub>O

Ακολούθησε επώαση για 2h στους 37 °C

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 και προσθήκη άλλου 1μl CIP για άλλα 30 min στους 37°C. Τέλος το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75°C για 10 min.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστική πηκτή (1% αγαρόζης σε 1x TAE, 1:20.000 βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml) με πηγαδάκια των 50 και 100μl. Ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα των δειγμάτων στα 90V και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκαν οι ζώνες από την πηκτή με τη βοήθεια λυχνίας UV(364nm). Ακολούθησε ανάκτηση από την πηκτή με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction.

#### 3.2.4. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης με χρήση kit της Qiagen για gel Extraction

- Ζύγισμα των τμημάτων της πηκτής και προσθήκη 3 όγκων buffer QG σε ένα όγκο πηκτής (100 mg~100 μl) και επωάστηκαν για 10 min στους 50°C έτσι ώστε να λιώσει η πηκτή.
- Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης και ανάδευση.
- Μεταφορά δείγματος σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 1 min

- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) προσθήκη 0,5 ml buffer QG και φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 1 min
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 1 min
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 1 min
- Μεταφορά στήλης σε καθαρό σωληνάκι και έκλουση με 30μl ddH<sub>2</sub>O και φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 1 min (αφού πρώτα αφεθεί το ddH<sub>2</sub>O στη στήλη για 1 min) .

### 3.2.5. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης)

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση, το οποίο καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων. Το μείγμα της αντίδρασης σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με το τμήμα HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E ήταν το εξής:

(Πραγματοποιήθηκε και αντίδραση control)

	Ligation HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E (μl)	Control (μl)
pGEX-4T-1	1	1
HIF-1α <sup>348-826</sup> S→E	5	-
T4 ligase Buffer 10x	2	2
T4 DNA ligase	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	11,5	16,5
Τελικός όγκος	20	20

Ακολούθησε O/N επώαση των αντιδράσεων σε θερμοκρασία 16 °C.

### 3.2.6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* TOP 10 και BL21RIL

Σε δεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* Top10 έγινε εισαγωγή του προϊόντος αντίδρασης λιγάσης pGEX4T1-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E ώστε να απομονωθεί σε αρκετές ποσότητες το DNA, ενώ σε δεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21RIL έγινε εισαγωγή του ίδιου καθαρισμένου πλασμιδίου με σκοπό την υπερέκφραση της αμινοξικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Επώαση 200 μl δεκτικών κυττάρων για 30 min στον πάγο με το προς μετασχηματισμό DNA (0.5μl όταν πρόκειται για έτοιμο πλασμίδιο, 10μl για προϊόν αντίδρασης σύνδεσης).
- Θερμικό σοκ στους 42°C για 1 min.
- Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα σε 500μl υγρό LB.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 4500-5000rpm.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου έως ότου περισσέψουν 50μl και επαναδιάλυση ιζήματος σε αυτόν τον όγκο.
- Μεταφορά σε τρυβλία LB με αντιβιοτικά επιλογής (LB-Amp για τα TOP 10, LB-Amp-Chl για τα BL21RIL ) και επώαση στους 37 °C όλη νύχτα.

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

τρυβλία LB-Amp: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin

τρυβλία LB-Amp-Chl: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin, chloramphenicol 34 μg/μl.

### 3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση

- Εμβολιασμός αποικιών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10 με το πλασμίδιο pGEX4T1-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E σε αποστειρωμένα σωληνάκια με 3ml LB-3 μl Amp και επώαση O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά σε σωληνάκι φυγοκέντρου 1,5 ml καλλιέργειας και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 30 δευτερόλεπτα.



- Απόρριψη υπερκειμένου, προσθήκη 100 μl TENS και ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex).
- Προσθήκη 100μl CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 5.2 και ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13500 rpm και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι
- Προσθήκη 300μl 100% αιθανόλη και ψύξη στους -20 °C για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκειμένου και πλύση του ιζήματος με 70% ψυχρής αιθανόλη
- Στέγνωμα του ιζήματος και αιώρηση σε 30μl ddH<sub>2</sub>O

Διάλυμα TENS  
 - 0,1N NaOH  
 - 0,5 % SDS σε TE

Διάλυμα TE  
 - 10 mM Tris pH 7,5  
 - 1 mM EDTA

Για τον έλεγχο του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε ακολουθεί πέψη με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

### 3.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση του Qiagen Midi Kit

- Ολονύκτια επώαση καλλιεργείων των 100 ml E.coli Top10 (μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια pGEX4T1-HIF-1α S→E, pGEX4T1-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E και pGEX4T1-MTD S→E) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση
- Μοίρασμα της κάθε καλλιέργειας σε δύο πλαστικά σωληνάκια (50 ml σε κάθε σωληνάκι) και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 20 min στους 4 °C
- Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση βακτηριακού ιζήματος σε 4ml buffer P1 (Resuspension Buffer + RNase) από το kit της Qiagen με ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) και ένωση των διαλυμάτων.

- Προσθήκη 4ml Buffer P<sub>2</sub> (Lysis Buffer) από το kit της Qiagen και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου μετά από καλή ανάμιξη
- Προσθήκη 4ml παγωμένου Buffer P<sub>3</sub> (Neutralization Buffer) από το kit της Qiagen, καλή ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min.
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 45 min στους 4 °C
- Εξισορρόπηση στήλης Qiagen 100 με 4 ml Buffer QBT (χρησιμοποιείται μια στήλη για κάθε πλασμίδιο)
- Μεταφορά υπερκλειμένου στη στήλη (αφού περάσει από γάζα)
- Πλύσιμο στήλης με 2x10ml buffer QC
- Έκλουση DNA με 5ml Buffer QF (συλλογή σε 6 σωληνάκια φυγοκέντρου του 1,5μl)
- Κατακρήμνιση DNA με 3,5ml ισοπροπανόλης (0.6ml σε κάθε σωληνάκι) με μίξη και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 30 min στους 4 °C
- Ξέπλυμα με 70% αιθανόλη (200μl σε κάθε σωληνάκι) και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 3min στους 4 °C
- Στέγνωμα ιζήματος και επαναδιάλυση σε 100 μl νερό (σε κάθε σωληνάκι)

### 3.2.9. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε πέψη για έλεγχο του πλασμιδίου pGEX4T1-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι BamHI, EcoNI, PstI.

Το μείγμα κάθε πέψης περιείχε:

- Πλασμιδιακό DNA: 1μg DNA
- Buffer 10x (κατάλληλο για το ένζυμο που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση): 2 μl
- Ένζυμο περιορισμού 0,5 μl
- Τελικός όγκος αντίδρασης: 20μl σε νερό.

Η επώαση των δειγμάτων έγινε στους 37°C για 1 ώρα.

Ο έλεγχος των πέψεων έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αγαρόζη.

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.

### 3.2.10. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών GST-HIF-1α-348-826 wt, GST-HIF-1α-348-826 S→A και GST-HIF-1α-348-826 S→E σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με IPTG

Το γονίδιο της πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο 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 του κλωνοποιημένου γονιδίου και της έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής:

- Επιλογή μιας αποικίας από τρυβλίο που περιείχε BL21RIL με το μετασχηματισμένο πλασμίδιο και εμβολιασμός σε 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB που περιείχε τα αντιβιοτικά 50 μl αμπικιλίνη και 50 μl χλωραμφενικόλη
- Επώαση της καλλιέργειας υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C.
- Εμβολιασμός 500ml LB (με αντιβιοτικά) με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια και επώαση υπό ανακίνηση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε στο 0.4 (μέτρηση στα 600 nM).
- Προσθήκη 1 mM IPTG και η επώαση στους 25° C. Κρατάω δείγμα 1 ml από την κάθε καλλιέργεια πριν (-IPTG) και μετά (+IPTG) την προσθήκη IPTG
- Μετά από 2h φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 6000rpm και συλλογή του βακτηριακού ιζήματος.

- Ξέπλυμα των κυττάρων με H<sub>2</sub>O και αποθήκευση τους στους -20<sup>0</sup>C.

### 3.2.11. Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος

Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1/20 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας σε κατάλληλο διάλυμα λύσης. Για την πλήρη λύση των κυττάρων γίνονται υπέρηχοι στο διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στις 12000 rpm για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης πραγματοποιείται χρωματογραφία αγκιστείας όπου χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στους 4<sup>0</sup>C.

- 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 (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων)
- Έγινε φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στις 12000rpm για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα και κρατάω δείγμα (1ml) από το κάθε υπερκείμενο (sup) και το κάθε ίζημα (pel). Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιείχε 20 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 5% γλυκερόλη, 0,1 % Tween 20, και 5 mM DTT.

### 3.2.12. Καθαρισμός πρωτεΐνης με επίτοπο GST

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 (GSH). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη.

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (συνήθως από το *Schistosoma japonicum*) πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χιμαιρικών 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 τη χιμαιρική GST-πρωτεΐνη επωάστηκε για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (500 με 700 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2 lt καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλες στήλες των 10 ml όπου κατακρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια, αφού πρώτα φυλάχθηκε δείγμα 1ml (flow through, ft). Ακολούθησαν 3 ή 4 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος λύσης. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με επώαση των σφαιριδίων με 300 μl διαλύματος 10mM γλουταθειόνης, 25mM Tris pH 8.5 για 5 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του κλάσματος.

### 3.2.13. 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 διαπίδωσης (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδωσης) 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 12000rpm και στους 4°C για την απομάκρυνση ιζήματος που πιθανόν δημιουργηθήκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

#### *3.2.14. 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.

#### *3.2.15. 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 σε 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 Hoeffeur 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 πηκτή επιστοίβαξης (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 πηκτή επιστοίβαξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή 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:

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.

### 3.2.16. Μεταφορά υγρής φάσης και ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Για επιβεβαίωση του γεγονότος ότι μια πρωτεΐνη είναι αυτή που αναμένεται και όχι ένα μη ειδικό προϊόν, έγινε ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στην πρωτεΐνη GST και τον HIF μετά τον καθαρισμό των

πρωτεϊνών. Επίσης έγινε ανοσοαποτύπωση με τα ίδια αντισώματα και μετά τη δοκιμασία αλληλεπίδρασης με το κυτταρικό εκχύλισμα των HeLa για τον αποκλεισμό της ύπαρξης τμημάτων της GST ή του HIF στις πρωτεϊνικές ζώνες που θα έπρεπε να αντιστοιχούν στο εκχύλισμα.

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτή 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 πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν με τη σειρά 3 χαρτιά Wattman, η νιτροκυτταρίνη, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου και τέλος άλλα 3 χαρτιά Wattman (όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική συσκευή τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά με τη νιτροκυτταρίνη να είναι προς τον θετικό πόλο. Η μεταφορά έγινε στα 400 mA 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 Ronceau S 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 Ronceau. 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 20 (15 min, 5 min, 5 min). Έπειτα έγινε επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-Tween 20 με 3% γάλα σε σκόνη για O/N υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min). Ακολούθως έγινε επώαση με το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα ενάντια στο πρώτο σε κατάλληλη αραίωση, με 3% 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 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάστηκε για ένα λεπτό με διάλυμα που περιείχε 10 ml λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), 10



μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Στη συνέχεια καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

**Διάλυμα μεταφοράς:** 48 mM Tris, 39 mM 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:** 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4

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

### 3.2.17. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250

Για να βαφούν οι πρωτεϊνικές ζώνες, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη, όπου και ανακινείται για διάστημα 1 ώρας. Στο διάλυμα αυτό γίνεται συγχρόνως και στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση σε υδατικό διάλυμα 10% οξικό οξύ, 10% μεθανόλη.

### 3.2.18. Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>)

Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με Coomassie Brilliant Blue R-250 για τη μεγαλύτερη ευαισθησία της στην ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Οι ποσότητες των πρωτεϊνών που μπορεί να ανιχνεύσει

είναι μέχρι 1 ng έχοντας περίπου 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Εμβάπτιση τη πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε διάλυμα που αποτελείται από 50% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ για 30 λεπτά προκειμένου να στερεωθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών.
- Ανακίνηση της πηκτής σε απιονισμένο νερό για τουλάχιστον 2 ώρες, με αρκετές αλλαγές του νερού κατά τη διάρκεια της πλύσης.
- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα 5 μg/ml DTT για 30 λεπτά
- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  (0.1% w/v) για 30 λεπτά υπό συνεχή ανακίνηση.
- Δύο γρήγορες πλύσεις της πηκτής με απιονισμένο νερό, και εμβάπτιση στο διάλυμα εμφάνισης των πρωτεϊνικών ζωνών (3% w/v  $\text{NaCO}_3$ , 0.0185% HCHO).
- Προσθήκη κιτρικού οξέως για τερματισμό της αντίδρασης όταν οι πρωτεϊνικές ζώνες στην πηκτή αποκτήσουν την επιθυμητή ένταση.
- Πλύση της πηκτής και φύλαξη της σε απιονισμένο νερό.

### 3.2.19. Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων HeLa

Για την παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος:

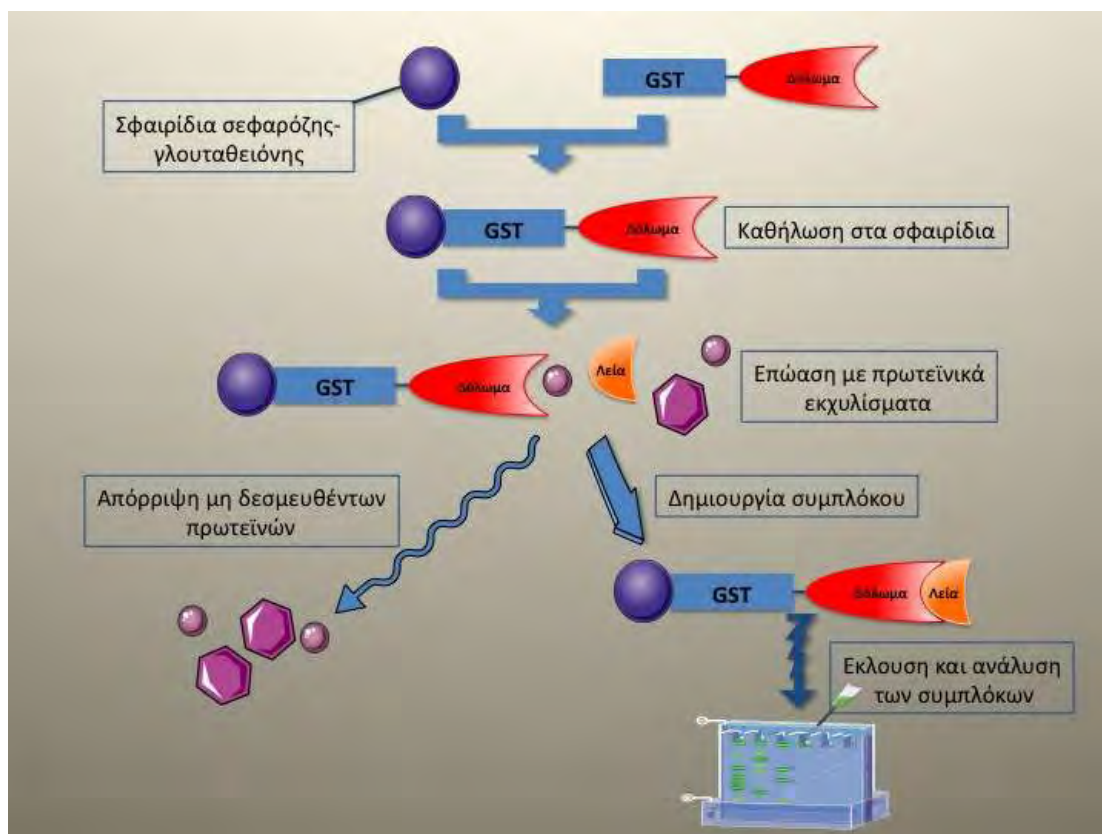
- Πλύση 6 τρυβλίων με κύτταρα HeLa με PBS και στη συνέχεια απομάκρυνση του PBS
- Προσθήκη σε κάθε τρυβλίο 200μL κατάλληλου διαλύματος λύσης .
- Επώαση στον πάγο για 15min
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm
- Συλλογή υπερκλειμένου

PBS: 8.0 gr/l NaCl, 0.2 gr/l KCl, 1.15 gr/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 gr/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Διάλυμα λύσης: 25mM Tris 7.5, 150mM NaCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$  , 1% Triton, και 0,5 mM DTT

### 3.2.20. Δοκιμή *in vitro* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε στήλες αγκιστείας (*pull down assays*)

Τα πειράματα συγκατακρήμνισης επιτρέπουν τη διερεύνηση της ικανότητας πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η τεχνική στηρίζεται στη δυνατότητα καθήλωσης διαφόρων πρωτεϊνών σύντηξης (π.χ με επιτόπους GST στην συγκεκριμένη περίπτωση) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων στηλών χρωματογραφίας (γλουταθειόνη-σεφαρόζη) με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία. Οι καθηλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία και οι οποίες είτε βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είτε περιέχονται σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ο έλεγχος της σύνδεσης επιτυγχάνεται με ανάλυση των καθηλωμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με SDS-PAGE και χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών ή με ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση δοκιμής *in vitro* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης

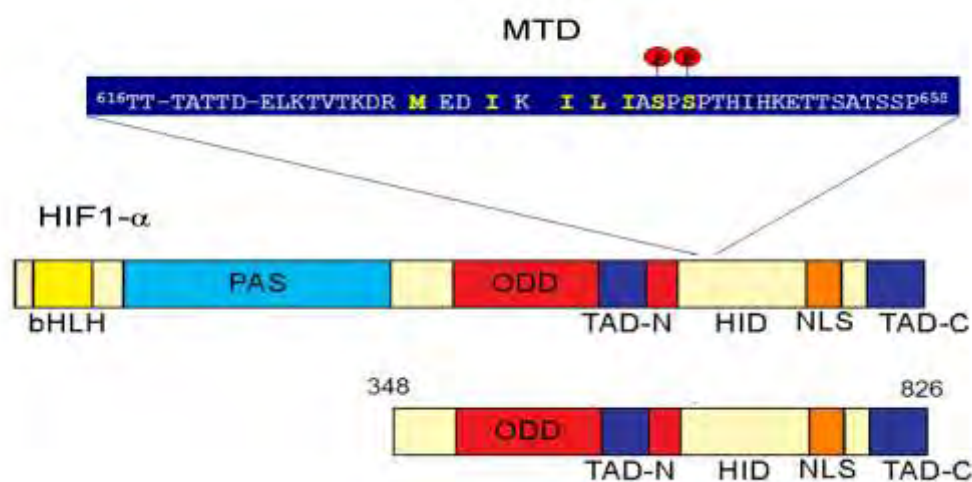
Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Ξέπλυμα των σφαιριδίων γλουταθειόνης (50μl) με το διάλυμα λύσης για πρωτεΐνες με επίτοπο GST(Υλικά και μέθοδοι 4.12) (3x10min).
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και επώαση υπό ανακίνηση για 1h στους 4°C.
- Ξέπλυμα για 3x10min με κατάλληλο διάλυμα λύσης (25mM Tris 7.5, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton, 1 mM PMSF και 0,5 mM DTT).
- Προσθήκη 200 μl (1,6mg) κυτταρικού εκχυλίσματος HeLa και 400μL διαλύματος λύσης
- Εκχύλιση πρωτεϊνών με 60 μl διαλύματος GSH (10 mM GSH, 25 mM Tris pH 8,5)

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Κλωνοποίηση τμήματος του HIF-1α που φέρει την φωσφομιμητική μετάλλαξη (S641→E) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1 (HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E)

Σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα (Mylonis et al.2006, Mylonis et al. 2008) η αγρίου τύπου μορφή των τμημάτων MTD (MAPK Target Domain, HIF-1α<sup>616-658</sup>) και HIF-1α<sup>348-826</sup> παραλαμβάνεται σε ικανοποιητική ποσότητα και σε αρκετά καθαρή μορφή όταν εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα E. Coli BL21RIL σε αντίθεση με τον πλήρους μήκους HIF-1α. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου του HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (Ser641→Glu) που αντιστοιχεί στο τμήμα αυτό (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14.** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του HIF-1α που έγινε προσπάθεια να κατασκευαστούν σε προηγούμενες εργασίες. Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκε το τμήμα 348-826.

Απεικονίζεται ο πλήρους μήκους HIF-1α (826 aa) με σημασμένες τις διάφορες δομικές περιοχές του και το τμήμα 348-826. Απεικονίζεται επίσης η αμιοξική αλληλουχία του τμήματος MTD (616-658) ενώ επισημαίνονται ακόμη οι θέσεις φωσφορυλίωσης (Ser641-Ser643) και το σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα NES

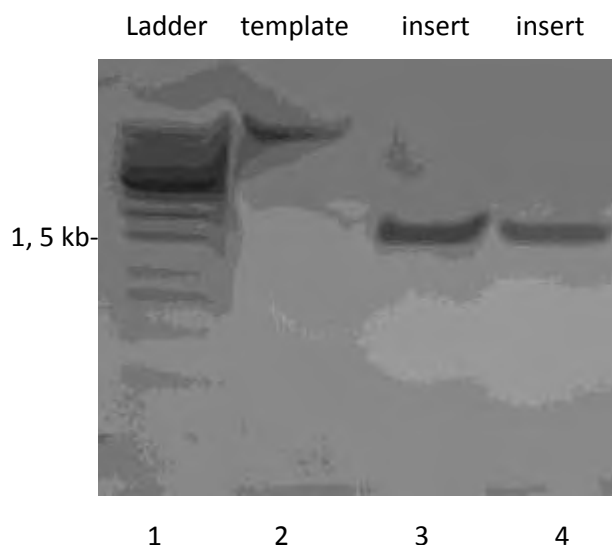
(αρίθμηση σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία).

#### 4.2. Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E

Για την κλωνοποίηση του μικρότερου τμήματος του HIF-1α S→E (348-826) είχε ήδη γίνει παρασκευή μεσαίας κλίμακας του πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E ώστε να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την PCR.

#### 4.3 Ενίσχυση του τμήματος HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E με PCR

Με χρήση του πλασμιδίου pGEX4T1-HIF-1α S→E ως εκμαγείου έγινε ενίσχυση του τμήματος HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E με PCR.



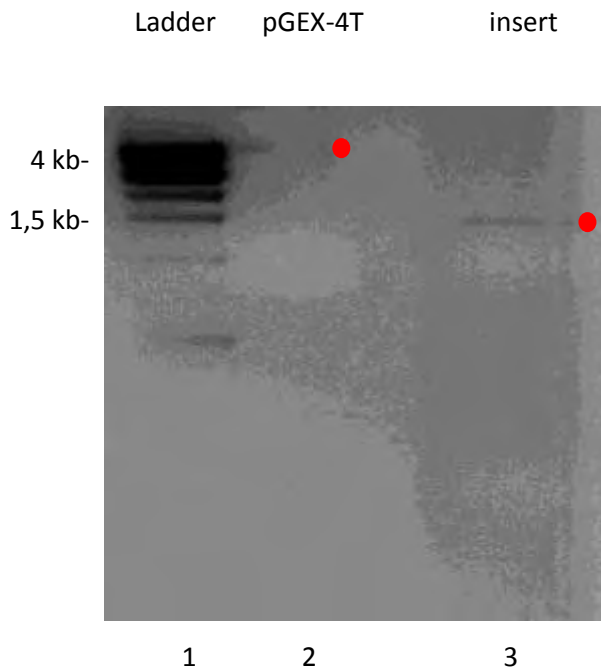
**Εικόνα 15.** Ενίσχυση του τμήματος του HIF-1α 348-826 με PCR.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, διαδρομή 2: template, διαδρομή 3 και 4: HIF-1α<sup>348-826</sup>S→E. Το τμήμα 348-826 δίνει προϊόν στα 1500bp.

Το μέγεθος των τμημάτων είναι το αναμενόμενο στα 1500bp για το HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E (Εικόνα 15, διαδρομές 3 και 4).

#### 4.4 Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX-4T-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E και έλεγχος με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

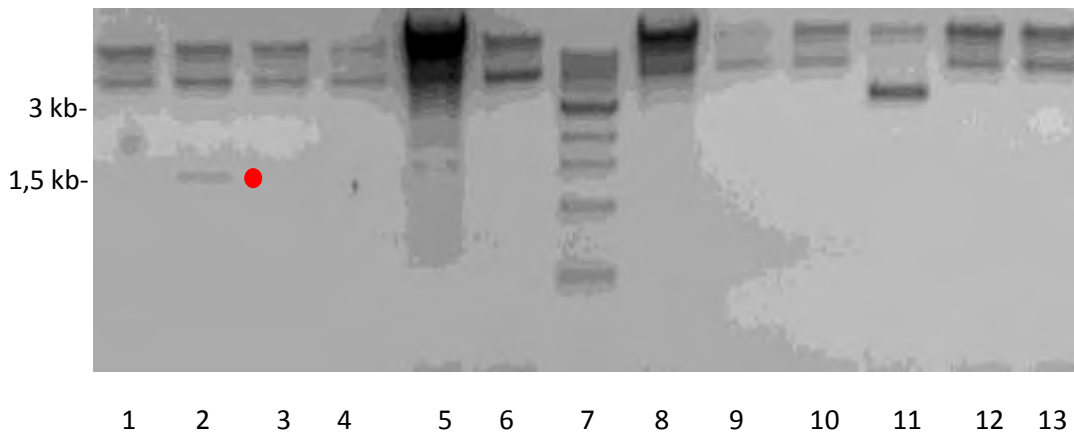
Το προϊόν HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E καθώς και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 υπέστησαν πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης. Ηλεκτροφορήθηκε δείγμα από την αντίδραση και δείγμα control. (Εικόνα 16)



**Εικόνα 16.** Κλωνοποίηση του HIF-1α 348-826 S→E με τον PGEX. Διαδρομή 1: ladder, διαδρομή 2: pGEX-4T, διαδρομή 3: insert (HIF-1α 348-826)

Με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli TOP10. Από τα τρυβλία επιλέχθηκαν τυχαία κάποιες αποικίες για ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Ακολούθησε πέψη του DNA των αποικιών αυτών με BamHI για έλεγχο της εισαγωγής των ενθεμάτων και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Η εισαγωγή του τμήματος του HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα έγινε στη θέση BamHI άρα η πέψη των νέων πλασμιδιακών κατασκευών με το ένζυμο αυτό τη διαχωρίζει στο φορέα και το ένθεμα ενώ πέψη μόνο του πλασμιδιακού φορέα τον καθιστά γραμμικό. Έτσι στην ηλεκτροφόρηση μπορούμε να ξεχωρίσουμε σε ποιες αποικίες έχει προσληφθεί το ένθεμα από το φορέα καθώς εμφανίζουν μια ζώνη επιπλέον που αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος (στα 1500bp για το HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E) σε σχέση με τις αποικίες στις οποίες το ένθεμα δεν έχει προσληφθεί (Εικόνα 17, διαδρομή 2).



**Εικόνα 17.** Κλωνοποίηση του  $HIF-1\alpha^{348-826} S \rightarrow E$  σε  $pGEX-4T1$  και έλεγχος της εισαγωγής των ενθέσεων με πέψη με  $BamHI$ . Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

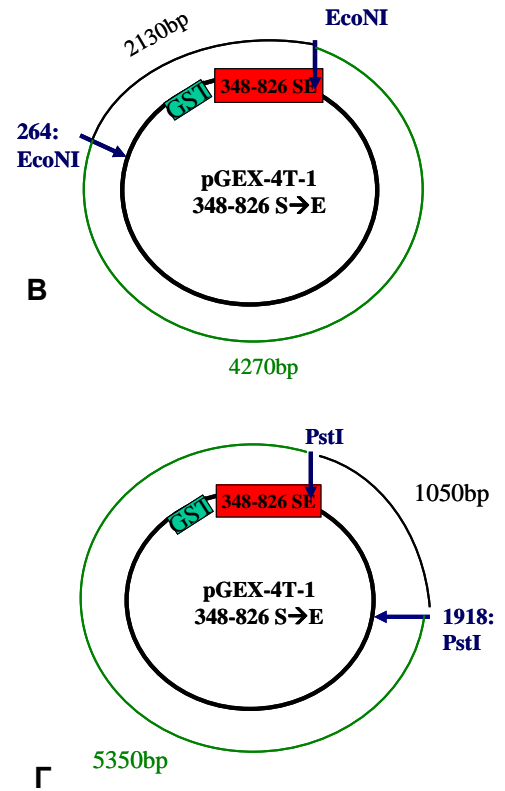
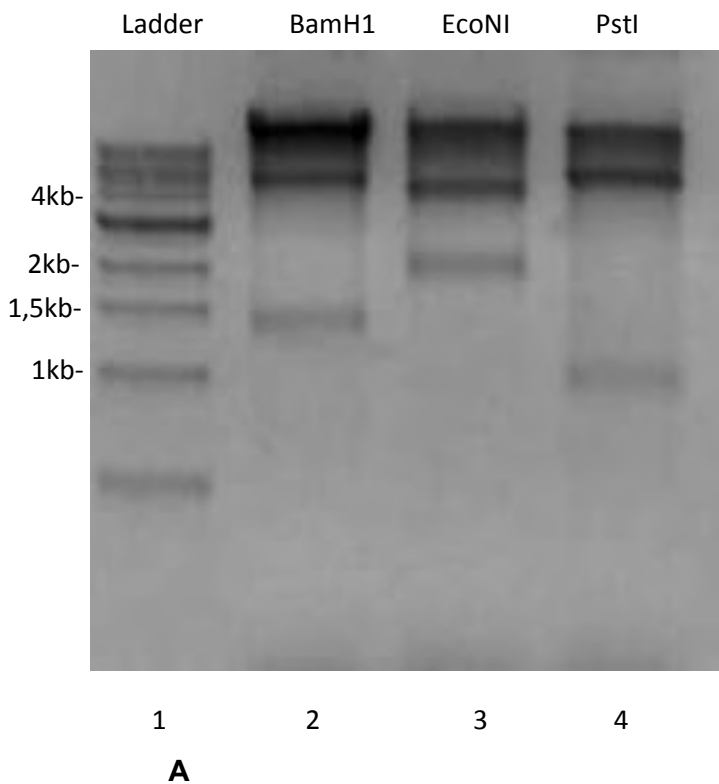
Διαδρομές 1-6 και 8-13: DNA αποικιών 1-6 και 8-13 μετά από πέψη με  $BamHI$ , διαδρομή 7: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb  
Μόνο η αποικία 2 έχει προσλάβει το ένθεμα

Παρατηρούμε πως το ένθεμα  $HIF-1\alpha^{348-826} S \rightarrow E$  έχει προσληφθεί μόνο στην αποικία 2 (Εικόνα 17).

Η ύπαρξη του ενθέματος όμως δεν εξασφαλίζει την έκφραση των σωστών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, λοιπόν, θα πρέπει να ελεγχθεί και ο προσανατολισμός του. Αυτό έγινε με πέψη του DNA της αποικίας αυτής με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού (Εικόνα 18).

Για τον έλεγχο του DNA της αποικίας 2 για το ένθεμα  $HIF-1\alpha^{348-826} S \rightarrow E$  έγιναν δύο πέψεις μία με την ενδονουκλεάση περιορισμού  $EcoNI$  και μία με την  $PstI$ . Η  $EcoNI$  πέπτει το ένθεμα 40 νουκλεοτίδια περίπου από το 3' άκρο του. Έτσι πέψη με  $EcoNI$  πλασμιδίων με το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό δίνει τμήματα ~2130bp και ~4270bp ενώ πέψη πλασμιδίων με το ένθεμα με λάθος προσανατολισμό τμήματα ~710bp και ~5690bp. (Εικόνα 18B) Η  $PstI$  πέπτει τον πλασμιδιακό φορέα στη θέση 1918 και το ένθεμα περίπου 60 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο του. Άρα η πέψη με  $PstI$  πλασμιδίων με το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό δίνει τμήματα ~1050bp και ~5350 ενώ πέψη πλασμιδίων με το ένθεμα με λάθος προσανατολισμό τμήματα ~2450bp και ~3950bp (Εικόνα 18Γ)





**Εικόνα 18. Α)** Έλεγχος του προσανατολισμού της ένθεσης του  $HIF-1\alpha^{348-826}$  S→E στον pGEX-4T με πέψεις με EcoNI και PstI. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

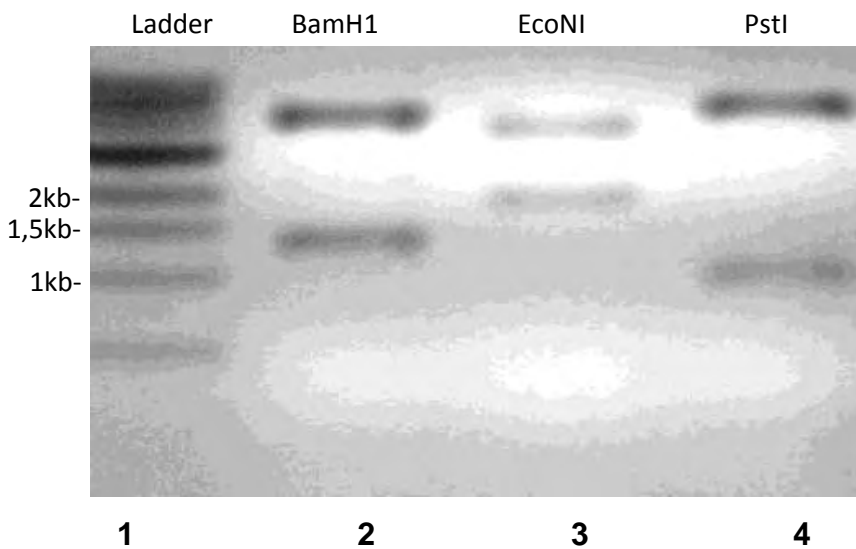
Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, διαδρομή 2: DNA αποικίας 2-BamHI, διαδρομή 3: DNA αποικίας 2-EcoNI, διαδρομή 4: DNA αποικίας 2-PstI  
Ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι σωστός

**Β,Γ)** Σχηματική απεικόνιση της νέας πλασμιδιακής κατασκευής pGEX-4T-HIF-1 $\alpha^{348-826}$  S→E. Σημειώνονται οι θέσεις πέψης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoNI (B) και PstI (C) και το μέγεθος των τμημάτων που προκύπτει μετά τις δύο πέψεις.

Ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι σωστός.

#### 4.5 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA $HIF-1\alpha^{348-826}$ S→E

Ακολούθως επιλέχθηκε η αποικία που είχε το ένθεμα  $HIF-1\alpha^{348-826}$  S→E με το σωστό προσανατολισμό για παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση kit της Qiagen. Στη συνέχεια, έγινε νέος έλεγχος των πλασμιδιακών κατασκευών με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο έλεγχος αυτός έδωσε και πάλι προϊόντα με το προ-υπολογισμένο μοριακό βάρος (Εικόνα 19).

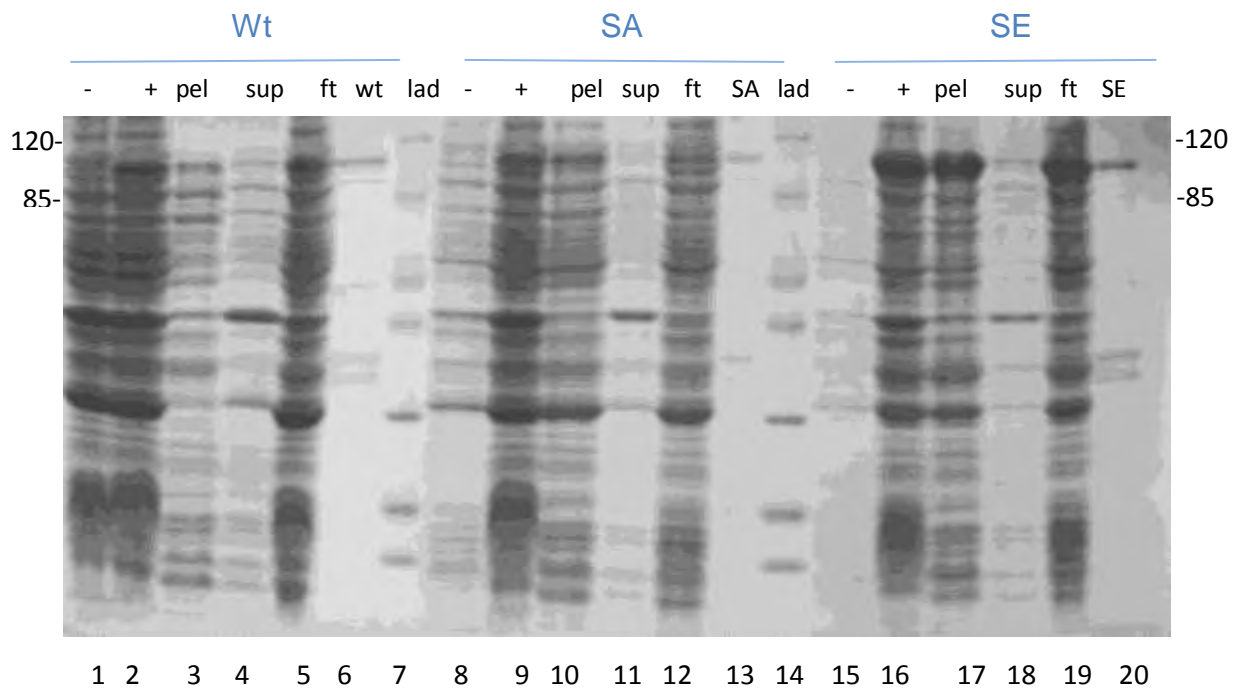


**Εικόνα 19.** Πέψη του  $pGEX4T1-HIF-1\alpha^{348-826} S \rightarrow E$  με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, διαδρομή 2 : πέψη με *BamH1*, *EcoNI*, διαδρομή 3: πέψη με *PstI*.

#### **4.6 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-HIF-1 $\alpha^{348-826}$ wt, GST-HIF-1 $\alpha^{348-826}$ S→A και GST-HIF-1 $\alpha^{348-826}$ S→E σε BL21RIL και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης**

Στη συνέχεια ακολούθησε εισαγωγή των πλασμιδιακών κατασκευών  $pGEX-4T-HIF-1\alpha^{348-826}$  wt,  $pGEX-4T-HIF-1\alpha^{348-826}$  S→A και  $pGEX-4T-HIF-1\alpha^{348-826}$  S→E σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με μετασχηματισμό με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε καλλιέργειες αυτών των κυττάρων. Στα πλασμίδια που λάβαμε τα ενθέματα είχαν εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα  $pGEX-4T-1$  αμέσως μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Έτσι κατά την έκφραση δημιουργούνται GST-χιμαιρικές πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να απομονωθούν εύκολα.

Συνοπτικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε λογαριθμική φάση ( $OD_{600nm} \sim 0.4$ ) και τότε προστέθηκε στις καλλιέργειες ο επαγωγέας IPTG για χρονικό διάστημα 4 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 4 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 20.** Υπερέκφραση των πρωτεϊνών  $GST-HIF-1\alpha^{348-826}$  wt,  $GST-HIF-1\alpha^{348-826} S\rightarrow A$  και  $GST-HIF-1\alpha^{348-826} S\rightarrow E$  και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης.

#### Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομές 1-6: wt, διαδρομές 8-12: SA, διαδρομές 15-20: SE

Διαδρομές 1, 8, 15: δείγματα που λήφθηκαν πριν την προσθήκη IPTG

Διαδρομές 2, 9, 16: δείγματα που λήφθηκαν μετά την προσθήκη IPTG

Διαδρομές 3, 10, 17: δείγματα που λήφθηκαν από το ίζημα των λυμένων κυττάρων

Διαδρομές 4, 11, 18: δείγματα που λήφθηκαν από το υπερκείμενο των λυμένων κυττάρων

Διαδρομές 5, 12, 19: δείγματα που λήφθηκαν από το ελεύθερο κλάσμα που διέρχεται από τη στήλη

Διαδρομές 6, 13, 20: wt, SA, SE (1<sup>η</sup> έκλουση)

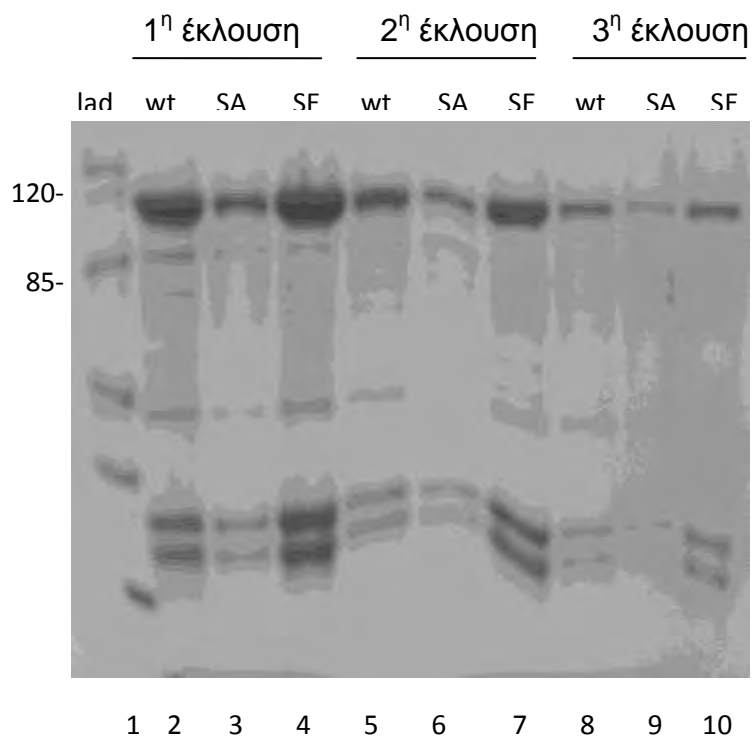
Διαδρομές 7, 14: μάρτυρες μοριακών βαρών

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 υπερκείμενο και το ίζημα μετά τη λύση των κυττάρων (sup, pel), από το αδέσμευτο κλάσμα της στήλης (flow through), και από τις 3 εκλούσεις. Τα δείγματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ώστε να ελεγχθεί αν η υπερέκφραση και ο καθαρισμός ήταν επιτυχείς (Εικόνα 20).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, με την προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια εμφανίζεται έντονα μια ζώνη στα 95 kDa, μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στη  $GST-HIF-1\alpha^{348-826} S\rightarrow E$ , ενώ μετά τον καθαρισμό με στήλη

γλουταθειόνης-σεφαρόζης παρατηρείται απομόνωση της σε σχετικά καθαρή μορφή.

Κατά τον καθαρισμό των τριών τμημάτων (wt, SA, SE) έγιναν από τρεις εκλούσεις για το κάθε δείγμα. (Εικόνα 21)

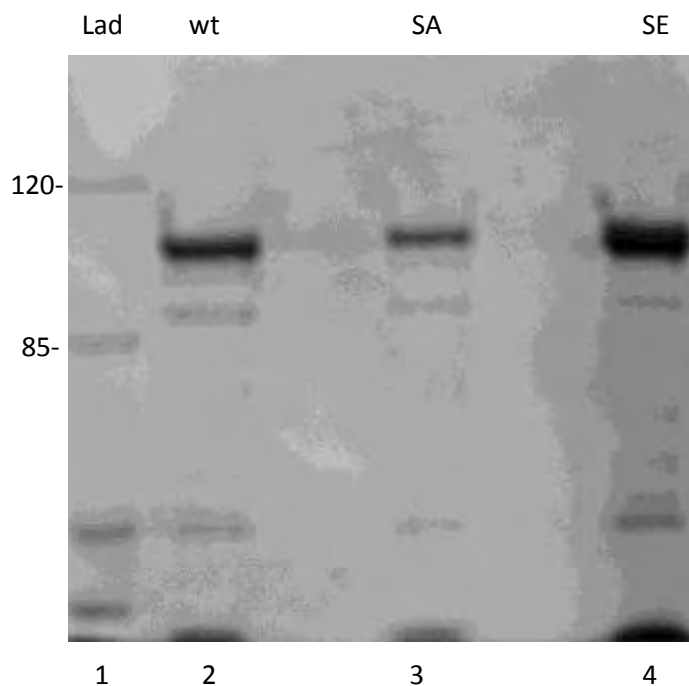


**Εικόνα 21.** Υπερέκφραση και καθαρισμός των  $GST-HIF^{348-826}$  wt,  $GST-HIF^{348-826}$   $S \rightarrow A$  και  $GST-HIF^{348-826}$   $S \rightarrow E$  με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης.

Διαδρομή 1: μάρτυρες μοριακών βαρών

Διαδρομές 2-4: 1<sup>εξ</sup> εκλούσεις των τριών πρωτεϊνών, διαδρομές 5-7: 2<sup>εξ</sup> εκλούσεις, διαδρομές 8-10: 3<sup>εξ</sup> εκλούσεις.

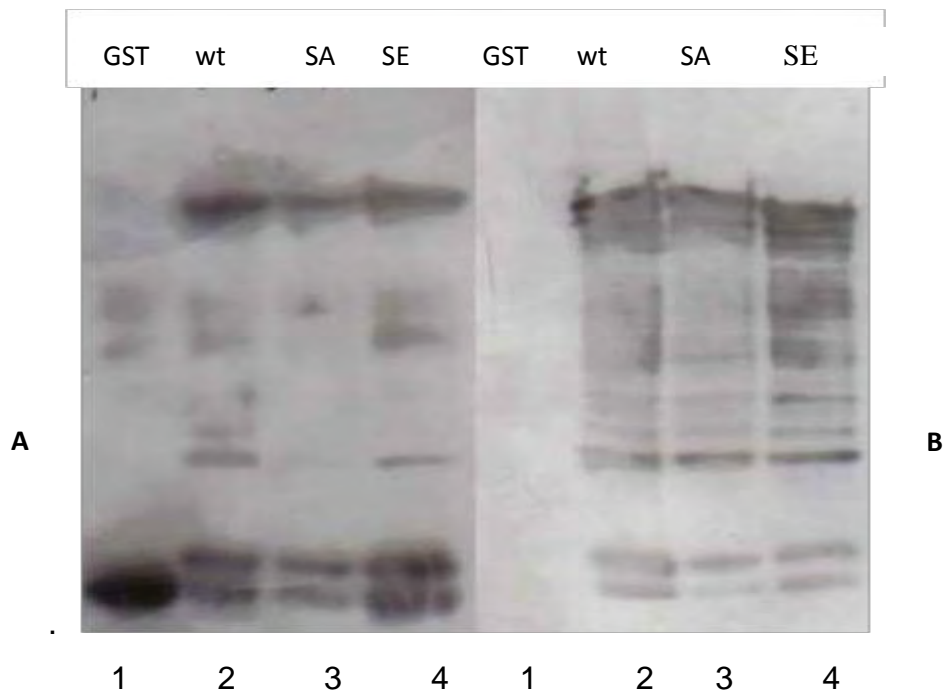
Πραγματοποιήθηκε επιπλέον ένα ακόμα βήμα, η ένωση των 3 εκλουσμάτων από κάθε πρωτεΐνη σε ένα δείγμα και η διαπίδυση σε ειδική μεμβράνη με πόρους που συγκρατούν την πρωτεΐνη μας αλλά αποκλείουν μικρού μοριακού βάρους ανεπιθύμητες ενώσεις όπως η γλουταθειόνη και άλατα. Και από αυτό το βήμα έγινε λήψη δείγματος και ηλεκτροφόρηση. (Εικόνα 22)



**Εικόνα 22.** Καθαρισμός των  $GST-HIF^{348-826}$  wt,  $GST-HIF^{348-826} S \rightarrow A$  και  $GST-HIF^{348-826} S \rightarrow E$  με διαπίδυση.

Μετά το τέλος της υπερέκφρασης και του καθαρισμού πήραμε τις πρωτεΐνες  $GST-HIF^{348-826}$  wt,  $GST-HIF^{348-826} S \rightarrow A$  και  $GST-HIF^{348-826} S \rightarrow E$  σε ικανοποιητική ποσότητα και αρκετά καθαρή μορφή (Εικόνα 22).

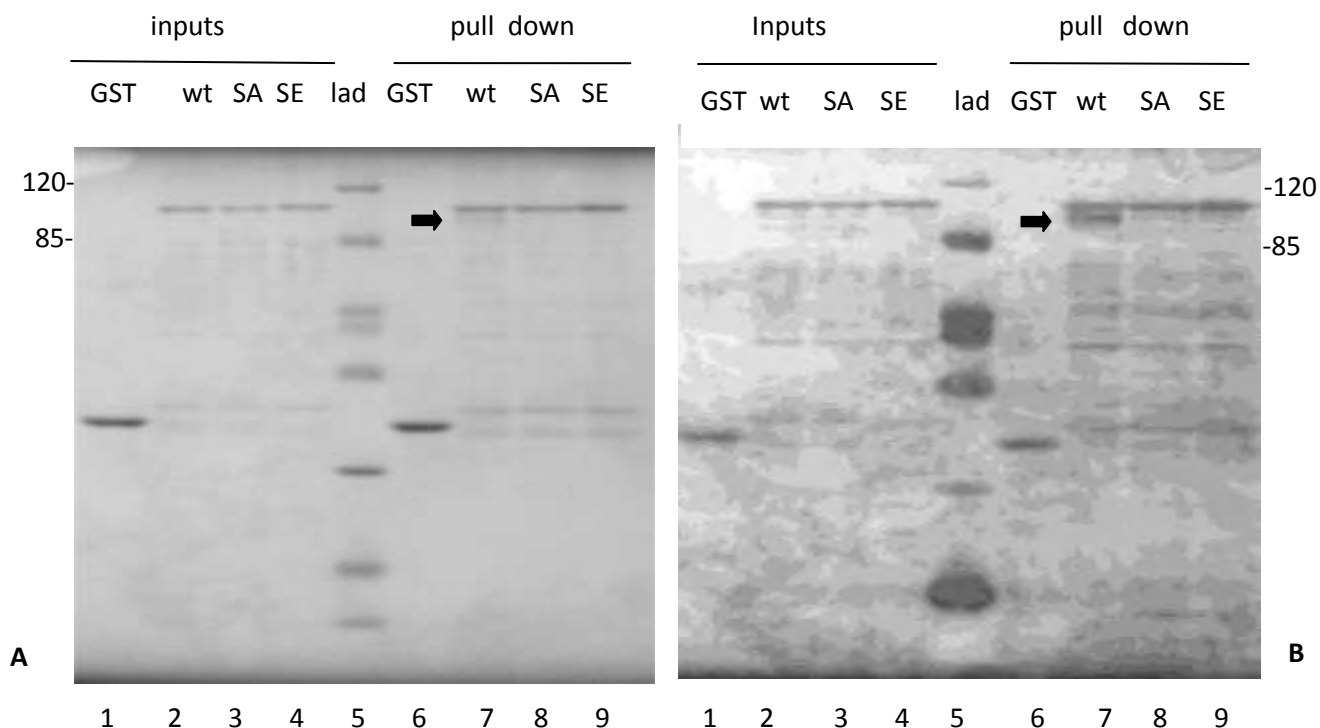
Για να βεβαιωθούμε ότι οι πρωτεΐνες που καθαρίστηκαν είναι αυτές που θέλουμε έγινε ανοσοαποτύπωση με anti-GST και anti-HIF αντισώματα και επιβεβαιώθηκε ο καθαρισμός των σωστών πρωτεϊνών και με τα δυο αυτά αντισώματα (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** Α) Ανοσοαποτύπωση με anti-GST Β) Ανοσοαποτύπωση με anti-HIF

4.7 Δοκιμή αλληλεπίδρασης πυρηνικών πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) με τις πρωτεΐνες GST και GST-HIF<sup>348-826</sup> wt, GST-HIF<sup>348-826</sup> S→A και GST-HIF<sup>348-826</sup> S→E με πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down assays).

Κατά τη δοκιμασία αλληλεπίδρασης έγινε πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς και της GST σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και επώασή τους με πυρηνικό εκχύλισμα από κύτταρα HeLa. Στη συνέχεια, μετά το ξέπλυμα των σφαιριδίων για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών, παραλήφθηκαν τα εκλούσματα που περιέχουν τις ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24.** Δοκιμή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγχιστείας (pull down assay). Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

(A) Χρώση με Coomassie. (B) Χρώση με AgNO<sub>3</sub>.

Διαδρομές 5: unstained protein ladder, διαδρομές 2-4: 1μl από κάθε πρωτεΐνη (inputs), διαδρομές 7-10: 5μl από κάθε έκλουσμα μετά τη συγκατακρήμνιση με εκχύλισμα HeLa (pull down)

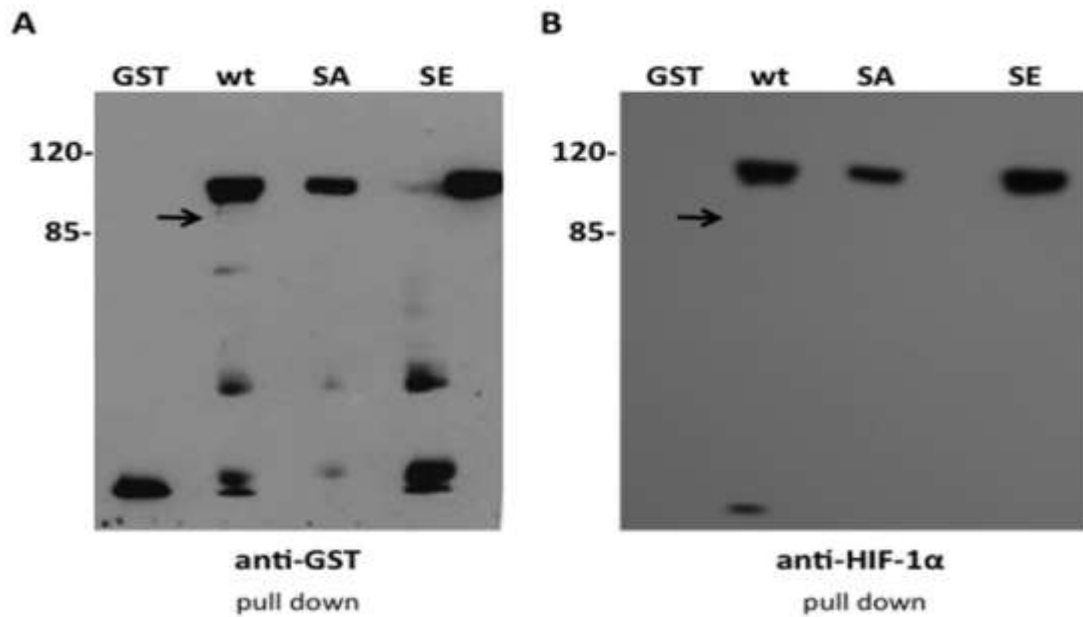
Με βέλος επισημαίνεται η πρωτεϊνική ζώνη που παρατηρείται αποκλειστικά στη διαδρομή της GST-HIF<sup>348-826</sup> wt μετά από δοκιμασία αλληλεπίδρασης.

Με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και στη συνέχεια χρώση είτε με AgNO<sub>3</sub> είτε με Coomassie έγινε δυνατή η σύγκριση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν σε καθεμία από τις μορφές του HIF-1α<sup>348-826</sup> (Εικόνα 24).

Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήσαμε μία ζώνη που εμφανίζεται αποκλειστικά στο έκλουσμα της GST-HIF<sup>348-825</sup> wt (Εικόνα 24, διαδρομές 7) και όχι στα εκλούσματα των GST, GST-HIF<sup>348-825</sup>S→A και GST-HIF<sup>348-825</sup>S→E, αλλά ούτε στην ηλεκτροφόρηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-HIF<sup>348-825</sup>wt (άρα δεν πρόκειται για πρωτεϊνική επιμόλυνση από μη σωστό καθαρισμό της GST-HIF<sup>348-825</sup> wt στο προηγούμενο στάδιο) (Εικόνα 24, διαδρομές 6, 8, 9, 2 αντίστοιχα). Έτσι μπορεί να υποτεθεί πως η ζώνη αυτή, στα 88 kDa αντιστοιχεί είτε σε πρωτεΐνη των κυττάρων HeLa που αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με τη wt μορφή του GST-HIF<sup>348-825</sup> είτε στο προϊόν αποικοδόμησης της GST ή του HIF<sup>348-826</sup>.

Για να αποκλειστεί το δεύτερο ενδεχόμενο έγινε ανοσοαποτύπωση με anti-GST και anti-HIF-1α και είδαμε ότι η ζώνη αυτή δεν αντιδρά με κανένα και έτσι, υποθέτουμε την ύπαρξη μιας κυτταρικής πρωτεΐνης των κυττάρων HeLa

που αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την αγρίου τύπου μορφή του HIF-1α.  
(Εικόνα 25)



**Εικόνα 25.** A) Ανοσοαποτύπωση με *anti-GST*, B) Ανοσοαποτύπωση με *anti-HIF-1α*. Παρατηρείται ότι η ζώνη που φαινόταν στην SDS-PAGE στην διαδρομή του *wt*, δεν παρατηρείται κατά την ανοσοαποτύπωση με κανένα από τα δύο αντισώματα. Με βέλος απεικονίζεται η θέση όπου αναμενόταν να εμφανιστεί η άγνωστη πρωτεΐνη.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία, καθώς επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τον ενεργειακό μεταβολισμό, την ορμονική ρύθμιση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, συνδεδεμένος με τις περιοχές HRE των υποκινητών τους. Οι διαδικασίες αυτές αποσκοπούν στην προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Ο HIF-1 αποτελείται από δυο υπομονάδες. Τη συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β ή ARNT και τη ρυθμιζόμενη υπομονάδα HIF-1α. Παρόλο που συγκέντρωση του οξυγόνου αποτελεί τον κυριότερο ρυθμιστή του και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται στη ρύθμισή του όπως ορμόνες, κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, κ.α. Κατά την νορμοξία η πρωτεΐνη pVHL συνδέεται στο HIF-1α με αποτέλεσμα την ουβικουιπινίωσή του και την ακόλουθη αποδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Αντίθετα, κατά την υποξία σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τα γονίδια-στόχους του.

Ιδιαίτερη θέση στη ρύθμιση του HIF-1α φαίνεται να κατέχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Φαινόμενα όπως η υδροξυλίωση, η νιτροξυλίωση, και η σουμοϋλίωση δυνατόν να επηρεάζουν σημαντικά τη ρύθμισή του. Μια πολύ σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίησή η οποία φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση του HIF-1α ακόμη και ανεξάρτητα από τις συνθήκες του οξυγόνου είναι η φωσφορυλίωσή του και ιδιαίτερα αυτή από τις MAP κινάσες.

Με δεδομένη την ενεργό εμπλοκή της δράσης του HIF-1α σε πολλές ανθρώπινες νόσους και ιδιαίτερα στον καρκίνο φαίνεται λογική η προσπάθεια που καταβάλλεται για την στοχοποίησή του ως φαρμακευτική θεραπεία. Πράγματι, αρκετοί αναστολείς του βρίσκονται ήδη σε κλινικές μελέτες με ως τώρα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι αναστολείς αυτοί στοχεύουν σε όλα τα πιθανά επίπεδα ρύθμισης του HIF-1α και κυρίως στο μεταμεταφραστικό. Πάντως, παρόλο που από την ανακάλυψή του δεν έχει σταματήσει να μελετάται, η ρύθμισή του παραμένει μερικώς κατανοητή αλλά αρκετά ενδιαφέρουσα.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ο κύριος βιολογικός ρόλος μιας συγκεκριμένης φωσφορυλίωσης του HIF-1α, της φωσφορυλίωσης από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 είναι η 'απόκρυψη' ενός γειτονικού NES από την εξαπορτίνη CRM1 με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της υποξίας (Mylonis 2006, Mylonis 2008). Στις μελέτες αυτές όμως είχε υποθεθεί πως είναι πολύ πιθανόν η φωσφορυλίωση αυτή να προκαλεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες του πυρήνα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια εύρεσης των πρωτεϊνών αυτών.

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η κατασκευή μικρότερου τμήματος του HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641→E, του 348-826 ώστε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια, σε συνδυασμό με το αντίστοιχο τμήμα που φέρει τη μετάλλαξη που αναιρεί τη φωσφορυλίωση (Ser641→A, Ser643→A) και το αγρίου τύπου τμήμα (wt) σε δοκιμή αλληλεπίδρασης με εκχύλισμα κυττάρων HeLa με χρωματογραφία αγκιστείας.

Έτσι, έγινε ενίσχυση του τμήματος αυτού με PCR και κλωνοποίηση του στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T-1. Ακολούθησε υπερέκφραση του τμήματος αυτού, ως πρωτεΐνη σύντηξης με τη GST, σε βακτηριακά κύτταρα BL21RIL με επαγωγή με IPTG και εκφράστηκε σε ικανοποιητική ποσότητα.

Στη συνέχεια, έγινε υπερέκφραση και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-HIF<sup>348-826</sup> wt, GST-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→A και GST-HIF-1α<sup>348-826</sup> S→E (Τα τμήματα HIF-1α<sup>348-826</sup> wt και HIF-1α<sup>348-826</sup> S→A υπήρχαν ήδη κλωνοποιημένα στον pGEX-4T-1). Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε ικανοποιητική ποσότητα και ο καθαρισμός τους θεωρήθηκε επιτυχής. Ο καθαρισμός των συγκεκριμένων πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση με anti-GST και anti-HIF αντισώματα και έτσι επαληθεύτηκε πως οι πρωτεΐνες που καθαρίστηκαν ήταν οι αναμενόμενες.

Ακολούθησε η δοκιμή αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών αυτών με εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Η δοκιμή αυτή έδειξε πως μια τουλάχιστον πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 88 kDa των κυττάρων HeLa αλληλεπιδρά αποκλειστικά με την αγρίου τύπου μορφή του HIF-1α.

Η υπόθεση ότι είναι δυνατόν να πρόκειται για πρωτεολύματα της GST ή του HIF απορρίφθηκε μετά από ανοσοαποτύπωση με τα αντίστοιχα αντισώματα. Επίσης, απορρίφθηκε η πιθανότητα της ύπαρξης κάποιας πρωτεΐνης που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α (π.χ. CBP/p300) με βάση το μοριακό βάρος στο οποίο αντιστοιχεί η ζώνη στην πηκτή.

Έτσι, ενώ ο στόχος της παρούσης εργασίας ήταν η εύρεση κυτταρικών πρωτεϊνών που να αλληλεπιδρούν ειδικά με την φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α, ανιχνεύθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση με SDS-PAGE, μια πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε στην αγρίου τύπου μορφή. Το αποτέλεσμα αυτό παραμένει σημαντικό, αφού υποδεικνύει την πιθανότητα της ύπαρξης μιας πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με την αγρίου τύπου μορφή. Το γεγονός μάλιστα ότι η αλληλεπίδραση αυτή δεν παρατηρείται και με την SA μορφή καθιστά το αποτέλεσμα ακόμη πιο σημαντικό, αφού υποδεικνύει την πιθανότητα η σερίνη 641 να ευθύνεται για αυτήν την αλληλεπίδραση και μάλιστα μια ομάδα υδροξυλίου αυτής η οποία καταργείται στις άλλες δύο μεταλλαγμένες μορφές του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (Ala και Glu).

Φυσικά, η πειραματική διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί για τον αποκλεισμό του ενδεχομένου ύπαρξης λάθους. Για τον ίδιο λόγο πρέπει να ελεγχθούν και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την τυχόν δημιουργία κάποιας τυχαίας μετάλλαξης. Τέλος, είναι πιθανό η φάση της κυτταρικής διαίρεσης στην οποία βρίσκονταν τα κύτταρα HeLa να σχετίζεται με τροποποιήσεις του HIF-1α που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις του με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες.

Η πρωτεϊνική ζώνη μπορεί τότε να υποβληθεί σε φασματοσκοπία μάζας για τον προσδιορισμό της αμινοξικής της αλληλουχίας που πιθανόν να μας επιτρέψει να κατανοήσουμε το βιολογικό της ρόλο.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η κατασκευή μικρότερων τμημάτων του HIF-1α τα οποία περιείχαν τις θέσεις φωσφορυλίωσης. Έτσι, και εάν ακόμη επιβεβαιωθούμε για την αλληλεπίδραση του αγρίου τύπου τμήματος ειδικά με κάποια πρωτεΐνη των κυττάρων, θα πρέπει να εξεταστεί και η πιθανότητα της ύπαρξης της αλληλεπίδρασης αυτής και με την πλήρους μήκους μορφή του. Είναι λοιπόν πιθανό να καταργείται, να αυξάνεται ή και να τροποποιείται η αλληλεπίδραση αυτή με την πλήρους μήκους μορφή. Ακόμη,

η αλληλεπίδραση αυτή θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε ευκαρυωτικά κύτταρα προκειμένου να ελεγχθεί ο πραγματικός βιολογικός της ρόλος.

Πάντως, το ενδεχόμενο της προσέγγισης μιας νέας πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης με την αγρίου τύπου μορφή του HIF-1α είναι πολύ ενδιαφέρον γιατί είναι πιθανόν να διευκρινιστεί περεταίρω ο βιολογικός του ρόλος και η ρύθμισή του, ενώ επιφυλάσσει την πιθανότητα της εύρεσης ενός νέου πιθανού θεραπευτικού στόχου για πολλές χρόνιες νόσους και ιδιαίτερα τον καρκίνο.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Konhauser, K. O. et al., Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the Great Oxidation Event, *Nature*, 2009; 458:750-753.
- Semenza G., Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1, *Physiology*, 2008; 24: 97-106.
- Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Hubbi ME, Byun H, SemenzaGL, Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1, *J Biol Chem*, 2007; 282: 23572–23580.
- Baek JH, Liu YV, McDonald KR, Wesley JB, Zhang H, Semenza GL, Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1, *J Biol Chem*, 2007; 282: 33358–33366.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC, Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1, *Nat Med*, 2001; 10: 858–864.
- Chen EY, Fujinaga M, Giaccia AJ, Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development, *Teratology*, 1999; 60: 215–225.
- Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ, The human oxygen sensing machinery and its manipulation, *Chem Soc Rev*, 2008; 37: 1308–1319.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL, Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 4604–4613.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL, Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cell, *J Biol Chem*, 2002; 277: 38205–38211.
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL, HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells, *Cell*, 2007; 129: 111–122.
- Hay N, Sonenberg N, Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev*, 2004; 18: 1926–1945.
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G, Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 4441–4445.
- Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine, *Methods Enzymol*, 2007; 435: 179–197.
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ, Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Mol Cell*, 2008; 30: 393–402.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL, Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of

- angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia inducible factor 1, *Circ Res*, 2003; 93: 1074–1081.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL, HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 2001; 21: 3995–4004.
  - Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T, Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia: influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system, *J Hypertens*, 1997; 15: 1593–1603.
  - Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL, RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 and is required for O<sub>2</sub>-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1, *Mol Cell*, 2007; 25: 207–217.
  - Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, Liu JO, Semenza GL, Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization, *J Biol Chem*, 2007; 282: 37064–37073.
  - Lok CN, Ponka P, Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene, *J Biol Chem*, 1999; 274: 24147–24152.
  - Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL, Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1, *Blood*, 2005; 105: 659–669.
  - Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL, Role of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency, *J Biol Chem*, 2000; 275: 21048–21054.
  - Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaultont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS, Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs), *J Clin Invest*, 2007; 117: 1926–1932.
  - Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH, Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1, *J Biol Chem*, 1997; 272: 20055–20062.
  - Semenza GL, Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level, *Physiology*, 2004; 19: 176–182.
  - Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J, The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1, *J Cell Physiol*, 2008; 217: 809–818.
  - Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W, Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL, 2003; *Nature*, 425: 307–311.
  - Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E, Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia, *J Neurosci*, 1995; 15: 4738–4747.
  - Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, Van Obberghen E, Insulin stimulates hypoxia inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling

- Pathway, 2002; *J Biol Chem*, 277: 27975–27981.
- Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia, *J Biol Chem*, 2005; 280: 4321–4328.
  - Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR, Induction of HIF-1 expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR, *J Cell Physiol*, 2008; 217: 674–685.
  - Bruick RK, McKnight SL, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science*, 2001; 294: 1337-40.
  - Hewitson KS, Mcneil LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Hypoxia inducible factor asparagines hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family, *J Biol Chem*, 2002; 277: 26351-5.
  - Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain, *Science*, 2002; 295: 858-61.
  - Mahon PC, Hirota K, Semeza GL, FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity, *Genes Dev*, 2001;15:2675-86
  - Semenza GL, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *J Appl Physiol*, 2000; 88: 1474-80
  - Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, and Pouyssegur, HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia, *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*, 2003; 22:4082–4090.
  - Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, and Maity A, Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1, Interaction between H-ras and hypoxia, *J Biol Chem*, 2001; 276:9519–9525.
  - Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, and Semenza GL, Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2, 1999; *Cancer Res* 59:3915–3918.
  - Goldberg MA, Dunning SP, and Bunn HF, Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein, *Science*, 1988; 242:1412–1415.
  - Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, et al, Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1, *Cancer Res*, 2003; 63:1138–1143.
  - Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, and Taubman MB, Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation, *Biochem Cell Biol*, 2002; 80:421–426.
  - Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, et al, Intracellular localisation of human HIF-1  $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing, *J Cell Sci*, 2003; 116:1319–1326.
  - Nakayama K, and Ronai Z, Siah: new players in the cellular response to hypoxia, 2004; *Cell Cycle* 3:1345–1347.

- Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, Schramm M and Flamme I, Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors, 2002; *Biochem Biophys Res Commun* 296:343–349.
- Reyes H, Reisz-Porszasz S, and Hankinson O, Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor, *Science*, 1992; 256:1193–1195.
- Semenza GL, Neefelt MK, Chi SM, and Antonarakis SE, Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located to the human erythropoietin gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88:5680–5684.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci*, 1995; *USA* 92:5510–5514.
- Qingdong Ke and Max Costa, Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1), *Molecular Pharmacology*, 2006; 70: 1469-1477.
- Salceda S, Caro J, Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends upon redox-induced changes., *J Biol Chem*, 1997; 272: 22642-22647.
- Sutter CH, Laughner E, Semenza GL, Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations, *Proc Natl Acad Sci*, 2000; 97: 4748-4753.
- Jiang B-H, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL, Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : modulation of transcriptional activity by oxygen tension, *J Biol Chem*, 1997; 272: 19253-19260.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit., *J Biol Chem*, 1997; 272: 11205-11214.
- Yang-Sook Chun, Myung-Suk Kim, Jong-Wan Park, Oxygen-Dependent and -Independent Regulation of HIF-1 $\alpha$ , *J Korean Med Sci*, 2002; 17: 581-8.
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1, *Kidney Int*, 1997; 51: 553-5.
- Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J, Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene, *J Biol Chem*, 1991; 266: 15563-6.
- Semenza GL, Neefelt MK, Chi SM, Antonarakis SE, Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3'to the human erythropoietin gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 5680-4.



- Semenza GL, Wang GL, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol*, 1992; 12: 5447-54.
- Wang GL, Semenza GL, Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1, *J Biol Chem*, 1995; 270: 1230-7.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 5510-4.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells *Genes Dev*, 1997; 11: 72-82.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 4273-8.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA, Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha, *Gene Expr*, 1998; 7: 205-13.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L, Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha, *EMBO*, 1998; 17: 6573-86.
- Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF, Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling, *J Biol Chem*, 1999; 274: 9038-44.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation, *Science*, 2001; 292: 468-72.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr, HIF 1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing, *Science*, 2001; 292: 464-8.
- Salnikow K, An WG, Melillo G, Blagosklonny MV, Costa M, Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors, *Carcinogenesis* 1999; 20: 1819-23.
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T, Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta, *Hypertension* 2002; 39: 46-50.
- Gatenby RA and Gillies RJ, A microenvironmental model of carcinogenesis, *Nat Rev Cancer*, 2004; 4: 891-899

- Warburg O, *Science*, 1956; 124: 269-270
- Semenza GL, Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene*, 2009 29, 625–634
- Evon Poon, AdrianL, Harris and Margaret Ashcroft, Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer, *Expert Reviews*, 2009; 11: 1-23.
- Barbara Onnis, Annamaria Rapisarda and Giovanni Melillo, Development of HIF-1 Inhibitors for Cancer Therapy, *J Cell Mol Med*, 2009; 13(9A): 2780–2786.
- Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, et al, A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol.Cancer Ther*, 2008;7:3598–608.
- Rapisarda A, Uranchimeg B, Sordet O, et al, Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications, *Cancer Res*, 2004;64:1475–82.
- Sapra P, Zhao H, Mehlig M, et al, Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model, *Clin.Cancer Res*, 2008; 14:1888–96.
- Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, et al, Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha, *Mol.Cancer Ther*, 2004; 3:233–44.
- Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al, mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways, *Nat.Med*, 2004;10:594–601.
- Neckers L, Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer, *Curr.Top.Med.Chem*, 2006; 6:1163–71.
- Lee K, Qian DZ, Rey S, et al, Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2009;106:2353–58.
- Wang GL et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension, *Proc Natl Acad Sci*, 1995; 92(12): 5510-5514.
- Mylonis I et al., Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK, *J Biol Chem*, 2008; 283(41): 27620-27627.
- Salceda S et al., Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia, *Kidney Int*, 1997; 51(2): 556-559.
- Maxwell PH et al., The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, 1999; 399(6733): 271-275.
- Yasinka IM and Sumbayev VV, S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity, *FEBS Lett*, 2003; 549(1-3): 105-109.

- Cho H et al., Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha., *FEBS Lett*, 2007; 581(8): 1542-1548.
- Berta M, Brahimi-Horn C, Pouyssegur J, Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research, *J Soc Biol*, 2004; 198(2): 113-120.
- Bae SH et al., Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity, *Biochem Res Commun*, 2004; 324(1): 394-400.
- Brahimi-Horn C, Mazure N and Pouyssegur J, Signaling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications, *Cell Signal*, 2005; 17(1): 1-9.
- Carbia-Nagashima A et al., RSUME, a small RDW-containing protein enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia, *Cell*, 2007; 131(2): 309-323.
- Wang GL, Semenza GL, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, *J Biol Chem*, 1993; 268(29): 21513-21518.
- Wang GL, Jiang BH, Semenza GL, Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1, *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 216(2): 669-675.
- Mottet D et al., Role of casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity, *Int J Cancer*, 2005; 117(5): 764-774.
- Gradin K et al., The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine, *J Biol Chem*, 2002; 277(26): 23508-23514.
- Lancaster DE, McDonough MA, Schofield CJ, Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases, *Biochem Soc Trans*, 2004; 32: 943-945.
- Flugel D et al., Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner, *Mol Cell Biol*, 2007; 27: 3253-3265.
- Mottet D et al., Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells, *J Biol Chem*, 2003; 278(33): 31277-31285.
- Mylonis et al., Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha, *J Biol Chem*, 2006; 281(44): 33095-33106.
- Triantafyllou A et al., Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity, *Free Radic Biol Med*, 2008; 44(4): 657-670.

- Zhang Y and Xiong Y, A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation, *Science*, 2001; 292(5523): 1910-1915.
- Lee H and Bai W, Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation, *Mol Cell Biol*, 2002; 22(16): 5835-5845.
- Ikuta T, Kobayashi Y and Kawajiri K, Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor, *J Biol Chem*, 2004; 279: 19209-19216.
- Sasaki T et al., Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1 and its biological role, *Mol Cell*, 2006; 24: 63-75.
- Carrero P et al., Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha, *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 402-415.
- Zhang W, Tsuchiya T and Yasukochi Y, Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia, *J Hum Genet*, 1999; 44: 293-299.
- Kato H, Tamamizu-Kato S, Shibasaki F, Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1 alpha and increases transcriptional activity, *J Biol Chem*, 2004; 279:41966-41974.
- Kaidi A Williams AC and Paraskeva C, Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia, *Nat Cell Biol*, 2007; 9: 210-217.
- Lyberopoulou A et al., MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity, *Cell Physiol Biochem*, 2007; 20: 995-1006.
- Ravi R et al., Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha, *Genes Dev*, 2000; 14: 34-44.
- Fels DR and Koumenis, HIF-1alpha and p53: the ODD couple?, *Trends Biochem Sci*, 2005; 30: 426-429.
- Bae MK et al., Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability, *J Biol Chem*, 2002; 277: 9-12.
- Larsen M et al., Interactions between HIF-1 and Jab1: balancing apoptosis and adaptation. Outline of a working Hypothesis, *Adv Exp Me Biol*, 2005; 566: 203-211.
- Baek JH et al., OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha, *Mol Cell*, 2005; 17: 503-512.
- Amir S et al., Sept9-vl upregulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation, *J Biol Chem*, 2009; 284: 11142-11151.

- Pollard PJ et al., Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF-1alpha in tumors wich result from germline FH and SDH mutations, *Hum Mol Genet*, 2005; 14: 2231-2239.
- Berra E, Pages G and Pouyssegue J, MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression, *Cancer Metastasis Rev*, 2000; 19: 139-145.
- Miyake K et al., Expression of hypoxia-inducible factor-1alph, histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation, *Pancreas*, 2008; 36: 1-9.
- Klatte T et al., Hypoxia-inducible factor 1 alpha in renal clear cell carcinoma , *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 7388-7393.
- Bos R et al., Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma, *Cancer*, 2003; 97: 1573-1581.
- Gruber G et al., Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter?, *Breast Cancer Res*, 2004; 6: 191-198.
- Osada R et al., Expression of hypoxia-inducible factor 2alpha and von Hippel-Lindau protein in the epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma, *Hum Pathol*, 2007; 38: 1310-1320.
- Winter SC et al., The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer, *Cancer*, 2006; 107: 757-766.
- Fillies T et al., HIF-1alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor, *BMC Cancer*, 2005; 5: 84.
- Sumiyoshi Y et al., Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer, *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 5112-5117.
- Anthony O. Fedele, Murray L. Whitelaw, and Daniel J. Peet, Regulation of Gene Expression by the Hypoxia-Inducible Factors, *Mol.Interv*,2002;2:229-243.
- Konhauser, K. O. et al, Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the Great Oxidation Event, *Nature* ,2009, 458:750-753.
- Steve Bonello, Christian Zähringer, Rachida S, BelAiba, Talij Djordjevic, John Hess, Carine Michiels; Thomas Kietzmann; Agnes Görlach, Reactive Oxygen Species Activate the HIF-1 $\alpha$  Promoter Via a Functional NF $\kappa$ B Site, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007;27:755.

- Eric Metzen, Jie Zhou, Wolfgang Jelkmann, Joachim Fandrey and Bernhard Brüne, Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases, *Mol Biol Cell*, 2003; 14(8): 3470-3481.
- Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R, Maeda N, Mitsuda N, Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1, *Neuroscience*,2004;126(2):433-40.
- Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Van Waes C, 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res*, 2004;10(24):8665-73.
- Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ, mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ , *Mol Cell*, 2010; 40(4): 509-20.
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al, Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 8104–8109.
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R,Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA, Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction, *N Engl J Med*, 2000; 342: 626–633.
- Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS, Early expression of myocardial HIF-1 $\alpha$  in response to mechanical stresses:regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway, *CircRes*.2002;90:E25–E33.
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al., Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta, *Hypertension*, 2002; 39: 46–50.
- Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al, Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *J Clin Invest*, 1999; 103: 691–696.
- Kim Cheng, Kenneth Ho, Rebecca Stokes, et al., Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates  $\beta$  cell function in mouse and human islets, *J Clin Invest*, 2010; 120(6): 2171–2183.
- Shi H, Hypoxia Inducible Factor 1 as a Therapeutic Target in Ischemic Stroke, *Curr Med Chem*, 2009; 16(34): 4593.
- Potter C, Harris AL, Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target, *Cell Cycle*., 2004 Feb; 3(2): 164-167.
- Yequan Wang, Zhenyu Tang, Ruyue Xue, Gurinder K. Singh, Kunning Shi, Yonggang Lv, Li Yang, Combined effects of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and HIF-

- 1 $\alpha$  on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: An in vitro study, *Journal of Orthopaedic Research*, 2011.
- Kyung Jin Woo, Tae-Jin Lee, Jong-Wook Park and Taeg Kyu Kwon Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 $\alpha$  accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 343(1): 8-14.
  - Semenza GL, Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene*, 2010; 29: 625–634.
  - Alkmini Kalousi, Ilias Mylonis, Anastasia S. Politou, Georgia Chachami, Efrosyni Paraskeva and George Simos, Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1, *Journal of Cell Science*, 2010; 123, 2976-2986.
  - Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, Pantopoulos K, Simos G, Koromilas AE, eIF2{alpha} Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{alpha}, *Cancer res*, 2010; 70(20):7820-7829.
  - Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W, Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha, *J Biol Chem.*,2010; 285(50): 38944-38950.
  - RIZOS Helen, WOODRUFF Sarah, KEFFORD Richard F., p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners, *Cell Cycle* 2005; 4: 597-603.
  - Karoly Fatyol and Aladar A. Szalay, The p14<sup>ARF</sup> Tumor Suppressor Protein Facilitates Nucleolar Sequestration of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Inhibits HIF-1-mediated Transcription, *JBC*, 2001.
  - Mei Yee Koh and Garth Powis, HAF: the new player in oxygen-independent HIF-1 $\alpha$  degradation, *Cell Cycle*, 2009; 8(9): 1359–1366.
  - Fisher JW., Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Exp Biol Med (Maywood)*., 2003; 228(1): 1-14.
  - Nathalie Dehne, Bernhard Brüne, HIF-1 in the inflammatory microenvironment, *Experimental Cell Research*, 2009;315: 1791-1797.
  - Sandra Cascio, Rita Ferla, Aleco D'Andrea, Aldo Gerbino, Viviana Bazan, Eva Surmacz, Antonio Russo, Expression of angiogenic regulators, VEGF and leptin, is regulated by the EGF/PI3K/STAT3 pathway in colorectal cancer cells, *Journal of Cellular Physiology*, 2009; 221(1): 189–194.