



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**Διευθυντής Εργαστηρίου: Καθηγητής Βιοχημείας Γεώργιος Σίμος**

**Διδακτορική Διατριβή**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ  
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2α»**

υπό

**ΙΩΑΝΝΑΣ-ΜΑΡΙΑΣ ΓΚΟΤΙΝΑΚΟΥ**

Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2019

Στη μητέρα μου, Ασημώ Πανάγου  
Το μεγαλύτερό μου στήριγμα, η πρώτη μου δασκάλα

© 2018 ΙΩANNA-MAPIA ΓΚΟΤΙΝΑΚΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3<sup>ο</sup>/13-03-2019 ΓΣΕΣ):

- 1<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**  
**(Επιβλέπων)** Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Γεώργιος Σίμος**  
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Ανδρέας Τσακάλωφ**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Δημήτριος Λεωνίδας**  
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Ευφροσύνη Παρασκευά**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Κυττάρου, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Ηλίας Μυλωνής**  
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ο</sup> Εξεταστής Δρ. Γεωργία Χαχάμη**  
Λέκτορας, Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με Επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Παναγιώτη Λιάκο, για την ανάθεση της διατριβής, για τη πολύτιμη και συνεχή επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου, την υπομονή και την επιμονή του. Η συνεργασία μου με τον κ. Λιάκο αποτέλεσε σημαντική πηγή γνώσεων για την επιστήμη της Βιοχημείας. Κυρίως όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, και μου έμαθε να πιστεύω περισσότερο στον εαυτό μου και να βασίζομαι στις δυνάμεις μου.

Ένα άλλο πολύ σημαντικό πρόσωπο για μένα είναι ο Διευθυντής του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητής Βιοχημείας κ. Γεώργιος Σίμος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σίμο για τις πολύτιμες συμβουλές και επισημάνσεις, που συνέβαλαν σημαντικά στην επιστημονική μου εξέλιξη όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ, του οποίου οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Ακόμη, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας Ηλία Μυλωνή, για την προθυμία του να απαντήσει σε ερωτήσεις μου τόσο σε τεχνικά όσο και σε θεωρητικά ζητήματα και την αμέριστη ηθική υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτρη Λεωνίδα για τη δυνατότητα διεξαγωγής πειραμάτων στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τις πολύτιμες συμβουλές του και την εξαιρετική συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Κυττάρου κα. Ευφροσύνη Παρασκευά και την Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας κα. Γεωργία Χαχάμη, μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, για το χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση της διδακτορικής διατριβής και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και διορθώσεις τους.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια και φίλη μου Χριστίνα Μπεφάνη, η βοήθεια της οποίας υπήρξε πολύτιμη όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ θερμά

για την αμέριστη βοήθεια, την άψογη συνεργασία και τη διαρκή υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την ευχάριστη παρέα τους. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ελένη Κεχαγιά, Κατερίνα Δισερή και Αντωνία Αγγελή για την δημιουργική συνεργασία τους και το φιλικό συναδελφικό περιβάλλον.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους αγαπημένους μου φίλους, Ραφαέλα Μπέτα, Θύμιο Κυριάκη, Χρύσα Ταζέ και Κωνσταντίνο Τσιλαφάκη, για την ανεπανάληπτη συντροφιά τους και την οικογενειακή ατμόσφαιρα που δημιουργήσαμε στη Λάρισα.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στα μέλη της οικογένειάς μου, στη μητέρα μου, την αδερφή μου και τη γιαγιά μου που όλα αυτά τα χρόνια για την ηθική και υλική συμπαράσταση και με στήριξαν σε κάθε μου βήμα.

Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### 1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο	<b>Ιωάννα- Μαρία Γκοτινάκου</b>
Διεύθυνση	<b>Πανεπιστημίου 3, Βιόπολις, Λάρισα, Ελλάδα</b>
Τηλέφωνο	<b>(+30)2410685583</b>
Email	<b><a href="mailto:iogotinak@icloud.com">iogotinak@icloud.com</a>, <a href="mailto:iogotina@med.uth.gr">iogotina@med.uth.gr</a></b>

### 2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ- ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

#### ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Ιούλιος 2014- Μάρτιος 2019</b>
<b>Ίδρυμα</b>	Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
<b>Τίτλος</b>	<b>Μελέτη των Μοριακών μηχανισμών δράσης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α</b>
<b>Επιβλέπων Καθηγητής</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Παναγιώτης Λιάκος
<b>Περιγραφή</b>	Διερεύνηση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του HIF-2α, με έμφαση στη φωσφορυλίωσή του από τις ERK1/2. Αναγνώριση μιας θέσης τροποποίησης του HIF-2α από τις ERK1/2 με πειράματα in vitro φωσφορυλίωσης και μεταλλαξιγένεσης. Μελέτη της βιολογικής επίδρασης αυτής της τροποποίησης στη μεταγραφική δράση και λειτουργία της HIF-2. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού που αποτελεί τη βάση αυτής της τροποποίησης μελετώντας τον εντοπισμό και τις νέες αλληλεπιδράσεις της HIF-2α υπομονάδας με άλλες πρωτεΐνες. Εύρεση ενός νέου ανεξάρτητου από οξυγόνο ρυθμιστικού μηχανισμού του HIF-2α (Gkotinakou et al., 2019).

#### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Σεπτέμβριος 2011- Μάρτιος 2014</b>
<b>Ίδρυμα</b>	Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
<b>Τίτλος</b>	<b>Ο ρόλος των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και HIF-2α στη διαφοροποίηση των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562</b>
<b>Επιβλέπων Καθηγητής</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Παναγιώτης Λιάκος

<b>Περιγραφή</b>	Μελετήθηκε η επίδραση της υποξίας στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων K562. Για τη διαφοροποίηση των K562 κυττάρων σε ερυθροκύτταρα, χρησιμοποιήθηκε αιμίνη και μελετήθηκε η συμβολή της υποξίας και η έκφραση των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και HIF-2α στις παραπάνω συνθήκες. Δείξαμε ότι η υποξία αναστέλλει την ανάπτυξη των K562 και αυξάνει τον ρυθμό κυτταρικού θανάτου. Οι μακροχρόνιες επιδράσεις της υποξίας δεν φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με την έκφραση της πρωτεΐνης των HIF-α. Παρατηρήσαμε επίσης ότι ενώ η υποξία διευκολύνει την επαγόμενη από την αιμίνη διαφοροποίηση των κυττάρων K562 σε ερυθροκύτταρα, η έκφραση των HIF-α υπομονάδων, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη.
------------------	--

#### **ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ**

<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Σεπτέμβριος 2005- Ιούλιος 2011</b>
<b>Ίδρυμα</b>	Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
<b>Τίτλος</b>	<b>Έκφραση και απομόνωση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α</b>
<b>Επιβλέπων Καθηγητής</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Παναγιώτης Λιάκος
<b>Περιγραφή</b>	Η μελέτη αυτή είχε ως στόχο την κλωνοποίηση και την απομόνωση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης HIF-2α. Το cDNA που κωδικοποιεί τον πλήρους μήκους HIF-2α κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pGEX-4T-1 προκειμένου να εκφράσει βακτηριακά την αντίστοιχη πρωτεΐνη με σήμανση GST. Ο πλήρους μήκους GST-HIF-2α εκφράστηκε για πρώτη φορά επιτυχώς σε βακτήρια. Για να βρεθούν αλληλεπιδράσεις του HIF-2α με άλλες πρωτεΐνες, καθαρές GST και GST-HIF-2α πρωτεΐνες δεσμεύθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης και χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες ανοσοκαθίζησης με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυττάρων. Μία πρωτεΐνη με φαινομενικό μοριακό βάρος 150kDa από εκχυλίσματα πρωτεΐνης Huh7 και άλλες τρεις πρωτεΐνες από εκχυλίσματα πρωτεΐνης HeLa με φαινομενικό μοριακό βάρος 250-300kDa, 120kDa και 150kDa βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με HIF-2α.

### 3. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ- ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Νοέμβριος 2017- Νοέμβριος 2018</b>
<b>Περιγραφή</b>	Συμμετοχή στην επίβλεψη της διπλωματικής εργασίας της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Αικατερίνης Δισερή με τίτλο «Μελέτη των μοριακών μηχανισμών δράσης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2» υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθ. Ιατρικής Βιοχημείας Παναγιώτη Λιάκου.
<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Νοέμβριος 2016- Φεβρουάριος 2018</b>
<b>Περιγραφή</b>	Συμμετοχή στην επίβλεψη της διπλωματικής εργασίας της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Ελένης Κεχαγιά με τίτλο «Μηχανισμοί της αντι-καρκινικής δράσης της βιταμίνης D: ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και HIF-2» υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθ. Ιατρικής Χημείας Ανδρέα Τσακάλωφ.
<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Χειμερινό Εξάμηνο 2017- 18 και 2018- 19</b>
<b>Περιγραφή</b>	Συμμετοχή στην επίβλεψη και εκπαίδευση προπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Ιατρικής, στα πλαίσια των Εργαστηριακών ασκήσεων του μαθήματος «Βιοχημεία II Γονιδιακή Έκφραση, Ανθρώπινα Όργανα και Βιολογικές Λειτουργίες (BE0712)», υπό την Επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, Παναγιώτη Λιάκου.
<b>Ημερομηνίες</b>	<b>2018</b>
<b>Περιγραφή</b>	Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 6 <sup>ου</sup> Πανελληνίου Forum Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 22 Νοεμβρίου 2018, Λάρισα.
<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Απρίλιος 2016- Μάιος 2016</b>
<b>Περιγραφή</b>	<b>Μάρτιος 2015- Σεπτέμβριος 2015</b> Υποστήριξη σε Βιοχημικές Αναλύσεις για τη διάγνωση πολλαπλής σκλήρυνσης και άλλων νευρολογικών παθήσεων, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
<b>Ημερομηνίες</b>	<b>Ιούλιος 2007- Αύγουστος 2007</b>
<b>Περιγραφή</b>	Πρακτική εκπαίδευση στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Λάρισα.

### 4. ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

<b>Ημερομηνίες</b>	<b>15/05/17- 02/01/19</b>
<b>Περιγραφή</b>	<b>Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)</b> στα πλαίσια του Προγράμματος χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών 18-36 μήνες, Μάϊος 2017.

Ημερομηνίες	04/07/18- 12/07/18
Περιγραφή	Υποτροφία για τη συμμετοχή στο 18 <sup>th</sup> FEBS-Young Scientist's Forum. Newsletter 04/07 - 07/07 2018. Prague. <b>και</b> στο 43 <sup>rd</sup> FEBS-EMBO Meeting. Newsletter 07/07 - 12/07 2018. Prague.

## 5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### Δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά με κριτές

1. **Gkotinakou IM**, Befani C, Simos G, Liakos P. "ERK1/2 phosphorylates HIF-2 $\alpha$  and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling". Journal of Cell Science. 2019 Apr 8; 132: jcs225698 doi: 10.1242/jcs.225698. Impact factor: 4,401.
2. Befani C, Mylonis I, **Gkotinakou IM**, Georgoulas P, Hu CJ, Simos G, Liakos P. "Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2013 Jul 25; 45 (11): 2359-68. Impact factor: 4,152.

### Αναρτημένες Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

#### Διεθνή Συνέδρια

1. **Gkotinakou IM**, Befani C, Simos G, Liakos P. "ERK1/2 directly phosphorylate HIF-2 $\alpha$  and regulate its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling". Proceedings of the 43<sup>rd</sup> FEBS-EMBO Meeting. Newsletter 07/07 - 12/07 2018. Prague. Abstract P.09-021-Wed **and** Proceedings of the 18<sup>th</sup> FEBS-Young Scientist's Forum. Newsletter 04/07 - 07/07 2018. Prague. Abstract P.33
2. Befani C, Mylonis I, **Gkotinakou IM**, Georgoulas P, Hu CJ, Simos G, Liakos P. "Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells". Proceedings of the 39<sup>th</sup> FEBS-EMBO Meeting. Newsletter 30/08 - 04/09 2014. Paris. Abstract Tue-051.

#### Πανελλήνια Συνέδρια

1. **Gkotinakou IM**, Befani C, Simos G and Liakos P. "ERK1/2-dependent phosphorylation of HIF-2 $\alpha$  regulates its activity by controlling its CRM1-mediated nuclear export". Proceedings of the 69<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 23-25 November 2018. Larisa. Abstract P020.
2. Diseri A, **Gkotinakou IM**, Pangou E, Liakos P. "TNF- $\alpha$  inhibits hypoxic stimulation of HIF-2 $\alpha$  transcriptional activity by impairing its interaction with ARNT". Proceedings of the 69<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 23-25 November 2018. Larisa. Abstract P103.

3. Kechagia E, **Gkotinakou IM**, Pazaitou- Panayiotou K, Liakos P, Tsakalof A. "Molecular background of Vitamin D anticancer action: Impact on hypoxia inducible transcription factors (HIFs)". Scientific Workshop: Vitamin D, Mediterranean Experts Meeting, Thessaloniki, 30 - 31 August 2018.
4. **Gkotinakou IM**, Befani C, Simos G and Liakos P. "Regulation of CRM1-dependent nucleocytoplasmic transport of HIF-2 $\alpha$  by its direct ERK1/2 mediated phosphorylation". Proceedings of the 68<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 10-12 November 2017. Athens. Abstract P32.
5. Kechagia E, **Gkotinakou IM**, Pazaitou- Panayiotou K, Liakos P, Tsakalof A. "1,25-dihydroxyvitamin D negatively regulates hypoxia- inducible factors 1 and 2 in human hepatoma cell line". Proceedings of the 68<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 10-12 November 2017. Athens. Abstract P41.
6. **Gkotinakou IM**, Befani C, Pangou E, Mylonis I, Simos G and Liakos P "Direct phosphorylation by ERK1/2 is required for nuclear accumulation and transcriptional activation of Hypoxia Inducible Factor -2 $\alpha$ ". Proceedings of the 67<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 25-27 November 2016. Ioannina. Abstract P37.
7. **Gkotinakou IM**, Befani C, Visirianakis I, Tsiftoglou A, Simos G, Liakos P "Effect of hypoxia and HIFs on K562 human erythroleukemia cell differentiation". Proceedings of the 65<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 28-30 November 2014. Thessaloniki. Abstract P4.
8. Befani C, Mylonis I, **Gkotinakou IM**, Georgoulis P, Hu CJ, Simos G, Liakos P. "Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells". Proceedings of the 64<sup>th</sup> Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. Newsletter 6-8 December 2013. Athens. Abstract P184.

## 6. ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

### Ξένες γλώσσες

<b>Αγγλικά</b>	<b>Άριστο Επίπεδο</b> Certificate of Proficiency in English, University of Michigan Proficient Communication, Edexcel International, University of Westminster
<b>Γαλλικά</b>	<b>Άριστο Επίπεδο</b> Diplôme approfondi de langue française DALF (B1, B2, B3, B4) Sorbonne 2 <sup>e</sup> Degré
<b>Πληροφορική</b>	<b>Πολύ καλό Επίπεδο</b> Cambridge International Diploma in IT Skills

## 7. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Αρωγό μέλος της της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (EEBMB).

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ  
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2α»**

**ΙΩΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΓΚΟΤΙΝΑΚΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Όνοματεπώνυμο** Δρ. Παναγιώτης Λιάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Όνοματεπώνυμο** Δρ. Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Όνοματεπώνυμο** Δρ. Ανδρέας Τσακάλωφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική απόκριση στην υποξία ενορχηστρώνεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται από τη υποξία (HIFs). Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 2 (HIF-2) είναι βασικό συστατικό της κυτταρικής προσαρμογής στην ελάττωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Ο HIF-2 είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής αποτελούμενος από μια άλφα υπομονάδα που ρυθμίζεται από το οξυγόνο (HIF- $\alpha$ ) και την HIF-1 $\beta$  υπομονάδα που εκφράζεται σταθερά, η οποία είναι γνωστή και ως ARNT. Αν και το οξυγόνο αποτελεί κύριο ρυθμιστή της  $\alpha$  υπομονάδας του HIF-2, η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 ελέγχεται, επίσης, από μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από αυτό. Οι ανεξάρτητοι του οξυγόνου μηχανισμοί ρύθμισης της λειτουργίας του HIF-2α περιλαμβάνουν την μετα-μεταφραστική του τροποποίηση με χαρακτηριστικό παράδειγμα την φωσφορυλίωση. Αν και η λειτουργία του HIF-2 είχε συσχετιστεί παλαιότερα με την ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2, δεν υπήρχαν στοιχεία για την άμεση φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK αλλά και για τον μοριακό μηχανισμό που ελέγχει την δράση του μεταγραφικού παράγοντα.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, διερευνήσαμε τη φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις κινάσες πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα 1/2 (ERK1/2) σε συνθήκες υποξίας (1% O<sub>2</sub>). Αρχικά, με πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, δείξαμε ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνης στη θέση 672. Η μετάλλαξη αυτής της σερίνης σε αλανίνη ή φαρμακολογική αναστολή της οδού των ERK1/2 μειώνει τη μεταγραφική δράση του HIF-2 λόγω μετατόπισης του HIF-2α στο κυτταρόπλασμα χωρίς ταυτόχρονη αλλαγή των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-2α. Επιπλέον, δείξαμε ότι τόσο η συσσώρευση του HIF-2α στον πυρήνα, όσο και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 αποκαθίστανται αναστέλλοντας την εξαγωγή των πυρηνικών πρωτεϊνών με την προσθήκη του αναστολέα της εξαπορτίωσης CRM1, λεπτομυκίνη Β (LMB). Πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού, μεταγραφικής ενεργότητας και ανοσοκατακρήμνισης δείχνουν ότι ο HIF-2α συνδέεται με την CRM1 με τρόπο ευαίσθητο στη φωσφορυλίωση. Τέλος, ταυτοποιήσαμε δύο κρίσιμα κατάλοιπα λευκίνης που γειτνιάζουν με την θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK ως μέρη ενός εξαρτώμενου από τη CRM1, άτυπου, σήματος πυρηνικής εξαγωγής (NES). Η αναστολή της CRM1 από τη λεπτομυκίνη Β ή η μετάλλαξη αυτών των καταλοίπων λευκίνης σε αλανίνη αποκαθιστά την πυρηνική συσσώρευση και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α που δεν τροποποιείται από τις ERK1/2. Συνοπτικά, αποκαλύψαμε ένα νέο ρυθμιστικό μηχανισμό του HIF-2, που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 η οποία ελέγχει τον εντοπισμό του HIF-2α στον πυρήνα και, συνεπώς, την μεταγραφική δράση

του HIF-2. Η ρυθμιστική επικοινωνία μεταξύ των ERK1/2 και του HIF-2 που περιγράφεται σε αυτή την εργασία προσφέρει ένα εναλλακτικό μηχανισμό για τον έλεγχο της δράσης του HIF-2, του οποίου η περαιτέρω διερεύνηση μπορεί να προσφέρει πολύτιμα εργαλεία για την αντιμετώπιση νοσημάτων που σχετίζονται με την υποξία, όπως ο καρκίνος.

Όπως αναφέρθηκε, οι HIF είναι σημαντικοί ρυθμιστές της προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στην στέρηση οξυγόνου. Παράλληλα, πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D. Παρόλο που υπάρχουν λίγες αναφορές που υποδεικνύουν ότι η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από τον βιοενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, δεν υπάρχουν στοιχεία που να συνδέουν τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D με τον HIF-2α. Δεύτερος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, σε σύγκριση με την αντίστοιχη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην HIF-1α υπομονάδα σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος, Huh7. Τα αποτελέσματά υποδεικνύουν ότι τόσο τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-2α όσο και της πρωτεΐνης HIF-1α μειώνονται παρουσία της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και η μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης συνοδεύεται από μερική μεταγραφική απενεργοποίηση των HIF σε συνθήκες υποξίας. Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D μειώνει τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων στόχων τόσο του HIF-1 όπως το *PGK1*, όσο και του HIF-2 όπως η *EPO* και η *SERPINE1*. Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων οφείλεται στη γενωμική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης του υποδοχέα της βιταμίνης D3 (VDR) σε συνθήκες υποξίας και μελετήθηκε η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α και στη μεταγραφική δράση των HIF. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D επηρεάζει τόσο τα επίπεδα πρωτεΐνης HIF-α όσο και τη μεταγραφική δράση των HIF με κάποιον μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της γενωμικής δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Συμπερασματικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη ύπαρξη κάποιου άλλου ρυθμιστικού μηχανισμού της δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην ενεργότητα των HIF, η αποσαφήνιση του οποίου θα μπορούσε δυνητικά να συμβάλει σε θεραπευτικές προσεγγίσεις νοσημάτων όπως ο καρκίνος του ήπατος.

## ABSTRACT

In order to adapt to the hypoxic environment, cells upregulate the expression of genes involved in processes such as metabolic reprogramming, cell proliferation, invasion and metastasis, erythropoiesis and angiogenesis. This cellular response to low oxygen is transcriptionally orchestrated by Hypoxia Inducible Factors (HIFs). Hypoxia -Inducible Factor 2 (HIF-2) is a major component of the cellular response to oxygen deprivation. HIF-2 is a transcriptional activator composed of a hypoxia-inducible alpha subunit (HIF- $\alpha$ ) and a stably expressed beta subunit HIF-1 $\beta$ , also known as Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT). Apart from oxygen, HIF-2 $\alpha$  subunit is also controlled by oxygen-independent mechanisms that include its post-translational modification such as phosphorylation. Although HIF-2 function was correlated with ERK1/2 pathway activation, there were no data to support its direct phosphorylation by ERKs and the molecular mechanism governing HIF-2 regulation by ERKs.

In the first part of this PhD thesis, we investigated the phosphorylation of HIF-2 $\alpha$  by the Extracellular signal -Regulated protein Kinases 1/2 (ERK1/2) under hypoxia (1% O<sub>2</sub>). We demonstrate by *in vitro* phosphorylation assays that HIF-2 $\alpha$  is phosphorylated at serine residue 672. Mutation of this site to alanine or inhibition of the ERK1/2 pathway by chemical agents (U0126) decreases HIF-2 transcriptional activity by mislocalizing HIF-2 $\alpha$  to the cytoplasm without affecting HIF-2 $\alpha$  protein expression levels. Furthermore, we demonstrate that both HIF-2 $\alpha$  nuclear accumulation and transcriptional activity is re-established by inhibiting nuclear protein export upon addition of the Chromosomal Maintenance 1 (CRM1) inhibitor Leptomycin B (LMB). Immunofluorescent microscopy, reporter gene and immunoprecipitation experiments further demonstrate that HIF-2 $\alpha$  associates with the exportin Chromosomal Maintenance 1 (CRM1) in a phosphorylation-sensitive manner and identify two critical Leucine residues as part of an atypical CRM1-dependent nuclear export signal (NES) that neighbours Ser672. CRM1 inhibition or mutation of these Leu residues restores the nuclear accumulation and activity of HIF-2 $\alpha$  that lacks the ERK1/2 modification site. In summary, we reveal a novel regulatory mechanism of HIF-2 that involves the ERK1/2-dependent phosphorylation of HIF-2 $\alpha$ , which controls HIF-2 $\alpha$  nucleocytoplasmic shuttling and, thus, HIF-2 transcriptional activity. This regulatory crosstalk between ERK1/2 and HIF-2 that is described in this thesis provides an alternative means to control HIF-2 activity in disease, which can potentially provide valuable tools and information for treating hypoxia-related diseases such as cancer.

As already mentioned HIFs are major components of the regulatory mechanism that supports the adaptation of cancer cells to oxygen deprivation. Moreover, many bibliographic data demonstrate the anti-cancer role of vitamin D. Although there are a few reports showing that the HIF-1 $\alpha$  subunit is regulated by the bioactive metabolite of vitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, there are no data that correlate 1,25(OH)<sub>2</sub>D to HIF-2 $\alpha$ . Thus, the second aim of this PhD thesis was the investigation of the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D on the regulation of HIF-2 $\alpha$  under hypoxic conditions, in direct comparison to the corresponding effect on HIF-1 $\alpha$  in Huh7 liver cancer cells. Our results indicate that both HIF-2 $\alpha$  and HIF-1 $\alpha$  protein levels are decreased in response to 1,25(OH)<sub>2</sub>D addition. This decrease of HIF- $\alpha$  protein levels is accompanied by the partial transcriptional inactivation of HIFs under hypoxia. 1,25(OH)<sub>2</sub>D was found to reduce the transcription of both HIF-1-specific target genes like *PGK1*, and HIF-2-specific target genes like *EPO* and *SERPINE1*. In order to investigate whether the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D on the regulation of HIF- $\alpha$  subunits is mediated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D genomic function, we performed vitamin D3 receptor (VDR) silencing experiments under hypoxic conditions and tested the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D on HIF- $\alpha$  protein levels and HIF transcriptional activity. Our results suggest that 1,25(OH)<sub>2</sub>D affects both HIF- $\alpha$  protein levels and HIF transcriptional activity in a non-genomic fashion. Thus, we cannot exclude the possibility that other, yet unidentified, molecular mechanisms control the regulation of HIFs by vitamin D, the clarification of which could potentially contribute to the development of therapeutic interventions regarding liver carcinogenesis.

# Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1 ΥΠΟΞΙΑ</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF ...</b>	<b>22</b>
1.2.1 HIF-1α .....	23
1.2.2 HIF-2α .....	23
1.2.3 HIF-3α .....	26
1.2.4 HIF-1β ή ARNT .....	27
<b>1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-2α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ</b> .....	<b>27</b>
1.3.1 Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας .....	28
1.3.1.1 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας μέσω υδροξυλίωσης .....	28
1.3.1.2 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και τα μιτοχόνδρια .....	32
1.3.1.3 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από τη διακοπτόμενη υποξία .....	33
1.3.2 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας .....	34
1.3.2.1 Ρύθμιση της μεταγραφής της HIF-2α υπομονάδας .....	35
1.3.2.2 Ρύθμιση της μετάφρασης της HIF-2α υπομονάδας .....	36
1.3.2.3 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις .....	38
1.3.2.3.1 Ακετυλίωση .....	39
1.3.2.3.2 Σουμοϋλίωση .....	40
1.3.2.3.3 Φωσφορυλίωση .....	41
1.3.2.3.4 Οικογένεια των κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (Extracellular signal Regulated Kinases ERK1/2) .....	43
1.3.2.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες .....	49
1.3.2.4.1 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα USF2 .....	49
1.3.2.4.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον παράγοντα μεταγραφής ELK-1 .....	50
1.3.2.4.3 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα NEMO .....	50
1.3.2.4.4 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα c-MYC .....	51
1.3.2.4.5 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον HAF .....	52
1.3.2.4.6 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη Int6 .....	53
1.3.2.4.7 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA 4 (RNA-Binding Motif protein RBM4) .....	54
<b>1.4 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ</b> .....	<b>55</b>
1.4.1 Ρόλος του HIF-2 στην εμβρυογένεση .....	55
1.4.2 Ρόλος του HIF-2 στην ανάπτυξη .....	56
1.4.3 Ρόλος του HIF-2 στην ερυθροποίηση .....	57
<b>1.5 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ</b> .....	<b>60</b>
1.5.1 Ρόλος του HIF-2 στον καρκίνο .....	60
1.5.1.1 Πολλαπλασιασμός .....	61
1.5.1.2 Μεταβολικός Επαναπρογραμματισμός .....	62
1.5.1.3 Αγγειογένεση .....	62
1.5.1.4 Μετάσταση .....	63
1.5.1.5 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις .....	64

<b>1.6 Η 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνη D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)</b> .....	<b>65</b>
1.6.1 Ο μεταβολισμός της 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνης D <sub>3</sub> .....	65
1.6.2 Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της 1,25(OH) <sub>2</sub> D .....	66
1.6.2.1 Γενωμικός μηχανισμός δράσης.....	66
1.6.2.2 Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης .....	67
1.6.3 Ο ρόλος της 1,25(OH) <sub>2</sub> D στον καρκίνο .....	68
1.6.4 Σημεία σύγκλισης σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH) <sub>2</sub> D και των HIF .....	69
1.6.5 Δράση της 1,25(OH) <sub>2</sub> D στο σηματοδοτικό μονοπάτι των HIF .....	70
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>71</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>73</b>
<b>2.1 ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>73</b>
2.1.1 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές .....	73
2.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	73
2.1.2.1 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδίων .....	73
2.1.2.2 Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών .....	73
2.1.3 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	74
2.1.4 Εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια και small interfering RNA (siRNA).....	80
2.1.5 Αλληλούχιση (Sequencing).....	81
2.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια.....	81
2.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας.....	81
2.1.8 Αντισώματα .....	81
2.1.9 Διαλύματα .....	82
2.1.9.1 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x.....	82
2.1.9.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης κυττάρων .....	83
2.1.9.2.1 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης ευκαρυωτικών κυττάρων .....	83
2.1.9.2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων .....	84
2.1.9.3 Ρυθμιστικά διαλύματα υγρής χρωματογραφίας συγγένειας GST 4B, Protino .....	84
2.1.9.4 Πηκτή ακρυλαμιδίου.....	84
2.1.9.5 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10x.....	85
2.1.9.6 Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer) Tris- Borate 10x.....	85
2.1.9.7 Διάλυμα Laemli .....	85
2.1.9.8 Διαλύματα χρώσης πηκτής πολυακρυλαμιδίου .....	85
2.1.9.9 Διαλύματα για την εμφάνιση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ..	86
2.1.9.10 Ρυθμιστικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 50x.....	86
2.1.9.11 Διαλύματα για παρασκευή βακτηριακών κυττάρων Top10 και BL21RIL δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) .....	87
<b>2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>87</b>
2.2.1 Κλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας σε πλασμιδιακούς φορείς .....	87
2.2.2 Πέψη Με ενδονουκλεάσες περιορισμού .....	88
2.2.3 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA .....	88
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	88
2.2.5 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	89
2.2.6 Αντίδραση λιγάσης.....	89

2.2.7 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός E. coli Top10 και E. coli BL21RIL .....	90
2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation .....	90
2.2.9 Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-2α με PCR.....	91
2.2.10 Σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Site-directed mutagenesis) .....	92
2.2.11 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Με IPTG .....	94
2.2.12 Λύση βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος	94
2.2.13 Απομόνωση πρωτεϊνών σε σύντηξη Με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).....	95
2.2.14 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών Bradford.....	95
2.2.15 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) .....	96
2.2.16 Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου Με Coomassie Brilliant Blue R- 250 .....	97
2.2.17 Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου Με νιτρικό άργυρο (AgNO <sub>3</sub> ).....	98
2.2.18 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot .....	99
2.2.19 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (IP) .....	100
2.2.20 Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Pull- Down) .....	101
2.2.21 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών in vitro .....	102
2.2.22 Αυτοραδιογραφία .....	102
2.2.23 Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.....	103
2.2.24 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών .....	103
2.2.25 Επίδραση ουσιών και μελέτη της επαγωγής των HIF-1α και HIF-2α .....	104
2.2.26 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....	104
2.2.27 Παρασκευή πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	104
2.2.28 Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό .....	105
2.2.29 Παροδική διαμόλυση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	107
2.2.30 Αποσιώπηση της έκφρασης με siRNA.....	107
2.2.31 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2.....	108
2.2.32 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του .....	110
2.2.33 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR).....	110
2.2.34 Στατιστική ανάλυση .....	115
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>117</b>
<b>3.1 ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ.....</b>	<b>117</b>
3.1.1 Επίδραση των κινασών ERK1/2 στη ρύθμιση του HIF-2α .....	117
3.1.2 Επίδραση της αναστολής των κινασών ERK1/2 στην έκφραση του HIF-2α.....	117
3.1.3 Επίδραση της αναστολής των κινασών ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2	119
3.1.4 Φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2.....	121
3.1.5 Μελέτη της <i>in vitro</i> φωσφορυλίωσης του πλήρους μεγέθους ανασυνδυασμένου HIF-2α και μικρότερων τμημάτων του από τις ERK1/2. ....	122
3.1.6 Ταυτοποίηση υποψήφιων θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 εντός της περιοχής 620-680 .....	129
3.1.7 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α S672A και T626A. ....	130
3.1.8 φωσφορυλίωση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α T626A και S672A από τις ERK1/2 και από ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7.....	132

3.1.9 Μελέτη του ρόλου των θέσης φωσφορυλίωσης (S672) από τις ERK1/2 στη ρύθμιση του HIF-2α.....	133
3.1.10 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α.....	135
3.1.11 Επίδραση της φωσφορυλίωσης της σερίνης 672 από τις ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α.....	135
3.1.12 Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2.....	137
3.1.13 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στην πρωτεϊνική του σταθερότητα.....	137
3.1.14 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στην αλληλεπίδρασή του με τον μεταγραφικό συμπράγοντα USF2.....	138
3.1.15 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στον υποκυτταρικό του εντοπισμό.....	139
3.1.16 Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών του HIF-2α μετά από αναστολή της εξπορτίνης CRM1 με λεπτομυκίνη B (LMB).....	142
3.1.17 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στην αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1.....	144
3.1.18 Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-2α.....	145
3.1.19 Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στην αλληλεπίδρασή του ενδογενούς HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1.....	147
3.1.20 Εντοπισμός υποψήφιων σημάτων πυρηνικής εξαγωγής παρακείμενων της θέσης φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2.....	148
3.1.21 Δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α L662/ 677A και HIF-2α L662A/ L677A/ S672A.....	149
3.1.22 Επίδραση της κατάργησης των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στον υποκυτταρικό του εντοπισμό.....	150
3.1.23 Επίδραση της κατάργησης των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στη μεταγραφική του ενεργότητα.....	152
3.1.24 Επίδραση της κατάργησης των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στην αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1.....	154
3.1.25 Επίδραση της κατάργησης των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στη λειτουργία των τμημάτων 640- 679 του HIF-2α.....	155
3.1.26 Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της επικράτειας 640- 679 του HIF-2α.....	158
3.1.27 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών της επικράτειας 640- 679 του HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1.....	158
3.1.28 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στην αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες.....	159
3.1.29 Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της Ρεπτίνης.....	161
3.1.30 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τη Ρεπτίνη και της επίδρασης του μονοπατιού των ERK1/2 στην ισχύ της αλληλεπίδρασης.....	162
<b>3.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2 ΑΠΟ ΤΗΝ 1,25(OH)<sub>2</sub>D.....</b>	<b>164</b>
3.2.1 Επίδραση της 1,25(OH) <sub>2</sub> D στην έκφραση των HIF-α υπομονάδων.....	165
3.2.2 Επίδραση της 1,25(OH) <sub>2</sub> D στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF-2 και HIF-1.....	165

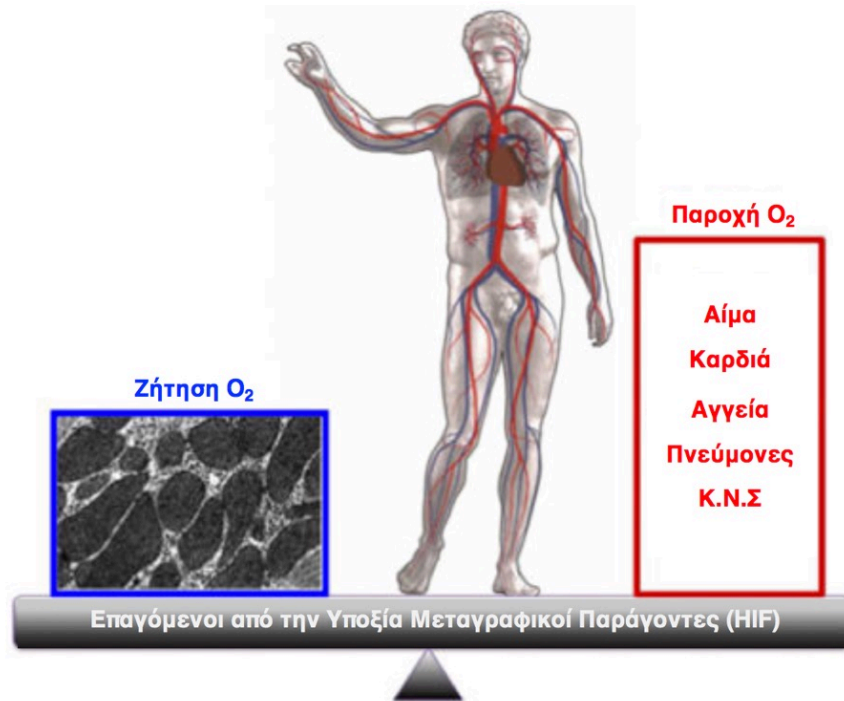


3.2.3 Επίδραση της 1,25(OH) <sub>2</sub> D στην έκφραση των mRNA των ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-2, <i>EPO</i> και του <i>PAI-1</i> και του γονιδίου στόχου του HIF-1, <i>PGK-1</i> με Ποσοτική Rt-PCR.....	166
3.2.4 Επίδραση της αποσιώπησης του VDR 1,25(OH) <sub>2</sub> D στην έκφραση των HIF-α υπομονάδων και στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF.....	169
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>172</b>
4.1 Φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 .....	173
4.2 Ρύθμιση του HIF-2α από την 1,25(OH) <sub>2</sub> D3.....	183
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>190</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΥΠΟΞΙΑ

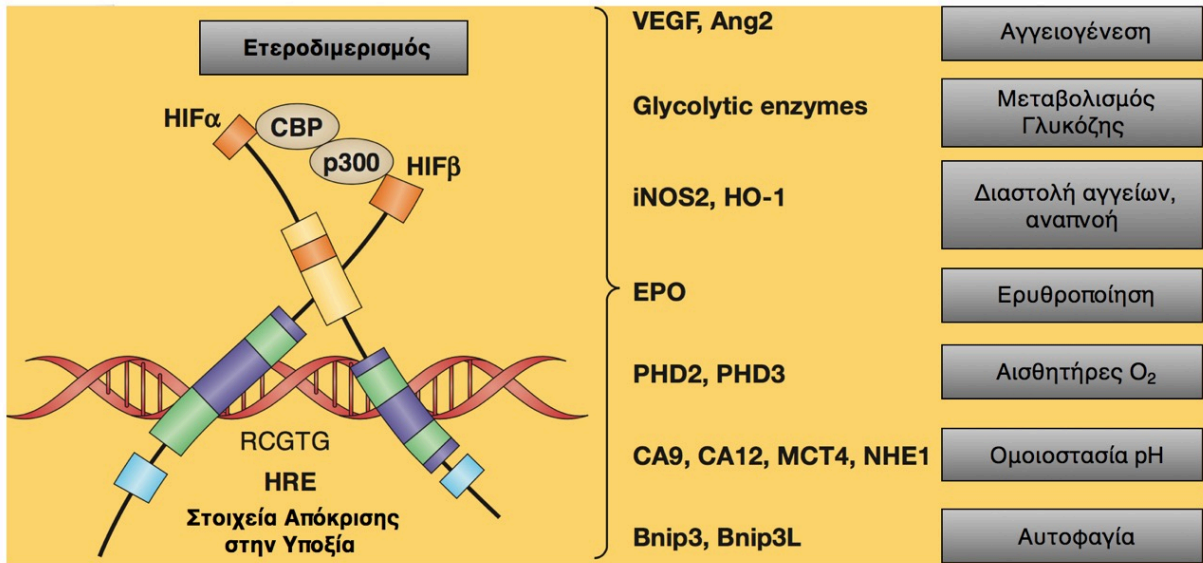
Το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής των αερόβιων οργανισμών. Όλα τα ανθρώπινα κύτταρα απαιτούν σταθερή παροχή  $O_2$  προκειμένου να παράγουν μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που αποτελεί το κύριο ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου. Το  $O_2$  χρησιμοποιείται ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων (Electron Transport Chain ETC), με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού. Για την περιγραφή της συγκέντρωσης του  $O_2$  χρησιμοποιούνται οι όροι υποξία (0.1–1%  $O_2$ ), νορμοξία (~21%  $O_2$ ) και υπεροξία (>21%  $O_2$ ). Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας είναι βελτιστοποιημένη σε φυσιολογικά επίπεδα μερικής πίεσης  $O_2$  ( $PO_2$ ) και παρατεταμένη απόκλιση από την νορμοξία (υπεροξία ή υποξία) προκαλούν αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ROS) από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). Τα ROS οξειδώνουν λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα οδηγώντας έτσι σε κυτταρική δυσλειτουργία ή θάνατο. Η υποξία μπορεί να προκύψει σε τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως η άσκηση, η εμβρυϊκή ανάπτυξη ή το μεγάλο υψόμετρο όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο σχηματισμός συμπαγών όγκων, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η φλεγμονή (1). Κατά την εξέλιξη οι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου, ώστε να προσαρμόζονται και να ανταπεξέρχονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Σε κυτταρικό επίπεδο, κεντρικοί ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors, HIF). Οι HIF ενεργοποιούν γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση της κυτταρική ομοιοστασίας οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή ερυθροκυττάρων, στην αγγειογένεση και τον αναερόβιο μεταβολισμό (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** οι Επαγόμενοι από την Υποξία Μεταγραφικοί Παράγοντες HIF ως ρυθμιστές της ομοιοστασίας του  $O_2$ . Τροποποιημένο από (2).

## 1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/ PER-ARNT-SIM, bHLH/PAS) (3). Οι HIF δρουν ως ετεροδιμερή που αποτελούνται από μια ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο άλφα υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη βήτα υπομονάδα (4, 5). Στα θηλαστικά, οι άλφα υπομονάδες κωδικοποιούνται από τρία γονίδια: *HIF1A*, *EPAS1* (η υπομονάδα που εκφράζεται από το γονίδιο *EPAS1* είναι γνωστή ως HIF-2α) και *HIF3A* (4, 6, 7). Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, οι άλφα υπομονάδες υδροξυλιώνονται σε αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης και στοχοποιούνται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (8). Η βήτα υπομονάδα HIF1β επίσης γνωστή και ως ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) κωδικοποιείται από δύο γονίδια: *ARNT1* και *ARNT2*. Η HIF1β εκφράζεται σταθερά και σχηματίζει επίσης σύμπλοκο με τον πυρηνικό υποδοχέα AHR (Aryl hydrocarbon receptor) (3, 9, 10). Τα μοτίβα bHLH-PAS είναι απαραίτητα για το σχηματισμό ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των α και β υπομονάδων και για την πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs) στις αλληλουχίες DNA των γονιδίων στόχων (11) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Ετεροδιμερισμός των HIFα και HIFβ υπομονάδων και πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία για τη ενεργοποίηση γονιδίων στόχων για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας O<sub>2</sub>. Τροποποιημένο από (11).

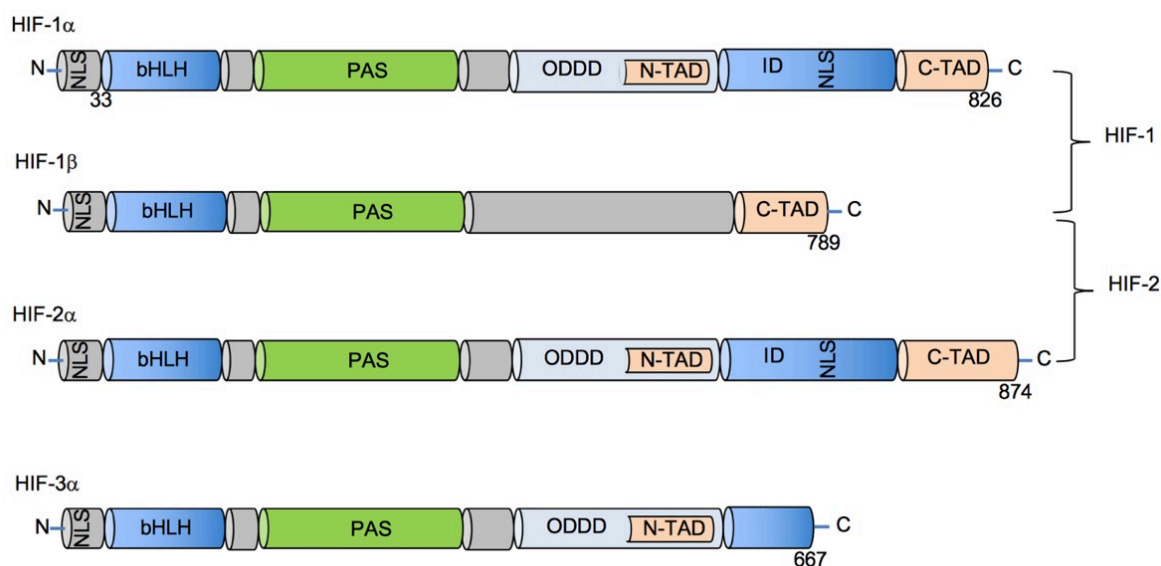
### 1.2.1 HIF-1A

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *HIF1A* στο χρωμόσωμα 14q23.2. Η αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α εμφανίζει μεγάλη συντήρηση σε διάφορους οργανισμούς καθώς εμφανίζει 90% ομολογία ανάμεσα στον άνθρωπο, τον αρουραίο και το ποντίκι. Στην αμινοτελική περιοχή της HIF-1α υπομονάδας εντοπίζονται τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS απαραίτητα για τον διμερισμό με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs. Ο HIF-1α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), μια αμινοτελική, την N-TAD (αμινοξέα 531-575) και μια καρβοξυτελική, την C-TAD (αμινοξέα 831-826). Η N-TAD περιοχή αλληλοεπικαλύπτεται με την ODDD περιοχή (Oxygen- dependent Degradation Domain, ODDD), (αμινοξέα 401-603) και παίζει ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη σταθερότητα της πρωτεΐνης (12) (Εικόνα 3). Εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και επάγεται σε υποξικές συνθήκες (0,1-2% O<sub>2</sub>). Στους εξειδικευμένους μεταγραφικούς στόχους του περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης (PGK1, LDHA), στην απόπτωση (BNIP3) και στη ρύθμιση του pH (CAIX).

### 1.2.2 HIF-2A

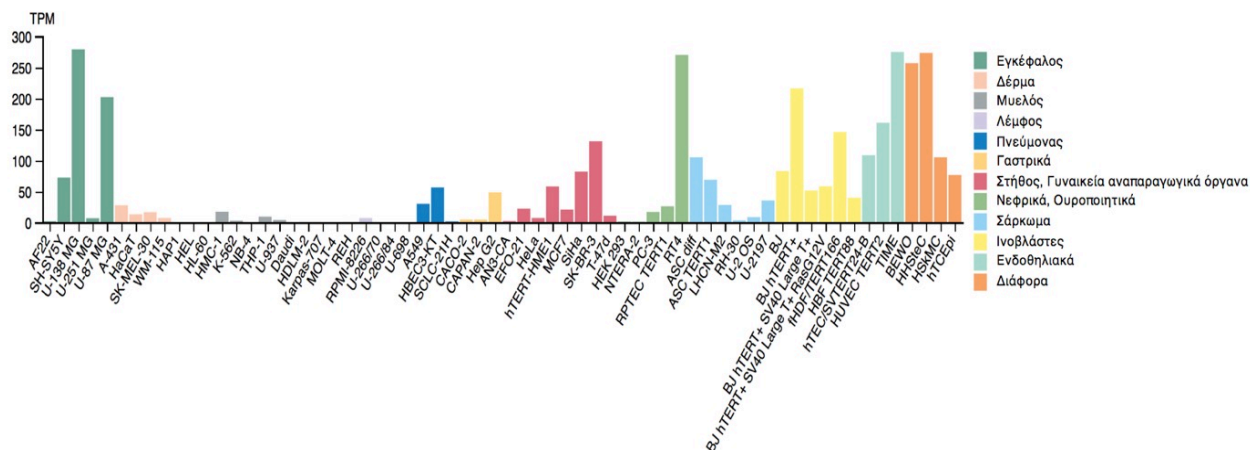
Ο HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη 870 αμινοξέων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *EPAS1* στο χρωμόσωμα 2p21. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως endothelial PAS domain protein 1

(EPAS1) **(5)** ή HIF-related factor (HRF) **(13)** ή HIF-like factor (HLF) **(6)** ή MOP2 (member of PAS family 2) **(14)**. Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει την επικράτεια HLH (αμινοξέα 28-64) και την επικράτεια PAS στην οποία περιλαμβάνονται οι υποεπικράτειες A (αμινοξέα 84-154) και B (αμινοξέα 230-350). Διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, την N-TAD αμινοτελική (αμινοξέα 496-542) και την C-TAD καρβοξυτελική (αμινοξέα 830-870), οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές όπως οι CBP/p300 και είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική του δράση **(15)**. Η επικράτεια N-TAD καθορίζει επιπλέον και την εξειδίκευσή του HIF-2α ως προς τα γονίδια στόχους του μέσω αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται εκεί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες **(16)**. Ανάμεσα στις N-TAD και C-TAD επικράτειες παρεμβάλλεται και η ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (Inhibitory Domain, ID). Επιπλέον, φέρει μια οξυγόνο-εξαρτώμενη επικράτεια (ODDD) η οποία αλληλεπικαλύπτεται με την N-TAD και ρυθμίζει την αποικοδόμησή του σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου **(6)**. Σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, εμφανίζει υψηλή ομολογία με την HIF-1α υπομονάδα (48%). Ο μεγαλύτερος βαθμός ομολογίας εμφανίζεται στις περιοχή bHLH με ποσοστό 85%, και στις περιοχές PAS-A και PAS-B με ποσοστά 68% και 73% αντίστοιχα **(5)**. Τέλος, η HIF-2α υπομονάδα, περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals). Το N-NLS στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 14-50) και το C-NLS στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 705-742) **(17)** **(Εικόνα 3)**.



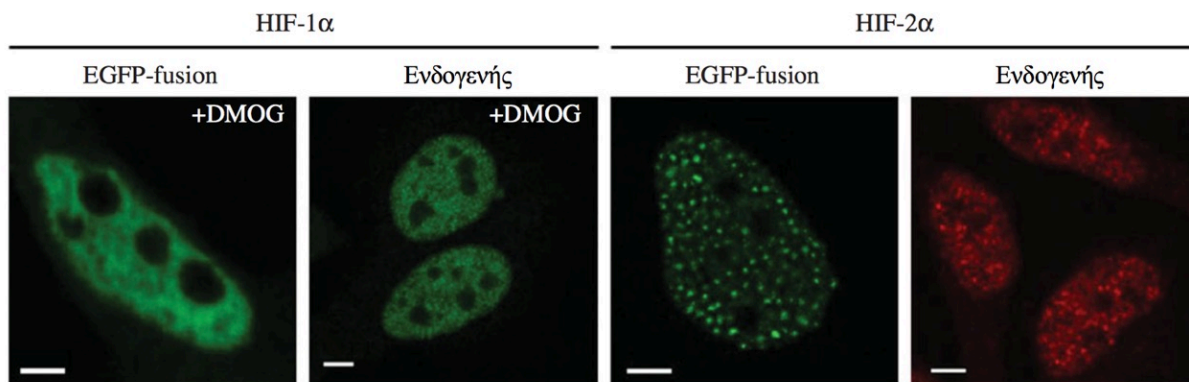
**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών επικρατειών των μελών της οικογένειας των HIF. Οι HIF αποτελούνται από συντηρημένες επικράτειες οι οποίες εμπλέκονται στην πρόσδεσή τους στο DNA (bHLH), στον ετεροδιμερισμό τους (PAS), στην οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμησή τους (ODDD) και στη μεταγραφική τους ενεργότητα (N-TAD, C-TAD). Ο ARNT έχει μια επικράτεια TAD **(18)**.

Ο HIF-2α παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση που περιορίζεται κυρίως στο ενδοθήλιο, στα νεφρά, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες, στην καρδιά και στο επιθήλιο του παχέος εντέρου (19)(Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Επισκόπηση δεδομένων έκφρασης του mRNA του HIF-2α. Οι κυτταρικές σειρές που αναλύθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 12 ομάδες με χρωματικό κώδικα με βάση τα όργανα από το οποίο προήλθαν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης RNA (RNA-sequencing) αναφέρονται ως αριθμός μεταγράφων ανά ένα εκατομμύριο κιλοβάσεις TPM (Transcripts per Kilobase Million). Τροποποιημένο από (*Human Protein Atlas*).

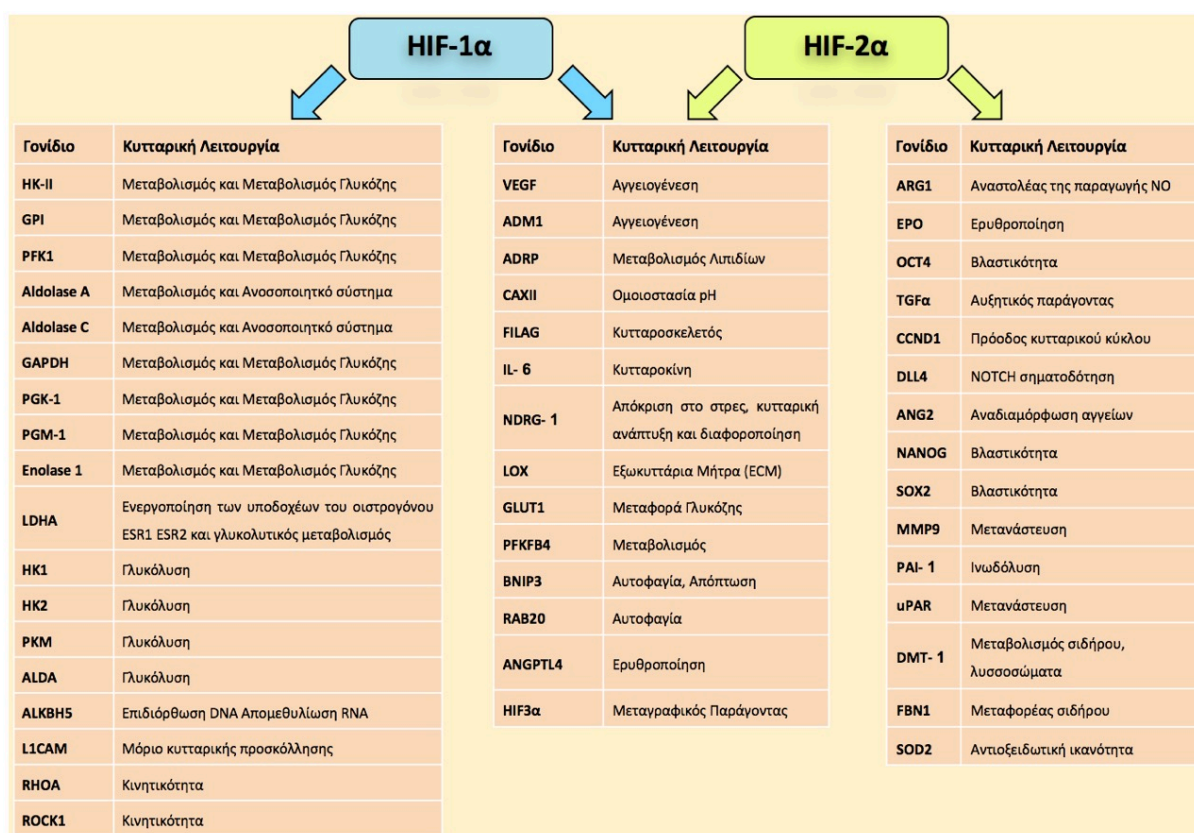
Ο HIF-2α συσσωρεύεται σε συγκεκριμένες δομές του πυρήνα (speckles), κοντά στην ενεργή RNA πολυμεράση. Ο υποπυρηνικός εντοπισμός του, φαίνεται να διευκολύνει την πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του, σε αντίθεση με τον HIF-1α που φαίνεται να κατανέμεται ομοιογενώς μέσα στον πυρήνα (20) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5:** Υποκυτταρικός εντοπισμός των HIF-1α και HIF-2α. Κύτταρα HeLa που εκφράζουν τους HIF-1α και HIF-2α ενδογενώς ή σε σύντηξη με την GFP. Διακρίνεται το διάχυτο πυρηνικό σήμα του HIF-1α (αριστερά) και η συσσώρευση του HIF-2α σε συγκεκριμένες πυρηνικές δομές (δεξιά) (20).



Οι HIF ενεργοποιούν τη μεταγραφή κοινών και διακριτών γονιδίων. Οι HIF-1 και HIF-2 ενεργοποιούν από κοινού γονίδια που εμπλέκονται σε βιολογικές λειτουργίες όπως η αγγειογένεση (VEGF). Ο HIF-1 ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στη γλυκόλυση, στην απόπτωση και στη ρύθμιση του pH, ενώ ο HIF-2 ενισχύει κυρίως την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η βλαστικότητα και η μετάσταση. Στους ειδικούς στόχους του HIF-2, περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η ερυθροποίηση (EPO), η διαφοροποίηση (OCT4), ο πολλαπλασιασμός (TGF- $\alpha$ , Cyclin D1), η διηθητική και μεταναστευτική ικανότητα (PAI-1, MMP2), καθώς και η αντιοξειδωτική άμυνα (SOD2, CAT, GPX) (21) (22) (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Οι HIF-1 και HIF-2 ενεργοποιούν τη μεταγραφή κοινών και διακριτών γονιδίων. Οι HIF-1 και HIF-2 ενεργοποιούν από κοινού γονίδια που εμπλέκονται σε βιολογικές λειτουργίες όπως η αγγειογένεση. Ο HIF-1 εξειδικευμένα ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στη γλυκόλυση, στην απόπτωση και στη ρύθμιση του pH, ενώ ο HIF-2 εξειδικευμένα ενισχύει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η βλαστικότητα και η μετάσταση.

### 1.2.3 HIF-3A

Ο HIF-3 $\alpha$  κωδικοποιείται από το γονίδιο HIF3A στο χρωμόσωμα 19q13.32. Διαφέρει δομικά από τους HIF-1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$ , με βασικό χαρακτηριστικό της ότι δεν φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD (23) (Εικόνα 3). Εκφράζεται σε ιστούς όπως οι

πνεύμονες, η καρδιά, και οι νεφροί (24). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το βιολογικό ρόλο του HIF-3α στην υποξία είναι αντικρουόμενα. Έχει προταθεί ότι ανταγωνίζεται τους HIF-1α και HIF-2α για τη πρόσδεσή τους στον ARNT, αναστέλλει την έκφρασή τους και τελικά τους απενεργοποιεί (25). Πρόσφατες μελέτες με οργανισμό μοντέλο το zebrafish ανέδειξαν το ρόλο του σαν μεταγραφικό παράγοντα. Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν γονίδια στόχοι του που διαθέτουν στους υποκινητές τους άτυπα HRE στα οποία προσαράζει (26).

#### 1.2.4 HIF-1B Η ARNT

Ο HIF-1β είναι μια πρωτεΐνη 789 αμινοξέων που κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 1q21.3. Αποτελείται από δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2) (27). Περιέχει μια επικράτεια bHLH απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA, από δύο επικράτειες PAS υπεύθυνες για τον διμερισμό του και από μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (28). Διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που ρυθμίζει την είσοδό του στον πυρήνα μέσω του εξαρτώμενου από τις μιορτίνες α/β μονοπατιού (29) (Εικόνα 3). Συμμετέχει σε δύο διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια ως απόκριση σε ερεθίσματα. Σε συνθήκες έκθεσης των κυττάρων σε διοξίνες αποκρίνεται στην οδό του υποδοχέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) ενώ σε μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου, αποκρίνεται στην οδό των HIF (30). Μέχρι πρόσφατα η βιβλιογραφία υποστήριζε ότι εκφράζεται σταθερά και τα επίπεδα έκφρασής του δεν επηρεάζονται από τις συγκεντρώσεις του O<sub>2</sub>. Εντούτοις, αυξάνονται συνεχώς οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές ο ARNT ρυθμίζεται από τη μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου, αναδεικνύοντας έτσι έναν νέο ρόλο του στην καρκινογένεση (31, 32).

### 1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-2α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

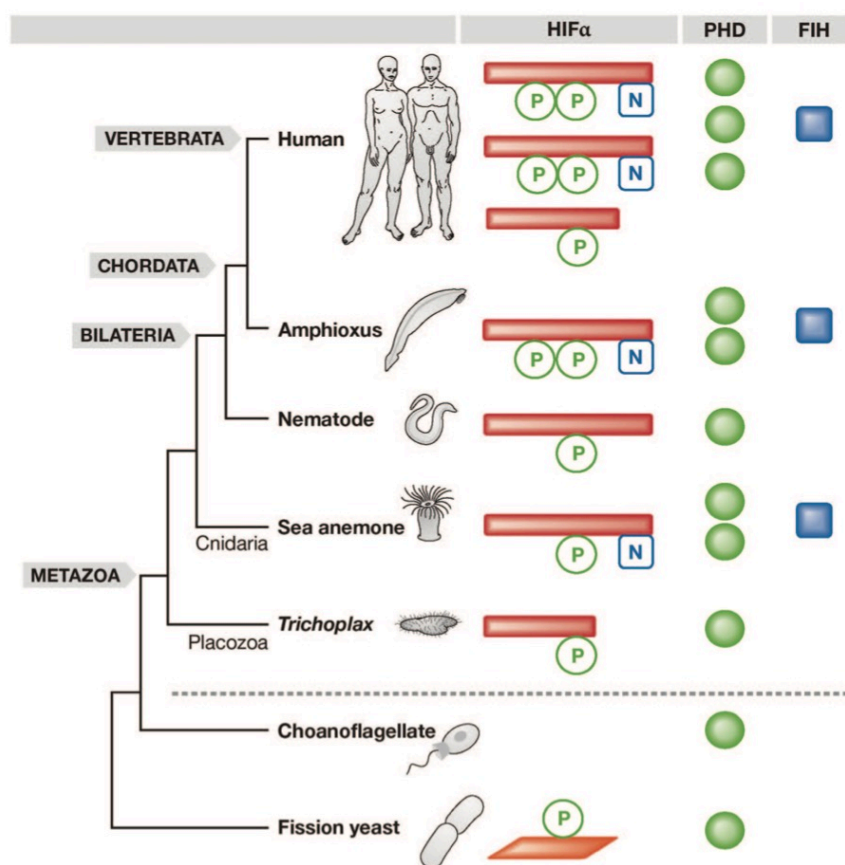
Ο HIF-2 δρα ως ετεροδιμερές, αποτελούμενο από μια ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο άλφα υπομονάδα (HIF-2α) και μια σταθερά εκφραζόμενη βήτα υπομονάδα (HIF-1β ή ARNT). Η ρύθμιση του HIF-2α περιλαμβάνει πολλά στάδια. Ελέγχεται σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου *EPAS1*, μετάφρασης του mRNA του και σταθεροποίησης της α υπομονάδας. Επιπλέον, ρυθμίζεται η είσοδος του HIF-2α στον πυρήνα, ο διμερισμός του με τον ARNT, η πρόσδεση του ετεροδιμερούς στο DNA και η αλληλεπίδρασή του με άλλους παράγοντες της μεταγραφής. Σε κάθε περίπτωση, οι παραπάνω ρυθμιστικοί μηχανισμοί, που είτε εξαρτώνται ή όχι από το οξυγόνο, περιλαμβάνουν εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-2α και τη συμμετοχή του σε σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες.



### 1.3.1 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΞΥΓΟΝΟ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-2Α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

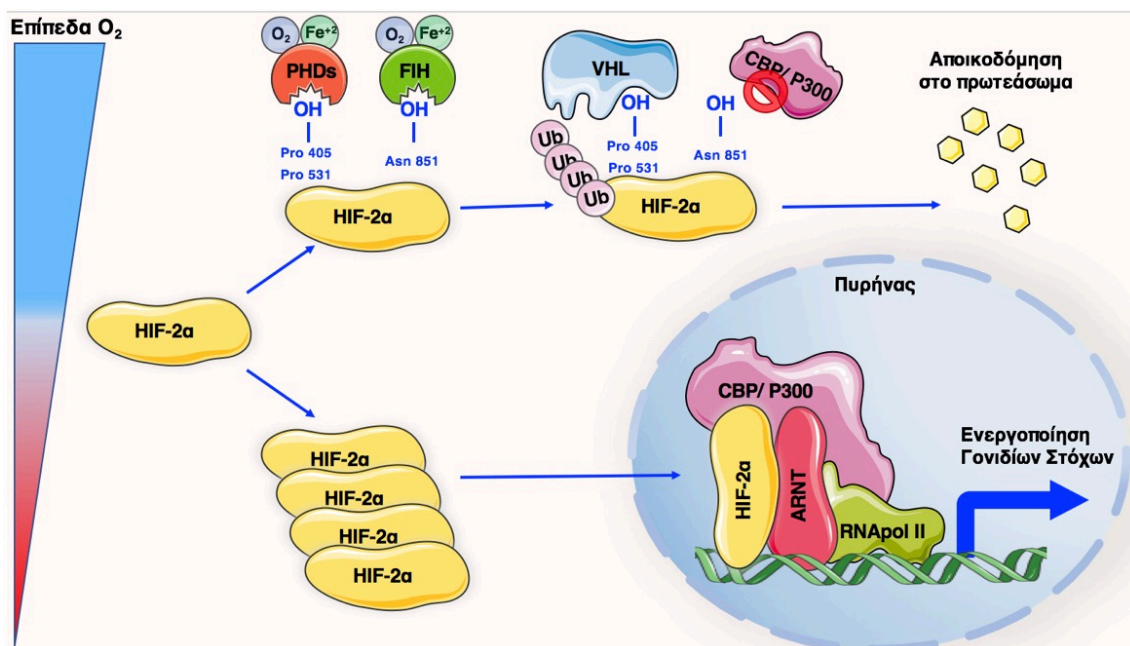
#### 1.3.1.1 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας μέσω υδροξυλίωσης

Σε όλα τα μετάρζωα, η διατήρηση της φυσιολογικής ομοιοστασίας του οξυγόνου προκαλείται από την εξαρτώμενη από οξυγόνο μετα-μεταφραστική υδροξυλίωση των HIF-α υπομονάδων (33, 34). Οι αντιδράσεις υδροξυλίωσης καταλύονται από υδροξυλάσες προλίνης (Prolyl Hydroxylase Domain, PHDs) και τον ανασταλτικό παράγοντα του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH-1) με δράση υδροξυλάσης ασπαραγίνης. Τα ένζυμα αυτά είναι ευαίσθητοι αισθητήρες οξυγόνου συντηρημένοι σε όλα τα μετάρζωα (35, 36) (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7:** Τα ομόλογα της HIFα υπομονάδας είναι παρόντα μόνο στα μετάρζωα, ενώ τα ομόλογα των PHDs συναντώνται και σε άλλους ευκαρυώτες. Τα ομόλογα του FIH δεν είναι τόσο διαδεδομένα στα μετάρζωα όσο οι PHDs. Ο μεγάλος αριθμός παραλόγων των HIFα υπομονάδων και των PHDs που συναντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να οφείλεται σε δυο διπλασιασμούς ολόκληρου του γονιδιώματος (36).

Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών και για την καταλυτική τους δράση απαιτείται α-κετογλουταρικό, μοριακό οξυγόνο και σίδηρος που συνδέεται σε δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος στο ενεργό τους κέντρο. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία), η καταλυτική περιοχή των PHDs αναγνωρίζει ένα ειδικό μοτίβο LXXLAP στην επικράτεια ODDD των HIF- $\alpha$  υπομονάδων (37). Η HIF-2 $\alpha$  υπομονάδα υδροξυλιώνεται από τις PHDs σε δύο καλά συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης (Pro-405, Pro-531). Η τροποποίηση αυτή οδηγεί στην αναγνώριση της HIF-2 $\alpha$  υπομονάδας από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (pVHL), που με τους παράγοντες elongin C, Cullin2 και Ring Box1 ανήκει στο σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικιτίνης E3. Η πρόσδεση της pVHL στις υδροξυ-προλίνες ενεργοποιεί την ουβικιτινυλίωση του HIF-2 $\alpha$  και τη γρήγορη αποικοδόμησή του στο 26S πρωτεάσωμα (38). Επιπλέον, ο ανασταλτικός παράγοντας του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH-1), η δράση του οποίου εξαρτάται επίσης από το οξυγόνο και από τον σίδηρο, υδροξυλιώνει την HIF-2 $\alpha$  υπομονάδα σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn-847) της επικράτειας C-TAD. Η τροποποίηση αυτή εξασθενεί τη μεταγραφική δράση του HIF-2 καθώς παρεμποδίζει την προσάραξη του μεταγραφικού συμπαραγόντα CBP/p300 στην επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD του HIF-2 $\alpha$  (8, 39). Σε συνθήκες υποξίας, η καταλυτική δράση υδροξυλάσης των PHDs και του FIH-1 αναστέλλεται, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-2 $\alpha$  και την ανάκτηση της πλήρους μεταγραφικής δράσης του HIF-2 (Εικόνα 8).

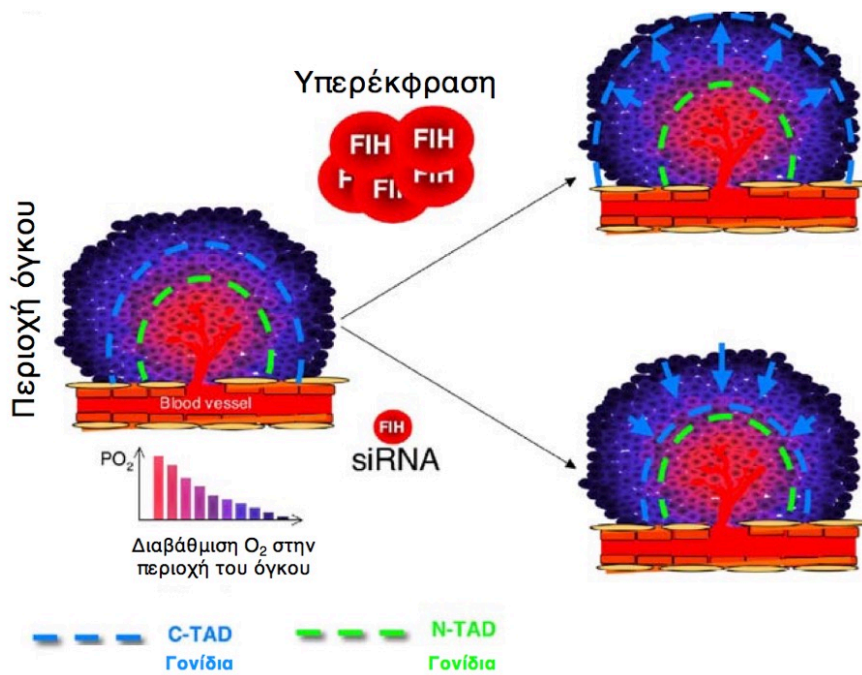


**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης του HIF-2 $\alpha$  μέσω υδροξυλίωσης σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και σε υποξία. Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, η υδροξυλίωση του HIF-2 $\alpha$  στις προλίνες Pro405

και Pro531 από τις υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) οδηγεί στην αποικοδόμησή του στο 26S πρωτεάσωμα. Η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης Asn851 από τον παράγοντα που αναστέλλει τον HIF (FIH-1), εμποδίζει την πρόσδεση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών CBP/p300. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ωστόσο, αναστέλλουν την καταλυτική δράση των PHDs και του FIH-1, επιτρέποντας έτσι την είσοδο του HIF-2α στον πυρήνα, το σχηματισμό του συμπλόκου HIF-2α/HIF-β και την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-2.

Οι PHDs παίζουν βασικό ρόλο στη διαμεσολαβούμενη από τους HIF σηματοδότηση, η οποία διευκολύνει την επιβίωση και την προσαρμογή των κυττάρων ως απόκριση στα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά επίπεδα οξυγόνου (40). Επιλεκτική αποσιώπηση των PHDs ενισχύει την ελεγχόμενη από τους HIFs γονιδιακή έκφραση *in vitro* (41). Έχουν βρεθεί 4 ισομορφές των PHDs (PHD1, PHD2, PHD3, PHD4) οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στους ιστούς, διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό και στοχεύουν εξειδικευμένα υποστρώματα (42). Οι PHDs1-3 εκφράζονται σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Η PHD-2 είναι γενικά η ισομορφή που συναντάται σε μεγαλύτερη αφθονία, με εξαίρεση τους όρχεις, όπου η έκφραση της PHD-1 είναι μεγαλύτερη και την καρδιά, όπου κυριαρχεί η έκφραση της PHD-3 (43). Η απώλεια της PHD-1 μειώνει την κατανάλωση οξυγόνου των σκελετικών μυών και του ήπατος με τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού της γλυκόζης από την αερόβια προς την αναερόβια παραγωγή ATP, γεγονός που υποδηλώνει προκαλούμενη από την PHD-1, επιλεκτική ανοχή στην υποξία (44, 45). Η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την *PHD-2*, αλλά όχι των *PHD-1* και *PHD-3*, οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο εξαιτίας ανωμαλιών της καρδιάς και του πλακούντα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η PHD-2 είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης των ποντικών (46). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε ενήλικες ποντικούς η απαλοιφή της PHD-2 οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η PHD-2 είναι σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της αγγειακής ανάπτυξης (47, 48). Η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την *PHD-3* αυξάνει την αγγειογένεση και διατηρεί την καρδιακή λειτουργία μετά από έμφραγμα, μέσω σταθεροποίησης της HIF-1α υπομονάδας (49). Η PHD1 εμφανίζει κυρίως πυρηνική κατανομή και έχει δειχθεί ότι ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών όπως ο NF-κB (50). Η PHD2 ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και φαίνεται να ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών όπως η NDRG3 (51). Η PHD3 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και τη νευρωνική ανάπτυξη (52). Τέλος, η PHD4 συσσωρεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει συσχετιστεί με την διέγερση της αγγειογένεσης μέσω του μονοπατιού του TGF-α (53). Οι PHD1 και η PHD3 παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τον HIF-2α συγκριτικά με τον

HIF-1α (54). Οι PHD2 και PHD3 φέρουν στον υποκινητή τους στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE και φαίνεται ότι η έκφρασή τους επάγεται από την υποξία. Αυτό ίσως αποτελεί έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης κατά τον οποίο μετά από παρατεταμένη υποξία οι HIF επάγουν την έκφραση των ενζύμων που οδηγούν τις HIFα υπομονάδες για αποικοδόμηση (55). Η επαγωγή των PHDs από την υποξία πιθανώς σχετίζεται με διαφορετική ρύθμιση των HIF σε οξεία και παρατεταμένη υποξία, μια ρύθμιση που εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα. Μελέτες της ενζυμικής δράσης έδειξαν ότι οι PHDs και ο FIH έχουν πολύ διαφορετικές σταθερές συγγένειας με το οξυγόνο. Η Km του FIH-1 για το οξυγόνο είναι 3 φορές χαμηλότερη από αυτή των PHDs. Έτσι μια μικρή πτώση της συγκέντρωσης του οξυγόνου θα αναστείλει αρχικά τη δράση των PHDs και όχι του FIH-1. Προκειμένου να ανασταλεί η ενζυμική δράση του FIH-1, απαιτείται μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Η ρύθμιση του HIF-2α μέσω της δράσης διακριτών υδροξυλασών αντιπροσωπεύει ένα αυστηρό σύστημα ελέγχου. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, εξασφαλίζεται ότι ακόμα και αν μια μικρή ποσότητα HIF-2α διαφύγει από τη δράση των PHDs και δεν αποικοδομηθεί, η μεταγραφική του δράση θα εξακολουθήσει να επηρεάζεται λόγω της δράσης του FIH-1. Πειράματα αποσιώπησης ή υπερέκφρασης του FIH έχουν αναδείξει τη διαφορετική λειτουργική δράση των επικρατειών μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD και N-TAD. Όταν ο FIH-1 υπερεκφράζεται, η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την C-TAD εντοπίζεται σε έντονα υποξικές περιοχές ενώ όταν ο FIH αποσιωπάται εντοπίζεται και σε περιοχές κοντά στα αιμοφόρα αγγεία που είναι λιγότερο υποξικές. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την N-TAD δεν εξαρτάται από τη ρύθμιση της δράσης του FIH-1. Συνεπώς, ο παράγοντας FIH-1 λοιπόν, εκτός από αναστολέας της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, διαχωρίζει και τα γονίδια στόχους του HIF-2 που επάγονται από την επικράτεια N-TAD από αυτά που επάγονται από την C-TAD (56) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Επιλογή των γονιδίων στόχων του HIF-2 από τον FIH. Η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την C-TAD (μπλε) μετατοπίζεται σε έντονα υποξικές περιοχές όταν ο FIH υπερκφράζεται και σε μέτρια έντονα υποξικές περιοχές κοντά στα αιμοφόρα αγγεία όταν ο FIH αποσιωπάται. Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την N-TAD (πράσινο) δεν εξαρτάται από τη ρύθμιση της δράσης του FIH (56).

### 1.3.1.2 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και τα μιτοχόνδρια

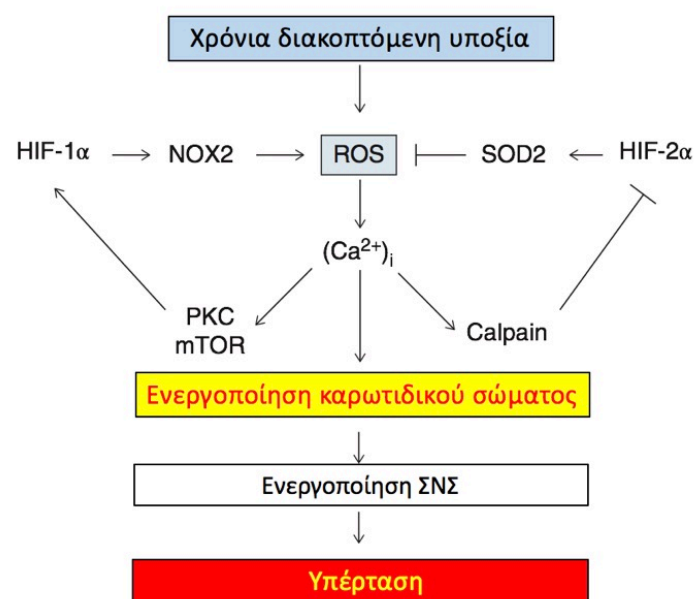
Η έλλειψη οξυγόνου οδηγεί στην παραγωγή ενεργών ριζών από τα μιτοχόνδρια. Οι ενεργές ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια με ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων που χρησιμοποιούν  $O_2$  όπως του κυτοχρώματος P450, των οξειδασών των αμινοξέων, των οξειδασών NADH/ NADPH και της συνθάσης του NO. Κάποιες από τις σημαντικότερες ενώσεις ROS είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $HO\bullet$ ), το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2\bullet$ ) και το μονοξειδίο του αζώτου ( $NO\bullet$ ). Τα κύτταρα χρησιμοποιούν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για να αντιμετωπίσουν τα ROS, που περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), και η καταλάση (CAT). Ωστόσο, όταν η υπέρμετρη παραγωγή ROS δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κυττάρου, το έντονο οξειδωτικό περιβάλλον προκαλεί βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στους πολυσακχαρίτες. Τα ROS δρουν επίσης και ως σήματα που ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης και την μεταβολή του κυτταρικού κύκλου (57). Τα μιτοχόνδρια μέσω των ROS εμπλέκονται

σε πολλές υποξικές διαδικασίες που είτε εξαρτώνται από τους HIF είτε όχι. Τα ROS σταθεροποιούν τους HIF-1α και HIF-2α μέσω στοιχείων του συμπλέγματος III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, όπως το κυτόχρωμα c και οι πρωτεΐνες σιδήρου-θείου (58). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι για τη σταθεροποίηση των HIFα υπομονάδων είναι απαραίτητη η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω του κυτοχρώματος c. Σε χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων βρέθηκε ότι η επαγωγή του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας απαιτεί λειτουργικά μιτοχόνδρια, χωρίς όμως να εμπλέκονται σε αυτό ο μηχανισμός των ROS (59). Η απαλοιφή του γονιδίου *junD* σε ποντίκια που επιδεικνύουν υψηλά επίπεδα ROS, οδηγεί σε σταθεροποίηση των HIFα υπομονάδων σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Τα υψηλά επίπεδα  $H_2O_2$ , οδηγούν σε οξείδωση του  $Fe^{2+}$ , που είναι απαραίτητος για την καταλυτική δράση των PHDs και την ακόλουθη σταθεροποίηση των HIFα υπομονάδων. Συνεπώς, παρατηρείται αυξημένη σταθεροποίηση των HIFα υπομονάδων (60). Τέλος, μελέτες που έγιναν σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL, έδειξαν ότι αυξάνεται η έκφραση της οξειδάσης του NADPH με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS. Τα αυξημένα ROS, διατηρούν την έκφραση της HIF-2α υπομονάδας και συμβάλλουν στη νεφρική καρκινογένεση (61).

### 1.3.1.3 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από τη διακοπόμενη υποξία

Ως διακοπόμενη υποξία (Chronic Intermittent Hypoxia, CIH) ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο η συγκέντρωση του οξυγόνου στους ιστούς εναλλάσσεται μεταξύ φυσιολογικών και υποξικών επιπέδων. Η συνεχής εναλλαγή των επιπέδων του οξυγόνου σχετίζεται με την επαναλαμβανόμενη υπνική άπνοια, όπου παροδικές παύσεις της αναπνοής οδηγούν σε χρόνια διακοπόμενη υποξία κατά τη διάρκεια του ύπνου. Κατά την διακοπόμενη υποξία, επάγεται η έκφραση της οξειδάσης 2 του NADPH (NOX2), ενός ενζύμου που παράγει υπεροξειδίο (62). Αρχικά, κατά την CIH παράγονται ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) που προκαλούν αύξηση της έκφρασης της HIF-1α υπομονάδας. Στη συνέχεια, ο HIF-1 επάγει την έκφραση της NOX2, που οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή ROS. Έτσι, δημιουργείται ένας βρόγχος θετικής ανατροφοδότησης που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ROS και HIF-1α. Τα αυξημένα επίπεδα ROS έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την πρωτεΐνη στόχο της ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mTOR) που μεσολαβούν στην αυξημένη σύνθεση και σταθερότητα του HIF-1α (63). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ τα επίπεδα του HIF-1α είναι χαμηλά στο καρωτιδικό σώμα (Carotid Body) και αυξάνονται κατά τη διάρκεια της CIH, τα βασικά επίπεδα

του HIF-2α αντιθέτως είναι υψηλά και μειώνονται μετά την CIH (64). Τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου προκαλούν αυξημένη δραστηριότητα των καλπαϊνών, πρωτεάσες που ενεργοποιούνται από ιόντα ασβεστίου  $Ca^{2+}$  και καταστέλλουν την έκφραση της HIF-2α υπομονάδας. Κατά συνέπεια μειώνεται η έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD2) (64). Η αναστολή του HIF-2α φαίνεται να συνεισφέρει στην αύξηση των ROS κατά τη διακοπτόμενη υποξία. Η απορρύθμιση των HIFs επάγει την παραγωγή ROS στο καρωτιδικό σώμα, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του Συμπαθητικού Νευρικού Συστήματος (ΣΝΣ) και υπέρταση (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Η χρόνια διακοπτόμενη υποξία (Chronic Intermittent Hypoxia, CIH) οδηγεί σε απορρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF-1α και HIF-2α. Η απορρύθμιση των HIFs επάγει την παραγωγή ROS στο καρωτιδικό σώμα, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του Συμπαθητικού Νευρικού Συστήματος (ΣΝΣ) και υπέρταση (65).

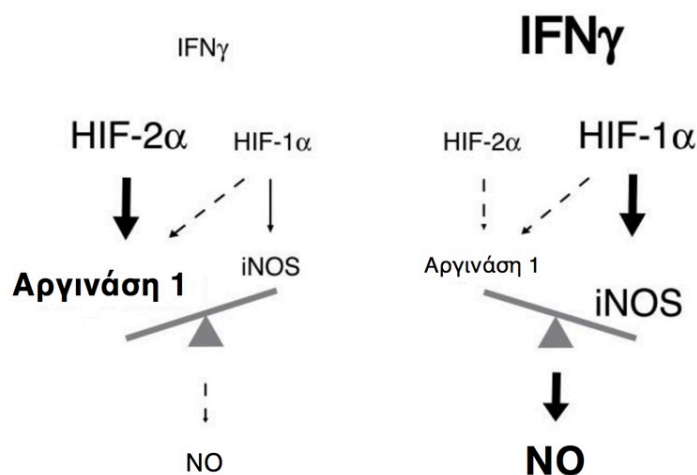
### 1.3.2 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΤΟ ΟΞΥΓΟΝΟ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ HIF-2Α ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ

Ο HIF-2α ρυθμίζεται από πολλούς μηχανισμούς ανεξάρτητους από το οξυγόνο σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου *EPAS1*, μετάφρασης του mRNA του και σταθεροποίησης της α υπομονάδας. Επιπλέον, μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ρυθμίζουν την είσοδό του στον πυρήνα, τον διμερισμό του με τον ARNT, την πρόσδεση του ετεροδιμερούς HIF-2 στο DNA και τον σχηματισμό του μεταγραφικού συμπλόκου.



### 1.3.2.1 Ρύθμιση της μεταγραφής της HIF-2α υπομονάδας

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-2α είναι λίγα. Μια μελέτη έχει αναδείξει έναν μηχανισμό για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στα μακροφάγα στον οποίο οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α δρουν ανταγωνιστικά (**Εικόνα 11**). Οι κυτταροκίνες ιντερλευκίνη-4 (IL-4) και ιντερλευκίνη-13 (IL-13) που παράγονται από τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα 2 (T<sub>H</sub>2), ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου *EPAS1* στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M2, οδηγώντας σε επαγωγή της έκφρασης της αργινάσης 1 και την ακόλουθη μείωση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO). Αντίθετα, η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) που παράγεται από τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα 1 (T<sub>H</sub>1), ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου *HIF1A* στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M1, οδηγώντας σε επαγωγή της έκφρασης της συνθάσης του μονοξειδίου του (iNOS) και την ακόλουθη αύξηση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) (**66**).

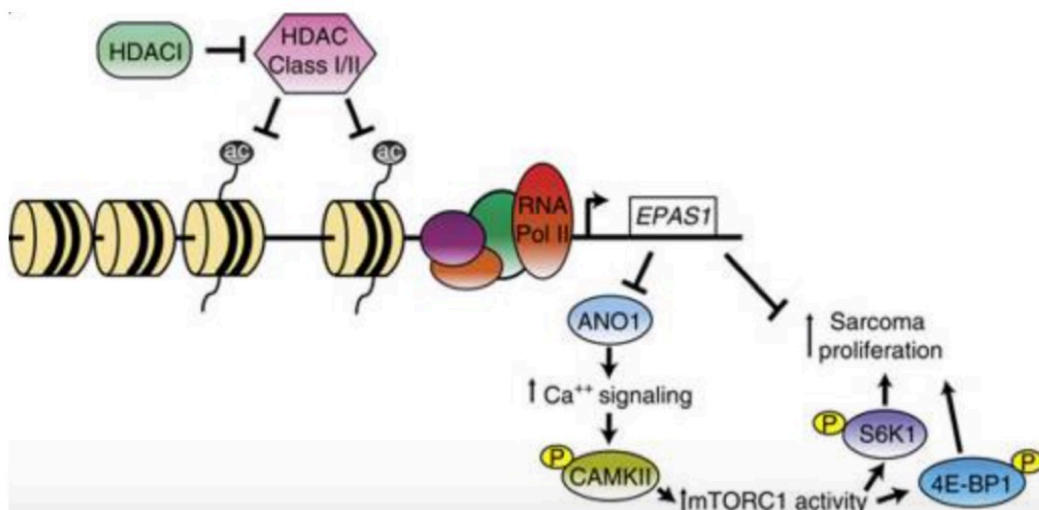


**Εικόνα 11:** Οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α δρουν ανταγωνιστικά για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- γ είναι χαμηλή, επάγεται η έκφραση του HIF-2α που οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της Αργινάσης 1 και μείωση της παραγωγής NO. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- γ είναι υψηλή, επάγεται η έκφραση του HIF-1α που οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της Συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) και αύξηση της παραγωγής NO (**66**).

Η μεταγραφή του HIF-2α ελέγχεται επίσης από επιγενετικές τροποποιήσεις. Μια πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-468, ανέδειξε έναν μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης της μεταγραφής του mRNA του γονιδίου *EPAS1* από την πρωτεΐνη MBD3 (Methylated CpG binding protein 3). Πιο συγκεκριμένα, η MBD3 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *EPAS1*, απομεθυλώνει περιοχές CpG στη θέση έναρξης της μεταγραφής, διευκολύνοντας έτσι τη μεταγραφή του (**67**). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η μεταγραφή του HIF-2α ελέγχεται από τη σηματοδότηση του IGF1R (Insulin like Growth



Factor 1 Receptor) και τη δράση της PI3K (phosphoinositide 3-kinase) και του συμπλέγματος mTORC2 (mTOR Complex 2) (68). Η από-ουβικιτινυλάση Cezanne εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της σύνθεσης του mRNA του HIF-2α. Η Cezanne μέσω της δράσης από-ουβικιτινυλάσης, ελέγχει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 (E2F transcription Factor 1) που συνδέεται απευθείας στον υποκινητή του γονιδίου *EPAS1* (69). Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *EPAS1* ρυθμίζεται αρνητικά από τις από-ακετυλάσες των ιστονών HDAC τάξης I/II (Εικόνα 12). Η μειωμένη έκφραση του HIF-2α, ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω ασβεστίου, οδηγώντας σε αυξημένη δράση του συμπλόκου mTORC1 και επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ποντίκια με σάρκωμα (70).



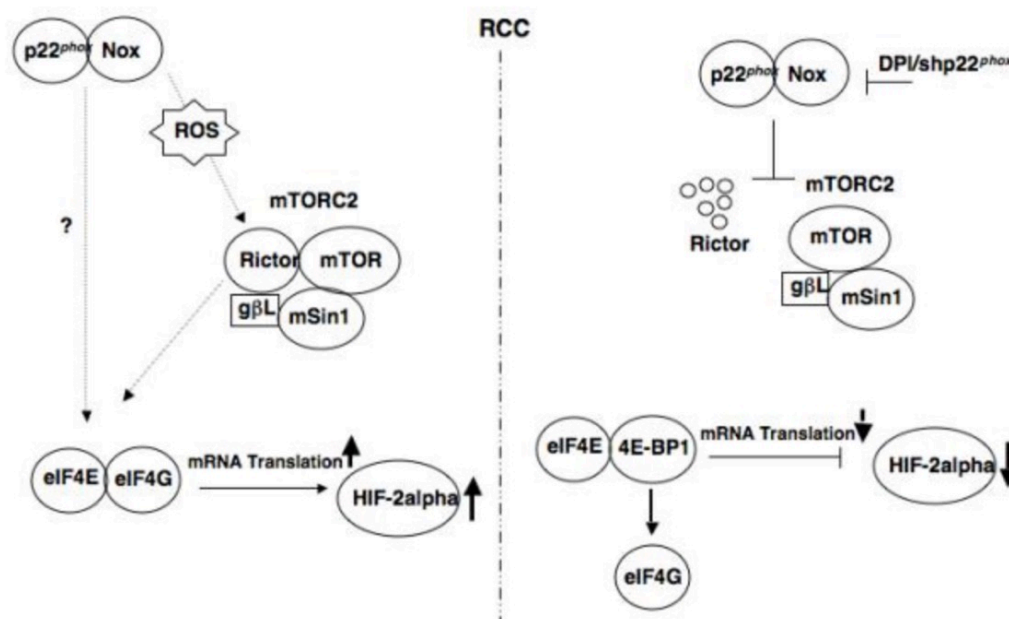
**Εικόνα 12:** Η έκφραση του γονιδίου *EPAS1* καταστέλλεται επιγενετικά από τις τάξεις I και II των αποακετυλασών των ιστονών (HDACs). Η μειωμένη έκφραση του HIF-2α, οδηγεί σε μειωμένη δράση της Ανοκταμίνης 1 (ANO1), ενισχύοντας τη σηματοδότηση μέσω ασβεστίου, και τη δράση του συμπλόκου mTORC1 (70).

### 1.3.2.2 Ρύθμιση της μετάφρασης της HIF-2α υπομονάδας

Στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-2α παίζει καθοριστικό ρόλο η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR. Σε αυτό το μηχανισμό ρύθμισης συμμετέχουν μόρια που διεγείρουν με ιστο-ειδικό τρόπο τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου *EPAS1* (71). Η πρωτεΐνη mTOR συμμετέχει σε δύο διακριτά σύμπλοκα, το mTORC1 και το mTORC2. Το mTORC1, που αποτελείται από την mTOR κινάση και τον ρυθμιστικό παράγοντα Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) που αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη. Η PI3K ενεργοποιεί τις κινάσες AKT και mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Η mTOR στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την p70 S6 κινάση (S6K), που

φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη που προσδένεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (4E-BP1). Η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 από τον mTOR παρεμποδίζει την πρόσδεσή του στον eIF-4E με αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' καλύπτρα. Το μονοπάτι αυτό διεγείρει την μετάφραση μιας ομάδας mRNA συμπεριλαμβανομένου και του *HIF1A*. Το mTORC2, που αποτελείται από την mTOR κινάση και τον ρυθμιστικό παράγοντα Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) δεν είναι ευαίσθητο στην αναστολή με ραπαμυκίνη και ενεργοποιεί την AKT μέσω φωσφορυλίωσης (72).

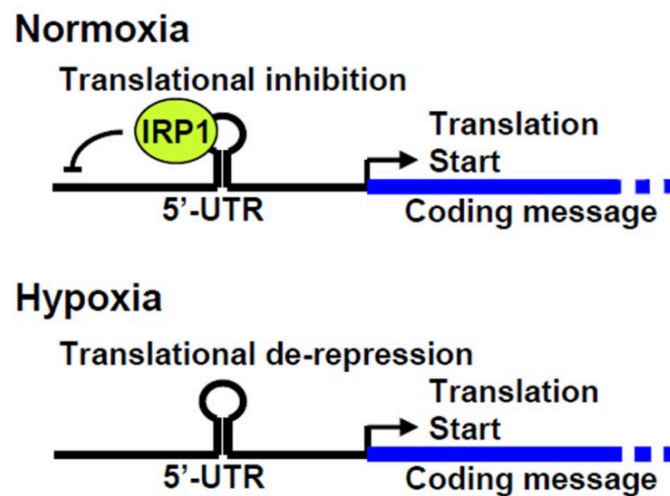
Η έκφραση της HIF-2α ισομορφής, εξαρτάται από το σύμπλοκο mTORC2 και όχι από το mTORC1 πιθανώς μέσω οξειδοαναγωγικής ρύθμισης του mTORC2 από τις p22<sup>phox</sup>-Nox οξειδάσες (Εικόνα 13). Έχει αναφερθεί επίσης στη βιβλιογραφία ότι η έκφραση του HIF-2α ελέγχεται από την κινάση AKT2 ενώ η έκφραση του HIF-1α από την κινάση AKT3 (73, 74).



**Εικόνα 13:** Σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος οι οξειδάσες p22<sup>phox</sup>-Nox προκαλούν τη συσσώρευση ROS. Έτσι σταθεροποιείται πρωτεΐνη Rictor και συγκροτείται το σύμπλοκο mTORC2 που επάγει την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α (73).

Επιπλέον, η 5' αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) του mRNA του *EPAS1* περιλαμβάνει ένα συντηρημένο, λειτουργικό στοιχείο απόκρισης στον σίδηρο IRE (iron-responsive element), όπου συνδέεται η ρυθμιζόμενη από τον σίδηρο πρωτεΐνη IREBP1 (IRE binding protein1). Σε νορμοξία, η IREBP1 συνδέεται στο IRE της 5'UTR του mRNA του *EPAS1* και αναστέλλει την μετάφρασή του (Εικόνα 14) (75). Αντίθετα, η IREBP1 δεν συνδέεται στο mRNA του

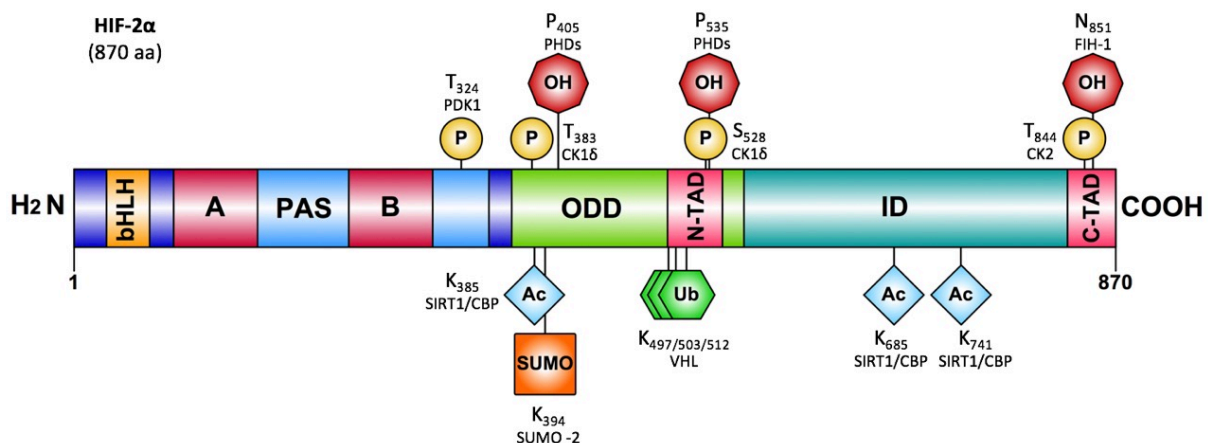
*HIF1A* (76), υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση αυτή είναι ειδική για τον HIF-2α. Πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η κυκλοπεντόνη της προσταγλανδίνης (15d-PGJ2), ενισχύει την πρόσδεση της IREBP1 στο IRE του HIF-2α αναστέλλοντας έτσι ειδικά την έκφραση του HIF-2α (77).



**Εικόνα 14:** Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η ρυθμιζόμενη από τον σίδηρο πρωτεΐνη (IRP1) προσδέεται σε ένα λειτουργικό στοιχείο απόκρισης στο σίδηρο IRE (iron-responsive element) στην (5' UTR) του mRNA του EPAS1 και αποτρέπει τη μετάφρασή του. Σε υποξία όμως, όταν τα επίπεδα σιδήρου είναι επαρκή, η IRP1 δεσμεύει σίδηρο και αποτρέπεται η σύνδεσή της με το IRE. Έτσι επιτρέπεται η πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α (76).

### 1.3.2.3 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

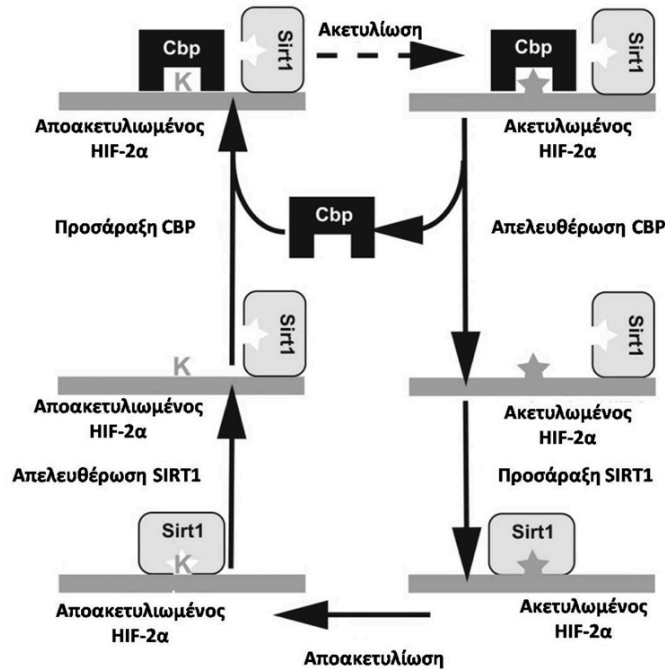
Μετά τη μετάφραση, ο HIF-2α ρυθμίζεται είτε μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλες πρωτεΐνες είτε με την τροποποίησή του από διάφορα ένζυμα που επηρεάζουν την πρωτεϊνική της σταθερότητα, τον υποκυτταρικό της εντοπισμό, την αλληλεπίδρασή της με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15:** Σχηματική αναπαράσταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της HIF-2α υπο μονάδας. Απεικονίζονται επίσης τα ένζυμα που ευθύνονται για αυτές τις τροποποιήσεις, καθώς και τα κατάλοιπα που τροποποιούνται.

#### 1.3.2.3.1 Ακετυλίωση

Η ακετυλίωση είναι η αντίδραση αντικατάστασης ενός ενεργού ατόμου υδρογόνου με μια ομάδα ακετυλίου (CH<sub>3</sub>-CO). Η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης (K) είναι μια αντιστρεπτή μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται από ένζυμα με δράση ακετυλοτρανσφεράσης. Η εξουδετέρωση του θετικού φορτίου της λυσίνης, αλλάζει τις ιδιότητες της πρωτεΐνης που τροποποιείται. Η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή η αφαίρεση της ακετυλομάδας, πραγματοποιείται από τις απακετυλάσες. Η ανεξάρτητη από τη CTAD επικράτεια μεταγραφική δράση του HIF-2, ρυθμίζεται από έναν μηχανισμό ακετυλίωσης /απακετυλίωσης της HIF-2α υπομονάδας από τον CBP και την απακετυλάση Sirt1. Η Sirt 1 ανήκει σε μια οικογένεια εξαρτώμενων από το NAD<sup>+</sup> και ευαίσθητων στο οξειδοαναγωγικό στρες απακετυλασών και περιλαμβάνει 7 μέλη (Sirt 1-7). Οι σιρτουΐνες εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης και η ρύθμιση στις οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (71). Αρχικά, είχε βρεθεί ότι σε συνθήκες υποξίας, η Sirt1 αλληλεπιδρά με την HIF-2α υπομονάδα και αποακετυλιώνει τα κατάλοιπα λυσίνης Lys-385, Lys-685 και Lys-741 (78). Η τροποποίηση αυτή, διευκολύνει την προσάραξη του HIF-2α στον υποκινητή της EPO, και κατ' επέκταση τη μεταγραφική δράση του HIF-2α. Το σύστημα Sirt1/HIF-2α, βρέθηκε να ρυθμίζει την ηπατική και νεφρική έκφραση της EPO in vitro σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B και in vivo σε ποντίκια. Ακολούθως, βρέθηκε ότι ο υποκινητής του γονιδίου *SIRT1*, φέρει στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE στα οποία προσαράζει ο HIF-2 και επάγει την έκφρασή του σε συνθήκες υποξίας. Αναδείχθηκε έτσι ένα σύστημα θετικής ανατροφοδότησης μεταξύ της απακετυλάσης Sirt1 και του HIF-2α (79). Στη συνέχεια, η ίδια ομάδα έδειξε ότι ο παράγοντας CBP είναι υπεύθυνος για την ακετυλίωση του HIF-2α στην παραπάνω σηματοδοτική ρύθμιση, αναδεικνύοντας μια καινούρια σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ CBP/HIF-2α σε ρόλο ενζύμου-υποστρώματος αντίστοιχα (Εικόνα 16) (80).



**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση της ανεξάρτητης από τη CTAD ρύθμισης του HIF-2α μέσω Sirt1/CBP. Η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης (N851) της CTAD επικράτειας του HIF-2α από τον FIH-1, εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τους συμπαραγόντες της μεταγραφής CBP/P300 και την . Ωστόσο, η απακετυλιωμένη HIF-2α υπομονάδα μπορεί να στρατολογήσει τον CBP μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει το σχηματισμό συμπλόκου με σχέση ενζύμου-υποστρώματος και την ακετυλίωση του HIF-2α από τον CBP. Μετά την ακετυλίωση, ο CBP αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο και ο HIF-2α αποακετυλιώνεται από τη Sirt1 η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με τον HIF-2α ανεξάρτητα από το προφίλ ακετυλίωσης του. Ο απακετυλιωμένος HIF-2α είναι ξανά σε θέση να δεσμεύσει τον CBP και να επαναληφθεί η παραπάνω κυκλική διαδικασία (80).

### 1.3.2.3.2 Σουμοϋλίωση

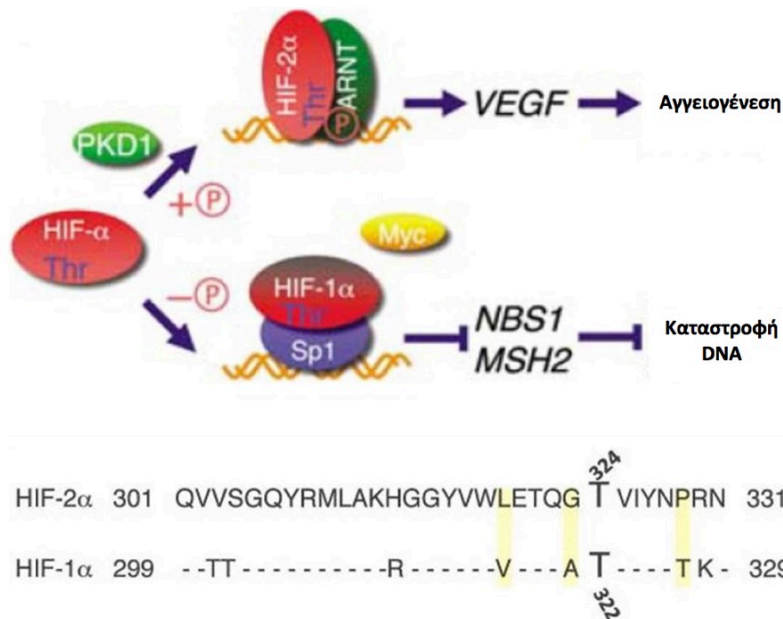
Η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) είναι μια πρωτεΐνη 100 περίπου αμινοξέων που προσδένεται ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες στόχους και τροποποιεί τη λειτουργία τους. Η ώριμη SUMO πρωτεΐνη παράγεται όταν τα τέσσερα τελευταία αμινοξέα της καρβοξυ-τελικής του περιοχής αποκόπτονται ώστε να δημιουργηθεί ένας ισοπεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβοξυ-τελικού καταλοίπου γλυκίνης της SUMO και ενός καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου. Η σουμοϋλίωση, έχει συνδεθεί με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα, η ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων, ο μεταβολισμός του RNA, η αντιγραφή και η επιδιόρθωση του DNA και ο κυτταρικός κύκλος (81).

Ο HIF-2α αποτελεί ένα παράδειγμα πρωτεΐνης στόχου σουμοϋλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι αμινοξικές αλληλουχίες LK394EE και LK497IE της HIF-2α υπομονάδας αποτελούν περιοχές ομοιοπολικής σύνδεσης της SUMO πρωτεΐνης. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στο κατάλοιπο λυσίνης 394 του HIF-2α μειώνοντας τη

μεταγραφική του ενεργότητα. Η σουμοϋλίωση του HIF-2α φαίνεται να ρυθμίζει την πρωτεϊνική του σταθερότητα σε υποξία μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τη λιγάση RNF4, την πρωτεάση SENP1 και τον VHL. Ο σουμοϋλιωμένος HIF-2α αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα **(82)**.

#### 1.3.2.3.3 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια μέτα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία μια γ-φωσφορική ομάδα ενός μορίου ATP προστίθεται στην ομάδα υδροξυλίου ενός καταλοίπου σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης (S, T, Y). Τα ένζυμα που καταλύουν αυτή την αντίδραση ονομάζονται κινάσες. Η αντίστροφη αντίδραση, ονομάζεται αποφωσφορυλίωση, και καταλύεται από τις φωσφατάσες. Έχει βρεθεί ότι η κινάση της πρωτεΐνης DI (PKD1) φωσφορυλιώνει τον HIF-2α στο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-324 αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή του με τον παράγοντα μεταγραφής SP1 (Specificity Protein 1) και την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα νιμπρίνη (NSBS1) που είναι απαραίτητος για το μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA **(83)**. Η τροποποίηση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ενός γειτονικού, στη θρεονίνη 324, καταλοίπου προλίνης που συναντάται αποκλειστικά στην αμινοξική αλληλουχία του HIF-2α. Ο HIF-1α δεν φωσφορυλιώνεται στο αντίστοιχο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-322 και αλληλεπιδρά με τον SP1. Έτσι παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον MYC και καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα διακριτής ρύθμισης των HIFα υπομονάδων από φωσφορυλίωση, καθώς επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την αλληλεπίδρασή τους με συμπάροντες της μεταγραφής, αποδίδοντάς τους έτσι διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους **(Εικόνα 17)**.

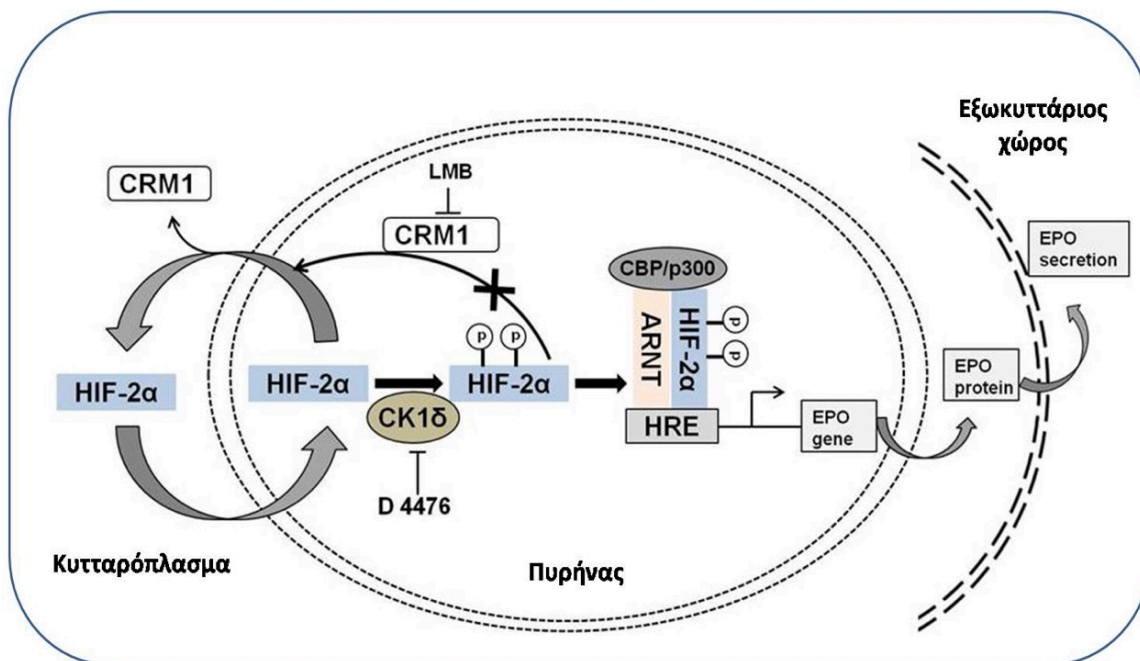


**Εικόνα 17: Μοντέλο της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από την PDK1.** Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη 324 από την PDK1. Το αντίστοιχο κατάλοιπο θρεονίνης (T322) του HIF-1α δεν τροποποιείται από την PDK1, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον MYC. Έτσι, ο HIF-1α συνδέεται με τον SP1 και καταστέλλεται η δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA (83).

Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται επίσης από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) στο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-844 που βρίσκεται στην επικράτεια C-TAD, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 (84). Η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τη CK2, μειώνει την συγγένεια του HIF-2α με τον ανασταλτικό παράγοντα FIH, γεγονός που εξηγεί την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 όταν η HIF-2α υπομονάδα φωσφορυλιώνεται από τη CK2 (85).

Πρόσφατα ευρήματα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ), φωσφορυλιώνει τον HIF-2α σε δύο αμινοξικά κατάλοιπα, τη Ser-383 και τη Thr-528 της HIF-2α υπομονάδας. Η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ συμβάλλει στην αποτελεσματική συσσώρευση του HIF-2α στον πυρήνα και κατ' επέκταση την πλήρη μεταγραφική του ενεργότητα, καθώς αποτρέπει την εξαρτώμενη από τη CRM-1εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα (Εικόνα 18) (86). Ωστόσο, από δεδομένα του εργαστηρίου μας, έχει δειχθεί ότι η CK1δ ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-1. Πιο συγκεκριμένα, η CK1δ φωσφορυλιώνει την HIF-1α υπομονάδα στη Ser247 και παρεμποδίζει το διμερισμό της με τον ARNT(87, 88). Οι HIF1-α και HIF2-α παρουσιάζουν μεγάλη αμινοξική ομολογία στην επικράτεια PAS-B όπου τροποποιούνται οι δυο HIF-α υπομονάδες από τη CK1δ. Έτσι, το γεγονός ότι η CK1δ φωσφορυλιώνει τις δυο HIF-α υπομονάδες σε διακριτά κατάλοιπα και ρυθμίζει τη δράση τους με αντίθετο τρόπο, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.





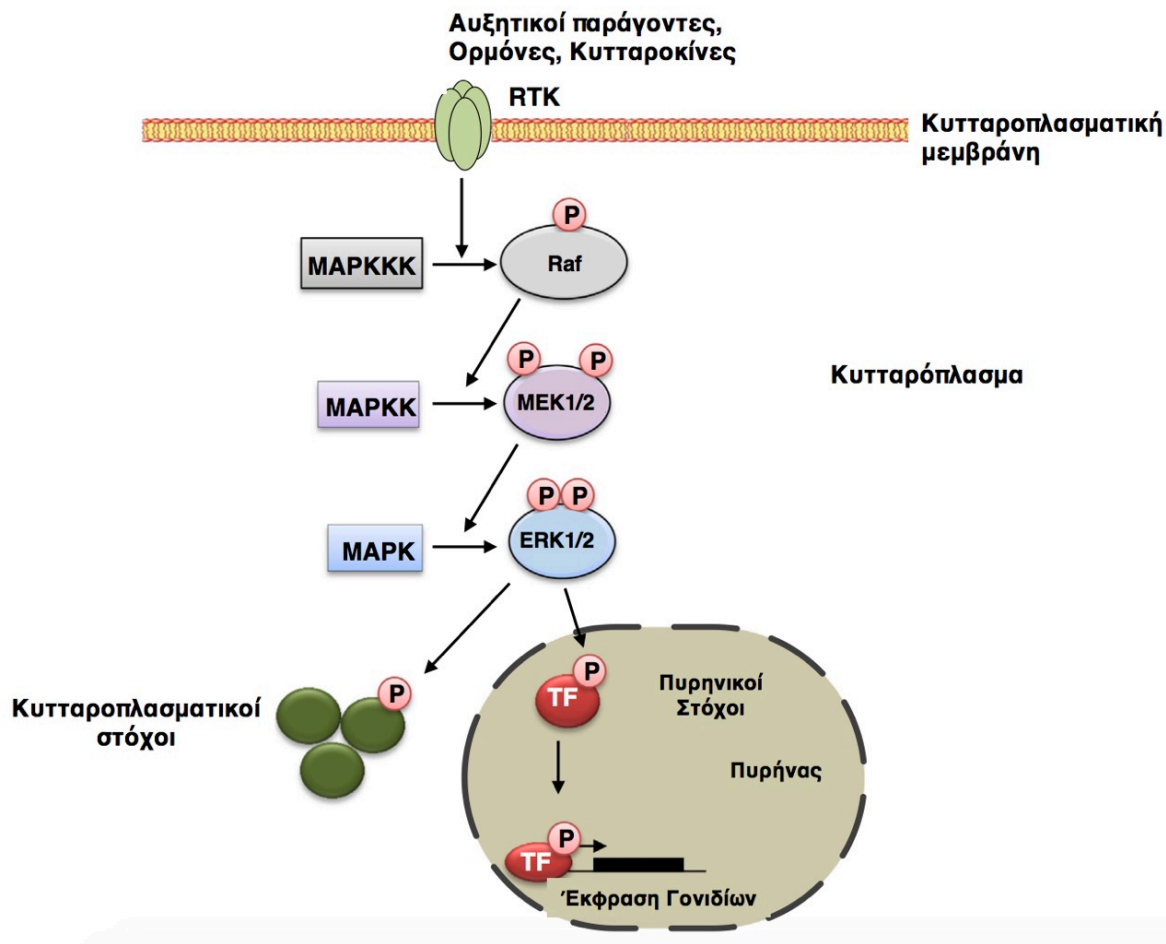
**Εικόνα 18: Μοντέλο της ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από τη CK1δ:** Ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τη CK1δ στη Ser383 και τη Thr528. Η φωσφορυλίωση του HIF-2α προκαλεί τη συσσώρευσή του στον πυρήνα καθώς εμποδίζει την εξαρτώμενη από την εξαπορτινή CRM-1 εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, ο HIF-2α διμερίζεται με τον ARNT και άλλους συνενεργοποιητές της μεταγραφής και επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων του όπως του γονιδίου της *EPO* σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (86).

#### 1.3.2.3.4 Οικογένεια των κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (Extracellular signal Regulated Kinases ERK1/2)

Η οικογένεια των κινασών πρωτεϊνών αποτελείται από 518 γονίδια, που αντιστοιχούν στο 1,7% περίπου του ανθρώπινου γονιδιώματος (89) και διαδραματίζουν βασικό ρυθμιστικό ρόλο σε έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών (90). Οι κινάσες πρωτεϊνών καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς της γ φωσφορικής ομάδας ( $PO_3^{-2}$ ) ενός μορίου ATP σε ένα υπόστρωμα πρωτεΐνης. Ανάλογα με τη φύση της πλευρικής OH ομάδας που φωσφορυλιώνουν, οι κινάσες ταξινομούνται ως κινάσες πρωτεϊνών σερίνης/ θρεονίνης και κινάσες πρωτεϊνών τυροσίνης. Από τα πιο καλά μελετημένα μέλη της οικογένειας είναι οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα, ERK (Extracellular signal Regulated Kinases), οι οποίες φωσφορυλιώνουν σε πρωτεΐνες υποστρώματα τόσο κατάλοιπα τυροσίνης όσο και θρεονίνης. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών από τις ERK1/2 είναι η πιο κοινή κατηγορία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που συναντάται στη μεταγωγή σήματος. Πρόκειται για μια γρήγορη και αναστρέψιμη διαδικασία, καθώς, ένα φωσφορυλιωμένο πρωτεϊνικό υπόστρωμα μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί από φωσφατάσες (91, 92). Οι ERK1/2 ανήκουν στην ευρύτερη



οικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinases MAPK), που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος από την επιφάνεια του κυττάρου στο εσωτερικό του. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ακόμη τις μορφές ERK1-8, την οικογένεια πρωτεϊνικής κινάσης p38 με τις μορφές p38α/β/γ/δ και την οικογένεια κινάσης JNK (c-Jun N-terminal kinase) με τις μορφές JNK1-3 (93-95). Οι κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (Extracellular signal Regulated Kinases ERK1/2) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinase MAPK). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK αποτελούνται από μια κινάση που ρυθμίζεται από μια GTPάση (MAPKKK) που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μία ενδιάμεση κινάση (MAPKK) η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια κινάση τελεστή (MAPK). Στο σηματοδοτικό μονοπάτι ERK-MAPK, αυτά τα συστατικά είναι η Ras GTPase και οι κινάσες πρωτεϊνών Raf, MEK και ERK1/2. Η ογκοπρωτεΐνη Ras και το μονοπάτι ERK-MAPK ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές και χημειοκίνες που προσδέονται σε υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTKs) και σε υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK (96).**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK, καταλύει τη φωσφορυλίωση πολυάριθμων πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, κινάσες, φωσφατάσες και άλλες πρωτεΐνες, αποτελούνται από μια κινάση που ρυθμίζεται από μια GTPάση (MAPKKK) που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μία ενδιάμεση κινάση (MAPKK) η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια κινάση τελεστή (MAPK). Στο σηματοδοτικό μονοπάτι ERK-MAPK, αυτά τα συστατικά είναι η Ras GTPase και οι κινάσες πρωτεϊνών Raf, MEK και ERK1/2. Η ογκοπρωτεΐνη Ras και το μονοπάτι ERK-MAPK ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές και χημειοκίνες που προσδένονται σε υποδοχείς κινάσων τυροσίνης (RTKs) και σε υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες.

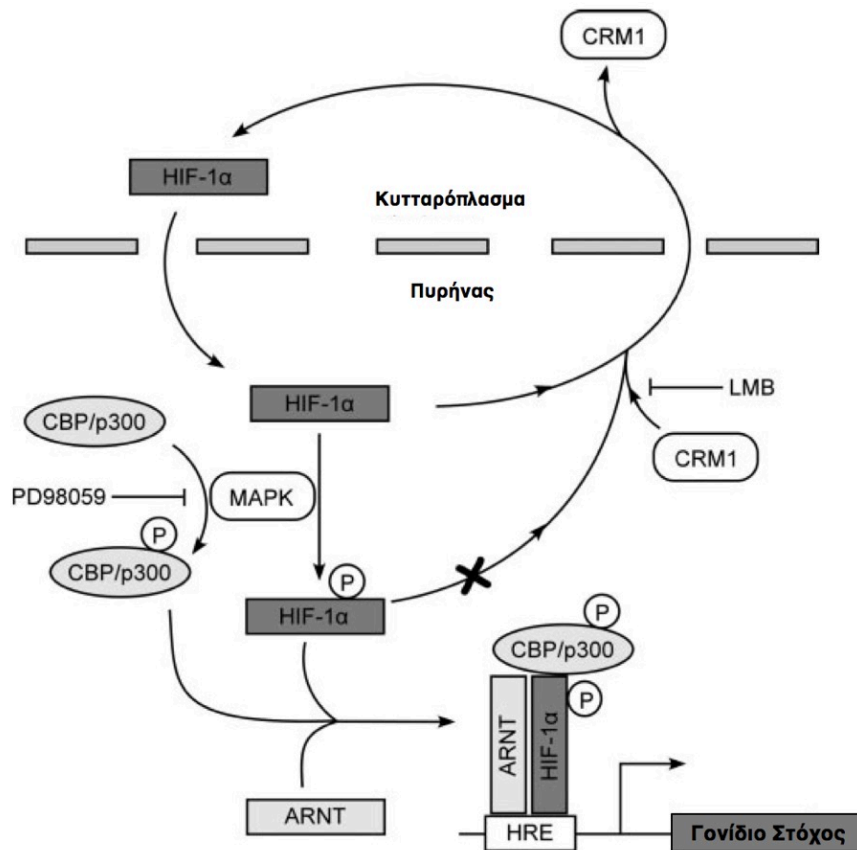
Οι ERK1/2 συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK που συχνά αναφέρεται ως καταρράκτης MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (97). Η σηματοδοτική οδός των MAPK συμμετέχει στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών όπως η κυτταρική προσκόλληση, ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, η κυτταρική επιβίωση η διαφοροποίηση, η μεταγραφή και ο μεταβολισμός.

Η αμινοξική αλληλουχία των ανθρώπινων ERK1 και ERK2 είναι ομόλογες σε ποσοστό 84% και έχουν πολυάριθμες, αν όχι όλες, κοινές λειτουργίες (98). Οι ERK1/2, όπως όλες οι κινάσες,

περιέχουν μοναδικές αμινο-τελικές και καρβοξυ-τελικές αμινοξικές αλληλουχίες που τους προσδίδουν εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμά τους. Η οικογένεια ERK1/2 περιέχει μια ακόμη επικράτεια 31 αμινοξικών καταλοίπων εντός της περιοχής με καταλυτική δράση κινάσης που παρέχει επιπρόσθετη λειτουργική εξειδίκευση. Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης που εμφανίζονται με συγκεκριμένο μοτίβο στην αμινοξική αλληλουχία Ser/Thr-Pro (**99**). Αν ορίσουμε τη θέση φωσφορυλίωσης ως 0 (μηδέν), είναι βασική προϋπόθεση να υπάρχει ένα κατάλοιπο προλίνης στη θέση P+1 προκειμένου να φωσφορυλιωθεί το υπόστρωμα. Μελέτες λεπτομερούς ανάλυσης της εξειδίκευσης των ERK1/2 ως προς τα υποστρώματά τους με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων έδειξαν ότι η αμινοξική αλληλουχία Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro, αντιπροσωπεί τη βέλτιστη πρωτοταγή δομή υποστρώματος των ERK1/2, με ένα κατάλοιπο προλίνης στη θέση P+1 και ένα κατάλοιπο προλίνης στη θέση P-2 (**99**). Οι ERK1/2 διαθέτουν επίσης ειδικές περιοχές στρατολόγησης των υποστρωμάτων τους, την περιοχή στρατολόγησης D (DRS) και την περιοχή στρατολόγησης F (FRS) μέσω των οποίων προσαράζουν στα υποστρώματά τους σε δυο ανεξάρτητες περιοχές πρόσδεσης, την περιοχή D και την περιοχή F αντίστοιχα. Ορισμένα υποστρώματα διαθέτουν μια περιοχή προσάραξης D, άλλα έχουν μια περιοχή προσάραξης F, κάποια έχουν και τις δύο, και μερικά δεν έχουν καμία (**100**). Η περιοχή προσάραξης D περιλαμβάνει υδρόφοβα ( $\Phi$ ) και θετικά φορτισμένα κατάλοιπα και παρουσιάζει συνήθως το μοτίβο  $(R/K)_{2-3}-X_{2-6}-\Phi_A-X-\Phi_B$ . Η περιοχή προσάραξης F συνήθως παρουσιάζει το μοτίβο FXFP. Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες υποστρώματα που μπορεί να έχουν πυρηνικό ή κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Η πυρηνική εισαγωγή και η εξαγωγή των ERK1/2 είναι περίπλοκες διαδικασίες. Ο κύριος μηχανισμός πυρηνικής εισαγωγής της μη φωσφορυλιωμένης ERK2 δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και διαμεσολαβείται από νουκλεοπορίνες (**101, 102**). Η μη ρυθμιζόμενη είσοδος της ERK2 αποτρέπει από τη δέσμευσή της σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος που την αγκυροβολούν στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με τις νουκλεοπορίνες. Η μη φωσφορυλιωμένη ERK2 μπορεί να εξέλθει από τον πυρήνα με δυο μηχανισμούς. Ο πρώτος διαμεσολαβείται από νουκλεοπορίνες ενώ επίσης μπορεί να εξαχθεί με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από την καρυοφερίνη CRM1. Η φωσφορυλίωση των ERK2 διευκολύνει την απρόσκοπτη εισαγωγή τους στον πυρήνα και με μηχανισμούς που δεν απαιτούν κατανάλωση ενέργειας και καρυοφερίνες. Άρα η φωσφορυλίωση αυξάνει το ρυθμό πυρηνική εισαγωγής της ERK2 σε σύγκριση με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Χαρακτηριστικά, πέρα από την κυρίαρχη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από τις MEK1/2, έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλίωση των

ERK1/2 από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2), επίσης διευκολύνει την πυρηνική τους εισαγωγή μέσω της ιμπορτίνης  $\alpha$ -7 (103).

Ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων και παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης των ERK1/2 στον πυρήνα (104). Ο μεταγραφικός παράγοντας Elk1 είναι ένας από τους πιο καλά μελετημένους στόχους των ERK1/2 (105). Το καρβοξυτελικό άκρο του Elk1 περιλαμβάνει μια σειρά καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης (S324, T336, S383, S389 και S422) που αποτελούν στόχο των ERK1/2. Η φωσφορυλίωσή τους οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δράση του Elk1 (106, 107). Οι μεταγραφικοί παράγοντες c-Fos και c-Jun είναι επίσης δυο καλά μελετημένοι πυρηνικοί στόχοι φωσφορυλίωσης των ERK1/2. Η φωσφορυλίωση του c-Fos από τις ERK1/2 στη σερίνη 374 (S374) εμποδίζει την αποικοδόμησή του (108, 109). Η φωσφορυλίωση του c-Jun από τις ERK1/2 και τις JNK1/2 στις σερίνες 63(S63) και 73(S73) αντίστοιχα, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας (110). Στο εργαστήριό μας επίσης, ταυτοποιήθηκαν δύο κατάλοιπα φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τις Ser-641/643 της HIF-1α υπομονάδας. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική του συσσώρευση στον πυρήνα και κατ' επέκταση την πλήρη μεταγραφική του ενεργότητα, καθώς αποκρύπτει ένα γειτονικό σήμα πυρηνικής εξόδου και αποτρέπει την εξαρτώμενη από τη CRM-1 εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα (Εικόνα 20) (111, 112).



**Εικόνα 20: Μοντέλο της ρύθμισης της HIF-1α υπομονάδας από τις ERK1/2:** Ο HIF-1α αφού σταθεροποιηθεί εισάγεται στον πυρήνα από όπου και εξάγεται αποτελεσματικά αλληλοεπιδρώντας με την εξπορτίνη CRM1 μέσω ενός σήματος πυρηνικής εξαγωγής NES. Όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ενεργοποιημένο ο HIF-1α τροποποιείται στις Ser641/643 από τις ERK1/2 και αποκρύπτεται το γειτονικό στις θέσεις φωσφορυλίωσης NES. Έτσι, η HIF-1α υπομονάδα συσσωρεύεται στον πυρήνα, διμερίζεται με τον ARNT, αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία του μεταγραφικού μηχανισμού και επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων της υποξίας (111, 112).

Στη βιβλιογραφία επίσης περιγράφεται ότι οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν επίσης έναν μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα αυτά περιλαμβάνουν φωσφατάσες, κινάσες πρωτεϊνών της οικογένειας RSK, τη φωσφοδιεστεράση του κυκλικού AMP (PDE4), πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες του αποπτωτικού μηχανισμού και πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (105). Η οικογένεια των πρωτεϊνών 90 kDa ριβοσωμικής S6 κινάσης (90 kDa Ribosomal S6 Kinases RSK) είναι μια ομάδα κινάσων πρωτεϊνών σερίνης/θρεονίνης που συμμετέχουν σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση (113). Φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές και χημειοκίνες. Η οικογένεια RSK ρυθμίζει τη μεταγραφή φωσφορυλιώνοντας μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο CREB, τον υποδοχέα των οιστρογόνων, τον πυρηνικό παράγοντα κB (Nuclear Factor-κB, NF-κB), τον πυρηνικό παράγοντα ενεργοποιημένων T κυττάρων 3

(NFAT3) και τον παράγοντα έναρξης της μεταγραφής TIF1A (113). Οι ενεργοποιημένες από τις ERK1/2 RSK φωσφορυλιώνουν ριβοσωμικές πρωτεΐνες και ενισχύουν την έκφραση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 και τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4B (eIF4B). Οι ενεργοποιημένες RSK φωσφορυλιώνουν και αδρανοποιούν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bad (Bcl-2 Associated Death promoter) και η DAPK (Death-Associated Protein Kinase) προάγοντας έτσι την κυτταρική επιβίωση. Οι ενεργοποιημένες RSK προάγουν επίσης την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση καθώς φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν τον εξαρτώμενο από την κυκλίνη αναστολέα της κινάσης p27<sup>KIP</sup> (113). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται με την ακτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, και επηρεάζει τη μορφολογία των κυττάρων, τη μίτωση και τη μεταναστευτική τους ικανότητα. Η Palladin είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη και φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser77 και Ser197 μετά από διέγερση από αυξητικούς παράγοντες. Η φωσφορυλίωσή της οδηγεί μείωση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων (114). Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν επίσης την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), διευκολύνοντας την κινητικότητα κυττάρων COS-7 και ανθρώπινων κυττάρων παγκρεατικού καρκινώματος FG (115).

#### 1.3.2.4 Ρύθμιση του HIF-2α μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες

Ο HIF-2α συνεργάζεται με μια πληθώρα πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αυστηρή ρύθμιση του HIF-2. Ελέγχουν τη σταθερότητα της HIF-2α υπομονάδας, τη μεταγραφική ενεργότητα και την εξειδίκευση του HIF-2 ως προς τα γονιδια-στόχους του (Εικόνα 21).

##### 1.3.2.4.1 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα USF2

Ο μεταγραφικός παράγοντας Upstream Stimulatory Factor (USF2) είναι μεταγραφικός συνενεργοποιητής του HIF-2α. Ο HIF-2α σχηματίζει μεταγραφικό σύμπλοκο με τον USF2, την RNA πολυμεράση II και τον CBP/p300 για την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων στόχων του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας. Ο USF2 έχει δείχθει ότι διευκολύνει τη στρατολόγηση των CBP/p300 στους υποκινητές ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2 όπως η *EPO* και ο *PAI-1* (116). Τα γονίδια αυτά, φέρουν στοιχεία πρόσδεσης του USF2 στους υποκινητές τους. Συνεπώς, η έκφραση των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* μπορεί να επάγεται από τον USF2 ανεξάρτητα από την πρόσδεση του HIF-2α στους υποκινητές τους. Ωστόσο η ταυτόχρονη

στρατολόγηση των δύο μεταγραφικών παραγόντων είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση (21). Σε προηγούμενη δουλειά της ομάδας μας, δείξαμε ότι σε κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος Huh7 το χλωριούχο κοβάλτιο ( $\text{CoCl}_2$ ), που χρησιμοποιείται ευρέως ως μιμητής της υποξίας, ενώ επάγει την έκφραση του HIF-2 $\alpha$ , σε αντίθεση με την υποξία, δεν ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από τον HIF-2 έκφραση του mRNA της EPO και την επακόλουθη παραγωγή και έκκριση της. Επιπροσθέτως, δείξαμε ότι η παρουσία του χλωριούχου κοβαλτίου δεν επηρεάζει γενικά την HRE-εξαρτώμενη μεταγραφή αλλά μάλλον αναστέλλει συγκεκριμένα τη μεταγραφική δράση του HIF-2. Τέλος, δείξαμε ότι αυτή η ειδική επίδραση του χλωριούχου κοβαλτίου στη δραστηριότητα του HIF-2 οφείλεται στη μειωμένη αλληλεπίδραση της HIF-2 $\alpha$  υπομονάδας με τον USF2 (117). Το εύρημα αυτό εξηγεί τη χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 που επάγεται από το χλωριούχο κοβάλτιο.

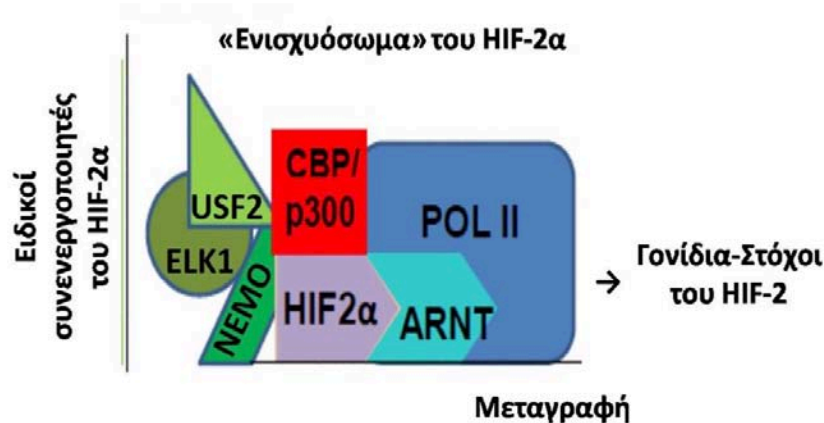
#### 1.3.2.4.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2 $\alpha$ με τον παράγοντα μεταγραφής ELK-1

Ο ETS domain-containing protein (ELK-1) ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ETS-1. Η μεταγραφική ενεργότητα του ELK-1 αυξάνεται μέσω φωσφορυλίωσης από το μονοπάτι των MAPK σε υποξία (118). Σε κύτταρα MCF-7 έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-2 $\alpha$  και ο ELK-1 αλληλεπιδρούν για τη μέγιστη ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-2, *CITED2* και *WISP2*, που φέρουν στον υποκινητή τους αλληλουχίες πρόσδεσης του ELK-1 (119). Σε κύτταρα Hep3B, η αλληλεπίδραση του HIF-2 με τον ELK-1 είναι σημαντική για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-2, *EPO* και *PAI-1*, αλλά δεν παίζει ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2 *IGFBP-1*, *ADM* και *NDRG-1*. Συνεπώς, φαίνεται πως η δράση του ELK-1 ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής του HIF-2 εξαρτάται από τις αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων στόχων του (16).

#### 1.3.2.4.3 Αλληλεπίδραση του HIF-2 $\alpha$ με τον μεταγραφικό παράγοντα NEMO

Ο NF-Kappa-B Essential Modifier (NEMO) είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη και αποτελεί μέρος του συμπλόκου IKK μαζί με τις καταλυτικές κινάσες IKK $\alpha$  και IKK $\beta$ . Το σύμπλοκο IKK φωσφορυλιώνει τον I $\kappa$ -B και τον στοχεύει για αποικοδόμηση, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του NF- $\kappa$ B. Ο NEMO αλληλεπιδρά με την C-TAD επικράτεια του HIF-2 $\alpha$  και διευκολύνει τη στρατολόγηση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή p300, ενισχύοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Η αλληλεπίδραση των παραγόντων HIF-2 και NEMO

πραγματοποιείται σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου. Αποτελεί συνεπώς έναν ιδιαίτερο μηχανισμό ενεργοποίησης της μεταγραφικής δράσης σε νορμοξία (120).



**Εικόνα 21:** Ο HIF-2α δρα ως συστατικό μεταγραφικών συμπλόκων. Η εξειδίκευση του HIF-2α ως προς τα γονίδια στόχους του επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με μεταγραφικούς συμπαραγόντες όπως οι USF2, ELK1 και NEMO, πάνω στους υποκινητές των γονιδίων του (21).

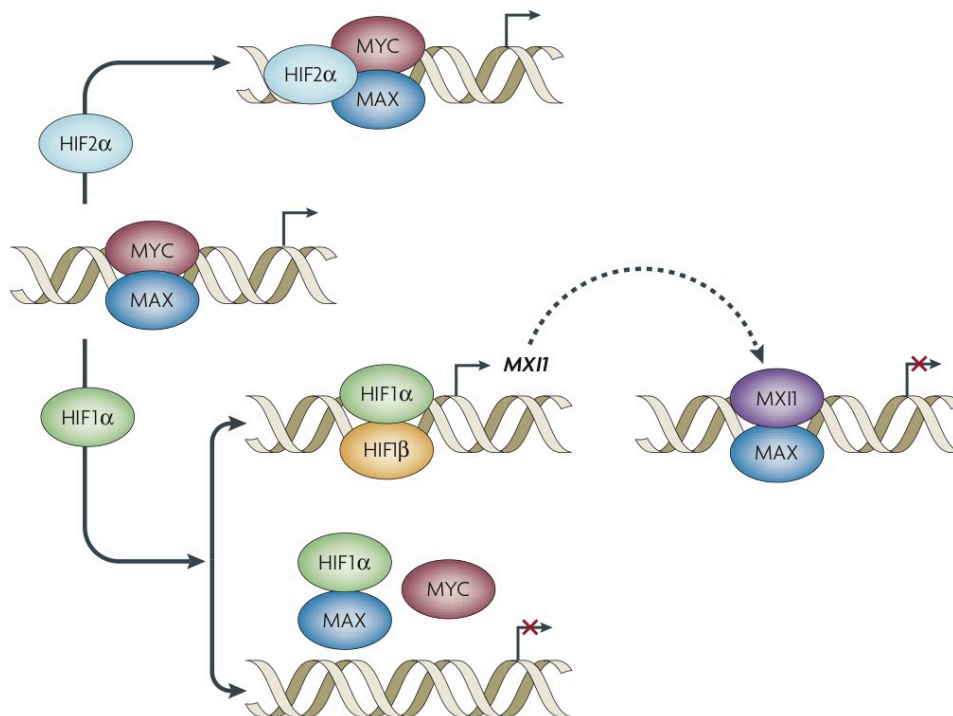
#### 1.3.2.4.4 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα c-MYC

Ο μεταγραφικός παράγοντας c-MYC κωδικοποιείται από το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* και ελέγχει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S. Υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκινικούς όγκους (121, 122). Ο c-MYC επάγει την έκφραση γονιδίων που προάγουν την ανάπτυξη, όπως η κυκλίνη D2 (*CCND2*) και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1. Ο MYC, σε ετεροδιμερές σύμπλοκο με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής Myc-Associated-protein X (MAX) προσαράζει σε συντηρημένες E-Box (CACGTG) αλληλουχίες των γονιδίων στόχων του και ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους. Παράλληλα, σε σύμπλοκο με τον MAX καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες p21 και p27 απομακρύνοντας τον παράγοντα (Specificity Protein) SP1 από τον παράγοντα Myc-interacting zinc finger protein 1 (MIZ1) (123, 124). Καθώς ο MYC εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και είναι ασταθές μόριο, ανταγωνίζεται τη σύνδεση του MAX με παράγοντες όπως ο MAD. Το σύμπλοκο MAD/MAX καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση μέσω E-box αλληλουχιών, ενώ ο MIZ1 χωρίς τον MYC λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής (121).

Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-2α αλληλεπιδρά με τον MYC και σταθεροποιεί τα σύμπλοκα MYC-MAX και MYC-MAX-SP1. Τα σύμπλοκα αυτά προσαράζουν στους υποκινητές των γονιδίων *CCND2*, *E2F1*, *p21*, και *p27* και προωθούν την μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (60) (Εικόνα 22). Σε κύτταρα νεφρικού



καρκινώματος (RCC) τα οποία εκφράζουν αποκλειστικά τον HIF-2α, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων του MYC *BRCA 1*, *BARD1*, *XRCC2*, *BUB1*, *CENPE* που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA προωθώντας τη γενωμική ακεραιότητα και την αντίσταση στο στρες της αντιγραφής (125). Αντίθετα, ο HIF-1α ρυθμίζει αρνητικά τον MYC. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τον MAX, εμποδίζοντας τη δημιουργία του συμπλόκου MYC-MAX. Παράλληλα, ο HIF-1α επάγει την έκφραση του MAD (επίσης γνωστός ως MXI1). Ο MAD δημιουργεί σύμπλοκο με τον MAX καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων στόχων του MYC. Η ρύθμιση της εξαρτώμενης από τον MYC γονιδιακής έκφρασης φαίνεται ότι εξαρτάται από τη στοιχειομετρία και συνεπώς τη δράση των HIF-1α και HIF-2α.

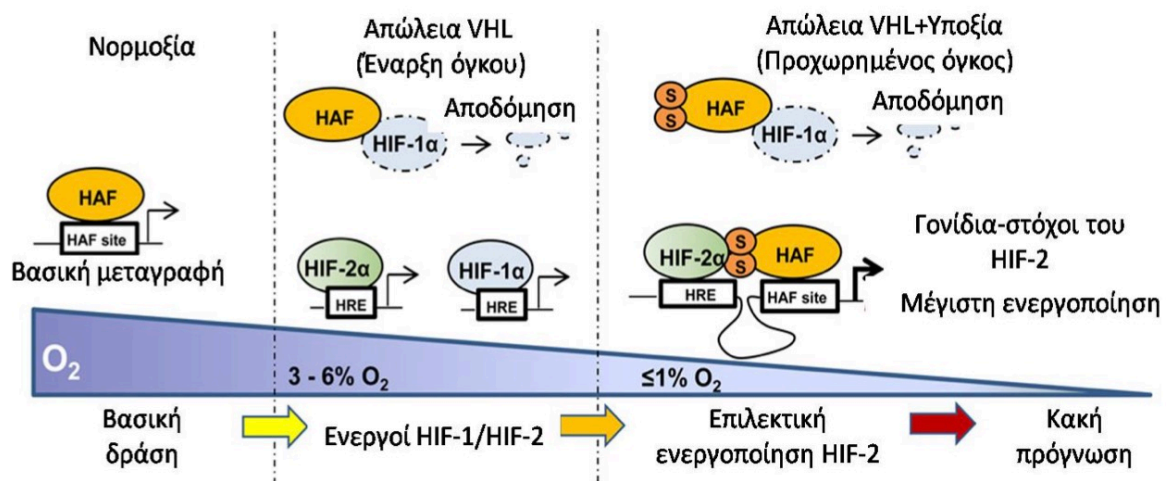


**Εικόνα 22:** Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-2α αλληλεπιδρά με το MYC και σταθεροποιεί το σύμπλοκο MYC-MAX, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του MYC. Αντίθετα, ο HIF-1α δεσμεύει τον MAX, εμποδίζοντας τη δημιουργία του συμπλόκου MYC-MAX. Παράλληλα, ο HIF-1α επάγει την έκφραση του MAD (επίσης γνωστός ως MXI1). Ο MAD δημιουργεί σύμπλοκο με τον MAX καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων στόχων του MYC.

#### 1.3.2.4.5 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον HAF

Ο παράγοντας που σχετίζεται με την υποξία (Hypoxia Associated Factor, HAF), είναι μια E3-λιγάση της ουβικιτίνης. Ο HIF-2α αλληλεπιδρά άμεσα με τον HAF μέσω της επικράτειας C-TAD (αμινοξέα 604-750) του HIF-2α και των αμινοξέων 300-500 του HAF. Η αλληλεπίδραση

αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 (126). Σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, τα κατάλοιπα λυσίνης K94 και K141 του HAF σουμοϋλιώνονται, επιτρέποντας τη σύζευξή του με τον HIF-2α. Το ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο στη συνέχεια μπορεί να προσαράξει σε αλληλουχίες HRE και σε στοιχεία πρόσδεσης του HAF στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του HIF-2. Αντίθετα, ο HAF ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του HIF-1α και μέσω της δράσης E3 λιγάσης, τον οδηγεί για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα Η έκφραση του HAF σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος μετατοπίζει την ισορροπία της απόκρισης στην υποξία προς τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-2 και όχι του HIF-1, όπως για παράδειγμα το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μεταλλοπρωτεΐνωση 9 (*MMP9*) και το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα OCT4 (*POU5F1*), προωθώντας έναν επιθετικό καρκινικό φαινότυπο (127) (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23:** Μοντέλο ρύθμισης των HIF-α ισομορφών από τον HAF στο νεφρικό καρκίνωμα (RCC). Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι HIF-α υπομονάδες δεν σταθεροποιούνται. Ο παράγοντας HAF δεν σουμοϋλιώνεται και επάγει τη βασική έκφραση των γονιδίων στόχων του. Στα αρχικά στάδια του όγκου, η απώλεια του VHL επιτρέπει τη σταθεροποίηση των HIF-α και την ενεργοποίηση των HIF, και ο HAF με τη δράση E3 λιγάσης οδηγεί την HIF-1α υπομονάδα για αποικοδόμηση. Κατά την εξέλιξη του όγκου, οι υποξικές συνθήκες που επικρατούν έχουν ως αποτέλεσμα τη σουμοϋλίωση του HAF. Ο HAF προσδένεται στον HIF-2α και επιτυγχάνεται η μέγιστη έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF-2. Ταυτόχρονα, ο HAF αλληλεπιδρά με τον HIF-1α οδηγώντας τον για αποικοδόμηση και αναστέλλοντας συνεπώς την εξαρτώμενη από τον HIF-1 απόκριση στην υποξία (127).

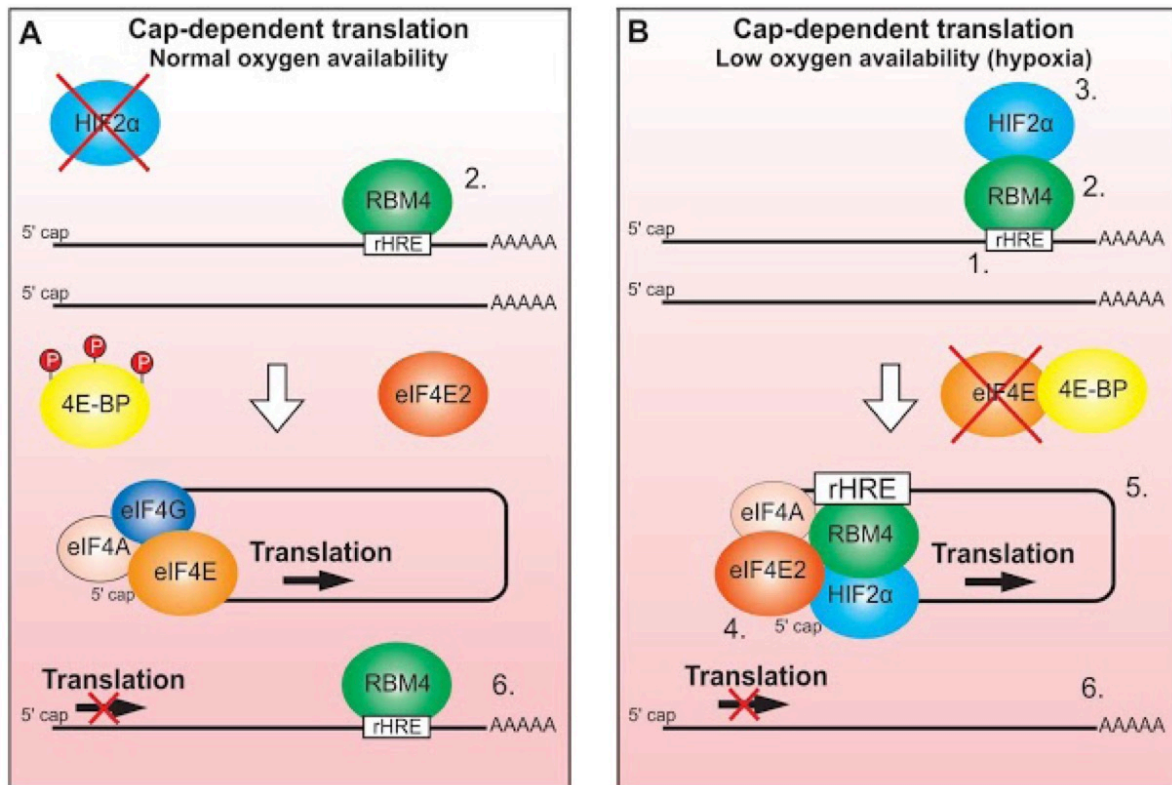
#### 1.3.2.4.6 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη Int6

Η πρωτεΐνη Int6 αποτελεί συστατικό του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης EIF3. Το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-2α αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της Int6. Η

αλληλεπίδραση αυτή αποσταθεροποιεί τον HIF-2α σε υποξία μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα ανεξάρτητα του pVHL. Η αποσιώπηση της Int6 σε κύτταρα MCF-7 και HeLa οδηγεί σε αυξημένη έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-2 όπως της αγγειοποιητίνη (*Ang-2*), του υποδοχέα της αγγειοποιητίνης *Tie-2* και του αυξητικού παράγοντα των αγγείων του ενδοθηλίου (*VEGF*) ακόμη και σε νορμοξία, υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση του HIF-2 από την Int6 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της ογκογένεσης (128).

#### 1.3.2.4.7 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA 4 (RNA-Binding Motif protein RBM4)

Το αρχικό στάδιο της σύνθεσης των πρωτεϊνών αποτελείται από τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4E) που δεσμεύεται στο 5' καλύπτρα των mRNAs. Καθώς η σύνθεση πρωτεϊνών είναι μια κυτταρική διαδικασία που απαιτεί μεγάλη κατανάλωση ενέργειας, ποικίλα στρες μπορούν να την αποτρέψουν. Ένα τέτοιο στρες είναι η χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου. Σε υποξία, η διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης διακόπτεται με αναστολή του eIF4E. Μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε έναν μηχανισμό σύνθεσης πρωτεϊνών σε υποξία που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA 4 (RNA-Binding Motif protein RBM4) και τον eIF4E2, ένα ομόλογο του eIF4E. Η RBM4 είναι διαρκώς δεσμευμένη σε mRNA που περιέχουν αλληλουχίες RNA στοιχείων απόκρισης στην υποξία (rHRE). Σε υποξία, τα mRNA που περιέχουν rHRE στοχεύονται για μετάφραση. Ο HIF-2α αλληλεπιδρά με την RBM4 ως απόκριση στην υποξία. Το σύμπλοκο HIF-2α/RBM4 διευκολύνει τη στρατολόγηση του eIF4E2 στα mRNA που περιέχουν rHREs. Στη συνέχεια το σύμπλοκο eIF4E2/HIF-2α/RBM4 δεσμεύεται στην 5' καλύπτρα, οδηγεί το mRNA στα πολυσώματα και ξεκινά η μετάφραση (129). Ο μηχανισμός αυτός δίνει απάντηση ως προς τον τρόπο με τον οποίο συντίθενται οι πρωτεΐνες σε περιόδους έλλειψης οξυγόνου και αναστολής της eIF4E και παράλληλα αναδεικνύει έναν καινούριο μη-γενωμικό ρόλο του HIF-2α (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24:** Μοντέλο ρύθμισης της μετάφρασης από το σύμπλοκο HIF-2 $\alpha$ /RBM4. 1) Σε υποξία, τα mRNA που περιέχουν αλληλουχίες RNA στοιχείων απόκρισης στην υποξία (rHRE) στοχεύονται για μετάφραση. 2) Η πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA 4 (RBM4) δεσμεύεται διαρκώς σε μετάγραφα που περιέχουν (rHRE), ακόμη και σε νορμοξία. 3) Ο HIF-2 $\alpha$  αλληλεπιδρά με την RBM4 ως απόκριση στην υποξία. 4) Το σύμπλοκο HIF-2 $\alpha$ /RBM4 διευκολύνει τη στρατολόγηση του eIF4E στα mRNA που περιέχουν rHREs. 5) Το σύμπλοκο eIF4E2/HIF-2 $\alpha$ /RBM4 δεσμεύεται στην 5' καλύπτρα, οδηγεί το mRNA στα πολυσώματα και ξεκινά η μετάφραση. 6) Τα rHREs διευκολύνουν την επιλεκτική έκφραση του υποξικού κυτταρικού πρωτεώματος. Τα άλλα μετάγραφα δεν μεταφράζονται (129).

## 1.4 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

### 1.4.1 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Στα μετέωρα, η διαδικασία ανάπτυξης των συστημάτων της μεταφοράς του οξυγόνου στην εμβρυογένεση, εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης οξυγόνου στους ιστούς που διαφοροποιούνται. Πειράματα απαλοιφής γονιδίων του μονοπατιού της υποξίας σε έμβρυα ποντικών, όπως των γονιδίων του *HIF-1A*, *EPAS-1* και *ARNT*, έδειξαν ότι κατά την

εμβρυογένεση, το υποξικό περιβάλλον (1%-5% O<sub>2</sub>), βοηθά την ανάπτυξη του πλακούντα και τη μορφογένεση του αναπνευστικού, του καρδιαγγειακού, και του νευρικού συστήματος. Οι παραπάνω

Αρκετές ερευνητικές ομάδες πραγματοποίησαν πειράματα απαλοιφής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α (*EPAS-1*<sup>-/-</sup>) σε ποντίκια. Τα πειράματα αυτά παρουσίασαν διαφορετικούς φαινοτύπους, ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα της πρώτης ομάδας που δημιούργησε ποντίκια *EPAS-1*<sup>-/-</sup>, έδειξαν ότι η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α οδηγεί σε ανεπαρκή παραγωγή κατεχολαμινών, με επακόλουθη βραδυκαρδία και θάνατο στα μέσα της κύησης. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι ο HIF-2α, σε συνθήκες υποξίας, ρυθμίζει τη σύνθεση των κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Επιπλέον, τα ομόζυγα νεογνά παρουσίασαν ατελή εμβρυϊκή ωρίμανση των πνευμόνων και πέθαναν απευθείας μετά τη γέννησή τους (130).

Μια ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α, προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο των ποντικών κατά τις ημέρες 9,5-13,5 εξαιτίας της ανεπαρκούς αναδιαμόρφωσής και συγχώνευσης των αγγείων τους (131). Μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι τα μισά από τα ποντίκια *EPAS-1*<sup>-/-</sup> πέθαναν μετά από την εμβρυϊκή μέρα 13,5, ενώ όσα επέζησαν, πέθαναν σύντομα μετά τη γέννησή τους, εξαιτίας συνδρόμου αναπνευστικής δυσφορίας (132). Συμπερασματικά, φαίνεται πως η φυσιολογικές υποξικές συνθήκες που συναντώνται *in utero*, είναι απαραίτητες για την άρτια ανάπτυξη του αναπνευστικού-καρδιαγγειακού συστήματος (133, 134).

#### 1.4.2 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Ο HIF-2 διακατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ήπατος. Οι μορφογενετικές διεργασίες που υφίσταται το ήπαρ κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των σπονδυλωτών, ορίζεται ως ηπατογένεση. Η ηπατογένεση πραγματοποιείται σε τρία στάδια: α) ο προσδιορισμός του ενδοδέρματος, β) η διαφοροποίηση των ηπατοβλαστών και γ) ο σχηματισμός της ηπατικής απόφυσης. Ο HIF-2 φαίνεται πως δεν εμπλέκεται στα δύο πρώτα στάδια της ηπατογένεσης. Ωστόσο, έχει κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό της ηπατικής απόφυσης και τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι έμβρυα zebrafish *EPAS-1*<sup>-/-</sup>, κατά την ηπατογένεση δεν σχημάτισαν την ηπατική απόφυση. Ο HIF-2, ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου *leg1* (liver enriched gene 1). Το γονίδιο στόχος του HIF-2, *leg1*, κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη έκκρισης που είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό της ηπατικής απόφυσης (135).

Ο HIF-2 φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση, καθώς η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α σε ποντίκια μετά τη γέννησή τους, οδήγησε σε μειωμένο μέγεθος όρχεων και στειρότητα. Ο φραγμός αίματος /όρχεων είναι απαραίτητος για τη σπερματογένεση. Τα κύτταρα Sertoli στα οποία δεν εκφράζεται ο HIF-2α, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού των στεγανών συνδέσεων, διαταράσσοντας έτσι τη σπερματογένεση. Επιπλέον, σε όρχεις *EPAS-1* /- ποντικών, παρατηρήθηκε διατάραξη της μεμβράνης που περιβάλλει τα σπερματικά σωληνάρια, με αποτέλεσμα την πρόωρη απελευθέρωση σπερματικών κυττάρων (136). Τέλος, οι HIF-2α και ARNT ταυτοποιήθηκαν ως οι κύριοι ρυθμιστές του μεταγραφικού προγράμματος των κυττάρων Sertoli σε πρόσφατη μελέτη μεταγραφικής ανάλυσης (transcriptome analysis) (137).

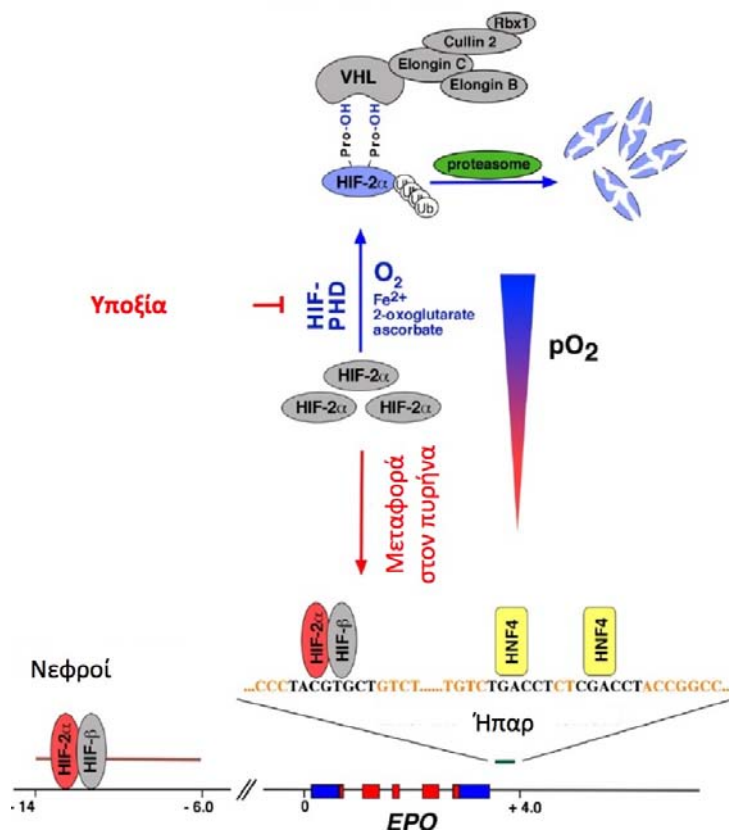
### 1.4.3 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Αρχικά, επικρατούσε η αντίληψη ότι ο HIF-1 ήταν ο ρυθμιστής της έκφρασης του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (*EPO*), καθώς η ανακάλυψη του HIF-1 έγινε σε μελέτη του μοριακού μηχανισμού έκφρασης του γονιδίου της *EPO*. Στη μελέτη αυτή, ο HIF-1 απομονώθηκε από μια στήλη αγκιστείας με την ακινητοποιημένη αλληλουχία DNA της 3' περιοχής του ενισχυτή της *EPO*. Ωστόσο στη συνέχεια αποδείχτηκε με πειράματα *in vivo* και *in vitro* ότι βασικός ρυθμιστής της έκφρασης της *EPO* στους νεφρούς και το ήπαρ κάτω από υποξία είναι ο HIF-2. Ιστολογικές μελέτες σε νεφρικά κύτταρα, έδειξαν ότι τα σημεία που εκφράζεται ο HIF-2α, συμπίπτουν με τα σημεία έκκρισης της ερυθροποιητίνης (138). Οι πρώτες ενδείξεις της μεταγραφικής ρύθμισης της *EPO* από τον HIF-2, προήλθαν από μελέτες σε έμβρυα ποντικών στα οποία είχε γίνει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α. Τα βιώσιμα ενήλικα ζώα μοντέλα αυτής της μελέτης, εμφάνισαν αναιμία και χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης. Η χορήγηση ανασυνδυασμένης *EPO* αποκατέστησε την ερυθροποίηση, υποδεικνύοντας ότι η αναιμία οφείλονταν σε μειωμένη παραγωγή *EPO* στους νεφρούς και όχι σε κάποια άλλη δυσλειτουργία κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων (139, 140). Τα δεδομένα μιας άλλης, ανεξάρτητης ερευνητικής ομάδας, έδειξαν ότι η αποσιώπηση του HIF-2α προκαλεί αναιμία στα ποντίκια, που συνδέεται με χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης. Αυτό αποδεικνύει ότι ο HIF-2α είναι ο βασικός ρυθμιστής της παραγωγής ερυθροποιητίνης στα ενήλικα (136). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον HIF-2α σε ηπατοκύτταρα ποντικού προκαλεί μείωση των επιπέδων της ηπατικής *EPO* (141). Η ίδια ομάδα έδειξε ότι ο HIF-2α είναι απαραίτητος για την έκφραση της *EPO* και όχι ο HIF-1α. Επιπλέον, πειράματα αποσιώπησης είτε του HIF-1α ή του HIF-2α σε

διάφορες κυτταρικές υποδεικνύουν ότι σε συνθήκες υποξίας, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της EPO, εξαρτάται αποκλειστικά από τον HIF-2 και όχι από τον HIF-1. Οι μελέτες αυτές έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλές κυτταρικές σειρές, όπως σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B, Huh7, αστροκύτταρα και κύτταρα νευροβλαστώματος Kelly (141-143). Πρόσφατα μάλιστα, η ομάδα μας έδειξε ότι η EPO είναι γονίδιο στόχος του HIF-2 και όχι του HIF-1, με πειράματα αποσιώπησης με siRNA του HIF-2α η του HIF-1α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 (117), (86).

Το βασικό όργανο παραγωγής της ερυθροποιητίνης στην εμβρυϊκής ζωή είναι το ήπαρ, ενώ στους ενήλικες οι νεφροί. Η υποξία είναι το κύριο φυσιολογικό ερέθισμα για την παραγωγή EPO και μάλιστα, η αύξηση των επιπέδων EPO είναι ανάλογη με τις συνθήκες υποξίας. Η παραγωγή ερυθροποιητίνης ως απόκριση στην υποξία εξαρτάται από το στάδιο της ανάπτυξης και το όργανο παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή ερυθροποιητίνης ως απόκριση στο ερέθισμα της υποξίας είναι διαφορετική για τους νεφρούς και το ήπαρ. Η ποσότητα ερυθροποιητίνης που παράγεται στα ηπατικά κύτταρα, είναι πολύ μικρότερη από αυτή που παράγεται στα νεφρικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας και επίσης, απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έκθεσης σε συνθήκες υποξίας για την παραγωγή EPO στο ήπαρ συγκριτικά με τους νεφρούς. Η ρύθμιση παραγωγής EPO στο ήπαρ εξαρτάται και από παράγοντες διαφορετικούς της υποξίας, όπως ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) και ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης 1 (IGF-1) (138, 144). Μια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της EPO στους νεφρούς σε υποξία, εξαρτάται αποκλειστικά από τον HIF-2 (145). Επιπλέον, όταν γίνεται απαλοιφή του HIF-2 στους νεφρούς, τον ρόλο του κύριου ρυθμιστή της έκφρασης της EPO, αναλαμβάνει ο ηπατικός HIF-2. Έδειξαν ακόμη, ότι ο HIF-2 που εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα, ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του μεταβολικού μονοπατιού του σιδήρου, αποδίδοντας έτσι, έναν καινούριο ρόλο στον HIF-2 στο συντονισμό της σύνθεσης της EPO που περιλαμβάνει τη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου (145). Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός της επαγωγής της έκφρασης της EPO που εξαρτάται από τον HIF-2 δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος έδειξαν ότι ο HIF-2, αλλά όχι ο HIF-1, προσδέεται στα HRE του ενδογενούς γονιδίου της EPO, ενώ ο HIF-1 δεσμεύεται *in vitro*, μόνο στα HRE της ανασυνδυασμένης EPO. Βρέθηκε επίσης, ότι η επαγωγή της μεταγραφής του ενισχυτή της EPO από τον HIF-2 απαιτεί την παρουσία μίας επιπλέον αλληλουχίας στην 3' περιοχή του ενισχυτή, η οποία εντοπίζεται δίπλα στα HRE και περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης για παράγοντες της μεταγραφής (Εικόνα 25).





**Εικόνα 25:** Στο ήπαρ, η επαγωγή της έκφρασης της EPO ως απόκριση στην υποξία, γίνεται με την πρόσδεση του HIF-2 στα στοιχεία απόκρισης που βρίσκονται στο 3' άκρο του γονιδίου που κωδικοποιεί για την EPO, ενώ στους νεφρούς εντοπίζονται στη περιοχή 6-14 kb, πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (138).

Αυτό είναι μια ακόμη απόδειξη της συνεργασίας του HIF-2 με άλλους παράγοντες της μεταγραφής για την επαγωγή της έκφρασης της EPO. Ανάμεσα σε αυτούς τους συμπαραγόντες της μεταγραφής συγκαταλέγεται και ο USF2 (21). Επιπλέον, ο ενισχυτής του γονιδίου της EPO περιλαμβάνει τα στοιχεία DR2, που είναι θέσεις δέσμησης των πυρηνικών παραγόντων. Ο HNF-4 (Hepacyte Nuclear Factor-4) είναι ένας πιθανός υποψήφιος παράγοντας που μπορεί να συνεργάζεται ειδικά με τον HIF-2, καθώς συνδέεται σε αλληλουχίες DR-2. Τέλος, έχει βρεθεί τόσο ο HNF-4, όσο και ο HIF-2α, εντοπίζονται στα σημεία σύνθεσης της EPO στο ήπαρ και στους νεφρούς και φαίνεται να είναι απαραίτητος για την επαγωγή του γονιδίου της EPO σε υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (138, 144)



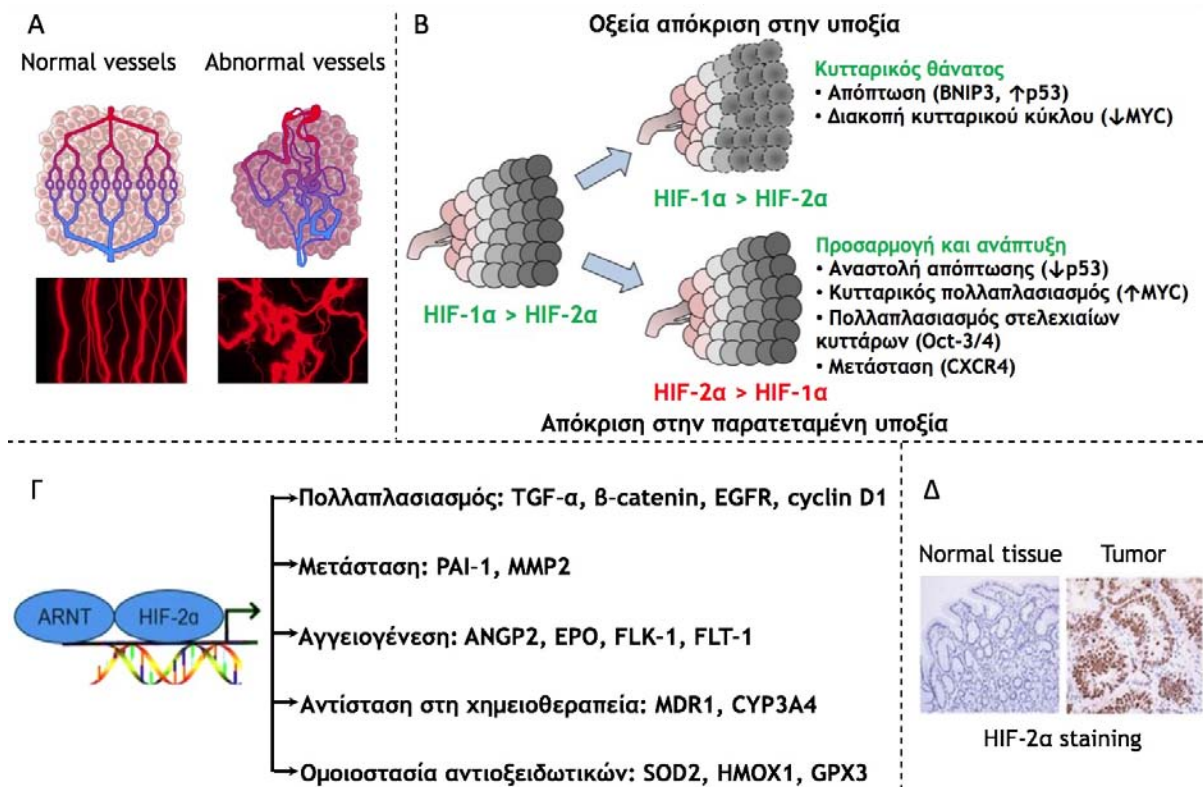
## 1.5 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-2 ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

### 1.5.1 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η υποξία είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος των όγκων. Οι περισσότεροι καρκινικοί όγκοι περιέχουν υποξικές περιοχές εξαιτίας της ανισορροπίας μεταξύ της διαθεσιμότητας και της κατανάλωσης του οξυγόνου. Σε ανθρώπινους όγκους, όπως για παράδειγμα του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του προστάτη και των νεφρών, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των HIF-1α και HIF-2α. Η υποξία, κυρίως μέσω της στεθεροποίησης των HIF, διευκολύνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων προάγοντας τον αναερόβιο μεταβολισμό, τη δημιουργία νέων αγγείων και την αντίσταση στην απόπτωση. Συνεπώς προωθεί κακοήγη φαινότυπο και επιθετική καρκινική συμπεριφορά. Τα παραπάνω σχετίζονται με αυξημένη μετάσταση και κακή διάγνωση σε ασθενείς σε διάφορους τύπους καρκίνου. **(Εικόνα 26).**

Ο HIF-1 επάγεται γρήγορα σε έντονη ή παροδική υποξία, ενώ η παρατεταμένη υποξία ευνοεί την ενεργοποίηση του HIF-2. Ωστόσο, για το αν είναι ο HIF-1 ή ο HIF-2, ή και οι δύο HIFs που προωθούν την ανάπτυξη του όγκου, αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαθεσιμότητα των απαιτούμενων μεταγραφικών συμπαραγόντων, και τον ρόλο των HIF-α υπομονάδων σε συγκεκριμένα μονοπάτια. Για παράδειγμα, η δράση του HIF-1 έχει συσχετιστεί κυρίως με διαδικασίες της αποπτωτικής οδού, ενώ HIF-2 φαίνεται να ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου **(126)**.

Η υπερέκφραση του HIF-2α σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως, το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (VHL-deficient ccRCC), το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και το νευροβλάστωμα έχει συσχετιστεί με αυξημένη θνησιμότητα και αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη της εξέλιξης της νόσου.



**Εικόνα 26:** (Α) Στους περισσότερους συμπαγείς όγκους, η ακανόνιστη δομή των αιμοφόρων αγγείων δυσχεραίνει τη διανομή του οξυγόνου προκαλώντας υποξία. Σε συνθήκες υποξίας, σταθεροποιούνται οι HIF-α υπ ομονάδες. (Β) Ο HIF-1 επάγεται γρήγορα σε έντονη ή παροδική υποξία, ενώ η παρατεταμένη υποξία ευνοεί την ενεργοποίηση του HIF-2. (Γ) Ο HIF-2 επάγει την έκφραση γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται σε λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός, η μετάσταση και η αντοχή σε χημικοθεραπευτικά σχήματα (146). (Δ) Υπερέκφραση HIF-2α υποονάδας σε ιστό ηπατοκαρκινώματος.

### 1.5.1.1 Πολλαπλασιασμός

Η απορρύθμιση της αποπτωτικής οδού αποτελεί ένα βασικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος στα οποία δεν εκφράζεται η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL (Renal Cell Carcinoma RCC), έδειξαν ότι ο HIF-2α επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για την κυκλίνη D1, τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), τον παράγοντα μετασχηματισμού α (TGF-α) και παράλληλα, καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BNip3, προάγοντας έτσι τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (147). Ο μοριακός μηχανισμός ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον HIF-2α δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως και τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα (146). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σφαιροειδή κυττάρων ηπατοκαρκινώματος HepG2, δείχνει ότι η υπερέκφραση του HIF-2α

προκαλεί την μετατόπιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 προς το αντι-αποπτωτικό προφίλ, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, η αποσιώπηση του HIF-2α αυξάνει την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, προσδίδοντας πλεονέκτημα επιβίωσης (148) (Εικόνα 26).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του HIF-2α προωθεί την ογκογένεση μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν οι EGFR, IGF1R και ERK/Akt, ή μέσω της σηματοδότησης COX2/mPGES-1/PGE2 (149, 150), ενώ αντίθετα, άλλες μελέτες προτείνουν ότι ο HIF-2α αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (151).

### 1.5.1.2 Μεταβολικός Επαναπρογραμματισμός

Ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων, μετατοπίζεται προς τη γλυκολυτική οδό (φαινόμενο Warburg) (152). Είναι γνωστό ότι ο HIF-1 κατέχει κυρίαρχο ρόλο στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα της γλυκολυτικής οδού ένζυμα. Ωστόσο, ο ρόλος του HIF-2 σε αυτή τη διαδικασία είναι λιγότερο μελετημένος. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου έδειξαν ότι η ταυτόχρονη απουσία του HIF-1α, του HIF-2α, και του ογκογονιδίου KRAS, προκαλεί μείωση της έκφρασης ενζύμων που συμμετέχουν στην οδό της σύνθεσης των μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων όπως τα AGPAT7, ACSL5 και PCK2 με επακόλουθη μείωση των επιπέδων της καρδιολιπίνης και την ανεπαρκή μιτοχονδριακή αναπνοή. Αυτός ο μηχανισμός προτείνει πως η έκφραση των HIF-1α, HIF-2α, και του KRAS είναι απαραίτητη για την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής ATP και της ελάχιστης παραγωγής ROS στα καρκινικά κύτταρα (153).

### 1.5.1.3 Αγγειογένεση

Η υποξία είναι το πρωταρχικό ερέθισμα για την αγγειογένεση στους καρκινικούς όγκους. Οι παράγοντες της μεταγραφής HIF κατέχουν κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-2 επάγει την μεταγραφή των γονιδίων του κύριου αγγειογόνου παράγοντα, VEGF και των υποδοχέων του VEGFR-1 (Flt-1) και VEGFR-2 (Flk-1), καθώς περιέχουν στους υποκινητές τους αλληλουχίες HREs (154). Ο VEGF είναι ο σημαντικότερος παράγοντας της αγγειογένεσης καθώς ρυθμίζει σχεδόν όλα τα στάδια αυτής της διαδικασίας. Ο VEGF ρυθμίζεται μεταγραφικά και από τις δυο HIF ισομορφές. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι ο HIF-2 προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση του υποκινητή του συγκριτικά με

τον HIF-1 (**6, 28**). Επιπλέον, έχειδειχθεί σε κύτταρα HMEC-1 και HUVEC, ότι ο HIF-2 σε συνθήκες υποξίας, προσδένεται στα HRE του υποκινητή του γονιδίου της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου του ενδοθηλίου (eNOS) και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του (**155**). Το οξείδιο του αζώτου (NO) έχει σημαντικό ρόλο τόσο στην διέγερση της αγγειογένεσης, αλλά και στην αγγειοδιαστολή (**156**). Άλλα γονίδια-στόχοι HIF-2 που συμμετέχουν στην αγγειογένεση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την EPO (**157-159**) και το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της αδενosίνης A2A, που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αγγειογόνο δράση σε ανθρώπινα μικρο-ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα (**160**). Επιπλέον, ο HIF-2 δρα μαζί με τον παράγοντα μεταγραφής Ets-1 για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των κοινών γονιδίων τους, που εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης. Για παράδειγμα, το μόριο προσκόλλησης VE-καντερίνη (VE-cadherin) και ο υποδοχέας του VEGF, VEGFR-2 (Flk-1), ελέγχονται από τον HIF-2 σε συνέργεια με τον Ets-1 (**154, 161**).

Επιπλέον, υπάρχουν πολλά αγγειογόνα γονίδια που έχειδειχθεί ότι ρυθμίζονται από τον HIF-2, ωστόσο δεν έχουν στον υποκινητή τους αναγνωρισμένα HRE. Κάποια παραδείγματα είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ιντεγκρίνη β3 (**162**) και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την φμπρονεκτίνη (**163**). Επίσης, έχειδειχθεί ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι που διαμεσολαβεί στην ωρίμανση των αγγείων και αποτελείται από τους υποδοχείς Ang-1, Ang-2 και Tie-2, ενεργοποιείται από τον HIF-2 (**5, 163**). Αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι ο HIF-2α έχει ρυθμιστικό ρόλο σε πολλά στάδια της αγγειογένεσης, γεγονός που το κατέστησε ελκυστικό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας.

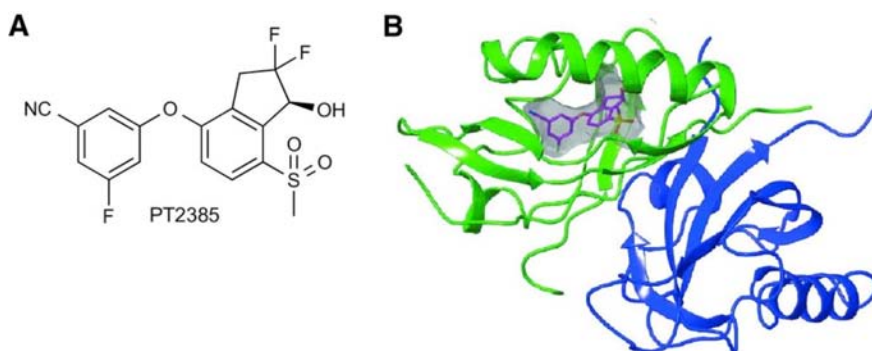
#### **1.5.1.4 Μετάσταση**

Η ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής HIF προωθεί τη διηθητικότητα και τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Έχειδειχθεί ότι ο HIF-2 επάγει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη διάσπαση της εξωκυττάριας μήτρας, όπως η μεταλλοπρωτεάση 2 (MMP-2), στη μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (EMT), όπως η E-καντερίνη (E-Cadherin) και στη μετάσταση, όπως ο παράγοντας μεταγραφής TWIST. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα, η εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα έκφρασης του HIF-2α στους πρωτοπαθείς όγκους (**164, 165**). Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης του HIF-2α που προωθούν τη μετάσταση αποτελούν αντικείμενο εντατικής μελέτης σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με μη

μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων (NSCLC), έδειξε ότι ο HIF-2α σε συνεργασία με το ογκογονίδιο KRAS, προωθεί τη διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση (166).

#### 1.5.1.5 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Η αναζήτηση ειδικών αναστολέων του HIF-2α μπορεί να έχει σημαντική κλινική προσφορά, καθώς ο HIF-2α διακατέχει κεντρικό ρόλο στην ογκογένεση. Βιβλιογραφικά δεδομένα, έχουν αναδείξει αρκετές ενώσεις που αναστέλλουν άμεσα ή έμμεσα τον HIF-2α σε διάφορα στάδια. Ένα από αυτά τα στάδια, είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-2α, με αναστολείς όπως οι 2-ME2 και ELR510444 οι οποίοι ελαττώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α καταστρέφοντας τη δομή των μικροσωληνίσκων (167, 168). Σε κύτταρα νευροβλαστώματος, έχει αναφερθεί ότι η τοποτεκάνη (topotecan) και ο αναστολέας των υποδοχέων κινασών τυροσίνης sunitinib, μειώνουν την πρωτεϊνική σταθερότητα και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 (122, 169). Η μετάφραση του HIF-2α ελέγχεται επίσης από την οδό του mTOR, στην οποία στοχεύει ο αναστολέας PP242 (170). Μια άλλη κατηγορία αναστολέων του HIF-2α, προσδένονται άμεσα στο μόριό του, και μπλοκάρουν τη μεταγραφική του δράση ή τη σταθερότητά του. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο τεχνητός προσδέτης THS-044, ο μηχανισμός δράσης του οποίου περιλαμβάνει την πρόσδεση στην επικράτεια PAS-B του HIF-2α και την επακόλουθη παρεμπόδιση του διμερισμού του με τον ARNT και πρόσδεσή του στο DNA (171-173). Πολλοί αναστολείς του HIF-2α δρουν έμμεσα, ενισχύοντας την αποδόμησή του από το 26S πρωτεάσωμα, όπως ο αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης εμετίνη, τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια JC243, JC244 και ο αναστολέας SF1126 της οδού PI3K (174-176). Επιπλέον, έχουν περιγραφεί αναστολείς που μειώνουν τη δράση του HIF-2 παρεμποδίζοντας είτε την αλληλεπίδρασή του με τους συνενεργοποιητές CBP/p300, όπως οι FM19G11 και η τριχοστατίνη A (TSA), είτε την πρόσδεση του παράγοντα PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase-1) στον υποκινητή του, όπως ο PJ34 (177-179). Τέλος, ο αναστολέας PT2385 που έχει δείχθει ότι δρα ως εξειδικευμένος ανταγωνιστής του HIF-2α και συμβάλλει στην αναστολή της αγγειογένεσης, βρίσκεται σε φάση I κλινικής δοκιμής σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο ccRCC (180, 181) (Εικόνα 27).

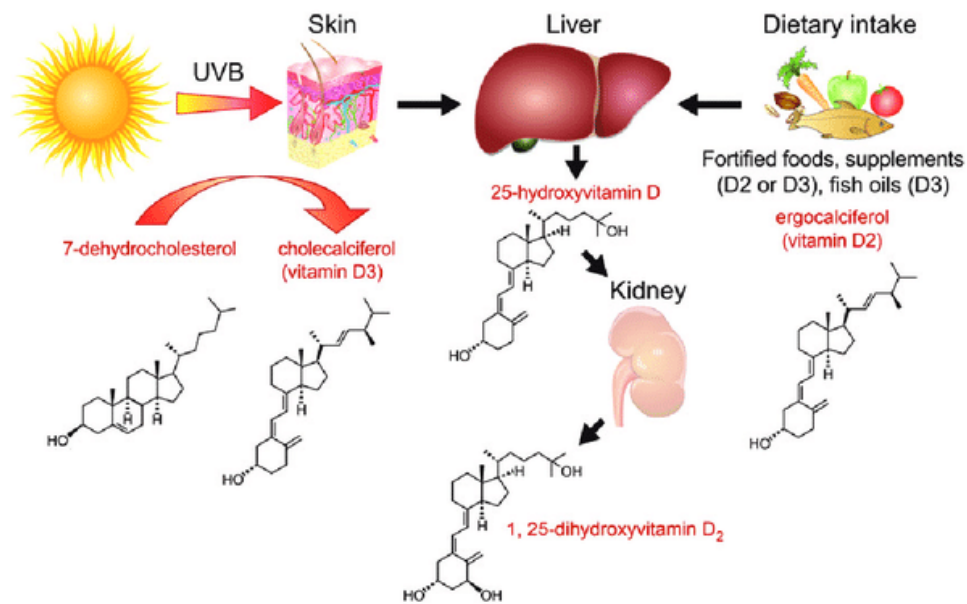


**Εικόνα 27: Η πρόσδεση του PT2385 στην επικράτεια PAS-B του HIF-2α διασπά το ετεροδιμερές σύμπλοκο HIF-2α/ARNT.** (A) Χημική δομή του αναστολέα PT2385. (B) Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής της επικράτειας HIF-2α PAS-B\* (πράσινο), της επικράτειας ARNT PAS-B\* (μπλε) και του PT2385 (μωβ) (181).

## 1.6 Η 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνη D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3)

### 1.6.1 Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 1,25-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-BITAMΙΝΗΣ D3

Η 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνη D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D3), είναι η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D3 και αποτελεί την βασική ορμόνη της ομοιοστασίας των οστών. Η βιταμίνη D3 μπορεί να ληφθεί από τη διατροφή (από γαλακτοκομικά προϊόντα και λιπαρά ψάρια). Ωστόσο, η μέγιστη πρόσληψη βιταμίνης D3 επιτυγχάνεται μέσω της σύνθεσής της στο δέρμα μετά από έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Η έκθεση του δέρματος σε υπεριώδες φως (270-300nm) καταλύει το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης της βιταμίνης D3, καθώς προκαλεί τη μετατροπή της 7-δεϋδροχοληστερόλης (7-DHC) σε προ-βιταμίνη D3, η οποία στη συνέχεια ισομεριώνεται σε βιταμίνη D3. Ο βιολογικά δραστικός μεταβολίτης 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, προκύπτει από τρία στάδια μεταβολισμού της βιταμίνης D3 που εκτελούνται από οξειδάσες του κυτοχρώματος P450 μικτής λειτουργίας (CYP). Αρχικά, η D3 υδροξυλιώνεται στο ήπαρ από την υδροξυλάση CYP2D25 και προκύπτει η 25-υδροξυ-βιταμίνη D3 (25OHD3). Στη συνέχεια, η 25OHD3 υδροξυλιώνεται από την υδροξυλάση CYP27B1 κυρίως στα κύτταρα του εγγύς σπειραματικού σωληναρίου του νεφρού και προκύπτει ο βιολογικά δραστικός μεταβολίτης 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 (Εικόνα 28) (182).



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D. (DOI: 10.1093/eurheartj/eh166)

Η παραγωγή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στους νεφρούς διεγείρεται από την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTH) και αναστέλλεται από αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου, φωσφόρου και από τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23). Η συγκέντρωση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ρυθμίζεται με έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Ειδικότερα, όταν η συγκέντρωση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  είναι πολύ υψηλή, διεγείρεται ο καταβολισμός της μέσω της επαγωγής της έκφρασης της υδροξυλάσης CYP24A1. Η  $25(\text{OH})\text{D}$  και  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  υδροξυλιώνονται από την υδροξυλάση CYP24A1 και σχηματίζουν τους βιολογικά αδρανείς μεταβολίτες  $24,25(\text{OH})_2\text{D}$  και  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}$ , αντίστοιχα.

## 1.6.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

### 1.6.2.1 Γενωμικός μηχανισμός δράσης

Οι περισσότερες βιολογικές δράσεις της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα της βιταμίνης D3 (VDR). Ο VDR είναι μέλος της υπερικογενείας των υποδοχέων πυρηνικών ορμονών (183). Η πρόσδεση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του VDR διευκολύνοντας τον ετεροδιμερισμό του με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς X (RXR). Το σύμπλοκο αυτό, προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του υποκινητή γονιδίων στόχων του VDR, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D3 (VDREs). Η δέσμευση του συμπλόκου στα VDRE, προκαλεί τη στρατολόγηση πρωτεϊνών που διεγείρουν τη μεταγραφή μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που επιτρέπει την προσάραξη των βασικών

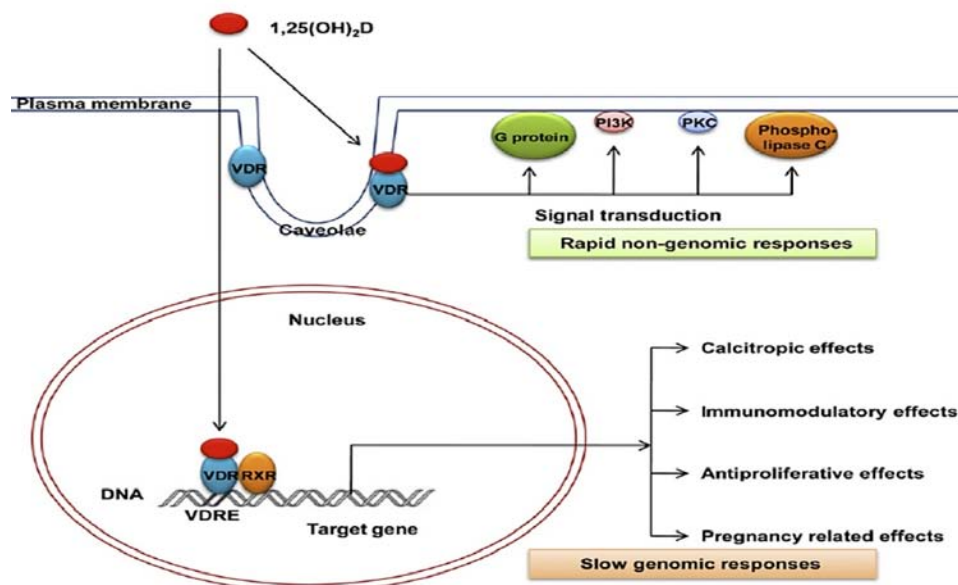
παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής (**Εικόνα 29**). Έτσι, ο VDR λειτουργεί ως παράγοντας της μεταγραφής που προσδέεται στις αλληλουχίες VDREs της περιοχής του υποκινητή γονιδίων που αποκρίνονται στην βιταμίνη D3 και επηρεάζει τον ρυθμό της διαμεσολαβούμενης από την RNA πολυμεράση II μεταγραφής (**184**).

#### 1.6.2.2 Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης

Οι μη γενωμικές δράσεις της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, είναι γρήγορες και περιλαμβάνουν τη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, που μπορεί να επηρεάσουν έμμεσα τη μεταγραφή γονιδίων, μέσω διασταυρούμενης σηματοδότησης. Η μη γενωμική δράση της αυτή 1,25(OH)<sub>2</sub>D, διαμεσολαβείται από έναν υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης που είναι λιγότερο χαρακτηρισμένος από τον πυρηνικό VDR (**185**). Παραδείγματα σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, είναι η οδός των κινασών MAPK (**186**), το μονοπάτι της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 PI3K/Akt (**187**) η οδός της κινάσης πρωτεϊνών που εξαρτάται από το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης CaMKII και της φωσφολιπάση C PLC (**188**). Στόχοι αυτών των κινασών πρωτεϊνών είναι παράγοντες μεταγραφής, για παράδειγμα ο SP1 (πρωτεΐνη ειδικότητας 1), που δεσμεύονται στους υποκινητές γονιδίων στόχων τους και η έκφρασή τους κατά συνέπεια ρυθμίζεται έμμεσα από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D (**184**) (**Εικόνα 29**).

Η πιο διαδεδομένη μη γενωμική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, είναι η γρήγορη απορρόφηση του Ca<sup>2+</sup> από τα εντερικά κύτταρα. Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D συνδέεται στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης ενεργοποιεί πολυάριθμους σηματοδοτικούς καταρράκτες. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης πρωτεϊνών C (PKC) προκαλεί την ταχεία απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Ca<sup>2+</sup>. Η απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup>, προκαλεί την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη Raf-MEK-ERK (**185**).





Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση των μοριακών μηχανισμών δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D

### 1.6.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D (189-191). Η αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D αποδίδεται κυρίως στην αναστολή την ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και τη διέγερση της απόπτωσης (192-195).

Μελέτες σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη PC3, έδειξαν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D προκαλεί αύξηση της έκφρασης των αναστολέων των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες p21<sup>Waf/Cip1</sup> και p27<sup>Kip1</sup>, και ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης της κινάσης που εξαρτάται από κυκλίνες CDK2. Έτσι, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος δεν φωσφορυλιώνεται επαρκώς, και προωθείται η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/G0. Μέσω αυτού του μηχανισμού, αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (196-199). Επιπλέον, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αυξάνει την έκφραση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax ενώ ταυτόχρονα μειώνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2, προωθώντας έτσι την ενεργοποίηση της αποπτωτικής οδού σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη του και μαστού (200).

Η δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D έχει επίσης συνδεθεί με τη διαφοροποίηση τόσο φυσιολογικών όσο και καρκινικών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι διεγείρει τη διαφοροποίηση των ανώριμων αιμοποιητικών κυττάρων της μυελοειδούς σειράς σε ώριμα κύτταρα. Ειδικότερα, έχει δειχτεί ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει τη μεταγραφή του ογκογονιδίου c-myc στα ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 διεγείροντας τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα

ουδετερόφιλα **(201)**. Με παρόμοιο μηχανισμό, δηλαδή μέσω αναστολής της έκφρασης του ογκογονιδίου c-myc, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του προστάτη που αποκρίνονται σε ανδρογόνα **(202)**.

Είναι γνωστό ότι η φλεγμονή είναι ένας παράγοντας που πυροδοτεί την ανάπτυξη πολλών καρκινικών όγκων **(203-205)**. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες όπως οι κυτταροκίνες, οι προσταγλανδίνες (PGs) και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που προωθούν την ογκογένεση. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα μαστού και προστάτη υποδεικνύουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς ρυθμίζει κύριες σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στη φλεγμονή. Ειδικότερα, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει την κινάση που ενεργοποιείται από το στρες p38 σε κύτταρα του προστάτη **(206)**, αναστέλλει τη σύνθεση και της προσταγλαδίνης (PG) **(207)** και τέλος, αναστέλλει τη σηματοδότηση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) **(208-210)**.

Η αγγειογένεση, είναι κρίσιμη διαδικασία για την ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων **(211)**. Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη ενότητα, ο VEGF είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας διέγερσης της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση πυροδοτείται από την τοπική υποξία. Η διέγερση της αγγειογένεσης ως απόκριση στην υποξία, προκαλείται από τους HIF, που ενεργοποιούν άμεσα την έκφραση πολλών αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF **(28, 212)**. Σε μοριακό επίπεδο, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D ασκεί την αντι-αγγειογενετική δράση της ρυθμίζοντας την έκφραση βασικών παραγόντων που ελέγχουν την αγγειογένεση. Έχει δειχθεί ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D μειώνει την έκφραση του VEGF σε διάφορες καρκινικές σειρές, μέσω της μείωσης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 **(213)**.

#### **1.6.4 ΣΗΜΕΙΑ ΣΥΓΚΛΙΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D ΚΑΙ ΤΩΝ HIF**

Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές καταδεικνύουν σημεία σύγκλισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και των HIF. Ανάμεσα στα πολλά γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων HIF, συγκαταλέγεται και το γονίδιο της δισμουτάσης του υπεροξειδίου 2 (SOD2). Ειδικότερα, η SOD2 είναι γνωστό ότι αποτελεί ειδικό γονίδιο στόχο του HIF-2. Βιβλιογραφικές αναφορές έχουν δείξει ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D επάγει την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων SOD1 και SOD2 σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη LNCaP και PECs **(214, 215)**. Έχει επίσης δειχθεί ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) **(208-210)** που έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας σε μεταγραφικό επίπεδο **(216, 217)**. Έχει

επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D εμπλέκεται σημαντικά στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών πρωτεϊνών. Πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2, αποκαλύπτει ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους μέσω ενεργοποίησης της φωσφατάσης PTEN και επακόλουθη αναστολή του μονοπατιού PI3K/Akt (187). Το μονοπάτι PI3K/Akt είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της μετάφρασης των HIF-α υπομονάδων (218). Τέλος, υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που δείχνουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2, οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία των HIF-1α (111, 112) και HIF-2α (Gkotinakou et al., 2019 J.Cell Sci in press) υπομονάδων.

### 1.6.5 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ HIF

Υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Ειδικότερα, στον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α έχουν ταυτοποιηθεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs)(219). Συνεπώς, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε σύμπλοκο με τον ενεργοποιημένο VDR προσδένεται σε αυτά και ελέγχει την έκφραση του HIF-1α. Η πρώτη μελέτη της επίδρασης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιήθηκε το 2007 από τους (213). Σε αυτή τη μελέτη, αποκαλύφθηκε ότι ένα σημαντικό μέρος της αντι-αγγειογενετικής δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D διαμεσολαβείται από τον HIF-1. Ειδικότερα, αναφέρθηκε ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D προκαλεί μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης του HIF-1α με επακόλουθη μείωση της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και του ορθού. Έδειξαν ακόμη, ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D δρα αναστέλλοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-1α και την επακόλουθη έκφραση ειδικών γονιδίων στόχων του, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων του VEGF, της ενδοθηλίνης 1 (ET-1) και του μεταφορέα της γλυκόζης 1 (Glut-1) στην καρκινική σειρά κυττάρων του πνεύμονα CL-1. Στην μελέτη αυτή ωστόσο, χρησιμοποιούνται αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της 1,25(OH)<sub>2</sub>D από 0,1 έως 1μM, που απέχουν πολύ από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης που παρατηρούνται στην κυκλοφορία. Αντίθετα, μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D επάγει την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία) σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα και σε μακροφάγα (51).

Παρόλο που υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η HIF- 1α υπομονάδα ρυθμίζεται από τον τελικό βιοδραστικό μεταβολίτη της βιταμίνης D, την 1,25(OH)<sub>2</sub>D, δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν την 1,25(OH)<sub>2</sub>D με τον HIF-2α.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο HIF-2 είναι μέλος της οικογένειας των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων και εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Η βιβλιογραφία περιγράφει πως έχει παρά τις πολλές ομοιότητες με το πρώτο και καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας, τον HIF-1. Ωστόσο, καθημερινά συσσωρεύονται ενδείξεις ότι HIF-2 διαθέτει μοναδικούς μεταγραφικούς στόχους και διαφορετικούς ρόλους από τον HIF-1 σε καταστάσεις όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός και η μετάσταση του όγκου. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία για τις λειτουργίες του HIF-2 σε αυτές τις καταστάσεις είναι σε πολλές περιπτώσεις αμφιλεγόμενη αλλά και περιορισμένη, καθώς οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στον HIF-1. Πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση της HIF-2α υπομονάδας είναι ιστοειδική, εκφράζεται πιο ισχυρά στο ενδοθήλιο και στα ηπατοκύτταρα και η δράση του σε αυτούς τους ιστούς φαίνεται να υπερισχύει έναντι του HIF-1α. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι δυο ισομορφές HIF έχουν διακριτούς και σε αρκετές περιπτώσεις αντίθετους ρόλους, αναδεικνύει τη σημασία της διαλεύκανσης των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του HIF-2.

Ο HIF-2 δρα ως ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από μια α υπομονάδα (HIF-2α) που επάγεται από την υποξία και μια συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β ή ARNT. Η HIF-2α υπομονάδα ρυθμίζεται και από μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από το οξυγόνο. Οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-2, καθώς επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-2α, τη μεταγραφική δράση του HIF-2 και την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες.

Στη βιβλιογραφία περιγράφεται ότι η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα ERK (Extracellular signal Regulated Kinases), συμμετέχει στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο και ο HIF-2, όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση και η διαφοροποίηση. Αν και παλαιότερα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 είχε συσχετιστεί με τη λειτουργία του HIF-2, ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει την δράση του μεταγραφικού παράγοντα παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στόχος της πρώτης ενότητας της διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της ρύθμισης της δράσης του HIF-2 από τις κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα (Extracellular signal Regulated Kinases, ERK1/2). Ειδικότερα, στόχος της διατριβής ήταν να διερευνηθεί εάν ο HIF-2α είναι υπόστρωμα των ERK1/2, να προσδιοριστούν τα κατάλοιπα

που φωσφορυλιώνονται και να διαλευκανθεί ο μοριακός μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2 από τις ERK1/2.

Η υπερέκφραση της HIF-2α υπομονάδας σχετίζεται με άσχημη εξέλιξη σε πολλούς τύπους καρκίνου και τα τελευταία χρόνια ο HIF-2 αποτελεί αντικείμενο μελέτης ως στόχος θεραπευτικών αντικαρκινικών παρεμβάσεων. Η βιοδραστική μορφή της βιταμίνης D, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D, έχει αναφερθεί ότι διαθέτει αντικαρκινικές ιδιότητες. Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές καταδεικνύουν σημεία σύγκλισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και των HIF. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν η 1,25(OH)<sub>2</sub>D, ρυθμίζει τη λειτουργία του HIF-2. Στόχος της δεύτερης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ήταν μελετηθεί η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, στο μονοπάτι ενεργοποίησης του HIF-2 και συγκεκριμένα στην έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και να συγκριθεί με την αντίστοιχη επίδρασή της στον HIF-1. Έτσι, η διευκρίνηση του μηχανισμού της επίδρασης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη λειτουργία του HIF-2, μπορεί να οδηγήσει στην χρήση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D ως πρότυπης ουσίας για την ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων σε νόσους που σχετίζονται με την υποξία, όπως ο καρκίνος.

## 2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1 ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές:

<b>HeLa</b>	ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας
<b>HepG2</b>	κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
<b>Huh7</b>	κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος

#### 2.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

##### 2.1.2.1 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδίων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του βακτηρίου E.coli:

Στέλεχος	Εταιρεία	Ανθεκτικότητα
TOP10	Invitrogen	στρεπτομυκίνη

Το στέλεχος αυτό είναι γενετικά τροποποιημένο ώστε να επιτρέπει τη σταθερή αναπαραγωγή πλασμιδίων με υψηλό αριθμό αντιγράφων. Τα TOP10 χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης.

##### 2.1.2.2 Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του βακτηρίου E.coli:

Στέλεχος	Εταιρεία	Ανθεκτικότητα
BL21 RIL	Stratagene	χλωραμφαινικόλη
BL21 GOLD (DE3)	Agilent Technologies	τετρακυκλίνη
Rosetta 2	Novagen	χλωραμφαινικόλη
B834 (DE3)	Novagen	-
B834 pLysS	Agilent Technologies	τετρακυκλίνη
Origami 2	Agilent Technologies	τετρακυκλίνη, καναμυκίνη

Τα παραπάνω στελέχη της E.coli είναι γενετικά τροποποιημένα ώστε να μην εκφράζουν τις πρωτεάσες Lon και OmpT. Για αυτό το λόγο είναι ιδανικά για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (220). Το στέλεχος BL21 RIL περιέχει επιπλέον αντίγραφα των γονιδίων argU, ileY και leuW tRNA. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν tRNAs που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια αργινίνης AGA και AGG, το κωδικόνιο ισολευκίνης AUA και το κωδικόνιο λευκίνης CUA αντίστοιχα (*Agilent. Competent cells*). Το στέλεχος Rosetta 2 περιέχει το πλασμίδιο pRARE2 το οποίο κωδικοποιεί τα γονίδια ileY, argU, leuW, proL και glyT tRNA (Novagen. Competent cells). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν tRNAs που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια ισολευκίνης AUA, αργινίνης AGG και AGA, λευκίνης CUA, προλίνης CCC και γλυκίνης GGA. Η διαθεσιμότητα των tRNAs στα παραπάνω στελέχη επιτρέπει υψηλού επιπέδου έκφραση ετερόλογων ανασυνδυασμένων γονιδίων σε περιπτώσεις όπου η μετάφραση θα περιοριζόταν από τη χρήση των κωδικονίων της E.coli. Το στέλεχος B 834 pLysS φέρει το πλασμίδιο pACYC184 που κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη, που είναι φυσικός αναστολέας της T7 RNA πολυμεράσης και χρησιμεύει στην καταστολή της βασικής έκφρασης των γονιδίων υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

### 2.1.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA και περιέχουν ένα μικρό μέρος της γενετικής πληροφορίας των βακτηριακών κυττάρων. Τα βακτήρια μπορεί να περιέχουν ένα ή και περισσότερα πλασμίδια. Αντιγράφονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA. Τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται για την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Το γονίδιο ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε έναν κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο εισάγεται σε μια ειδική περιοχή του φορέα, που ονομάζεται πολυσυνδέτης (multiple cloning site, MCS). Η περιοχή αυτή περιέχει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Έτσι είναι δυνατή η εισαγωγή ενός τμήματος DNA μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα εξής:

Πλασμίδιο	Προμηθευτής	Ανθεκτικότητα
pBlueScript II KS+	Agilent	αμπικιλίνη
pFLAG-CMV <sup>TM</sup> -2	Sigma	αμπικιλίνη
pGEX-4T1	Amersham	αμπικιλίνη
pEGFP-C1	Clontech	καναμυκίνη

**pGL3-VEGF-5HRE**

Dr. Giaccia (Department of Medicine,  
University of Stanford)

αμπικιλίνη

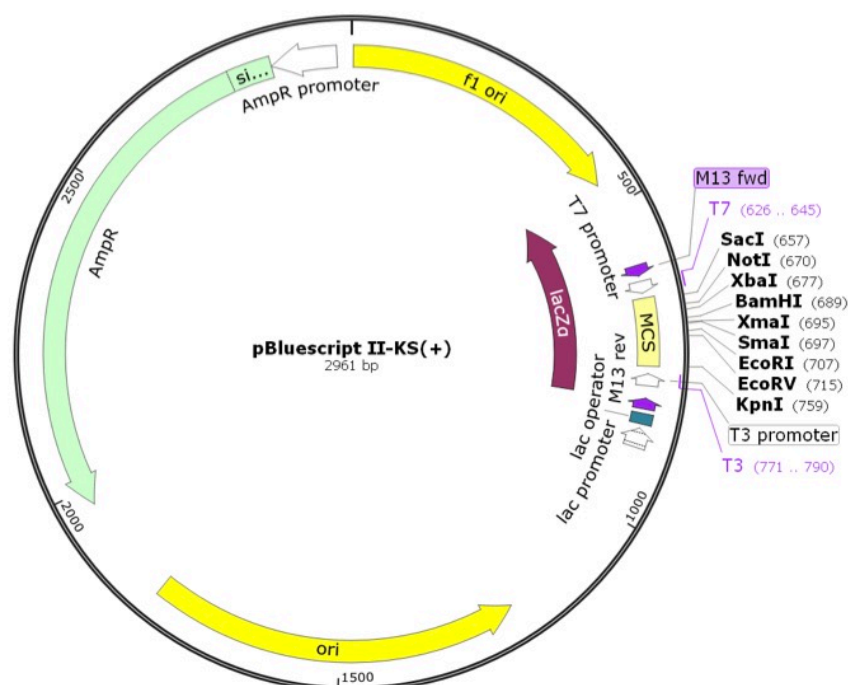
**pCI-Renilla**

Promega

αμπικιλίνη

### pBlueScript II KS+

Ο φορέας pBlueScript II KS+ φέρει στην αλληλουχία του τον υποκινητή lacZ. Όταν εκφράζεται σε βακτήρια τους προσδίδει μπλε χρώμα. Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α με *in vitro* στοχευμένη μεταλλαξιγένεση (Εικόνα 30).



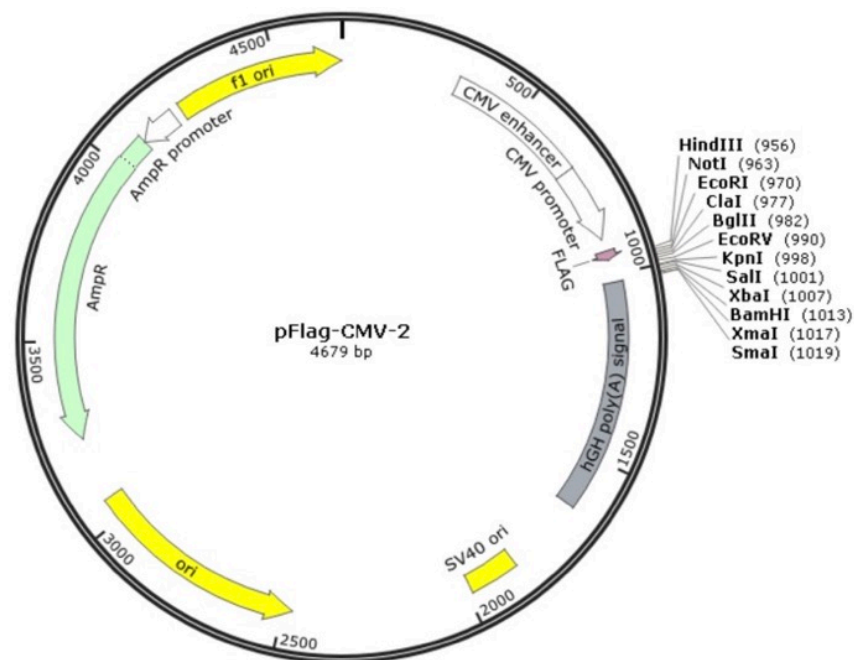
**Εικόνα 30:** Ο πλασμιδιακός φορέας pBlueScript II KS+

### pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2

Ο φορέας pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2 φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV επιτρέποντας έτσι την έκφραση μιας κλωνοποιημένης cDNA αλληλουχίας σε κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών. Στο 5' άκρο της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS) περιέχει μια αλληλουχία που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του HIF-2α πλήρους μήκους (WT, S672A, S672D, L662A/ L677A, L662A/ L6677A/ S672A) στη



θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI, που βρίσκεται εντός της MCS και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG (Εικόνα 31).

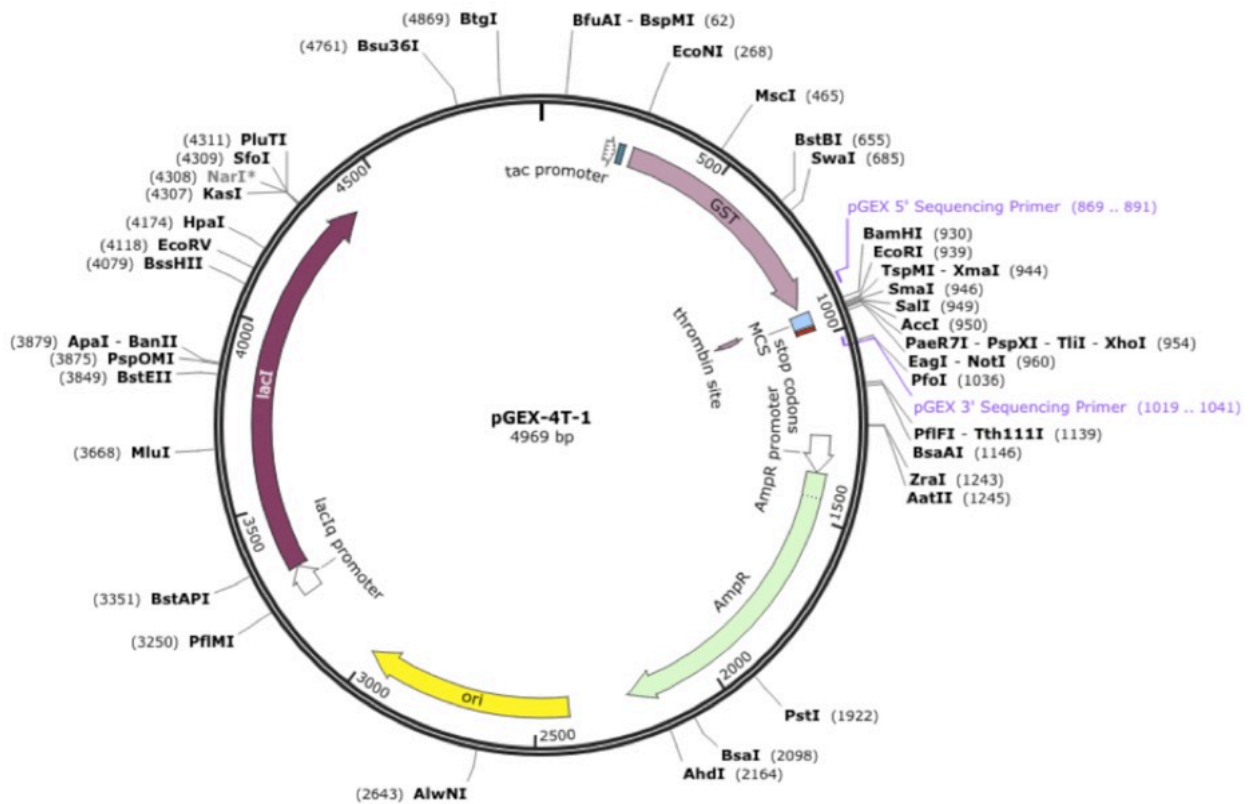


Εικόνα 31: Ο πλασμιδιακός φορέας pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2

### pGEX-4T1

Ο φορέας pGEX-4T1 είναι ένας πλασμιδιακός φορέας έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια. Η έκφραση των κλωνοποιημένων cDNA βασίζεται στην παρουσία του υποκινητή tac που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του καταστολέα lacI. Η έκφραση του lacI βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacIq. Στο 5' άκρο της περιοχής του πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site, MCS) περιέχει μια αλληλουχία που κωδικοποιεί για την S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Επιτρέπει έτσι, τη χημική επαγωγή της έκφρασης της κλωνοποιημένης cDNA αλληλουχίας σε σύντηξη με την GST σε βακτηριακά κύτταρα η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη στην καλλιέργεια του ανάλογου της αλλολακτόζης Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) το οποίο δεσμεύεται στον καταστολέα lacI και επιτρέπει την έκφραση της χημικής πρωτεΐνης με υψηλή απόδοση. Οι συζευγμένες με GST πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν εύκολα με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης 4B συζευγμένων με γλουταθειόνη. Η GST μπορεί να αποκοπεί από την χημική πρωτεΐνη μέσω της ύπαρξης της αλληλουχίας αναγνώρισης θρομβίνης μεταξύ της GST και του ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του HIF-2α πλήρους μήκους (WT, T626A, S672A) καθώς και μικρότερων τμημάτων του (1-542, 1-560,

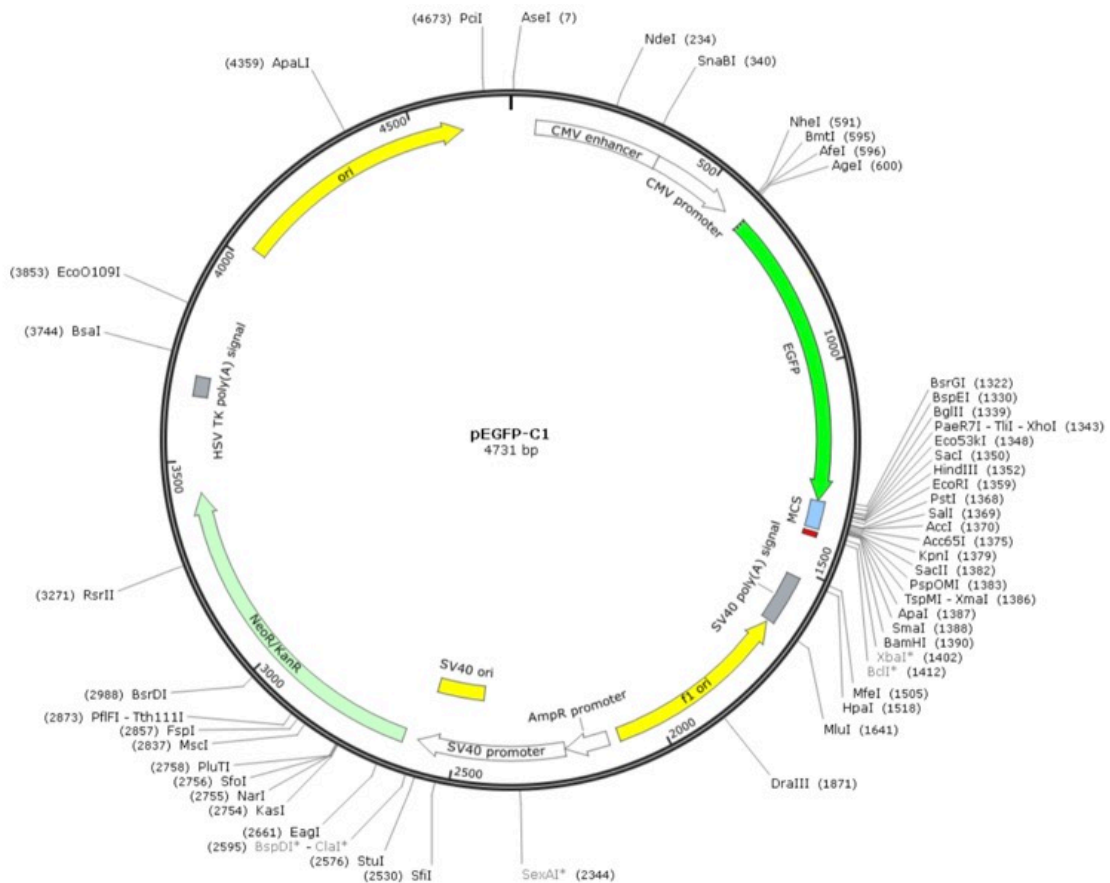
1- 620, 1-640, 1-679, 640-870, 680-870), στην αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI, που βρίσκεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη MCS και μετά από την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την GST (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1

### pEGFP-C1

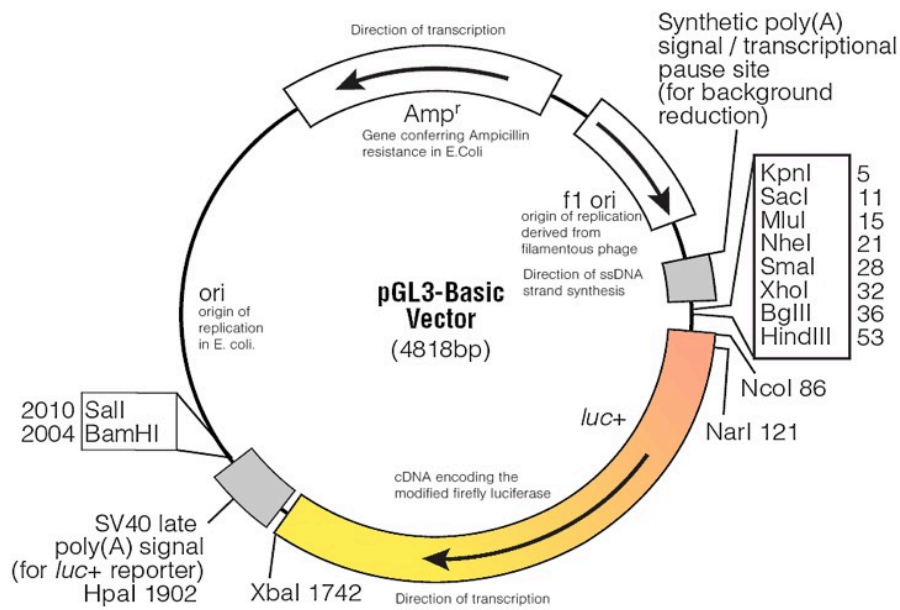
Ο φορέας pEGFP-C1 φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV επιτρέποντας έτσι την έκφραση μιας κλωνοποιημένης cDNA αλληλουχίας σε κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών. Στο 5' άκρο της περιοχής του πολυσυνδέτη MCS, περιέχει μια αλληλουχία που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Εικόνα 33). Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των διαφόρων μορφών του τμήματος 640- 679 του HIF-2α (WT, S672A, S672D, L662A/ L677A, L662A/ L6677A/ S672A) στην αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI, που βρίσκεται στην MCS και μετά από την αλληλουχία που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG.



Εικόνα 33: Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1

### pGL3-VEGF-5HRE

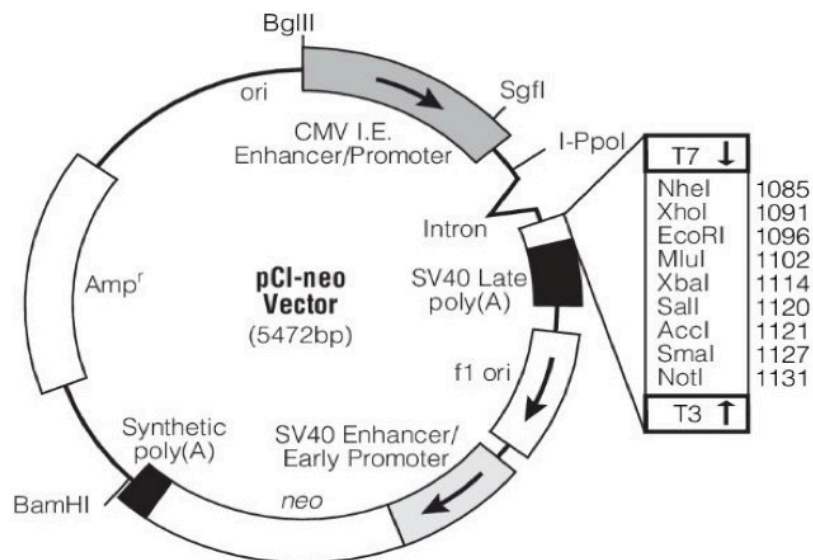
Ο φορέας pGL3-VEGF-5HRE φέρει τα χαρακτηριστικά του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic. Πιο συγκεκριμένα, φέρει τον υποκινητή του ιού SV40. Επιπλέον, περιέχει 5 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements, HREs) του γονιδίου VEGF, στις αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών BglII και KpnI εντός της MCS και πριν από την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση της πυρολαμπίδας. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2 και αποτελεί ευγενική χορηγία του Dr. Giaccia (Department of Medicine, University of Stanford) (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34:** Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-Basic

### pCI-Renilla

Φέρει τον υποκινητή του ιού SV40. Το πλασμίδιο αυτό εκφράζει τη λουσιφεράση της Renilla. Αποτελεί έτσι δείκτη της απόδοσης της διαμόλυνσης των ευκαρυωτικών κυττάρων και διευκολύνει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (**Εικόνα 35**).



**Εικόνα 35:** Ο πλασμιδιακός φορέας pCI

## 2.1.4 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ, ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΚΑΙ SMALL INTERFERING RNA (siRNA)

Οι εκκινητές και τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την εταιρία VBC-Biotech.

Οι αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

<b>HIF-2α F-1</b>	5' - TTTT <b>GGATCC</b> ATGACAGCTGACAAGGAGAAG - 3'
<b>HIF-2α F-640</b>	5' - TTTT <b>GGATCC</b> ATGCCAGATCCACCATTACAT - 3'
<b>HIF-2α F-680</b>	5' - TTTT <b>GGATCC</b> ATGAAGACAAGGTCTGCAAAG - 3'

Οι αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

<b>HIF-2α R-870</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGGTGGCCTG - 3'
<b>HIF-2α R-542</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGAAGTCTTCCCCGTC - 3'
<b>HIF-2α R-560</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGGGGGTGGACTGTGG - 3'
<b>HIF-2α R-620</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGCACGGTGGCAGGGATGC - 3'
<b>HIF-2α R-640</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGGGCCACTGGGTATTGG - 3'
<b>HIF-2α R-679</b>	5' - TTTT <b>GGATCCT</b> CAGAAGGTGGAGAC - 3'

Με **μπλε** χρώμα επισημαίνεται η αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI (**GGATCC**) και με **έντονη** γραμματοσειρά επισημαίνεται η αλληλουχία των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (**ATG** και **TCA**).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την RT- PCR είναι οι ακόλουθες:

	<b>Πρόσθιοι εκκινητές</b>	<b>Ανάστροφοι εκκινητές</b>
<b>EPO</b>	5' - AGGCCGAGAATATCAGACG - 3'	5' - CCATCCTCTTCCAGGCATAGAAA - 3'
<b>PAI-1</b>	5' - CAGCTGACAGGAGGAGA - 3'	5' - CCCATGAGCTCCTTGTACAGAT - 3'
<b>PGK1</b>	5' - CTGTGGCTTCTGGCATACT - 3'	5' - CGAGTGACAGCCTCAGTATA - 3'
<b>18S</b>	5' - CTCAACACGGGAAACCTCAC - 3'	5' - CGCTCCACCAACTAAGAACG - 3'

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την in vitro στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι οι ακόλουθες:

<b>T626A F</b>	5' - G GCC AGC GCC CCT CTC TCT TCC ATG-3'
<b>T626A R</b>	3' - CAT GGA AGA GAG AGG GGC GCT GGC C -5'
<b>S672A F</b>	5' - CCCCTGTCGCTCCACCCCATGTCTCCACC -3'
<b>S672A R</b>	5' - GGTGGAGACATGGGGTGGATCGACAGGGG -3'
<b>S672D F</b>	5' - CCCCTGTCGATCCACCCCATGTCTCCACC-3'
<b>S672D R</b>	5' - GGTGGAGACATGGGGTGGATCGACAGGGG-3'
<b>L662A/ L667A F</b>	5' -CACAGAGTTCGCGGGAGCAGCGCCGGCGGGGCCCCCTGTCTCT-3'
<b>L662A/ L667A R</b>	5' -AGAGACAGGGGGGCCCCGCGGCGCTGCTCCCGCGAACTCTGTG-3'

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) χρησιμοποιήθηκε το si (Abnova) και ως αρνητικό δείγμα ελέγχου το AllStars siRNA (Qiagen).

### 2.1.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (Sequencing)

Η ανάγνωση της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών πραγματοποιήθηκε από την εταιρία CeMIA SA με αλληλούχιση Sanger.

### 2.1.6 ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Applichem GmbH (Germany) και Sigma (St.Louis, USA)

Τα φιλμ ραδιογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα in vitro φωσφορυλίωσης και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των φιλμ ήταν:

X-Ray developer	Kodak
X-Ray fixer	Kodak

### 2.1.7 ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τα υλικά μοριακής βιολογίας προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Takara, New England BioLabs Inc, και Fermentas.

### 2.1.8 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα εξής:

Αντισώματα	Προμηθευτής	Αραίωση
------------	-------------	---------

Πολυκλωνικό αντί-HIF-2α	Novus Biologicals	1:750
Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α	(221)	1:1000
Μονοκλωνικό αντί-ARNT	BD Biosciences	1:500
Μονοκλωνικό αντί-Actin	Cell Signalling	1:5000
Μονοκλωνικό αντί-tubulin	Cell Signalling	1:10000
Μονοκλωνικό αντί-FLAG M5	Cell Signalling	1:10000
Πολυκλωνικό αντί-GST	Amersham Biosciences	1:15000
Ορός κόνικλος αντί- GFP	Δρ. Χαραλαμπία Μπολέτη (Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur)	1:3000
Πολυκλωνικό αντί-USF2	Santa Cruz	1:200
Πολυκλωνικό αντί- p44/42 MAPK	Cell Signalling	1:1000
Πολυκλωνικό αντί- phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling	1:1000
Μονοκλωνικό αντί-CRM1	BD Biosciences	1:1000
Πολυκλωνικό αντί- VDR	Abnova	1:500

- Ως δεύτερα αντισώματα για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν συζευγμένα με υπεροξειδάση αντισώματα έναντι των IgG αλυσίδων κόνικλος, ποντικού ή κατσίκας από τις εταιρείες Santa Cruz και Cell Signalling.
- Ως δεύτερα αντισώματα για τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν συζευγμένα με Cy3 αντισώματα έναντι των IgG αλυσίδων κόνικλος, ποντικού ή κατσίκας από τις εταιρείες Santa Cruz και Cell Signalling.

## 2.1.9 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### 2.1.9.1 Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x

NaCl	138 mM
KCl	2.67 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.47 mM

Το διάλυμα πρέπει να έχει pH 7.4 και δεν χρειάζεται ρύθμιση.



## 2.1.9.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης κυττάρων

### 2.1.9.2.1 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης ευκαρυωτικών κυττάρων

#### Lysis Buffer

Tris-HCl pH 7.5	25mM
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1%
PMSF	2mM
DTT	5mM

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα HeLa, Huh7 και HepG2.

#### IP Buffer

Hepes pH 7.6	25mM
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1%
PMSF	2mM
DTT	5mM

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα HeLa για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

#### Διαλύματα βιοχημικής κυτταρικής κλασμάτωσης

<b>Υποτονικό διάλυμα A</b>		<b>Υπέρτονο διάλυμα B</b>	
Hepes pH 7.6	10mM	Hepes-KOH	20mM
KCl	10mM	NaCl	420mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
Digitonin	0.5mM	EDTA	0.2mM
PMSF	0.2mM	PMSF	0.2mM
DTT	0.5mM	DTT	0.5mM
		Glycerol	25%



Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή κυτταροπλασματικού και πυρηνικού κλάσματος ευκαρυωτικών κυττάρων HeLa .

#### 2.1.9.2.2 Ρυθμιστικά διαλύματα λύσης βακτηριακών κυττάρων

##### Lysis Buffer για απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο GST

Tris-HCl pH 7.5	25mM
NaCl	130mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
Triton X-100	1%
Glycerol	5%
PMSF	2mM
DTT	5mM

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη λύση διάφορων στελεχών βακτηριακών κυττάρων E.coli που εκφράζουν χμιαρικές πρωτεΐνες με επίτοπο GST με απώτερο σκοπό την απομόνωση των καθαρών πρωτεϊνών.

#### 2.1.9.3 Ρυθμιστικά διαλύματα υγρής χρωματογραφίας συγγένειας GST 4B, Protino

Tris-HCl pH 9	25mM
ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)	10mM

Με το διάλυμα αυτό πραγματοποιήθηκε η έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης γλουταθειόνης. Έγινε επώαση των σφαιριδίων με 1 ml διαλύματος 10 mM γλουταθειόνης, 25 mM Tris pH 9 για 5 λεπτά και συλλογή του κλάσματος.

#### 2.1.9.4 Πηκτή ακρυλαμιδίου

Πηκτή διαχωρισμού (separating)		Πηκτή επιστοίβαξης (stacking)	
Tris- HCl pH 8.8	0.375 M	Tris- HCl pH 6.8	0.125M
ακρυλαμίδιο	8-12%	ακρυλαμίδιο	4.5%
EDTA	2mM	EDTA	2mM
SDS	0.1%	SDS	0.1%
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0.04%	Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0.04%
TEMED	0,02%	TEMED	0,04%

#### 2.1.9.5 Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10x

Tris	50 mM
Glycine	1.92 M
SDS	1%

Το διάλυμα πρέπει να έχει pH 8.3 και δεν χρειάζεται ρύθμιση. Για την Παρασκευή Running Buffer 1x, 1L: Αραίωση 100mL Running Buffer 10x σε 900mL dH<sub>2</sub>O.

#### 2.1.9.6 Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer) Tris- Borate 10x

Tris	125 mM
DTT	0.5mM
SDS	0.2%

Το διάλυμα ρυθμίζεται με άλας βορικού οξέος ώστε να έχει pH 8.5.

#### 2.1.9.7 Διάλυμα Laemmli

Tris-HCl pH 6.8	62.5 mM
DTT	25mM
SDS	2.3%
Glycerol	10%
Bromophenol Blue	0.05%

#### 2.1.9.8 Διαλύματα χρώσης πηκτής πολυακρυλαμιδίου

##### Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue G250

Coomassie Brilliant Blue	0.1%
Οξικό οξύ	10%
Μεθανόλη	50%

### Διάλυμα χρώσης Ponceau S

Ponceau S	0.5%
Οξικό οξύ	1%

### Διαλύματα χρώσης με νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>)

Διάλυμα μονιμοποίησης (Fixation) και τερματισμού (Stop)		Διάλυμα ευαισθητοποίησης (Sensitization)		Διάλυμα ανάπτυξης (Developer)	
Μεθανόλη	50%	AgNO <sub>3</sub>	0.1%	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3%
Οξικό οξύ	10%	DTT	5μg/ mL	HCHO	0.0185%

### 2.1.9.9 Διαλύματα για την εμφάνιση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Διάλυμα λουμινόλης		Διάλυμα κουμαρικού οξέος	
Tris- HCl pH 8.5	0.1 M	Κουμαρικό οξύ	6.8mM
λουμινόλη	1.25mM	DMSO	100%

### 2.1.9.10 Ρυθμιστικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 50×

Tris	24.2%
Οξικό οξύ	5.71%
EDTA pH 8.6	0.05M

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη φόρτωση των δειγμάτων αποτελείται από 5% γλυκερόλη, 0.42% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0.42% κυανούν του ξυλενίου.

### 2.1.9.11 Διαλύματα για παρασκευή βακτηριακών κυττάρων Top10 και BL21RIL δεκτικών για μετασχηματισμό (competent)

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

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ cDNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

Η κλωνοποίηση μιας αλληλουχίας DNA σε κάποιον πλασμιδιακό φορέα, βασίζεται στη θραύση του πλασμιδιακού DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ενδονουκλεάσες περιορισμού και στη σύνδεσή του με ένα τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Τα δύο είδη DNA μπορούν να ενωθούν με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται σε βακτηριακά κύτταρα με μετασχηματισμό. Η επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που έχουν παραλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με κατάλληλα αντιβιοτικά, τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων κλώνων.

Τα βήματα που απαιτούνται για την κλωνοποίηση είναι τα εξής:

1. Η ενίσχυση της αλληλουχίας DNA που θα κλωνοποιηθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, χρησιμοποιώντας το cDNA ως μήτρα DNA.
2. Πέψη του φορέα κλωνοποίησης με μια ενδονουκλεάση περιορισμού που αναγνωρίζει μόνο μια θέση στον πλασμιδιακό φορέα στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο φορέας θα γίνει γραμμικός και δεν θα κατακερματιστεί σε περισσότερα κομμάτια.
3. Ηλεκτροφόρηση των αλληλουχιών DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος για να ταυτοποιηθεί η παρουσία τους και γίνει η ποσοτικοποίησή τους
4. Ανάκτηση των αλληλουχιών DNA από πηκτή αγαρόζης
5. Αντίδραση επίδεσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (Ligation) με τη χρήση της λιγάσης του βακτηριοφάγου T4
6. Μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

7. Επιλογή των μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων και ταυτοποίηση με αλληλούχιση.

### **2.2.2 ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ**

Όλες οι αλληλουχίες DNA μπορούν να κοπούν σε μικρότερα τμήματα με συγκεκριμένα ένζυμα που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Η ενεργότητα του ενζύμου (Unit/μl) καθορίζει την ποσότητα που χρησιμοποιείται σε κάποια αντίδραση πέψης. Ειδικότερα, 1 Unit ενζύμου είναι η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1 μg DNA σε μια ώρα. Η αντίδραση πέψης με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιείται είτε για να ελέγξουμε την παρουσία του ενθέματος DNA και τον προσανατολισμό του, ή για να απομονώσουμε συγκεκριμένα τμήματα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Οι αντιδράσεις πέψης πραγματοποιήθηκαν σε 20 μl τελικού όγκου, με 1μg πλασμιδιακού DNA, 1 Unit του αντίστοιχου ενζύμου περιορισμού (New England Biolabs) και 1x ρυθμιστικού διαλύματος που είναι συγκεκριμένης σύστασης για κάθε ένζυμο και παρέχεται από την εταιρία παρασκευής. Ο χρόνος επώασης των αντιδράσεων πέψης ήταν 1-2 ώρες σε καθορισμένη θερμοκρασία για κάθε ένζυμο.

### **2.2.3 ΑΠΟΦΩΣΦΟΥΛΙΩΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA**

Η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιείται μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, για την αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλινα ή δίκλινα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια), εμποδίζοντας έτσι την επανασύνδεσή τους. Η αποφωσφορυλίωση πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (New England BioLabs). Η αντίδραση επίδεσης, περιέχει 1μg DNA που είχε επεξεργαστεί με ενδονουκλεάσες περιορισμού, 20 Units CIP (10.000 Unit/ml, New England Biolabs) και H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο αντίδρασης 30μl. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C.

### **2.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Ένας τρόπος διαχωρισμού και καθαρισμού τμημάτων DNA, είναι η ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτές αгарόζης και η ακόλουθη απομόνωσή τους από αυτές. Οι πηκτές αгарόζης παρασκευάζονται με την προσθήκη αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση μέχρι το σχηματισμό διαυγούς διαλύματος. Η ψύξη του διαλύματος προκαλεί το σχηματισμό ενός πλέγματος με πυκνότητα που εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης. Τα τμήματα DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένα. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, προκαλεί τη

μετακίνησή τους προς την άνοδο. Η ταχύτητα της μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων του DNA, τη συγκέντρωση της αгарόζης, τη διαμόρφωση των τμημάτων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση 1% αгарόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (**2.1.9.1**), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των τμημάτων DNA στην πηκτή εξαιτίας της ιδιότητάς του να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα (590 nm). Τα δείγματα προετοιμάζονται με διάλυμα φόρτωσης (**2.1.9.10**). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100V για 30 έως 60 λεπτά .

### **2.2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ Κ ΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που προτείνεται από την εταιρία, με διαλύματα που παρέχονται από το συγκεκριμένο kit και έχει ως εξής: Αρχικά το κομμάτι αгарόζης που περιείχε το προς απομόνωση DNA αφαιρέθηκε από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Το κομμάτι θερμάνθηκε με διάλυμα QG στους 50<sup>0</sup>C για 10 λεπτά για τον αποπολυμερισμό της αгарόζης και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Προστέθηκε στη συνέχεια ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύτηκε κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Ακολούθησε απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών με πλύση με διάλυμα PE. Η έκλουση του δεσμευμένου στη στήλη DNA έγινε με 30 μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O σε pH 8.

### **2.2.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ**

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων DNA (π.χ. ενός ενθέματος και ενός πλασμιδίου) με συμπληρωματικά 3' και 5' άκρα. Για την αντίδραση της λιγάσης πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε αναλογία 1/4 προστέθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης, 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/μl, New England Biolabs) και H<sub>2</sub>O. Το μίγμα επώαστηκε ολονύχτια στους 16 °C.

### **2.2.7 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (COMPETENT) ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ E. COLI TOP10 ΚΑΙ E. COLI BL21RIL**

Σε στελέχη E.coli Top10 και BL21RIL έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων ή των αντιδράσεων λιγάσης. Πρώτα παρασκευάστηκαν κύτταρα E.coli Top10 και E.coli BL21RIL δεκτικά για μετασχηματισμό (competent). Εμβολιάστηκαν καλλιέργειες 3 ml θρεπτικού ΤΥΜ (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl και 10 mM MgSO<sub>4</sub>) με αποικίες από πιάτο με stock καλλιέργειες Top10 και BL21RIL αντίστοιχα και έγινε ολονύχτια επώαση στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραιώση των καλλιεργειών 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml και επώασή τους στους 37°C μέχρι OD<sub>600nm</sub>=0,350-0,400. Τότε οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 4000xg για 5 λεπτά στους 4 °C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30 mM CH<sub>3</sub>COOK, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη) και επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000xg για 5 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl και 20% γλυκερόλη) και επώαστηκε για 1 ώρα στον πάγο. Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 100 ng/μl πλασμιδίου ή 20 μl από αντίδραση λιγάσης σε κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min. Μετά από θερμικό σοκ στους 42°C για 2 λεπτά, προστέθηκαν 700 μl θρεπτικού LB (Luria Broth) χωρίς αντιβιοτικά και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στα 4000xg, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl κυττάρων τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάστηκε ως εξής: Για 1 lt προστέθηκαν 10 g τρυπτόνης, 5 g εκχύλισματος ζύμης και 5 g NaCl. Στην περίπτωση παρασκευής στερεού θρεπτικού μέσου LB-άγαρ ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστέθηκαν επιπλέον 20 g άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώθηκε ενώ λίγο πριν την πήξη του διαλύματος έγινε προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού και επίστρωση σε τρυβλία.

### **2.2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI PREPARATION)**

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 5 ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής εμβολιάζονται αποικίες από τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα TOP10 και επώάζονται ολονύχτια στους 37°C υπό

συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται στα 4000rpm για 5 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 250 μl διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension Buffer A1) που περιέχει 0,1M NaOH, 0,5% SDS σε Tris-HCl pH 7.5 και γίνεται έντονη ανάδευση. Κατόπιν προστίθενται 150 μl διαλύματος οξικού νατρίου 3 M pH 5,2 έγινε έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 11000xg και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι. Το DNA κατακρημνίστηκε μέσω προσθήκης 100% ισοπροπανόλης και ψύξης στους -20°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου, ξέπλυμα με 500 μl 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στα 11000xg για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να επαναδιαλυθεί τελικά σε 30 μl αποστειρωμένου δις απιονισμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).

### **2.2.9 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕ PCR**

Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται στην ενότητα **2.2.33**. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν για τα τμήματα του HIF-2α 1-560, 1-620, 1-640, 640- 870, 680- 870 και 640- 679. Αρχικά τα τμήματα του HIF-2α ενισχύθηκαν με την DNA πολυμεράση Taq για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της PCR και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση Vent λόγω της μεγαλύτερης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στις ίδιες συνθήκες.

#### **Μίγμα αντίδρασης:**

- 100 ng εκμαγείο DNA
- 1x Thermopol Buffer
- 2 mM από κάθε dNTP
- 1 unit Vent πολυμεράση
- 10 pmoles/μl πρόσθιου εκκινητή
- 10 pmoles/μl οπίσθιου εκκινητή
- H<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο αντίδρασης τα 50 μl

#### **Συνθήκες αντίδρασης:**

- 5 min → 94 °C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1 min → 94 °C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1 min → 60 °C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση
- 30 secs → 72 °C Επιμήκυνση

#### **Αριθμός κύκλων: 30**

- 5 min → 72 °C Τελική επιμήκυνση



Για το στάδιο της υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το πρόγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (Tm) Oligo Calculator. Στο τέλος 4 μl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του PCR clean kit της εταιρείας Qiagen.

#### **2.2.10 ΣΗΜΕΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ (SITE-DIRECTED MUTAGENESIS)**

Η τεχνική της σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιεί τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με ειδικούς εκκινητές για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε κάποια αλληλουχία DNA με σκοπό την αλλαγή ή την απαλοιφή ή την ενσωμάτωση ενός ή περισσότερων κωδικονίων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το QuickChange II site-directed mutagenesis kit της εταιρείας Agilent Technologies. Η DNA πολυμεράση Pfu Ultra επιτρέπει την ενίσχυση των αλληλουχιών και των δύο αλυσίδων του πλασμιδίου με μεγάλη πιστότητα χωρίς να τους εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί ώστε να εισαχθεί μετάλλαξη. Για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι απαραίτητος ένας υπερελικωμένος πλασμιδιακός φορέας ανασυνδυασμένος με το υποψήφιο για μεταλλαξιγένεση γονίδιο και δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία περιέχουν την επιθυμητή μεταλλαγμένη αλληλουχία. Τα ολιγονουκλεοτίδια, που είναι συμπληρωματικά για τις δύο αλυσίδες του πλασμιδιακού φορέα επιμηκύνονται από την πολυμεράση PfuUltra με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR δημιουργώντας ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο. Μετά την PCR ακολουθεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού DpnI που αναγνωρίζει μεθυλιωμένες περιοχές στο DNA και πιο συγκεκριμένα την αλληλουχία 5'-Gm6ATC-3' που εντοπίζεται αποκλειστικά στο μητρικό πλασμιδιακό DNA, με αποτέλεσμα την εκλεκτική καταστροφή του. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων TOP10 και επιλογή των κλώνων που περιέχουν τη μετάλλαξη με αλληλούχιση.

### Σχεδιασμός ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων

Σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά για τις αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν τις: θρεονίνη 626, σερίνη 672, λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α που περιλαμβάνουν τις αντίστοιχες επιθυμητές μεταλλάξεις (βλ. Υλικά-Εκκινητές) και κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech. Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των ολιγονουκλεοτιδίων υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

όπου N συμβολίζει το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου σε βάσεις (ενδείκνυται να είναι περίπου 25 με 45 βάσεις με την περιοχή προς μετάλλαξη να βρίσκεται στο κέντρο του ολιγονουκλεοτιδίου), %GC είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων G και C στο σύνολο των νουκλεοτιδίων (ενδείκνυται να είναι τουλάχιστον 40%) και % mismatch είναι το ποσοστό των νουκλεοτιδίων που είναι διαφορετικά σε σχέση με την αλληλουχία αγρίου τύπου.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

- 20 ng pBlueScript - HIF-2α WT (εκμαγείο)
- 1x Buffer
- 125 ng πρόσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 125 ng οπίσθιου εκκινητή-ολιγονουκλεοτιδίου
- 1 μl από μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs
- 2,5 units PfuUltra HF DNA pol
- H<sub>2</sub>O ως 50 μl

### Συνθήκες PCR:

- 30 sec 95°C
- 30 min 95°C
- 1 min 55°C
- 6 min 68°C

Τα στάδια 2,3 και 4 επαναλήφθηκαν για 18 κύκλους.

Μετά το τέλος της αντίδρασης κρατήθηκαν 2 μl από την κάθε αντίδραση σαν δείγμα ελέγχου για τον μετέπειτα μετασχηματισμό.

### Πέψη με DpnI

Ακολουθεί πέψη των προϊόντων της PCR με την προσθήκη της ενδονουκλεάσης DpnI για 1 ώρα στους 37°C. Το προϊόν πέψης καθαρίζεται με τη μέθοδο της κατακρήμνισης του DNA με 100% αιθανόλη (προσθήκη 3 όγκων αιθανόλης, επώαση στους -20°C για 30 λεπτά, φυγοκέντρωση για 10 λεπτά και επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 μl H<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια γίνεται μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων TOP10 και επίστρωσή τους

σε τρυβλία LB με αμπικιλίνη. Την επόμενη μέρα επιλέγονται αποικίες, εμβολιάζονται μικρές καλλιέργειες, και πραγματοποιείται απομόνωση DNA μικρής κλίμακας. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA αποστέλλεται στην εταιρία CeMIA για ανάγνωση της αλληλουχίας του με αλληλούχιση κατά Sanger και έλεγχο ύπαρξης της επιθυμητής μετάλλαξης.

### **2.2.11 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ IPTG**

Το γονίδιο της υπονήφιας για υπερέκφραση πρωτεΐνης έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμίδιο κάτω υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» του οπερονίου της λακτόζης. Το κλωνοποιημένο γονίδιο βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση διότι η περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το γονίδιο *lacI* και εμποδίζει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Η λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG) προσδένεται στον καταστολέα και τον απενεργοποιεί, δίνοντας έτσι το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση του κλωνοποιημένου γονιδίου και την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η επαγωγή της έκφρασης των χημικών πρωτεϊνών με IPTG πραγματοποιείται ως εξής: 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη εμβολιάζεται με μια μοναδική αποικία από τρυβλίο που περιέχει βακτήρια μετασχηματισμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C. 500 ml LB (με αντιβιοτικά) εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια και επώάζονται υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει στα 0.4- 0.5 (μέτρηση στα 600 nM). Στη συνέχεια, προστίθενται στην καλλιέργεια 0,5 mM IPTG και η επώαση συνεχίζεται στους 18°C για 3 ώρες. Ακολούθως γίνεται συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 4000xg. Το ίζημα των κυττάρων ξεπλένεται με H<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται στους -80°C.

### **2.2.12 ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ**

Τα κύτταρα επαναιωρούνται στο διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων (~8 ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 500 ml αρχικής καλλιέργειας). Ακολουθεί λύση των κυττάρων με συσκευή εκπομπής υπερήχων (6 παλμοί υπερήχων διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 60 δευτερολέπτων). Το παραπάνω εκχύλισμα στη συνέχεια

φυγοκεντρείται στα 10000xg για 30 λεπτά προκειμένου να διαχωριστεί το διαλυτό από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις στους 4°C.

### **2.2.13 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST)**

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση χημικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με έναν επίτοπο που κωδικοποιεί την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη είναι ο προσδέτης που ακινητοποιείται σε σφαιρίδια κάποιου αδρανούς υλικού όπως η σεφαρόζη ή η αραρόζη. Οι χημικές πρωτεΐνες δεσμεύονται στα σφαιρίδια μέσω της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), που έχει σαν υπόστρωμα τη γλουταθειόνη. Με τη χρήση κατάλληλων πλασμιδίων (pGEX-σειρά) που περιέχουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης πριν από την περιοχή του πολυσυνδέτη, είναι δυνατή η παραγωγή ανασυνδυασμένων GST-πρωτεϊνών που μπορούν να απομονωθούν στη συνέχεια από τις υπόλοιπες με χρωματογραφία αγκιστείας όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με προσθήκη καθαρής ανηγμένης γλουταθειόνης η οποία ανταγωνίζεται τη συζευγμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Αρχικά πραγματοποιείται λύση των βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χημικές GST-πρωτεΐνες με τη διαδικασία που περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Το διαλυτό κλάσμα επωάζεται για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (GSH-Sepharose) της εταιρίας Amersham (~300 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 500 ml καλλιέργειας βακτηρίων), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια (Flow through) απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης των 10 λεπτών. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια πραγματοποιείται με επώαση των σφαιριδίων με το διάλυμα γλουταθειόνης.

### **2.2.14 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BRADFORD**

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη χρωματογραφική μέθοδο Bradford (222). Βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue -R250 σε όξινο περιβάλλον. Το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue -R250 είναι στα 470nm και μεταβάλλεται κατά τη συμπλοκοποίηση

στα 595nm. Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue -R250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Το αντιδραστήριο αναμιγνύεται με H<sub>2</sub>O σε αναλογία 1/4 σε τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το δείγμα πρωτεϊνών και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 595 nm. Βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA) η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης.

### **2.2.15 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση πηκτών ακρυλαμιδίου, είναι μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Η αρχή της μεθόδου είναι πως φορτισμένα μόρια όπως οι πρωτεΐνες μπορούν να μεταναστεύσουν και να διαχωριστούν διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα των πρωτεϊνών κατά τη μετακίνησή τους στο πήκτωμα εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης σύμφωνα με τον τύπο  $v = E \cdot q / f$ . Ο παράγοντας f εκφράζει την εξάρτηση της ταχύτητας από το σχήμα και τη μάζα της πρωτεΐνης καθώς και από το ιξώδες του πηκτώματος στο οποίο μετακινείται η πρωτεΐνη. Ο σχηματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου το οποίο διασυνδέει τις αλυσίδες ακρυλαμιδίου. Έτσι δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα με πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού ανάλογα με τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Το πλέγμα διαμορφώνεται μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών με την προσθήκη υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και του φωτοχημικού επιταχυντή TEMED, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών θείου που δημιουργούνται από το APS. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής. Στην ασυνεχή χρησιμοποιούνται δυο πηκτώματα που διαφέρουν ως προς το pH και τη σύστασή τους, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking) με pH 6.8 και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating) με pH 8.8. Όταν οι πρωτεΐνες ενός δείγματος μετακινούνται διαμέσου του πηκτώματος επιστοίβαξης συμπυκνώνονται σε μια λεπτή στοιβάδα ώστε να δημιουργηθεί ένα ενιαίο μέτωπο και να εισέλθουν όλες ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στη συνέχεια μετακινούνται διαμέσου του πηκτώματος διαχωρισμού και διαχωρίζονται σε λεπτές ζώνες. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει απουσία ή παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων. Απουσία αποδιατακτικών παραγόντων, διατηρούν την ανώτερη διαμόρφωσή τους. Παρουσία τέτοιων παραγόντων (ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες),

όπως το απορρυπαντικό SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου), χάνουν τη διαμόρφωσή τους. Η προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS εξασφαλίζει την κοινή μετακίνηση όλων των μορίων ενός μίγματος πρωτεϊνών από την κάθοδο προς την άνοδο καθώς καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις φορτίζοντάς τις πρωτεΐνες αρνητικά. Έτσι, τους προσδίδει έναν σταθερό λόγο φορτίου προς μάζα και επιτρέπει το διαχωρισμό τους βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι του φορτίου τους. Η γλυκίνη του διαλύματος μπορεί να απαντηθεί είτε ως αφόρτιστο αμινοξύ, είτε ως φορτισμένο ανιόν. Σε χαμηλό pH πρωτονιώνεται και έχει ουδέτερο φορτίο. Σε υψηλότερο pH αποκτά αρνητικό φορτίο. Κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα της γλυκίνης μετακινούνται προς την άνοδο. Στην άνοδο βρίσκεται η πηκτή επιστοίβαξης και τα δείγματα που έχουν χαμηλή τιμή pH οπότε η γλυκίνη χάνει το φορτίο της και δεν μεταναστεύει γρήγορα. Παράλληλα στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχονται ιόντα χλωρίου που μεταναστεύουν προς την άνοδο με μεγάλη ταχύτητα. Έτσι δημιουργείται μια λεπτή ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας στην κορυφή της πηκτής επιστοίβαξης όπου συγκεντρώνεται η τάση του ρεύματος. Η πολύ υψηλή τάση οδηγεί τις αρνητικά φορτισμένες από το SDS πρωτεΐνες να μετακινηθούν προς την άνοδο. Καθώς οι πρωτεΐνες έχουν πολύ μεγαλύτερο λόγο φορτίου/ μάζας σε σχέση με τη γλυκίνη, μετακινούνται πιο γρήγορα από τη γλυκίνη αλλά πιο αργά από τα ιόντα χλωρίου. Έτσι πραγματοποιείται το «πακετάρισμα» των δειγμάτων σε μια λεπτή ζώνη που μεταναστεύει διαμέσου της πηκτής επιστοίβαξης ώστε όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Στην πηκτή διαχωρισμού, η τιμή του pH είναι υψηλότερη. Έτσι η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά και μετακινείται πιο γρήγορα προς την άνοδο ενώ οι πρωτεΐνες επιβραδύνονται καθώς η πηκτή δρα ως ηθμός. Η ταχύτητα της μετανάστευσής τους είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού μεγέθους τους και μετακινούνται προς την άνοδο διαμέσου της πηκτής διαχωρισμού έως ότου το μέγεθός τους δεν επιτρέπει να διαπεράσουν τους ηθμούς του πλέγματος της πηκτής. Όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης τόσο μικρότερη είναι η ταχύτητα μετακίνησης διαμέσου της πηκτής. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150V.

#### **2.2.16 ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R- 250**

Για τη χρώση των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται στο διάλυμα Coomassie Brilliant Blue R-

250 και ανακινείται για 15 λεπτά. Στο διάλυμα αυτό, πραγματοποιείται στερέωση των πρωτεϊνών στην πηκτή καθώς γίνονται αδιάλυτες λόγω του οξικού οξέος. Παράλληλα, η μπλε χρωστική προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες. Η χρωστική που δεν έχει προσδεθεί στις πρωτεΐνες εκπλένεται με διάλυμα 10% οξικού οξέος, 20% μεθανόλης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος γίνεται ενυδάτωση της πηκτής με επώαση της πηκτής σε νερό υπό συνεχή ανάδευση.

#### **2.2.17 ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ ( $\text{AgNO}_3$ )**

Για την ανίχνευση πρωτεϊνικών ζωνών με μεγαλύτερη ευαισθησία, πραγματοποιείται χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ ). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση 1ng πρωτεΐνης που είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 (223). Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία βήματα. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη στερέωση των πρωτεϊνών στην πηκτή και επιτυγχάνεται με εμβάπτιση της πηκτής στο διάλυμα στερέωσης για 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα η πηκτή ενυδατώνεται για τουλάχιστον δυο ώρες σε απιονισμένο νερό. Το δεύτερο βήμα, είναι η ευαισθητοποίηση της πηκτής. Αυτό πραγματοποιείται με εμβάπτιση της πηκτής στο διάλυμα DTT για 30 λεπτά και εν συνεχεία στο διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  για τον ίδιο χρόνο υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα αυτό διευκολύνει την αντίδραση των καθηλωμένων στην πηκτή πρωτεϊνών με τον άργυρο, καθώς επίσης επιταχύνει την αναγωγή του ιόντος αργύρου. Παράλληλα, τα οξυανιόντα θείου σχηματίζουν σύμπλοκο με τα ελεύθερα ιόντα αργύρου εμποδίζοντας την αναγωγή σε μεταλλικό άργυρο. Στη συνέχεια, η πηκτή ξεπλένεται σε απιονισμένο νερό με δυο πλύσεις για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Το τρίτο βήμα είναι η ανάπτυξη της χρώσης που πραγματοποιείται με εμβάπτιση της πηκτής στο διάλυμα ανάπτυξης μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες στην επιθυμητή ένταση. Η φορμαλδεΰδη που περιέχεται σε αυτό το διάλυμα ανάγει τον άργυρο και η προσθήκη του ανθρακικού νατρίου κάνει το διάλυμα αλκαλικό καθώς για να λάβει χώρα η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται σε υψηλό pH. Τέλος, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού εξαιτίας του όξινου χαρακτήρα του, ξεπλένεται και φυλάσσεται σε απιονισμένο νερό.

## **2.2.18 ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΣΤΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT**

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν με εξειδικευμένα αντισώματα πρωτεΐνες που έχουν αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, είναι απαραίτητη η πρότερη ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε σύμπλοκο με το SDS και έχουν αρνητικό φορτίο, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα μετακινηθούν από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη όπου και θα καθηλωθούν στο πλέγμα αυτής εξαιτίας υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες εμβαπτίζεται μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών Transfer Buffer 1x για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετούνται στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad). Η τοποθέτηση γίνεται ανάμεσα σε δύο διηθητικά χαρτιά Whatman, τα οποία έχουν επίσης εμβαπτιστεί στο διάλυμα μεταφοράς, με τη μεμβράνη να είναι προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης 10V για 60 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη.

Για να ελέγξουμε αν πραγματοποιήθηκε η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, εμβαπτίζουμε τη μεμβράνη σε διάλυμα Ponceau S που θα δώσει στις πρωτεΐνες κόκκινο χρώμα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται με διάλυμα PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση και ακολουθεί η διαδικασία κορεσμού των μη ειδικών θέσεων δέσμησης πρωτεϊνών της μεμβράνης. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα ώστε να κορεστούν οι θέσεις δέσμησης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος και να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με PBS-0,1% Tween 20 (3 πλύσεις για 5 λεπτά). Έπειτα γίνεται ολονύχτια επώαση με το πρώτο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε στην κατάλληλη αραιώση σε 5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με PBS-0,1% Tween 20 (3 πλύσεις για 5 λεπτά). Στη συνέχεια η μεμβράνη επώάζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα και είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση σε 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με PBS-0,1% Tween 20 (3 πλύσεις για 5 λεπτά).



Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης, στο οποίο προστίθενται 30 μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100 μl κουμαρικού οξέος. Η υπεροξειδάση που είναι συζευγμένη στο δεύτερο αντίσωμα αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου. Οι ρίζες υπεροξειδίου αντιδρούν με το κουμαρικό οξύ που λειτουργεί ως καταλύτης της χημειοφωταύγειας δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Οι ρίζες κουμαρικού οξέος οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3 αμινο-φθαλικό οξύ εκπέμποντας φωτόνια. Για την ανίχνευση της χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων με το λογισμικό Alliance Software.

### **2.2.19 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (IP)**

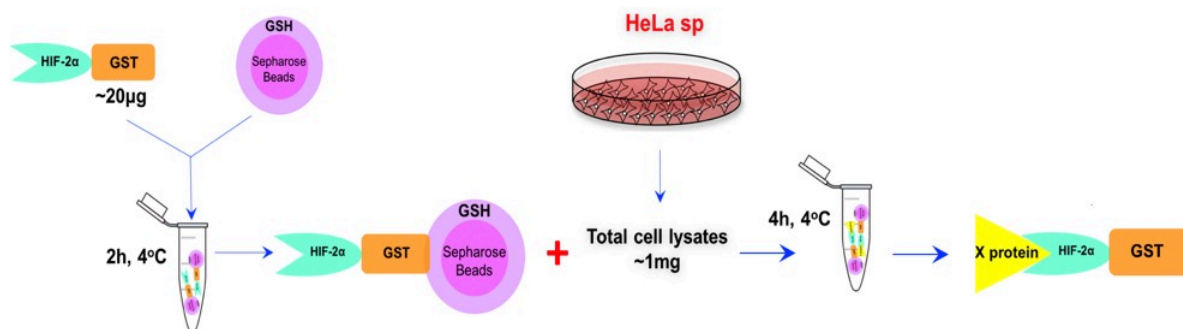
Η ανοσοκατακρήμνιση βασίζεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης A (protein A) του *Staphylococcus Aureus* να προσδέεται στη σταθερή περιοχή Fc των βαριών αλυσίδων των αντισωμάτων IgG. Χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης να την απομονώσουμε από εκχυλίσματα κυττάρων καθώς το αντίσωμα που έχει δεσμεύσει την εν λόγω πρωτεΐνη θα προσδεθεί στην πρωτεΐνη A που βρίσκεται καθηλωμένη σε ένα αδρανές υλικό π.χ. σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να συγκατακρημνιστούν πρωτεΐνες που δεσμεύονται ισχυρά στην πρωτεΐνη-στόχο, προσφέροντας έτσι μια εικόνα των αλληλεπιδράσεων της προς μελέτη πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες στο κυτταρικό περιβάλλον. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG, το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του HIF-2α και αντίσωμα έναντι της GFP από ορό κόνικλος. Αρχικά, τα σφαιρίδια σεφαρόζης που έχουν καθηλωμένη πρωτεΐνη A εξισορροπούνται στο ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης IP Buffer με 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμιά και παραλαμβάνονται με σύντομη φυγοκέντρηση στις 3000 rpm. Παράλληλα τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάζονται με 1 μg αντισώματος, υπό συνεχή ανάδευση για περίπου 2 ώρες στους 4° C ώστε να επιτευχθεί η συμπλοκοποίηση του αντισώματος με την πρωτεΐνη που αναγνωρίζει. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναμιγνύονται με τα εξισορροπημένα σφαιρίδια σεφαρόζης- πρωτεΐνης A. Η διαδικασία δέσμευσης του αντισώματος στα σφαιρίδια διαρκεί από 4 έως 16 ώρες. Με το πέρας της δέσμευσης, ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμιά με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να αποφευχθούν οι τυχόν ασθενείς μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Τέλος, οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια

εκλούνται με όξινο διάλυμα 0.2M γλυκίνης pH 2. Οι πρωτεΐνες που ανοσοκατακρημνίστηκαν μπορούν να ανιχνευτούν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Το έκλουσμα της στήλης μπορεί εναλλακτικά να αναλυθεί με φασματοσκοπία μαζών, ώστε να ανιχνευτούν υποψήφιες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν στο κυτταρικό περιβάλλον με την πρωτεΐνη που ανοσοκατακρημνίστηκε.

#### **2.2.20 ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (PULL- DOWN)**

Με πειράματα συγκατακρήμνισης είναι δυνατή η διερεύνηση της ικανότητας διάφορων πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δυνατότητα χημικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με έναν επίτοπο να προσδεθούν σε στήλες χρωματογραφίας με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία (π.χ. πρωτεΐνη σε σύντηξη με την GST καθηλώνεται σε σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης.). Οι πρωτεΐνες που έχουν καθηλωθεί στις στήλες μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες έχουν αγκιστεία και οι οποίες είτε είναι απομονωμένες σε καθαρή μορφή είτε περιέχονται σε κυτταρικά εκχυλίσματα. Η διαδικασία αυτή γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής ιοντικής ισχύος, ώστε να αποφεύγονται ασθενείς, μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.

Στην παρούσα διατριβή, τμήματα της πρωτεΐνης του HIF-2α σε σύντηξη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης- σεφαρόζης. Ως σημείο αναφοράς, πραγματοποιήθηκε δέσμευση σκέτης GST στα σφαιρίδια. Αρχικά, τα σφαιρίδια εξισορροπούνται στο ρυθμιστικό διάλυμα IP Buffer με 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμιά και παραλαμβάνονται με σύντομη φυγοκέντρηση στις 3000 rpm. Στη συνέχεια, 10-20μg χημικής πρωτεΐνης επωάζονται με τα σφαιρίδια υπό συνεχή ανάδευση για περίπου 2 ώρες στους 4° C ώστε να επιτευχθεί η δέσμευση της GST με το υπόστρωμά της, δηλαδή τη γλουταθειόνη που είναι συμπλοκοποιημένη με τα σφαιρίδια σεφαρόζης. Ακολούθως, ~1mg κυτταρικών εκχυλισμάτων αραιωμένων στο ρυθμιστικό διάλυμα IP αναμιγνύονται με τα σφαιρίδια. Η διαδικασία δέσμευσης πρωτεϊνών που περιέχονται στα κυτταρικά εκχυλίσματα στα σφαιρίδια διαρκεί από 4 έως 16 ώρες. Με το πέρας της δέσμευσης, ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών η καθεμιά με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να αποφευχθούν οι τυχόν ασθενείς μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Τέλος, οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια εκκλούνται με 2x SDS (**Εικόνα 36**). Οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν μπορούν να ανιχνευτούν με ανοσοαποτύπωση κατά Western.



Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση συγκατακρήμνισης GST- HIF-2α από κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa.

### 2.2.21 in vitro ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η καθαρή χμιαϊκή πρωτεΐνη HIF-2α σε σύντηξη με τη GST καθώς και μικρότερα τμήματά του δοκιμάστηκαν ως υποστρώματα σε πειράματα in vitro φωσφορυλίωσης (224), χρησιμοποιώντας είτε την ανασυνδυασμένη κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα ERK1 (p42 MAPK) είτε κυτταρικά εκχυλίσματα Huh7. Σε κάθε αντίδραση, 1 µg χμιαϊκής πρωτεΐνης επώαστηκε με περίπου 1 µg κυτταρικών εκχυλίσμάτων Huh7 ή με 5 μονάδες (units) του ενζύμου ERK2. Στο μίγμα αντίδρασης περιλαμβάνονται 25 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl pH 7.5, 80 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, 25 µM ATP και 5 mM γλυκεροφωσφορικού νατρίου (αναστολέας φωσφατασών σερίνης, θρεονίνης). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης προσαρμόζεται στα 25 µl με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Τα δείγματα επωάζονται στους 30° C για 30 λεπτά. Στο τέλος της επώασης προστίθενται 50 mM DTT και διάλυμα Laemli. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση SDS- PAGE. Ακολουθεί χρώση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R- 250 και αποχρωματισμός της. Στη συνέχεια η πηκτή ξηραίνεται πάνω σε χαρτί ανοσοαποτύπωσης Whatman και υποβάλλεται σε αυτοραδιογραφία. Οι ραδιενεργές ζώνες που προκύπτουν, αποκόπτονται από την ξηρή πηκτή και πραγματοποιείται μέτρηση των κρούσεων τους κατά Cherenkov στον μετρητή ραδιενέργειας Wallac 1409. Έτσι, είναι δυνατή η ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των διάφορων τμημάτων του HIF-2α βάσει του αριθμού κρούσεων.

### 2.2.22 ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η αυτοραδιογραφία βασίζεται στην ικανότητα της β-ακτινοβολίας που εκπέμπει το ραδιενεργό ισότοπο <sup>32</sup>P και χρησιμοποιείται για τη σήμανση πρωτεϊνών να προσβάλλει το ακτινογραφικό φιλμ. Το πήκτωμα που έχει ξηρανθεί πάνω σε χαρτί ανοσοαποτύπωσης Whatman. Το φιλμ αυτοραδιογραφίας εκτίθεται στην ξηρή ραδιενεργή πηκτή μέσα σε φωτοπολλαπλασιαστικό

θάλαμο. Ο απαιτούμενος χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα ραδιενέργειας και μπορεί να εκτιμηθεί με μέτρηση των κρούσεων της πηκτής με συσκευή Geiger. Η εμφάνιση και στερέωση του φιλμ πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο με εμβάπτισή του στο διάλυμα ανάπτυξης (Developer) και στο διάλυμα σταθεροποίησης Fixation της εταιρίας Kodak.

### **2.2.23 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, Huh7 και HepG2 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Biosera παρουσία 10% ορού εμβρύου βοός (FBS) και 100U/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στον επωαστήρα Heal Force HF 90 σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Η ανακαλλιέργεια των τριών κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης ανά 2-3 μέρες. Η θρυψίνη υδρολύει τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνών προσκόλλησης της επιφάνειας των κυττάρων και του καλλιιεργητικού τρυβλίου. Για τη θρυψινοποίηση, αρχικά απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με PBS 1x. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώάζονται σε 1mL θρυψίνης 0.2% για 5 λεπτά στους 37°C. Προστίθεται 1mL θρεπτικού μέσου ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και τα κύτταρα συλλέγονται, φυγοκεντρώνται στις 3000 rpm για 5 περίπου λεπτά και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε περίπου 7mL θρεπτικού μέσου και μοιράζονται στα τρυβλία καλλιέργειας.

### **2.2.24 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

Αρχικά απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με PBS 1x. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση των κυττάρων, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml θρεπτικού μέσου ψύξης, που περιέχει 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes) και ακολουθεί σταδιακή ψύξη τους με τελική αποθήκευση σε υγρό άζωτο (-196 °C). Για την ανάστροφη διαδικασία τα κύτταρα ξεπαγώνουν άμεσα με θέρμανση στους 37°C και μεταφέρονται στο τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει 7mL περίπου θρεπτικού μέσου DMEM, 10% FBS και 100U/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης.

### **2.2.25 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ HIF-1α ΚΑΙ HIF-2α**

Για την εφαρμογή υποξίας, τα κύτταρα επώαστηκαν για διάφορους χρόνους σε 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, και 5% CO<sub>2</sub> στον ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO<sub>2</sub> 200 (Baker Ruskinn, Sanford, Maine, USA). Για τη μελέτη της δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην έκφραση και μεταγραφική ενεργότητα των HIFs, τα κύτταρα προ επώαστηκαν για μια ώρα με την 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε συγκεντρώσεις και χρόνους που αναφέρονται στα αποτελέσματα κάτω από συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Για την αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα των MEK U0126 (5M) (Cell Signalling) για 16 ώρες. Τέλος, για την αναστολή της εξπορτίνης CRM1, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα της λεπτομυκίνης (LMB 10 ng/μl) σε χρόνους που αναφέρονται στα αποτελέσματα.

### **2.2.26 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ**

Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x. Τα κύτταρα στη συνέχεια αποξύνονται από το τρυβλίο καλλιέργειας με τη χρήση διαλύματος λύσης. Τα κυτταρικά λύματα μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου erpendorf 1.5mL, επωάζονται σε πάγο για 15 λεπτά με συχνή ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex) και ακολούθως φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση αποτελεί το διαλυτό ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Προκειμένου να αναλυθούν οι πρωτεΐνες του δείγματος με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, προστίθεται DTT 1mM και διάλυμα Laemli. Το δείγμα θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 95 °C και αποθηκεύεται στους -20 °C.

### **2.2.27 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ**

Αρχικά απομακρύνεται το μέσο καλλιέργειας και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με PBS 1x. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων. Μετά το τέλος της επώασης των κυττάρων με τη θρυψίνη, τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου erpendorf 1.5mL και φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στις 3000rpm στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150 μl υποτονικού διαλύματος A . Ακολούθως, τα κυτταρικά λύματα επωάζονται σε πάγο για 30 λεπτά με συχνή ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex) και φυγοκεντρούνται στις 7000rpm για 3 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη

φυγοκέντρωση αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα πρωτεϊνών και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα τύπου erpendorf 1.5mL. Το ίζημα επαναιωρείται σε 150 μl υπέρτονου διαλύματος B. Ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα και επώαση στον πάγο για 30 min. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 7000g για 3 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση αποτελεί το πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf 1.5mL. Για την ανάλυση των εκχυλισμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 2.2.25.

### **2.2.28 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΜΜΕΣΟ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ**

Το φαινόμενο κατά το οποίο κάποιο σώμα εκπέμπει φως όταν διεγείρεται από ακτινοβολία ονομάζεται φθορισμός. Το 1852 ο Stokes είχε διατυπώσει ότι το μήκος κύματος της παραγόμενης ακτινοβολίας (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από αυτό της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Συνεπώς, μια φθορίζουσα ουσία μπορεί να διεγερθεί με ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους (αόρατη) και να παραχθεί ακτινοβολία της περιοχής του ορατού φωτός. Στο φαινόμενο αυτό βασίζεται η μικροσκοπία φθορισμού, που κάνει δυνατή την παρατήρηση διάφορων συστατικών του κυττάρου τα οποία εκφράζονται σε σύντηξη με διάφορες φθορίζουσες όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent protein, GFP). Με τον ανοσοφθορισμό είναι δυνατή η παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής μιας πρωτεΐνης με τη χρήση ειδικού αντισώματος συνδεδεμένου με φθοριόχρωμα έναντι της προς μελέτη πρωτεΐνης (άμεσος ανοσοφθορισμός). Εναλλακτικά, το φθοριόχρωμα μπορεί να είναι συνδεδεμένο με κάποιο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα που βρίσκεται σε σύμπλοκο με την προς μελέτη πρωτεΐνη (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Η μεθοδολογία αυτή επινοήθηκε από τους Coons και Kaplan το 1950 και έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές επιστήμες καθώς και στις δύο περιπτώσεις το σήμα του φθορισμού υποδεικνύει την κατανομή της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος μας εντός του κυττάρου. Επιπλέον, ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του άμεσου φθορισμού και του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των GFP τμημάτων του HIF-2α και των FLAG-HIF-2α μορφών, αντίστοιχα. Κύτταρα HeLa, HepG2 και Huh7 αναπτύσσονται πάνω

σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm ώστε την ημέρα του ανοσοφθορισμού να καλύπτουν 60%- 80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS1x. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα PBS 1x/ 3% φορμαλδεΰδης για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS 1x και επώαση σε διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C ώστε να επιτευχθεί διάνοιξη των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολούθως, γίνεται κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται ολονύκτια επώαση με το πρώτο αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG σε διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA (αραίωση 1:5000) στους 4°C. Το πρωτογενές αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Tween 20. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία Cy3 και αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή των βαριών αλυσίδων IgG ποντικού. Η επώαση γίνεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Tween 20/ 1% BSA (αραίωση 1:500). Το δευτερογενές αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS 1x/ 0.1% Tween 20. Ακολουθεί μια τελευταία πλύση με PBS 1x και στιγμιαία εμβάπτιση σε H<sub>2</sub>O. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 4 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Mowiol) το οποίο περιέχει και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη) που προσδένεται στο DNA και γίνεται δυνατή η διάκριση των ορίων του πυρήνα. Η παρατήρηση των καλυπτρίδων πραγματοποιείται στο μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan, με μεγεθυντικούς φακούς 20X, 40X και 100X, με φίλτρα για την παρατήρηση στην μπλε και κόκκινη περιοχή του φάσματος του φωτός. Η φθορίζουσα ουσία DAPI διεγείρεται στα 358 nm (υπεριώδες φως) και εκπέμπει στα 461 nm (μπλε φάσμα ορατού φωτός). Η φθορίζουσα ουσία Cy3 διεγείρεται στα 550 nm (ορατό φως) και εκπέμπει στα 575 nm (ορατό φως).

Για τον άμεσο φθορισμό, οι καλυπτρίδες μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων ξεπλένονται 3 φορές για 5 λεπτά με PBS 1x, τοποθετούνται στις αντικειμενοφόρους με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan, με μεγεθυντικούς φακούς 20X, 40X και 100X, με φίλτρα για την παρατήρηση στην μπλε και πράσινη περιοχή του φάσματος του φωτός. Η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP διεγείρεται στα 488 nm (μπλε φάσμα ορατού φωτός) και εκπέμπει στα 509 nm (πράσινο φάσμα ορατού φωτός).

### **2.2.29 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων χρησιμοποιείται η μέθοδος της παροδικής διαμόλυνσης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η μέθοδος διαμόλυνσης περιλαμβάνει τη χρήση του μη λιπιδικού αντιδραστήριου διαμόλυνσης TurboFect της εταιρίας Thermo Scientific. Το TurboFect είναι ένα διάλυμα κατιονικών πολυμερών σε νερό. Τα κατιονικά πολυμερή και το δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) σχηματίζουν συμπαγή, σταθερά, θετικά φορτισμένα σύμπλοκα, τα οποία προστατεύουν το DNA από αποικοδόμηση, προσκολλώνται στην κυτταρική επιφάνεια και διευκολύνουν έτσι την παροχή γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Αρχικά, πραγματοποιείται η προετοιμασία του συμπλόκου. Η γενική αναλογία DNA προς μέσου διαμόλυνσης που χρησιμοποιούμε είναι 1:2 σε έναν σωλήνα τύπου eppendorf 1.5 mL σε θρεπτικό υλικό απουσία εμβρυϊκού βόειου ορού FBS και αντιβιοτικών. Η μάζα του πλασμιδιακού DNA ποικίλλει ανάλογα με τη διάμετρο του τρυβλίου καλλιέργειας από 1 μg για πλάκες των 24 πηγαδιών έως 10 μg για τρυβλία των 10 cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Το μίγμα πλασμιδιακού DNA και μέσου διαμόλυνσης επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά για το σχηματισμό των συμπλόκων. Ακολούθως, στα καλλιεργητικά τρυβλία με τα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό μέσο παρουσία 5% FBS. Το μίγμα πλασμιδιακού DNA και μέσου διαμόλυνσης διασπείρεται στη συνέχεια πάνω από τα κύτταρα και ακολουθεί επώαση στους 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> για 4 ώρες. Στο τέλος της επώασης το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με πλήρες (DMEM, 10% FBS, 100U/ml πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης) και τα κύτταρα επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

### **2.2.30 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ siRNA**

Ο όρος αποσιώπηση ή «RNA παρέμβαση» (RNA interference- RNAi) αναφέρεται σε έναν βασικό μηχανισμό κυτταρικής μετά- μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, πρόδρομα δίκλινα μόρια RNA (double- stranded RNA-dsRNA) των οποίων το μέγεθος και η προέλευση ποικίλει συμμετέχουν στην αναγνώριση των συμπληρωματικών τους μονόκλωνων μορίων mRNA και οδηγούν στην αποικοδόμησή τους σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν.

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του VDR έγινε διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με το αντίστοιχο ολιγοριβονουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας το λιπιδιακό αντιδραστήριο διαμόλυνσης Lipofectamine 2000 RNAi MAX της εταιρίας Invitrogen. Το Lipofectamine 2000 RNAi MAX

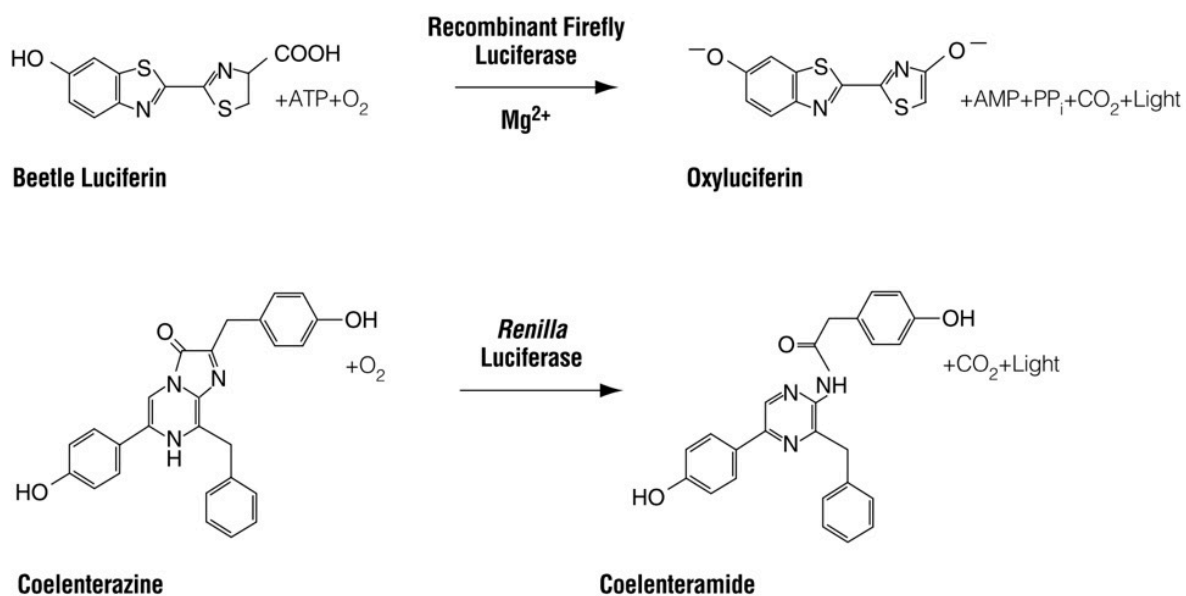


είναι ένα διάλυμα λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα περικλείουν το υδατικό διάλυμα του πλασμιδιακού DNA, προσκολλώνται στην κυτταρική επιφάνεια και διευκολύνουν έτσι την παροχή γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Σαν συνθήκη αναφοράς, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με το ολιγοριβονουκλεοτίδιο AllStars-siRNA της εταιρίας Qiagen το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών.

Αρχικά, πραγματοποιείται η προετοιμασία των λιποσωμάτων. Σε έναν σωλήνα τύπου eppendorf 1.5mL αναμιγνύουμε 50 μl DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά με τα siRNA. Σε έναν δεύτερο σωλήνα αναμιγνύουμε 50 μl DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά με 1.5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAi MAX, ανακινούμε και επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, ενώνουμε το περιεχόμενο των δυο σωλήνων και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά προκειμένου να δημιουργηθούν λιποσώματα εσωκλείουν το siRNA έναντι του VDR. Έπειτα, προστίθενται στα καλλιεργητικά τρυβλία με τα κύτταρα 400 μl DMEM απουσία FBS και αντιβιοτικών. Το μίγμα λιποσωμάτων και μέσου διαμόλυνσης διασπείρεται στη συνέχεια πάνω από τα κύτταρα και ακολουθεί επώαση στους 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> για 4 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου και αντικατάσταση με πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% FBS και αντιβιοτικά και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα επεξεργάζονται κατάλληλα ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που πρόκειται να ακολουθήσει.

### **2.2.31 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ HIF-1 ΚΑΙ HIF-2**

Για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF-1 και HIF-2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιείται το σύστημα λουσιφεράσης Dual- Luciferase Reporter assay της εταιρίας Promega. Το σύστημα αυτό βασίζεται στη μέτρηση της χημειοφωταύγειας που προκύπτει όταν το ένζυμο λουσιφεράση της πυγολαμπίδας *Photinus pyralis* οξειδώνει τη λουσιφερίνη σε μια αντίδραση που χρησιμοποιεί ATP και Mg<sup>2+</sup> (**Εικόνα 38**). Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία μετράται με το λουμινόμετρο Turner Design TD20/20. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως πλασμίδιο αναφοράς τα pGL3-VEGF-5HRE και ως πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί το λουσιφεράση από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το μη λιπιδιακό πολυμερές TurboFect.



**Εικόνα 38:** Αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα λουσιφεράση της πυγολαμπίδας *Photinus pyralis* και λουσιφεράση της *Renilla reniformis*

Το πρωτόκολλο αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται παθητική λύση των κυττάρων και στο δεύτερο στάδιο γίνεται η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Για τη λύση των κυττάρων απομακρύνεται αρχικά το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x. Ακολούθως προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 24 πηγαδιών 70 μl του διαλύματος λύσης που περιέχεται Luciferase assay system kit της Promega και οι πλάκες ανακινούνται για 15 λεπτά σε πλατφόρμα ανακίνησης σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ακόλουθη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης, αρχικά τα κυτταρικά εκχυλίσματα φυγοκεντρώνται στις 12000rpm για 3 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf 1.5mL. Αναμιγνύονται 20 μl του υπερκείμενου με 20 μl λουσιφερίνης (περιέχεται Luciferase assay system kit της Promega) και η ένταση του φωτός που παράγεται ανιχνεύεται στο λουμινόμετρο. Για τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης *Renilla reniformis* προστίθενται στον ίδιο σωλήνα 10 μl του διαλύματος Stop & Glow (περιέχεται Luciferase assay system kit της Promega) και η ένταση του φωτός που παράγεται ανιχνεύεται στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα Stop & Glow σταματά τη δράση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και παράλληλα αποτελεί υπόστρωμα της λουσιφεράσης *Renilla reniformis*. Ο λόγος της τιμής που προκύπτει από τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας προς αυτή της λουσιφεράσης *Renilla reniformis* δηλώνει τη μεταγραφική ενεργότητα κάθε ρυθμιστικού στοιχείου (RLU, Related Luciferase Units, σχετικές μονάδες λουσιφεράσης):  $RLU = \text{firefly luciferase} / \text{renilla luciferase}$ .

### **2.2.32 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ**

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρίας. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1x. Προστίθενται 400 μl NucleoZOL το μίγμα ομογενοποιείται και στη συνέχεια προστίθενται 160 μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο ριβονουκλεασών. Παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης ~500 μl μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου eppendorf και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 400 μl 75% αιθανόλης και φυγοκέντρηση τριών λεπτών στις 13000 rpm. Αφαιρείται η αιθανόλη, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 30 μl H<sub>2</sub>O ελεύθερο ριβονουκλεασών. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του έγιναν στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα μήκη κύματος 260nm (A260) και 280nm (A280). Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260 nm με βάση ότι διάλυμα RNA 40μg/ml έχει απορρόφηση 1 a. u. (absorbance units). Στο μήκος κύματος των 280nm ελέγχεται εάν υπάρχει πρόσμιξη πρωτεϊνών. Ο λόγος των τιμών απορρόφησης A260/A280, αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του και των προσμείξεων πρωτεϊνών. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 έως 2.

### **2.2.33 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real Time, RT-PCR)**

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας ειδικά συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) και θερμοάαντοχες πολυμεράσες με

επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, το προϊόν που προκύπτει είναι συγκεκριμένο και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου Real Time, RT-PCR είναι μια παραλλαγή της PCR. Χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το mRNA, παράγονται αντίγραφα cDNA. Στο πρώτο βήμα, για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου, χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Στο δεύτερο βήμα γίνεται η σύνθεση του επόμενου κλώνου και στα ακόλουθα βήματα ολοκληρώνεται η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

### **Σύνθεση του cDNA**

Η σύνθεση του cDNA βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Η RNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από ρετροϊούς, με κατάλληλους εκκινητές συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Στη συνέχεια η RNA αλυσίδα καταβολίζεται σε πολλά σημεία από τη δράση RNάσης. Τελικά, μια DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο DNA και μια λιγάση ενώνει τα κομμάτια με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). Για την αντίδραση χρησιμοποιείται ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα και προετοιμάζεται πάγο ως εξής:

- 10 µl δείγματος RNA 1 µg
- 2 µl RT Buffer (10x)
- 0,8 µl dNTPs Mix (100 mM)
- 2 µl τυχαίων εκκινητών
- 1 µl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4,2 µl H<sub>2</sub>O

Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση εκκινητών)
- 37°C για 120 λεπτά (αντίστροφη μεταγραφή)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C – ψύξη

Στα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 80µl ddH<sub>2</sub>O (δισ απεσταγμένο νερό) και συντηρούνται στους -20°C.

### **Real-Time PCR**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός αρχικού δείγματος DNA μέσω της συνεχούς ανίχνευσης της ενίσχυσής του. Η ενίσχυση του αρχικού δείγματος βασίζεται στη κλασική PCR με τα διαδοχικά στάδια της αποδιάταξης των δύο κλώνων, της σύνδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης από μια DNA πολυμεράση. Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται στη πρόσδεση στα ενισχυόμενα μόρια DNA μιας φθορίζουσας ουσίας και ανίχνευση της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος στο δίκλωνο DNA. Η φθορίζουσα ουσία μπορεί να είναι ειδική για μια ενισχυόμενη αλληλουχία επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό της από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, η RT-PCR πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Light Cycler® 96 System της εταιρίας Roche με τη χρήση του αντιδραστηρίου Sybr Green mix της εταιρίας Applied Biosystems που περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, Mogul2, dNTPs και σταθεροποιητές. Η χρωστική Sybr Green δεσμεύεται μη ειδικά πάνω στο δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να εκπέμπει ακτινοβολία, ενώ αντίθετα η μη δεσμευμένη χρωστική δεν εκπέμπει. Κατά τη διάρκεια λοιπόν της επέκτασης του DNA, όλο και περισσότερη χρωστική προσδένεται με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1), της κινάσης του φωσφογλυκερινικού 1 (PGK1), και της ριβοσωμικής υπομονάδας 18S που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα της δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

Παρασκευάζονται τα μείγματα για τα διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 10 pmol/μl ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες και DNάσες. Σε 7,5μl μείγματος προσθέτουμε 2,5μl cDNA από το σύνολο των 20μl που προέρχονται από την αντίστροφη μεταγραφή 1μg ολικού RNA. Κάθε συνθήκη ελέγχθηκε εις διπλούν, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA που έγινε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης (NRT) και αφετέρου δείγμα με H<sub>2</sub>O αντί για cDNA (NTC).

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τα γονίδια 18S, PAI-1 και PGK1 είναι:

- 95°C για 180 δευτερόλεπτα – ενεργοποίηση του SYBR Green.

- 95°C για 3 δευτερόλεπτα – ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης.
- 60°C για 30 δευτερόλεπτα – αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA.
- 95°C για 10 δευτερόλεπτα – σύνδεση εκκινητών και επιμήκυνση.
- Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές.
- 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης – αποδιάταξη των προϊόντων.

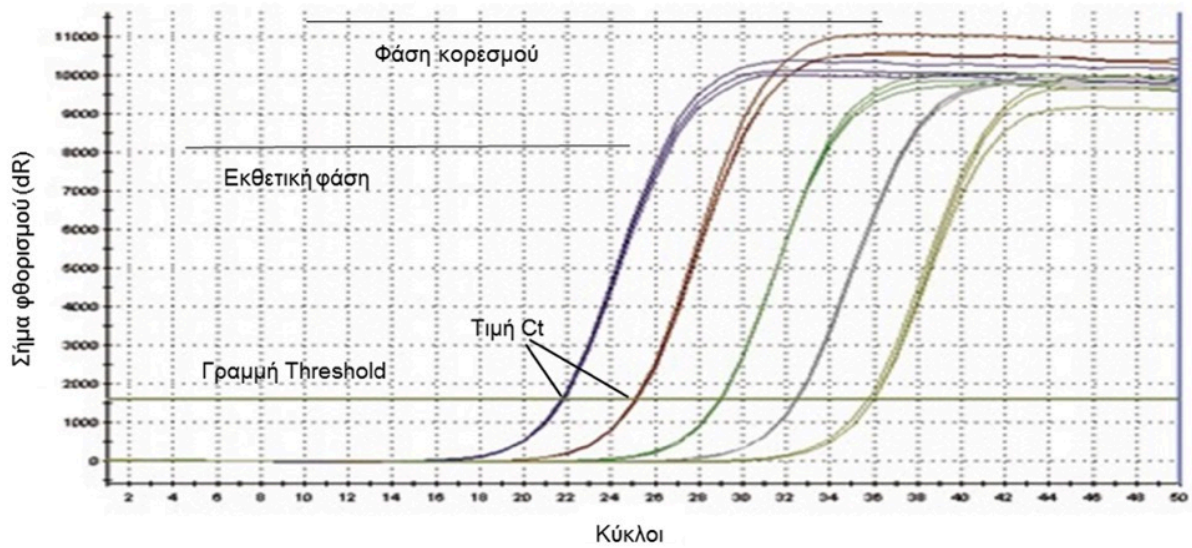
Οι συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο της EPO είναι:

- 50°C για 2 λεπτά
- 94°C για 10 λεπτά
- 95°C για 15 δευτερόλεπτα
- 60°C για 1 λεπτό
- Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές.
- 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης – αποδιάταξη των προϊόντων.

Η τεχνική της Real-Time RT-PCR παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης όχι μόνο της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του κυττάρου.

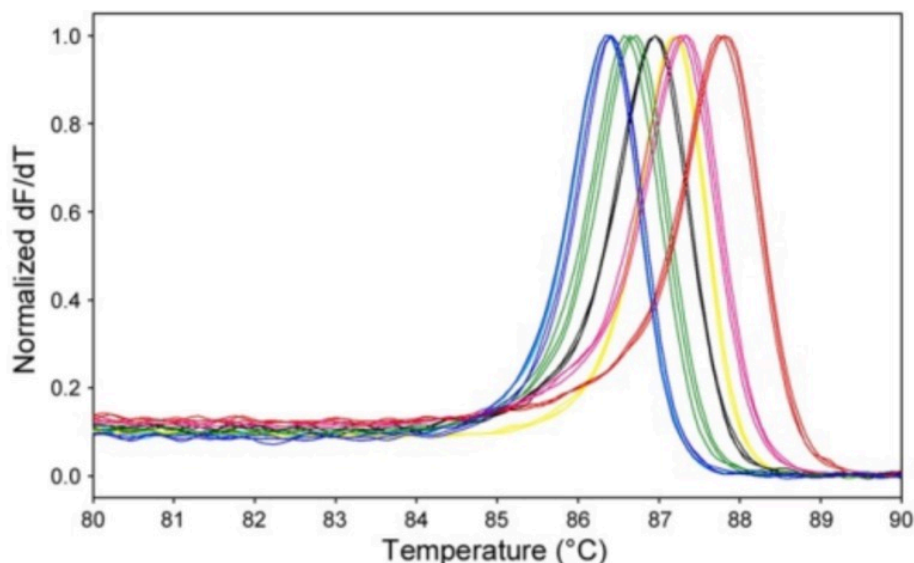
Το διάγραμμα της καμπύλης ενίσχυσης παρουσιάζει την αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA σε πραγματικό χρόνο. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται στην εκθετική φάση και στη φάση κορεσμού. Η μεταβολή των φάσεων σχετίζεται με την σταδιακή εξάντληση των αντιδραστηρίων (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) και τη συσσώρευση μορίων που δρουν ανασταλτικά για την αντίδραση. Έτσι ενώ στην εκθετική φάση ο διπλασιασμός του αρχικού προϊόντος γίνεται ιδανικά, ακολούθως η αντίδραση επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της, και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής

ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (225).



**Εικόνα 39:** Καμπύλη ενίσχυσης cDNA δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR Ανατύπωση από:www.bioline.com

Η ενίσχυση των προϊόντων ακολουθείται από την αποδιάταξή τους σε ένα στάδιο αυξανόμενης θερμοκρασίας. Καθώς η θερμοκρασία τήξης των δίκλωνων μορίων επηρεάζεται, κυρίως, από το μήκος τους και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, το σημείο τήξης  $T_m$  (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του κλώνου έχει αποδιαταχθεί) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος. Από την άλλη με την αποδιάταξη των κλώνων, η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης των προϊόντων της Real-Time PCR μέσω μιας καμπύλης τήξης (**Εικόνα 39**). Η καμπύλη αυτή εμφανίζει τον φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και σε επόμενο στάδιο τον λόγο της μεταβολής του φθορισμού προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας ( $-dF/dT$ ). Η ανάλυση της καμπύλης τήξης βοηθάει στον έλεγχο της ειδικότητας και της καθαρότητας των προϊόντων αντίδρασης ενίσχυσης, καθώς αποκαλύπτει πιθανό διμερισμό εκκινητών ή επιμόλυνση με ξένο DNA. Τα μόρια DNA που ενισχύθηκαν στοχευμένα κατά την αντίδραση, αναμένονται να συμβαδίζουν και να συσσωρεύονται σε κοινή κορυφή στη καμπύλη τήξης. Αντίθετα, επιμολύνσεις θα δώσουν μεταβολή φθορισμού σε πολλαπλά σημεία τήξης (**Εικόνα 40**).



**Εικόνα 40:** Αναπαράσταση τυπικής καμπύλης τήξης με χρήση της χρωστικής SYBR Green, όπου φαίνονται οι μονάδες φθορισμού σε συνάρτηση με θερμοκρασία. Ανατύπωση από: (225)

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης όπου ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ριβοσωμική υπομονάδα 18S. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου- στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA υπολογίζεται η διαφορά της διαφοράς των κύκλων  $\Delta\Delta Ct$ . Για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά Ct ( $\Delta Ct$ ) του γονιδίου στόχου (EPO, PAI-1, PGK1) και του γονιδίου αναφοράς 18S και στη συνέχεια από το  $\Delta Ct$  κάθε δείγματος αφαιρείται το  $\Delta Ct$  του δείγματος αναφοράς (18S). Έτσι προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχει εφαρμοστεί το μαθηματικό μοντέλο του  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Η μέθοδος του  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , που έχει και την πιο ευρεία χρήση, είναι κατάλληλη για αντιδράσεις με παρεμφερή τιμή απόδοσης (efficiency, E), καθώς δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση:  $R = 2^{-(\Delta Ct \text{ δείγμα} - \Delta Ct \text{ μάρτυρας})}$  (226).

#### 2.2.34 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.04. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση (SEM). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  και \*  $p < 0.05$ . Η



ανάλυση της διακύμανσης εκτιμήθηκε με One-Way-analysis of Variance και η σύγκριση επιλεγμένων ζευγών με Bonferroni test.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

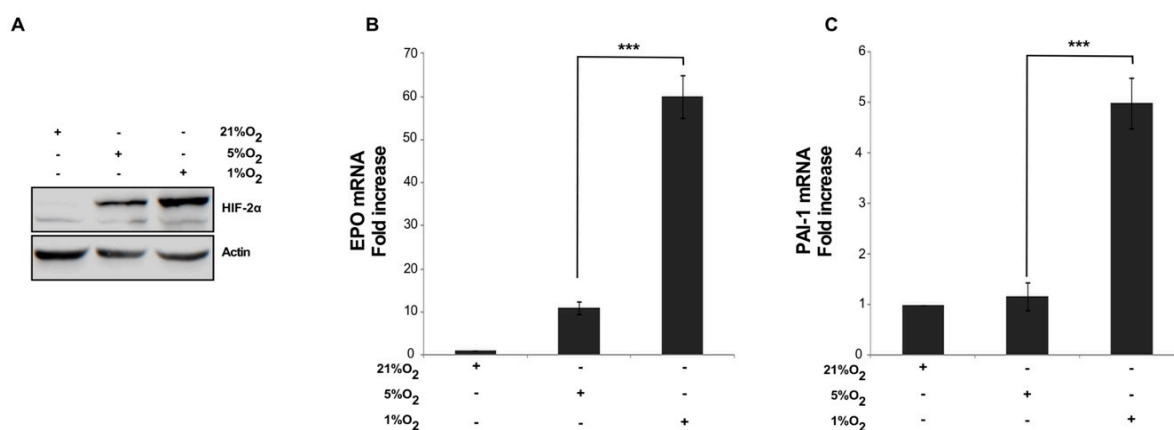
#### **3.1 ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ**

##### **3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ERK1/2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2Α**

Ο HIF-2 υπόκειται σε ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής, πρωτεϊνοσύνθεσης, σταθερότητας και δραστικότητας. Η ρύθμισή του περιλαμβάνει μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του HIF-2α όπως η φωσφορυλίωση. Οι γνώσεις μας για την ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-2α με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία παραμένουν αρκετά περιορισμένες. Πρόσφατα ευρήματα της ομάδας μας, έδειξαν ότι η κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) φωσφορυλιώνει τον HIF-2α προάγοντας την ενίσχυση της μεταγραφικής του ενεργότητας και την αύξηση της παραγωγής και έκκρισης της ερυθροποιητίνης (EPO) **(86)**. Ο μηχανισμός αυτός αντιπροσωπεύει ένα καινούργιο παράδειγμα διακριτής-αντίθετης ρύθμισης του HIF-2α από εκείνη του HIF-1α, καθώς η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τη CK1 οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν έναν πιθανό διακριτό βιολογικό ρόλο των δύο ισομορφών. Στο εργαστήριο μας έχει μελετηθεί εκτενώς η ρύθμιση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 **(111, 112)**. Έτσι δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν ο HIF-2α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και επιλέξαμε να εξετάσουμε την επίδραση των κινασών ERK1/2 στη ρύθμιση του HIF-2α.

##### **3.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-2α**

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, **(117)**, η έκφραση του HIF-2α στα ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος Huh7 καθίσταται σαφώς ανιχνεύσιμη σε συγκέντρωση οξυγόνου μικρότερη από 5% O<sub>2</sub>. Παρ' όλα αυτά, προκειμένου να επιλέξουμε για τα πειράματά μας τις ιδανικές συνθήκες υποξίας, πραγματοποιήσαμε σειρά πειραμάτων όπου μελετήθηκαν η έκφραση της πρωτεΐνης HIF-2α και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2 σε κύτταρα Huh7 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 21%, 5% και 1% O<sub>2</sub> για 16 ώρες **(Εικόνα 41)**.

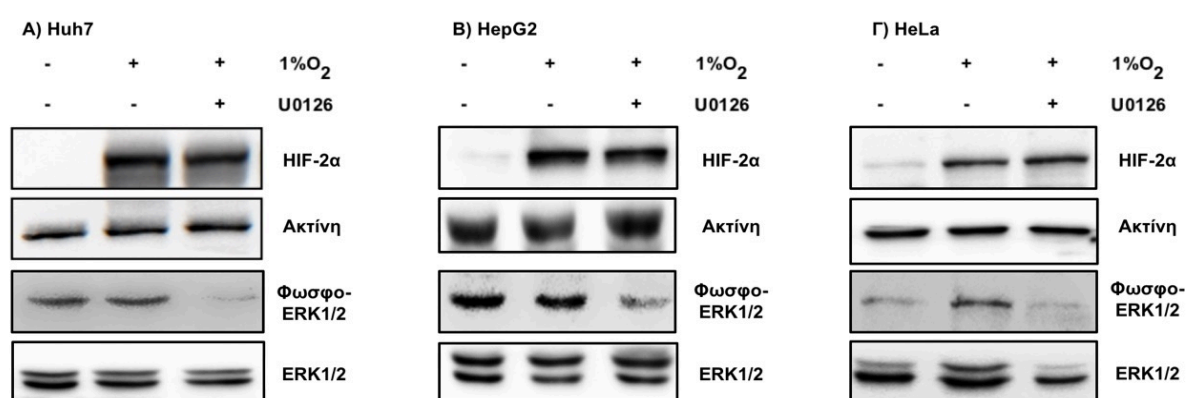


**Εικόνα 41:** Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου (21%, 5%, και 1%O<sub>2</sub>) στην έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α και τη μεταγραφή των ενδογενών γονιδίων *EPO* και *PAI-1*. **A)** Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με αντισώματα έναντι του HIF-2α, και της ακτινής ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε 21%, 5% και 1% O<sub>2</sub> για 16 ώρες. **B)** Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε 21%, 5% και 1% O<sub>2</sub> για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*)P<0,001).

Όπως φαίνεται στην (Εικόνα 41), η σταθεροποίηση του HIF-2α μετά από επώαση των κυττάρων σε 5% O<sub>2</sub> για 16 ώρες είναι μόνο μερική σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται όταν τα κύτταρα επωάζονται σε 1% O<sub>2</sub> για τον ίδιο χρόνο. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA της *EPO* μετά από επώαση των κυττάρων σε 5% O<sub>2</sub> σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε 21% O<sub>2</sub> ήταν πολύ μικρότερη από την αύξηση που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα επώαστηκαν σε 1% O<sub>2</sub>. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του *PAI-1* δεν παρουσίασαν αύξηση μετά από επώαση των κυττάρων σε 5% O<sub>2</sub> σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης σε 21% O<sub>2</sub>, ενώ η επώαση των κυττάρων Huh7 σε 1% O<sub>2</sub> οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του *PAI-1*. Ως εκ τούτου, η συνθήκη (1% O<sub>2</sub>) επιλέχθηκε ως η πλησιέστερη στην φυσιολογική υποξία αφού είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη σταθεροποίηση του HIF-2α και την πλήρη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του HIF-2 (δηλαδή αποτελεσματική κυτταρική απόκριση στην υποξία) σε σύγκριση με την ημιτελή σταθεροποίηση του HIF-2α και μερική ή καμία ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του HIF-2 (δηλαδή ανεπαρκής απόκριση στην υποξία) που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα επώαστηκαν σε 5% O<sub>2</sub>.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των ERK1/2 στη ρύθμιση της έκφρασης του HIF-2α, πραγματοποιήθηκε αναστολή της οδού των ERK1/2 με τον ειδικό αναστολέα του μονοπατιού των MEK, U0126 (5 μM). Κύτταρα Huh7, HepG2 και HeLa επώαστηκαν σε συνθήκες

νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία του αναστολέα U0126 για 16 ώρες. Η αποτελεσματικότητα της αναστολής της οδού των ERK1/2 ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου όπως αναμενόταν, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 μειώθηκαν σημαντικά παρουσία του U0126. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτες μεταβολές παρουσία του αναστολέα σε καμία συνθήκη, υποδεικνύοντας ότι η αναστολή των ERK1/2 δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α (Εικόνα 42).

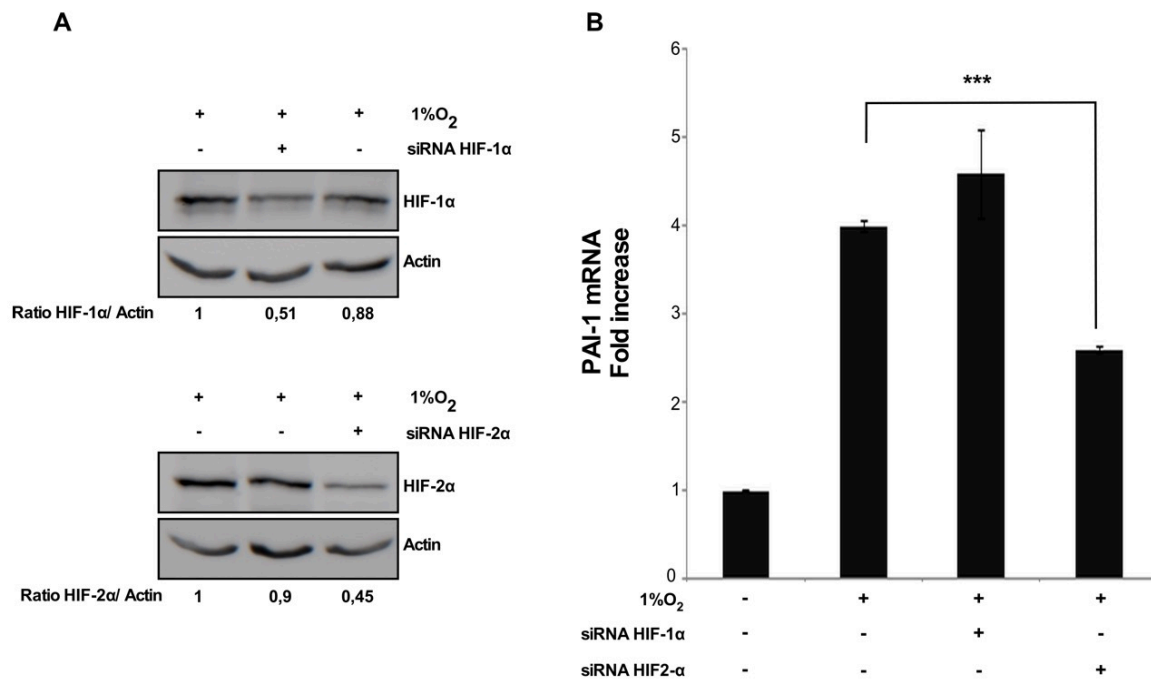


**Εικόνα 42: Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α.** Α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με αντισώματα έναντι των HIF-2α, ERK1/2 και α/β τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 Β) HepG2 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) ή υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες παρουσία ή απουσία του αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2 U0126 (5μM). Γ) HeLa που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) ή υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες παρουσία ή απουσία του αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2 U0126 (5μM)

### 3.1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ERK1/2 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-2

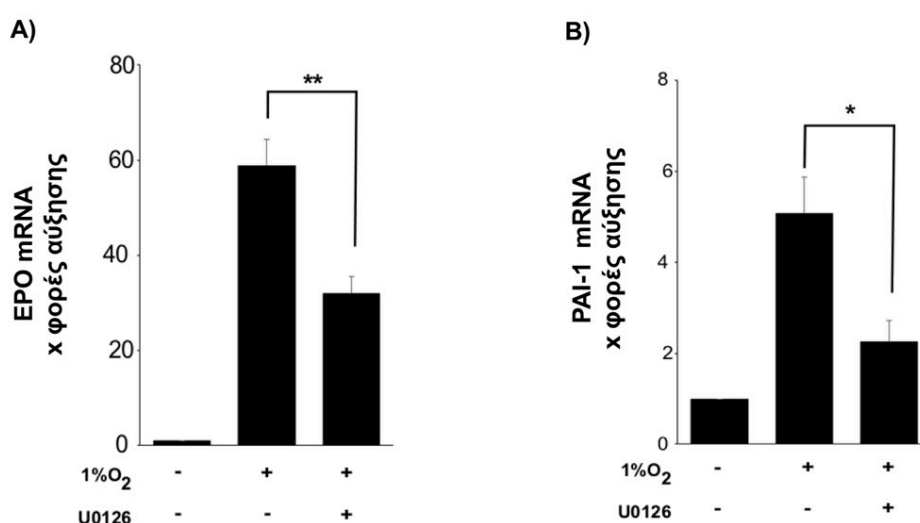
Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν επηρεάζεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 από τις ERK1/2. Για τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, εξετάσθηκε η μεταγραφή των ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2, *EPO* και *PAI-1*, με τη μέθοδο της Real Time PCR σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) με ταυτόχρονη φαρμακολογική αναστολή του μονοπατιού των κινασών ERK1/2. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (*EPO*) ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας ειδικά από τον HIF-2 σε ηπατικά και νεφρικά κύτταρα, καθώς και σε αστροκύτταρα (117, 141, 143, 145). Το γονίδιο του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,

ενεργοποιείται στην υποξία ειδικά από τον HIF-2 (16, 116, 159, 162). Ωστόσο, ελέγξαμε εάν η έκφραση του *PAI-1* ελέγχεται ειδικά από τον HIF-2α σε υποξία στο δικό μας μοντέλο, τα ηπατικά κύτταρα καρκινώματος Huh7 με πειράματα αποσιώπησης των HIF-1α και HIF-2α. Πραγματοποιήθηκε αρχικά διαμόλυνση Huh7 κυττάρων με siRNA-HIF-1α ή με siRNA-HIF-2α (ή με control siRNA) και 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν σε νορμοξία ή υποξία για 16 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του *PAI-1* με τη μέθοδο της RT-PCR. Η υποξία προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του *PAI-1* σε σύγκριση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α σε υποξία οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του *PAI-1* στα Huh7. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α σε υποξία διατήρησε τα επίπεδα mRNA του *PAI-1* (Εικόνα 43).



**Εικόνα 43: Επίδραση της αποσιώπησης του HIF-1α και του HIF-2α με siRNA στη μεταγραφή του ενδογενούς γονιδίου *PAI-1*.** **A)** Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με αντισώματα έναντι των HIF-1α, HIF-2α, και ακτίνη ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) και υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες μετά από αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α ή του HIF-2α. Οι αριθμοί κάτω από κάθε διαδρομή είναι οι λόγοι των επιπέδων πρωτεΐνης των HIF-1α/ακτίνης και HIF-2α/ακτίνης, όπως προσδιορίστηκαν μετά από ποσοτικοποίηση και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από δυο ανεξάρτητα πειράματα. **B)** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) και υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες μετά από αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α ή του HIF-2α. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 4 τιμών από 2 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*P<0,001).

Συνεπώς, επιβεβαιώθηκε ότι ο HIF-2 είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής του *PAI-1* στα Huh7 και ότι η μέτρηση των επιπέδων του mRNA του *PAI-1* αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της μεταγραφικής δράσης του HIF-2 στα κύτταρα Huh7. Μετρώντας τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού των MEK U0126 σε υποξία, παρατηρήσαμε μείωσή τους στο μισό σε σύγκριση με τα επίπεδά τους σε υποξία, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αναστολή της δράσης των ERK1/2 σχετίζεται με μειωμένη μεταγραφική δράση του HIF-2 (Εικόνα 44).



**Εικόνα 44: Επίδραση του ειδικού αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2, U0126, στη μεταγραφή ενδογενών γονιδίων στόχων του HIF-2.** Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Α) *EPO* και Β) *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) και υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα U0126 (5 μM) για 16 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05, \*\*P<0,01).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2, μειώνει σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση των *EPO* και *PAI-1*. Συνεπώς, οι ERK1/2 επάγουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 σε συνθήκες υποξίας, μέσω ενός μηχανισμού που δεν φαίνεται να μεταβάλλει την πρωτεϊνική του σταθερότητα.

### 3.1.4 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.2, το μονοπάτι των ERK1/2 είναι καθοριστικό για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-2. Έτσι, δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι οι ERK1/2 πιθανώς ρυθμίζουν τον HIF-2 μέσω φωσφορυλίωσης της HIF-2α υπομονάδας.

Γνωρίζουμε από προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου μας ότι η HIF-1α ισομορφή της οικογένειας των HIFs φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 σε δυο κατάλοιπα σερίνης της επικράτειας ID. Η φωσφορυλίωση αποτρέπει την πυρηνική εξαγωγή του HIF-1α και αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, καθώς καλύπτεται ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (NES) που αναγνωρίζει η εξπορτίνη CRM1 (**111, 112**). Ωστόσο, μετά από συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των HIF, οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α δεν εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στην περιοχή αυτή (**Εικόνα 45**).

```

EPAS1_HUMAN AENPQSTPQHCF SAM--TNIFQPLAPVAPHSPFLLDK FQQLESKKTEPEHRPMSS--IF 608
HIF1A_HUMAN ASPESASPQSTVTVFQQTQIQEPTANATTT-TATDELK-----TVTK-DRMEDIKIL 638
      * .  : : * *  . : :  * : * *  . :  * : :  * :  * :  * :  * :
EPAS1_HUMAN FDAGSKASLP-PCCGQASTPLSSMGRSNTQWPPDPPLHFGPTKWAVGDQRTEFLGAAPL 667
HIF1A_HUMAN IASPSPTHIKETTSATSSPYRDTQSR-----TASPNRAGK-----G-----VIEQTEK 682
      : : * : :  . : * *  .  . *  * : *  *  *  . :  :
EPAS1_HUMAN GPPVSPPHVSTFKTRSAKGF GARGPDVLS PAMVALSNK LKLRQLEYEEQAFQDLSSGGD- 726
HIF1A_HUMAN SHPRSPNVLSVALS----QRTTVPEEELNPKILALQNA-QRKRKMEHDGSLFQAVGIGTL 737
      . * **  : * .  :  :  : * . * : : * * . * : * : : : : . * * . *

```

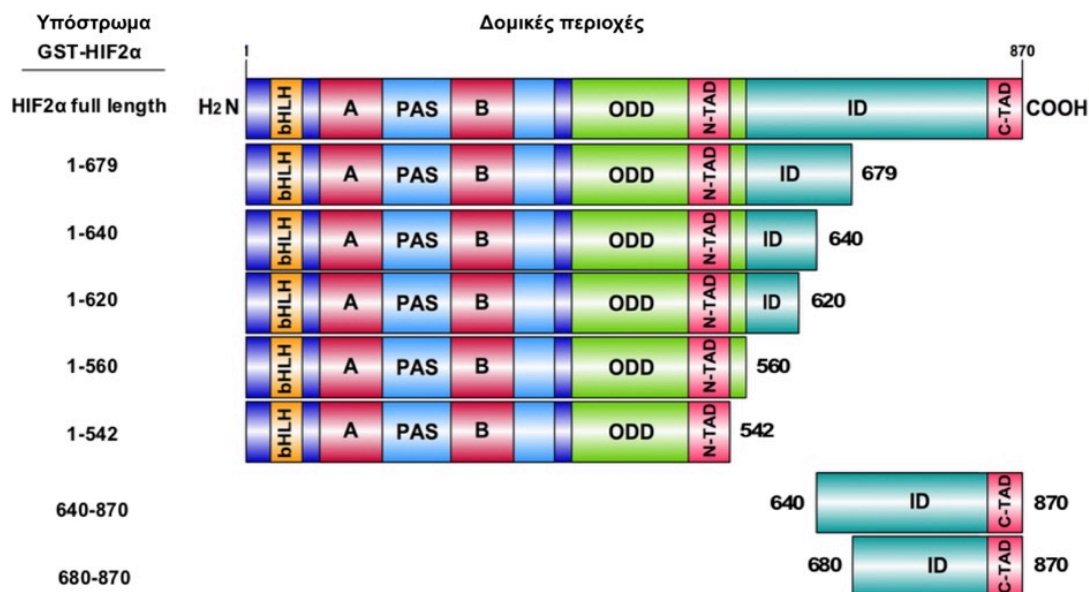
**Εικόνα 45:** Ομοπαράθεση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του ανθρώπινου HIF-2α (EPAS1) και του ανθρώπινου HIF-1α (HIF1A).

Ακόμη, παλαιότερη βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι ο HIF-2 ρυθμίζεται από τις ERK1/2 με έμμεσο τρόπο, μέσω του μονοπατιού της καλμοδουλίνης (227). Συνεπώς, δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν ο HIF-2α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ή ρυθμίζεται έμμεσα από αυτές.

### 3.1.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ *in vitro* ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-2α ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΤΕΡΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.

Προκειμένου να διερευνηθεί το ενδεχόμενο της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 και να βρεθεί η πιθανή θέση φωσφορυλίωσης, ήταν απαραίτητη η έκφραση και η απομόνωση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης του ανασυνδυασμένου HIF-2α και μικρότερων τμημάτων του σε βακτήρια. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, κατασκευάστηκαν τα τμήματα του HIF-2α : 1-560, 1-620, 1-640, 640-870, και 680-870 (**Εικόνα 46**). Η κατασκευή του πλήρους μεγέθους HIF-2α είχε πραγματοποιηθεί στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας με τίτλο «Έκφραση και απομόνωση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α » που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Παναγιώτη Λιάκου. Η

κατασκευή των τμημάτων 1-542 και 1-679, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Χριστίνας Μπεφάνη με τίτλο «Διερεύνηση του ρόλου του HIF-2α στην κυτταρική ομοιοστασία» υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Παναγιώτη Λιάκου.

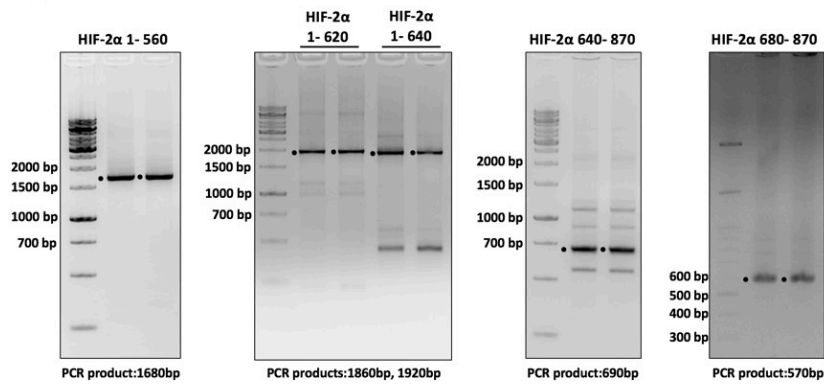


**Εικόνα 46:** Σχηματική απεικόνιση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης HIF-2α καθώς και μικρότερων τμημάτων της που κατασκευάστηκαν σε σύντηξη με την GST και χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, καθώς και των σχετικών επιπέδων φωσφορυλίωσής τους. Στο σχήμα απεικονίζονται ο πλήρους μεγέθους HIF-2α και τα μικρότερα τμήματά του που κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν ως πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST. Οι διάφορες δομικές περιοχές τους σημαίνονται με διαφορετικά χρώματα.

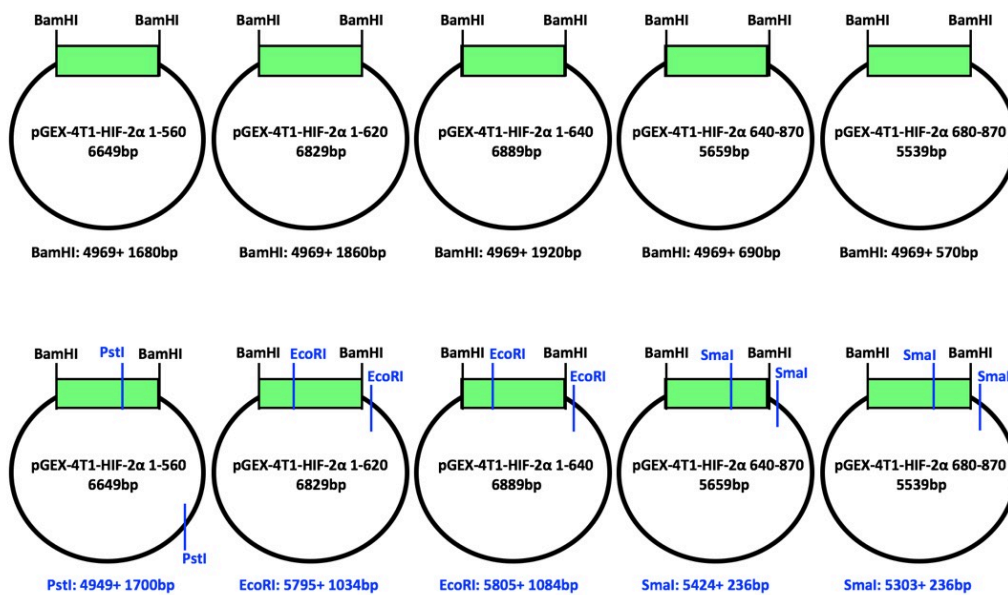
Αρχικά, ενισχύθηκαν με PCR οι αλληλουχίες cDNA που κωδικοποιούν για τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά τμήματα του HIF-2α. Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, ο οποίος χρησιμοποιείται για την έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST ώστε να είναι δυνατή η απομόνωσή τους (**Εικόνα 47**).



A)

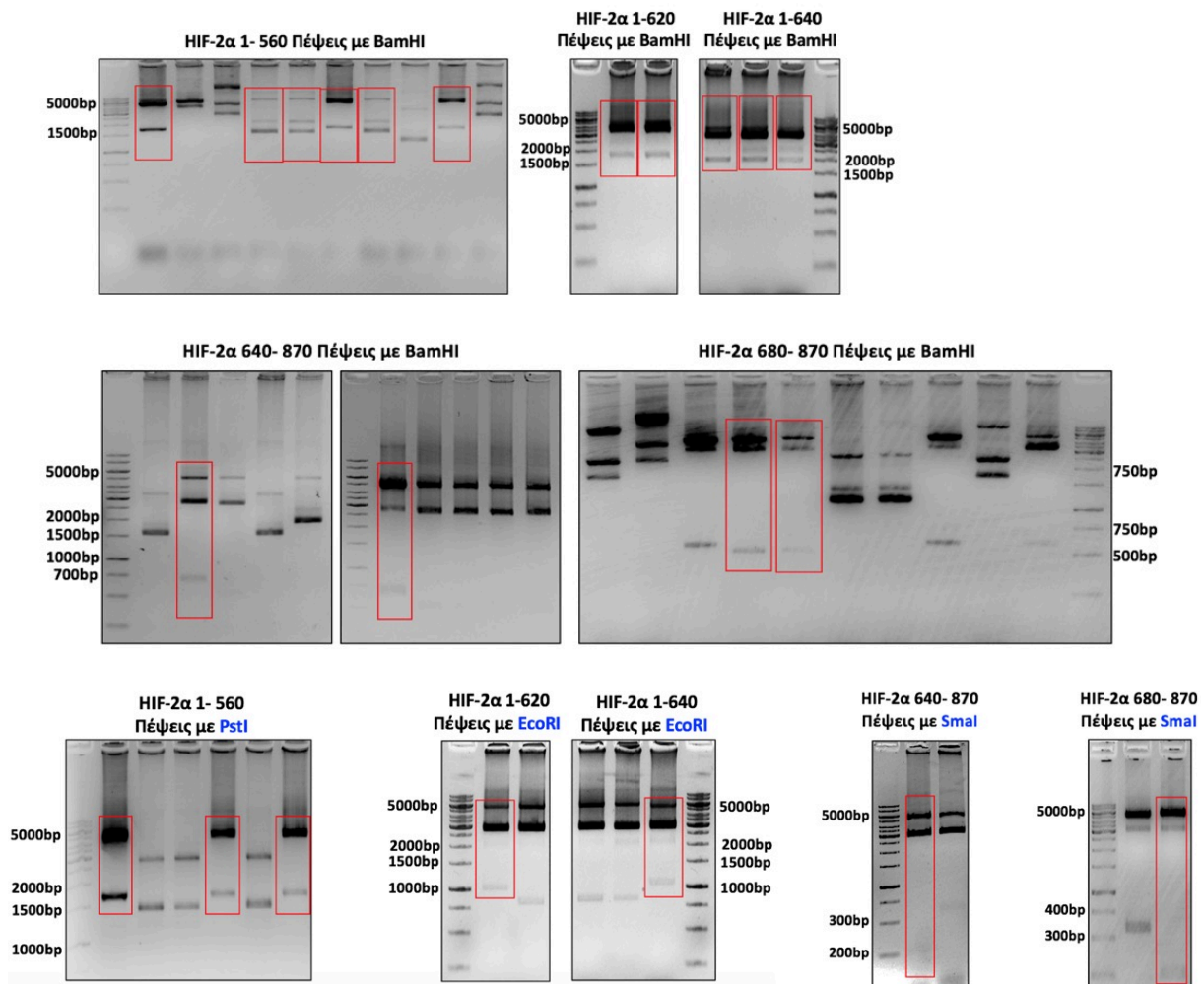


B)

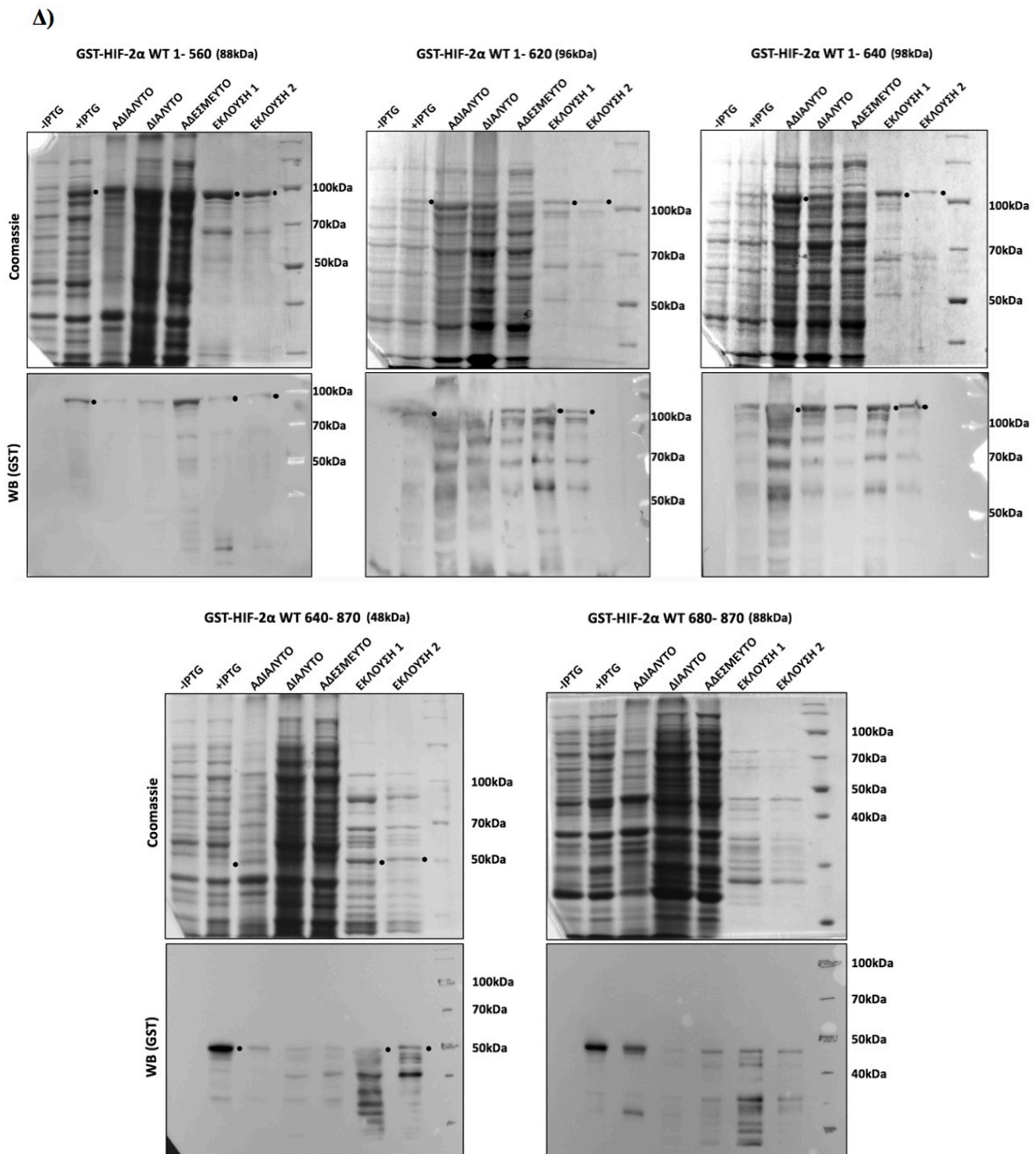


**Εικόνα 47:** Κλωνοποίηση των επικρατειών GST-HIF-2α 1-560, GST-HIF-2α 1-620, GST-HIF-2α 1-640, GST-HIF-2α 640-870, GST-HIF-2α 680-870 στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, υπερέκφραση και απομόνωσή τους από βακτηριακά κύτταρα BL21RIL. **A)** Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών cDNA που κωδικοποιούν τις επικράτειες 1-560, 1-620, 1-640, 640-870 και 680-870. **B)** Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού.

Γ)

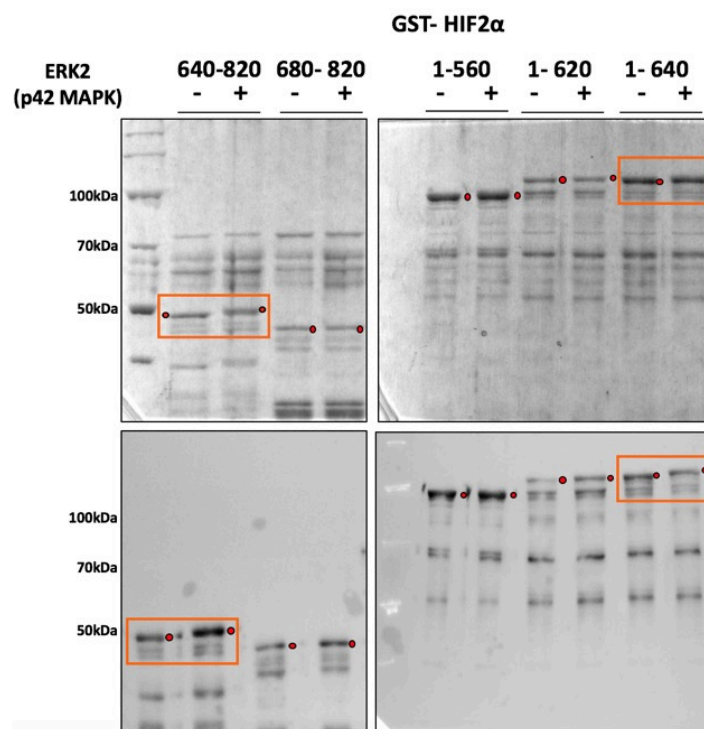


**Εικόνα 47:** Κλωνοποίηση των επικρατειών GST-HIF-2α 1-560, GST-HIF-2α 1-620, GST-HIF-2α 1-640, GST-HIF-2α 640-870, GST-HIF-2α 680-870 στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, υπερέκφραση και απομόνωσή τους από βακτηριακά κύτταρα BL21RIL. Γ) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pGEX-4T1-HIF-2α 1-560, pGEX-4T1-HIF-2α 1-620, pGEX-4T1-HIF-2α 1-640, pGEX-4T1-HIF-2α 640-870 και pGEX-4T1-HIF-2α 680-870 με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού.



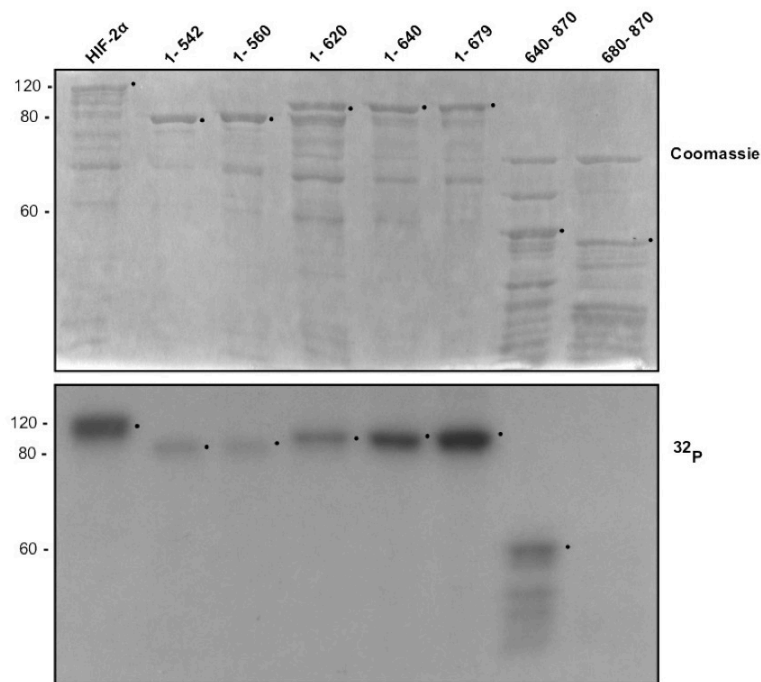
**Εικόνα 47:** Κλωνοποίηση των επικρατειών GST-HIF-2 $\alpha$  1-560, GST-HIF-2 $\alpha$  1-620, GST-HIF-2 $\alpha$  1- 640, GST-HIF-2 $\alpha$  640- 870, GST-HIF-2 $\alpha$  680- 870 στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, υπερέκφραση και απομόνωσή τους από βακτηριακά κύτταρα BL21RIL. Δ) Βακτηριακά κύτταρα E.Coli BL21RIL που περιείχαν τα πλασμίδια για την έκφραση των πρωτεϊνών GST-HIF-2 $\alpha$  1-560, GST-HIF-2 $\alpha$  1-620, GST-HIF-2 $\alpha$  1- 640, GST-HIF-2 $\alpha$  640- 870 και GST-HIF-2 $\alpha$  680- 870, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με, το αδιάλυτο, το διαλυτό κλάσμα των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και τα εκλούσματα της GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Προκειμένου να εξετάσουμε αν ο HIF-2α αποτελεί υπόστρωμα των ERK1/2 και να εντοπίσουμε την πιθανή περιοχή της φωσφορυλίωσης, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και τα μικρότερα τμήματά του που απομονώθηκαν, επώαστηκαν με ή χωρίς p42 (ERK2) παρουσία ψυχρού ATP και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα που είχαν επωαστεί με την ERK2, παρατηρήθηκε πιο αργή μετακίνηση των χημικών πρωτεϊνών 640-870 και 1-640, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο HIF-2α αποτελεί υπόστρωμα των ERK1/2 και ότι η πιθανή περιοχή φωσφορυλίωσης εντοπίζεται ανάμεσα στα κατάλοιπα 620-680. (Εικόνα 48).



**Εικόνα 48:** *in vitro* φωσφορυλίωση του πλήρους μεγέθους HIF-2α και των τμημάτων 1-560, 1-620, 1-640, 640-870 και 680-870 χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη κινάση ERK2 και ψυχρό ATP. Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της GST των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-HIF-2α πλήρους μεγέθους και των τμημάτων GST-HIF-2α 1-560, 1-620, 1-640, 640-870 και 680-870, ύστερα από επώαση με ή χωρίς 100 units ανασυνδυασμένης κινάσης ERK2 παρουσία ψυχρού ATP. Παρουσία της ERK2 διακρίνονται ζώνες των χημικών πρωτεϊνών 640-870 και 1-640 που μεταναστεύουν πιο αργά στην πηκτή, υποδεικνύοντας φωσφορυλίωση του HIF-2α στα τμήματα αυτά. Οι κουκίδες δείχνουν τη μετατόπιση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

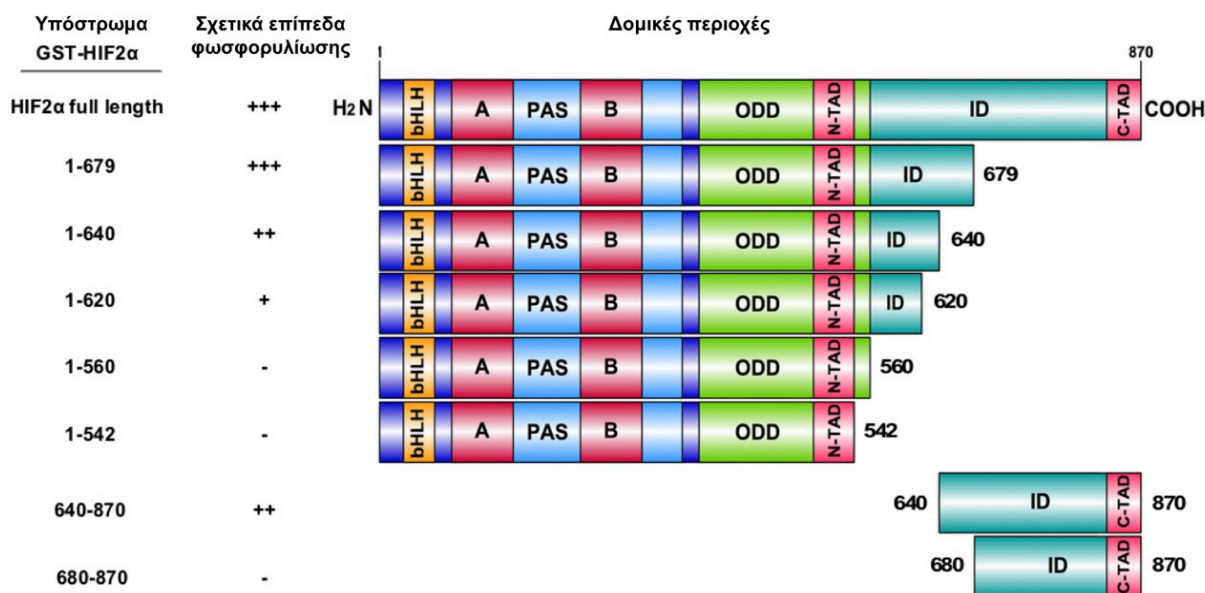
Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α και τα μικρότερα τμήματά του που απομονώθηκαν, υπεβλήθησαν σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης με την εμπορική ανασυνδυασμένη κινάση p42 (ERK2) και ραδιενεργά σημασμένο ATP ( $^{32}\text{P}$ ). Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία (Εικόνα 49)



**Εικόνα 49:** *in vitro* φωσφορυλίωση του πλήρους μεγέθους GST-HIF-2α και μικρότερων τμημάτων του με την ανασυνδυασμένη κινάση p42 (ERK2). Στο πάνω μέρος φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE μετά από βαφή με Coomassie, ενώ στο κάτω το φιλμ της αυτοραδιογραφίας ( $^{32}\text{P}$ ). Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις του μάρτυρα μοριακού βάρους (σε kDa).

Στα αμινοτελικά τμήματα 1- 542, 1- 560 και το καρβοξυτελικό τμήμα 680- 870 ανιχνεύθηκε ελάχιστη έως μηδενική φωσφορυλίωση συγκριτικά με την έντονη φωσφορυλίωση του πλήρους μήκους HIF-2α. Το αμινοτελικό τμήμα 1- 620 επίσης παρουσίασε πολύ χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης συγκριτικά με τον πλήρους μήκους HIF-2α. Στα τμήματα του HIF-2α 1-640 και 640- 870 του HIF-2α ανιχνεύθηκαν σημαντικά επίπεδα φωσφορυλίωσης, ενώ το τμήμα 1- 679 φαίνεται ότι διατηρεί πλήρως την ικανότητα του πλήρους μήκους HIF-2α να φωσφορυλιώνεται από την p42 (ERK2) κινάσης *in vitro*. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο HIF-2α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης της p42 (ERK2) κινάσης *in vitro*. Ακόμη, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φωσφορυλίωση εντοπίζεται κυρίως μεταξύ των αμινοξέων 620-680, μια περιοχή που περιλαμβάνει την ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής ID (Inhibitory Domain) του HIF-2α (Εικόνα 50).

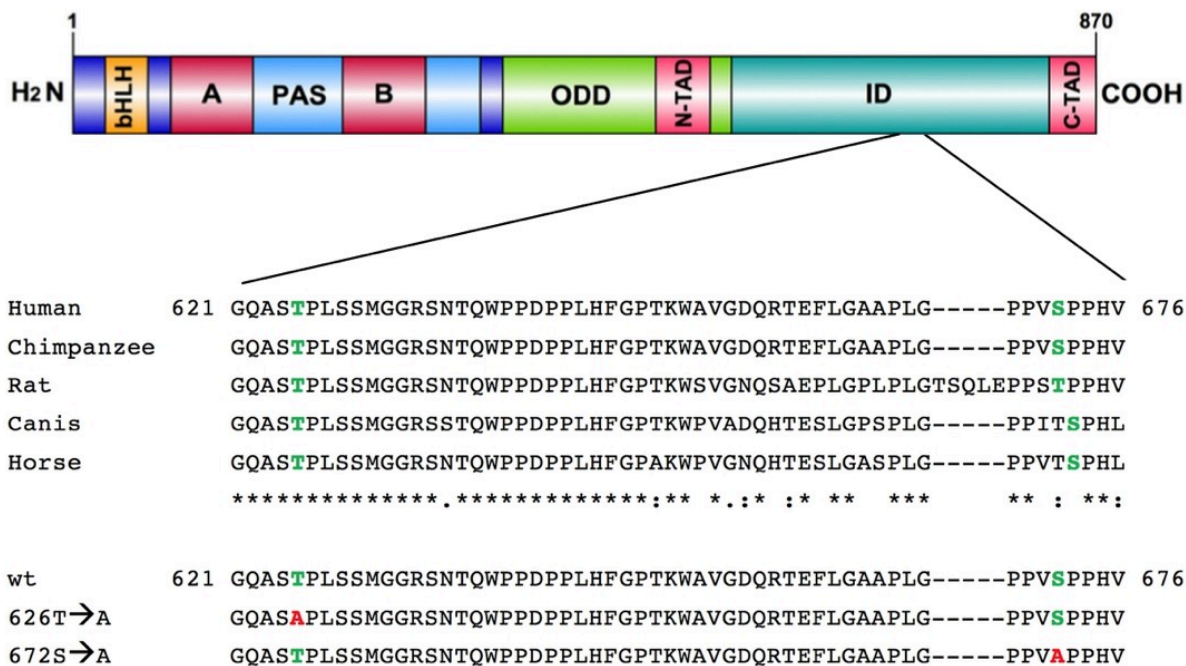




Εικόνα 50: Σχηματική απεικόνιση της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης HIF-2α καθώς και μικρότερων τμημάτων της που κατασκευάστηκαν σε σύντηξη με την GST και χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, καθώς και των σχετικών επιπέδων φωσφορυλίωσής τους. Στο σχήμα απεικονίζονται ο πλήρους μεγέθους HIF-2α και τα μικρότερα τμήματά του που κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν ως πρωτεΐνες σε σύντηξη με την GST. Οι διάφορες δομικές περιοχές τους σημαίνονται με διαφορετικά χρώματα. Στην κεντρική στήλη με το σύμβολο + σημειώνονται τα τμήματα του HIF-2α που ταυτοποιήθηκαν ως υποστρώματα της ανασυνδυασμένης κινάσης p42 (ERK2) με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων της *in vitro* φωσφορυλίωσης, καθώς και τα σχετικά επίπεδα της φωσφορυλίωσης.

### 3.1.6 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 620-680

Για να καθοριστούν με ακρίβεια οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, αναζητήσαμε στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 620 και 680 πιθανά SP ή TP διπεπτίδια τα οποία πληρούν το κλασικό μοτίβο αναγνώρισης από τις ERK1/2, PX(S/ T)P. Η ανάλυση ανέδειξε την παρουσία δύο πιθανών καταλοίπων που ταιριάζουν με το μοτίβο, τη σερίνη 672 και τη θρεονίνη 626. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας 620-680 μεταξύ των ομολόγων του HIF-2α σε διάφορα σπονδυλωτά, που αποκάλυψε ότι και τα δυο αυτά κατάλοιπα βρίσκονται σε συντηρημένη θέση (Εικόνα 51).

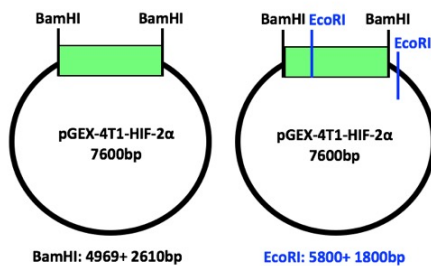


**Εικόνα 51: Πολλαπλή ομοπαράθεση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας 620-680 του HIF-2α μεταξύ διάφορων ανώτερων οργανισμών.** Η σερίνη 672 και η θρεονίνη 626 είναι αρκετά συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στην εικόνα αναπαρίσταται επίσης η μετατροπή της σερίνης 672 και της θρεονίνης 626 σε αλανίνη με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης.

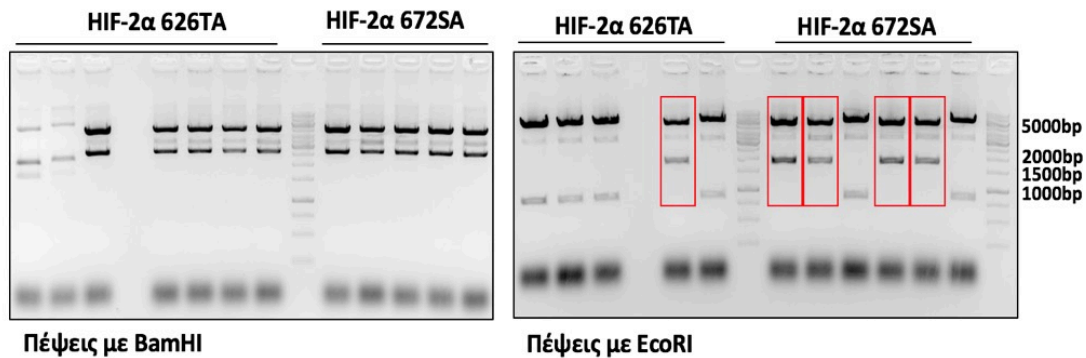
### 3.1.7 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-2Α S672Α ΚΑΙ T626Α.

Προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι τα κατάλοιπα 672 και 626 ευθύνονται για την φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2, έγινε μετατροπή κάθε καταλοίπου ξεχωριστά σε αλανίνη (S672A, T626A), ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται. Η μετατροπή των παραπάνω καταλοίπων σε αλανίνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης (site directed mutagenesis), όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Κατασκευάστηκαν μεταλλαγμένες μορφές του cDNA του HIF-2α οι οποίες κλωνοποιήθηκαν στον πλασμδιακό φορέα pGEX-4T1, εισήχθησαν σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli BL21RIL όπου και έγινε επαγωγή της έκφρασής τους με IPTG και απομόνωσή τους σε σύντηξη με την GST πρωτεΐνη (**Εικόνα 52**).

A)

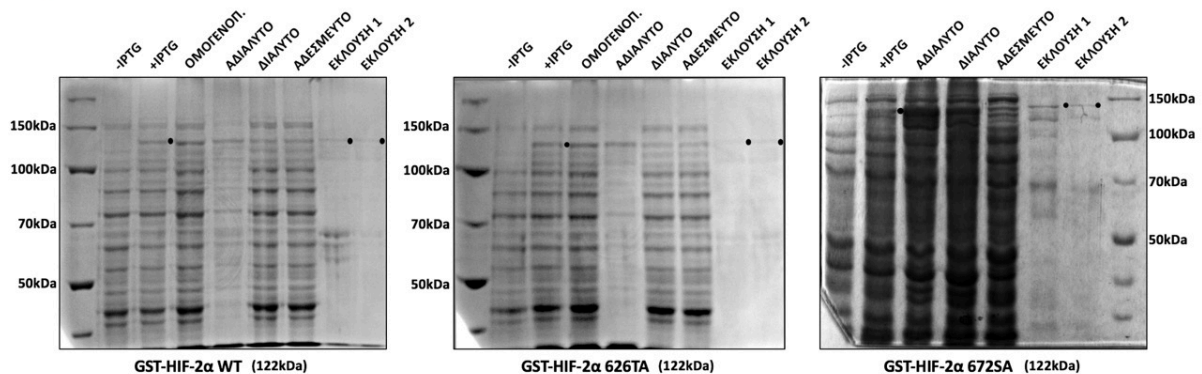


B)



**Εικόνα 52: Κλωνοποίηση των GST-HIF-2α 626TA και GST-HIF-2α 672SA στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, υπερέκφραση και απομόνωσή τους από βακτηριακά κύτταρα BL21RIL. Α) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Β) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pGEX- 4T1-HIF-2α 626TA και pGEX-4T1-HIF-2α 672SA με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού.**

Γ)



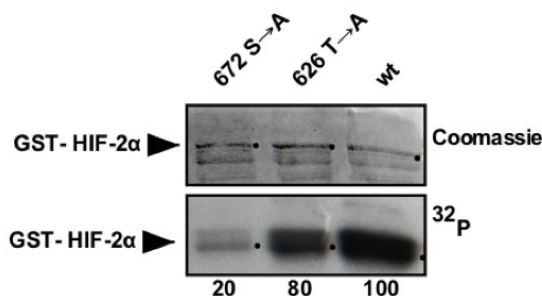
**Εικόνα 52: Κλωνοποίηση των GST-HIF-2α 626TA και GST-HIF-2α 672SA στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, υπερέκφραση και απομόνωσή τους από βακτηριακά κύτταρα BL21RIL. Γ) Βακτηριακά κύτταρα E.Coli BL21RIL που περιείχαν τα πλασμίδια για την έκφραση των πρωτεϊνών GST-HIF-2α WT, GST-HIF-2α 626TA και GST-HIF-2α 672SA, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με ομογενοποίηση, το αδιάλυτο, το διαλυτό κλάσμα των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και τα εκλούσματα της GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE**



και βαφή με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν τη θέση της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε KDa).

### 3.1.8 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-2α T626A ΚΑΙ S672A ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΚΑΙ ΑΠΟ ΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ Huh7.

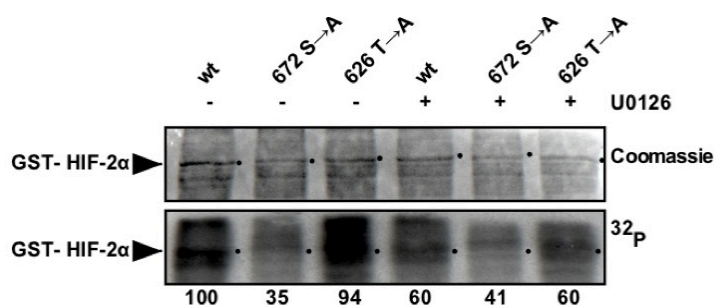
Ο πλήρους μεγέθους αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και οι μορφές που φέρουν τις μεταλλάξεις σε αλανίνη, μετά την απομόνωσή τους χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης με ανασυνδυασμένη p42 MAPK (ERK2) ή ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7, παρουσία ραδιενεργά σημασμένου ATP. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. Παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση της επώασης με p42 MAPK (ERK2), τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των HIF-2αS672A και HIF-2αT626A μειώθηκαν κατά 80% και 20% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του αγρίου τύπου HIF-2α (Εικόνα 53).



**Εικόνα 53:** *in vitro* φωσφορυλίωση του αγρίου τύπου HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών S672A, T626A *in vitro* χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη κινάση ERK2. Πάνω φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie, ενώ κάτω το φίλμ της αυτοραδιογραφίας ( $^{32}\text{P}$ ) για τον αγρίου τύπου HIF-2α και για τα μεταλλάγματα S672A και T626A. Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης έπειτα από μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων ανά λεπτό (cpm). Η τιμή των cpm της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (wt) θεωρείται ότι δίνει το μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης (100%) και τα ποσοστά φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις τιμές cpm τους σε σχέση με την τιμή cpm του wt. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων.

Όταν ως πηγή κινασών χρησιμοποιήθηκαν ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7, η μετάλλαξη της σερίνης 672 προκάλεσε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης περίπου 65% σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-2α, ενώ η μετάλλαξη της θρεονίνης 626 δεν επηρέασε καθόλου τα επίπεδα φωσφορυλίωσης (Εικόνα 54). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η σερίνη 672 είναι το κυρίαρχο αμινοξύ του ανθρώπινου HIF-2α που φωσφορυλιώνεται από την ERK2. Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι τροποποιήσεις των Ser672 και Thr626 οφείλονται στις ERK1/2, κύτταρα Huh7 προ επώαστηκαν για 16 ώρες με τον αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2, U0126 5μM, κάτω από συνθήκες υποξίας (1% O<sub>2</sub>) πριν τα εκχυλίσματά τους χρησιμοποιηθούν ως πηγή κινασών για τα πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης (Εικόνα 54). Η αναστολή της

ενζυμικής δράσης των ERK1/2 προκάλεσε μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του αγρίου τύπου HIF-2α κατά 40% παρόμοια με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2αS672A χωρίς επώαση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τον U0126. Η επώαση με U0126 δεν επηρέασε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2αS672A. Ωστόσο, η ίδια επώαση μείωσε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2αT626A κατά 40%, υπονοώντας ότι το κατάλοιπο αυτό αποτελεί στόχο κάποιας άλλης κινάσης και όχι των ERK1/2.



**Εικόνα 54:** *In vitro* φωσφορυλίωση του αγρίου τύπου HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών S672A, T626A χρησιμοποιώντας ως πηγή κινασών ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 μετά από επώαση με ή χωρίς τον ειδικό αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2, U0126 5μM. Πάνω φαίνεται η ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie, ενώ κάτω το φιλμ της αυτοραδιογραφίας (<sup>32</sup>P) για τον αγρίου τύπου HIF-2α και για τα μεταλλάγματα S672A και T626A. Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης έπειτα από μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων ανά λεπτό (cpm). Η τιμή των cpm της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (wt) θεωρείται ότι δίνει το μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης (100%) και τα ποσοστά φωσφορυλίωσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις τιμές cpm τους σε σχέση με την τιμή cpm του wt. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων.

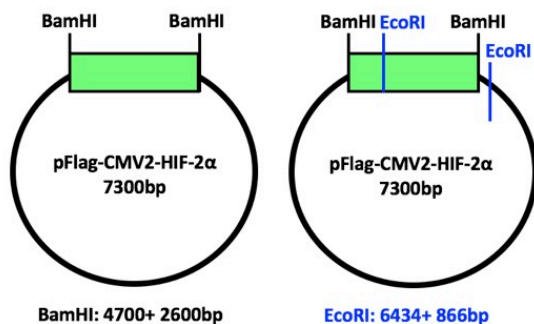
Συμπερασματικά, τα παραπάνω πειράματα υποδεικνύουν ότι η σερίνη 672 έχει κυρίαρχο ρόλο στην *in vitro* φωσφορυλίωση του ανθρώπινου HIF-2α από τις ERK1/2 και πιθανώς αποτελεί το μοναδικό κατάλοιπο που είναι στόχος τους.

### 3.1.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΘΕΣΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ (S672) ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α.

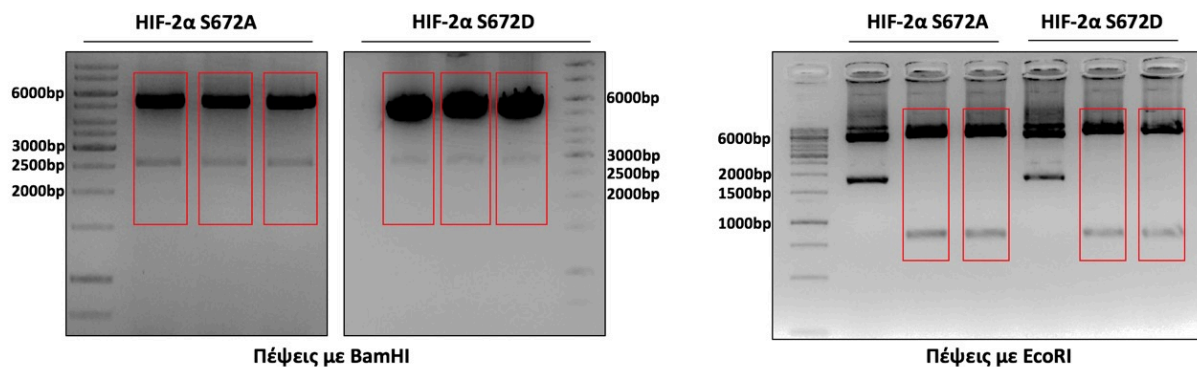
Τα πειραματικά δεδομένα της προηγούμενης ενότητας υποδεικνύουν ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 στο καρβοξυτελικό του άκρο και πιο συγκεκριμένα στη σερίνη 672. Το κατάλοιπο αυτό εντοπίζεται στην ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής ID (Inhibitory Domain) του HIF-2α, ο ρόλος της οποίας δεν έχει εκτενώς χαρακτηριστεί. Για να διερευνήσουμε τον βιολογικό ρόλο της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 στη Ser 672 στη λειτουργία του HIF-2α, κατασκευάστηκε επίσης η φωσφο-μιμητική μεταλλαγμένη μορφή HIF-2αS672D με *in vitro* στοχευμένη μεταλλαξιγένεση, το αρνητικό

φορτίο της οποίας θα μπορούσε ενδεχομένως να μιμηθεί το φορτίο του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου. Οι αλληλουχίες cDNA του αγρίου τύπου πλήρους μεγέθους HIF-2α καθώς και οι μεταλλαγμένες μορφές που είτε καταργούν τη θέση φωσφορυλίωσης HIF-2αS672A είτε μιμούνται το φορτίο της φωσφορυλίωσης HIF-2αS672D, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2, ο οποίος χρησιμοποιείται για την έκφραση πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG (Εικόνα 55).

A)



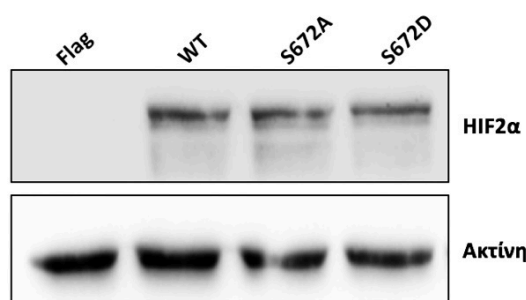
B)



**Εικόνα 55: Κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α πλήρους μεγέθους, HIF-2α-S672A και HIF-2α-S672D στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV2.** A) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. B) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων pFlag-CMV2-HIF-2αS672A και pFlag-CMV2-HIF-2αS672A με τα εικονιζόμενα ένζυμα περιορισμού.

### 3.1.10 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-2α.

Για να διερευνηθεί η πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, που είτε στερούνται την ικανότητα φωσφορυλίωσης, είτε μιμούνται τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Huh7 και HepG2, με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG. Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση Western blot έδειξε ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης των μεταλλαγμένων μορφών ήταν παρόμοια με εκείνα του αγρίου τύπου HIF-2α. (Εικόνα 56).



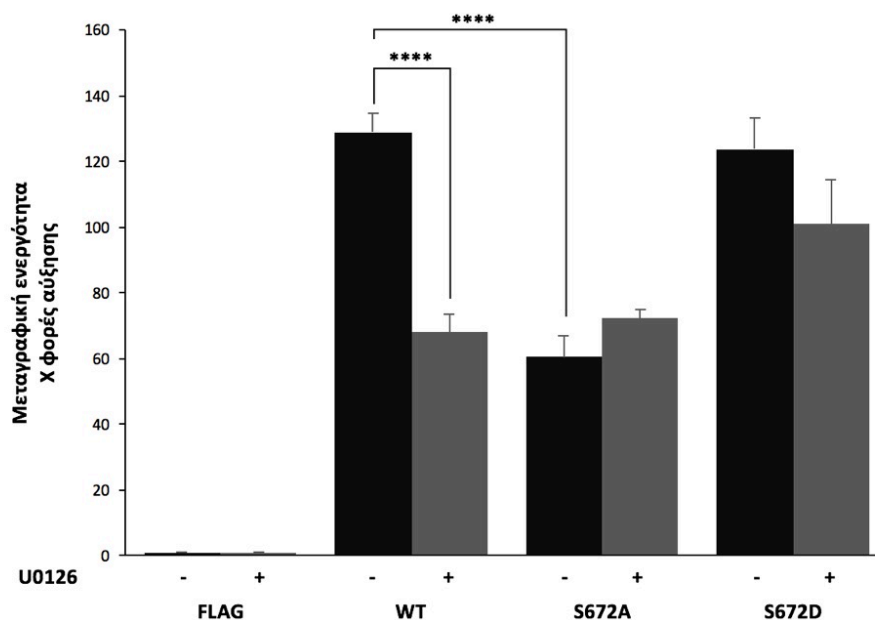
**Εικόνα 56:** Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι στους HIF-2α και τουμπουλίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, του pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του.

Συνεπώς, η φωσφορυλίωση της Ser672 από τις ERK1/2 δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του HIF-2α σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως άλλωστε έχει ήδη προταθεί από τα αρχικά πειράματα αναστολής του μονοπατιού των κινασών.

### 3.1.11 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ 672 ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-2α.

Για να ελέγξουμε την επίδραση των μεταλλάξεων στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α χρησιμοποιήσαμε το σύστημα της λουσιφεράσης όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τον αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και τις μεταλλαγμένες μορφές του σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, καθώς και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla. Παρατηρήσαμε ότι το S672A μετάλλαγμα του HIF-2α που έχει χάσει την ικανότητα φωσφορυλίωσης, παρουσίασε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα κατά 50% σε σύγκριση με αυτή του αγρίου τύπου HIF-2α. Αντίθετα, η μεταγραφική ενεργότητα του φωσφομιμητικού μεταλλάγματος

ήταν παρόμοια με αυτή του HIF-2α αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορλίωση του αγρίου τύπου HIF-2α είναι καθοριστική για τη μεταγραφική του ενεργότητα. (Εικόνα 57). Τα δεδομένα που περιγράφηκαν μέχρι τώρα δείχνουν ότι η αναστολή της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα του ενδογενούς HIF-2 (Εικόνα 44). Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω ότι το φαινόμενο που προκαλείται από τις ERK1/2 συνδέεται με την τροποποίηση της Ser672, ο αγρίου τύπου HIF-2α και οι μεταλλαγμένες μορφές του εκφράστηκαν ως σημασμένες με τον επίτοπο Flag πρωτεΐνες σε κύτταρα Huh7 απουσία ή παρουσία του ειδικού αναστολέα U0126 της οδού ERK1 / 2 σε νορμοξία (απουσία του ενδογενούς HIF-2α) και προσδιορίστηκε η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 με το σύστημα της λουσιφεράσης (Εικόνα 57). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο αγρίου τύπου HIF-2α αποκρίθηκε στην αναστολή της δράσης των ERK1/2 εμφανίζοντας σημαντικά χαμηλότερη ενεργότητα, παρόμοια με εκείνη της S672A μορφής και αναπαράγοντας ακριβώς τη συμπεριφορά του επαγόμενου από την υποξία ενδογενούς HIF-2α (Εικόνα 57). Ωστόσο, η ήδη χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα της S672A μορφής του HIF2-α και η κανονικές (σε σύγκριση με τις αγρίου τύπου) δραστηριότητα της φωσφο-μιμητικής μορφής δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τον αναστολέα των MEK, U0126. (Εικόνα 57). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν έντονα ότι η ρύθμιση του HIF-2α από τις ERK1/2 στα κύτταρα Huh7 περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο το κατάλοιπο Ser672.



**Εικόνα 57: Επίδραση του ειδικού αναστολέα U0126 των ERK1/2 στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του.** Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, μετά από διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα U0126 του μονοπατιού των

ERK1/2. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-*Renilla*. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της *Renilla* και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*) P<0,001).

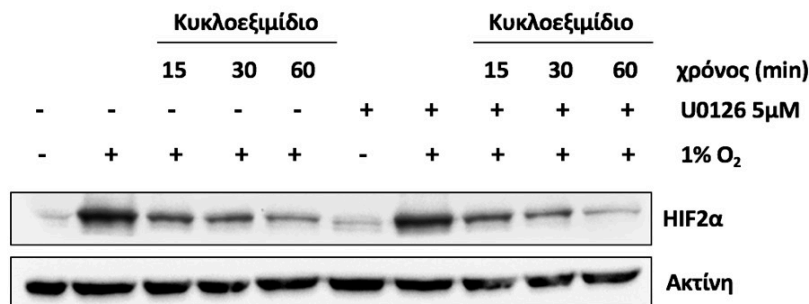
Συνολικά, αυτά τα δεδομένα, συμφωνούν με τα αποτελέσματα της πρώτης ενότητας (που αφορά στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς HIF-2α) και δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α στη Ser672 από τις ERK1/2 αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα Huh7.

### **3.1.12 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΣΩ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.**

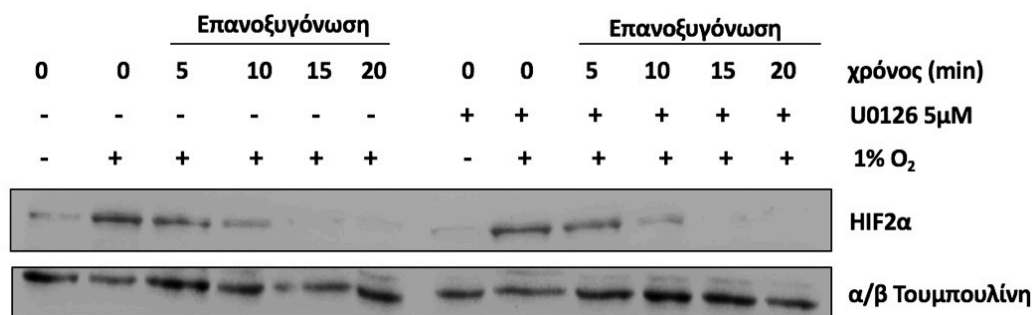
Τα αποτελέσματα που έχουν περιγραφεί ως τώρα προτείνουν ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2 σε σειρές ηπατοκαρκινώματος. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στις παραπάνω διαδικασίες θα μπορούσαν να οφείλονται σε εμπλοκή της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 σε στάδια όπως η πρωτεϊνική σταθερότητα της HIF-2α υπομονάδας, η αλληλεπίδρασή της με μεταγραφικούς συμπαράγοντες, καθώς και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της. Στην ενότητα που ακολουθεί, περιγράφεται αναλυτικά η εξέταση όλων των παραπάνω υποθέσεων σχετικά με το μοριακό μηχανισμό ρύθμισης του HIF-2α μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2.

### **3.1.13 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΤΟΥ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.**

Για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας HIF-2 μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, εξετάστηκε αρχικά η επίδραση της αναστολής των ERK1/2, στη σταθερότητα του HIF-2α. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου είτε είχε ανασταλεί η διαδικασία της μετάφρασης είτε είχε καταργηθεί η υποξία και προσδιορίστηκε ο χρόνος ημιζωής του HIF-2α. Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν σε υποξία παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126 για 16 ώρες, και στη συνέχεια στην καλλιέργεια προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο (CHX) το οποίο αναστέλλει τη μετάφραση ή η καλλιέργεια συνεχίστηκε σε συνθήκες νορμοξίας για διάφορες χρονικές περιόδους (Εικόνες 58, 59).



**Εικόνα 58: Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 στο χρόνο ημιζωής του HIF-2α.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι των HIF-2α και της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε 21% O<sub>2</sub> (νορμοξία) και 1% O<sub>2</sub> (υποξία) παρουσία ή απουσία του αναστολέα U0126 (5 μM) για 16 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επώαση με κυκλοεξιμίδιο (CHX 10 μg/ml) για 15, 30 και 60 λεπτά.



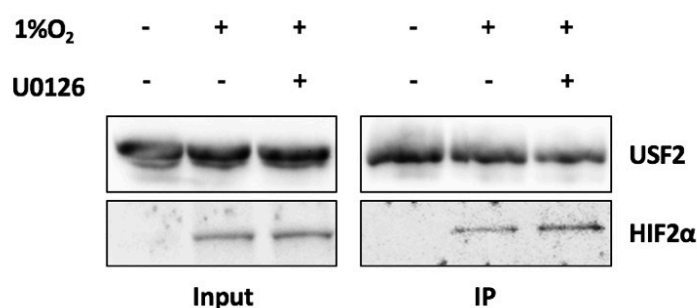
**Εικόνα 59: Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 στην πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι των HIF-2α και της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε 21% O<sub>2</sub> (νορμοξία) και 1% O<sub>2</sub> (υποξία) παρουσία ή απουσία του αναστολέα U0126 (5 μM) για 16 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επανοξυγόνωση (21% O<sub>2</sub>) για 5, 10 και 15 λεπτά.

Η πρωτεϊνική σταθερότητα του HIF-2α δεν μεταβλήθηκε παρουσία του U0126, καθώς τα επίπεδα έκφρασής του μειώθηκαν σταδιακά μέχρι που αποδομήθηκαν πλήρως και τελικά εξαφανίστηκαν ακριβώς όπως και τα επίπεδα του HIF-2α απουσία του U0126, τόσο μετά την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης όσο και μετά την επανοξυγόνωση. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση του HIF-2α από τις ERK1/2 δεν σχετίζεται με την πρωτεϊνική του σταθερότητα.

### 3.1.14 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΑ USF2.

Η επόμενη υπόθεση που ελέγχθηκε ήταν εάν η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με κάποιον από τους εξειδικευμένους και γνωστούς μεταγραφικούς του συμπαράγοντες. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι για τη βέλτιστη

έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF-2α, *EPO* και *PAI-1*, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον μεταγραφικό παράγοντα USF2 (Upstream Stimulatory Factor) (21, 116). Καθώς τα πειραματικά δεδομένα που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες δείχνουν ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών μειώνεται σημαντικά όταν καταργείται η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2, επιλέξαμε να μελετήσουμε αν η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με τον USF2 και κατά συνέπεια τη μεταγραφική του ενεργότητα. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει τον USF2 σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και στη συνέχεια επωάστηκαν σε νορμοξία και υποξία παρουσία ή μη του αναστολέα U0126 (Εικόνα 60).



**Εικόνα 60: Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον USF2.** Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του FLAG-USF2 και 24 ώρες μετά επωάστηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία και απουσία του ειδικού αναστολέα U0126 (5 μM) για 16 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση των FLAG-USF2 και HIF-2α.

Όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της γνωστής τους αλληλεπίδρασης, ο HIF-2α συγκατακρημνίστηκε με τον Flag-USF2 στην υποξία. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζεται παρουσία του αναστολέα U0126 στην υποξία, υποδηλώνοντας ότι οι ERK1/2 δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον USF2.

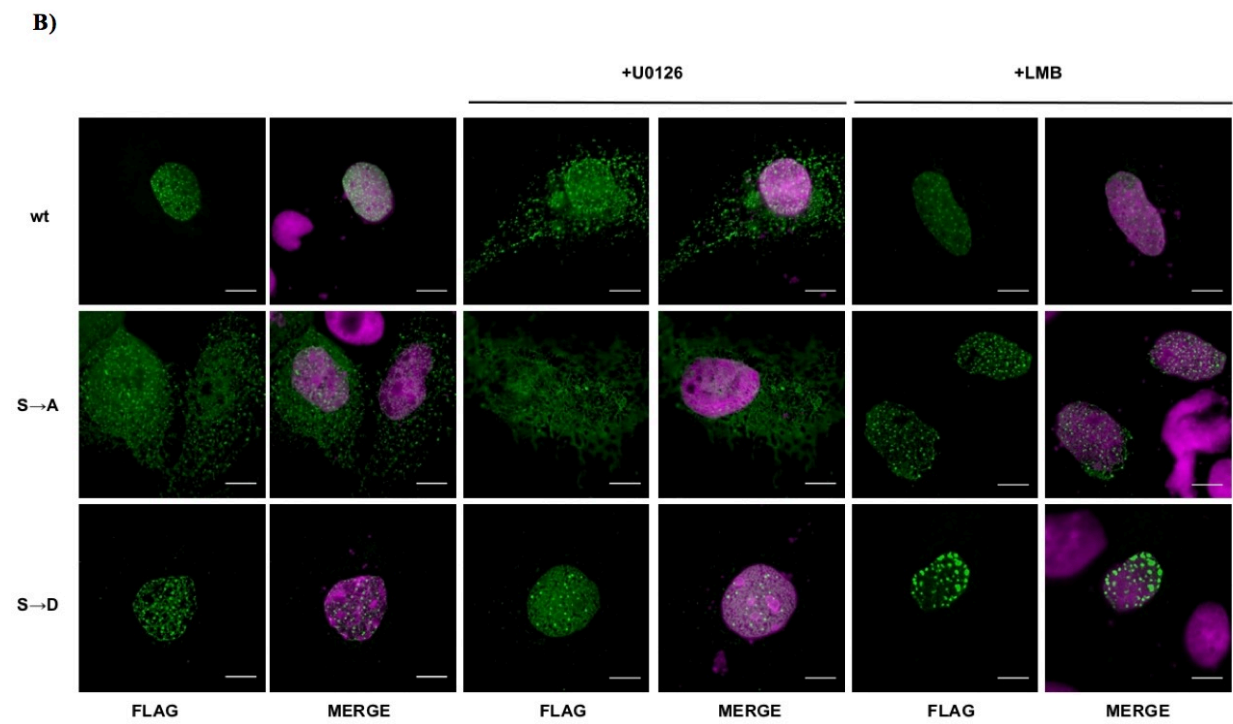
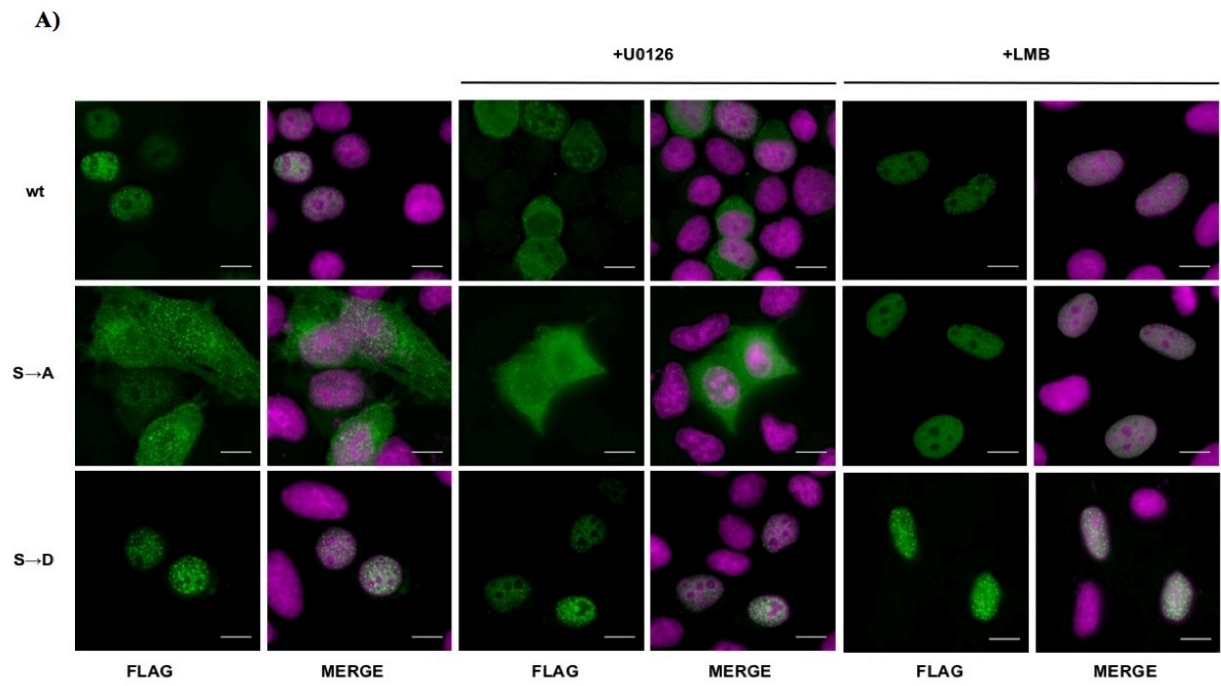
### 3.1.15 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ.

Για να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι η μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α οφείλεται σε μεταβολή του πυρηνικού εντοπισμού του, αναλύσαμε στη συνέχεια την υποκυτταρική του κατανομή.

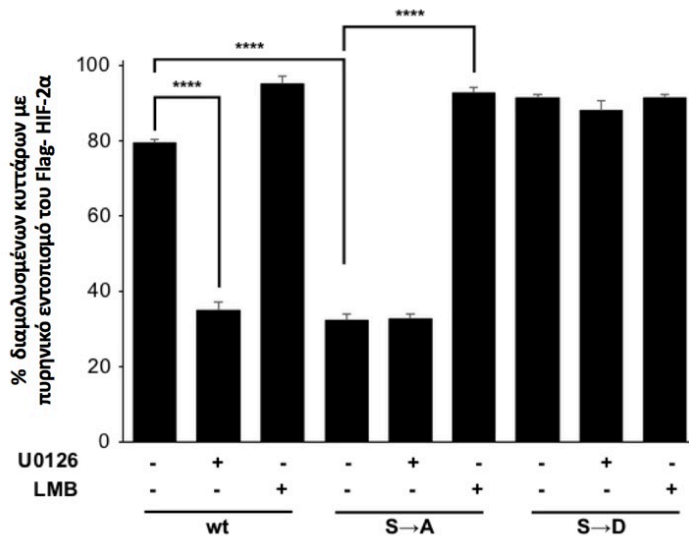
Ο αγρίου τύπου Flag-HIF-2α καθώς και οι μεταλλαγμένες μορφές του εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa ή Huh7 με παροδική διαμόλυνση και ο εντοπισμός τους ανιχνεύθηκε με



μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (**Εικόνα 61**). Ο άγριου τύπου Flag-HIF-2α ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα σε ποσοστό 80% των διαμολυσμένων κυττάρων ενώ εμφάνισε τόσο πυρηνικό όσο και κυτταροπλασματικό εντοπισμό σε ποσοστό 20% περίπου των κυττάρων (**Εικόνα 61**). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα της δράσης των ERK1/2 U0126, ο άγριου τύπου Flag-HIF-2α ανιχνεύθηκε στον πυρήνα σε ποσοστό 35% περίπου του κυτταρικού πληθυσμού που έχουν διαμολυνθεί, υποδηλώνοντας ότι η αναστολή των ERK1/2 επηρεάζει τη συσσώρευση του στον πυρήνα (**Εικόνα 61**). Ο εντοπισμός της S672A μορφής του HIF-2α που δεν φωσφορυλιώνεται, ήταν πυρηνικός σε περίπου 30% των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη, υποδεικνύοντας και πάλι ότι η έλλειψη τροποποίησης από τις ERK1/2 παρεμποδίζει τη συσσώρευση του HIF-2α στον πυρήνα. Το φωσφο-μιμητικό S672D Flag-HIF-2α μετάλλαγμα, φάνηκε να μιμείται την υποκυτταρική κατανομή του άγριου τύπου Flag-HIF-2α και ανιχνεύθηκε κατά κύριο λόγο στον πυρήνα σε ποσοστό 90% περίπου των διαμολυσμένων κυττάρων. Ο εντοπισμός του δεν άλλαξε μετά από επώαση με τον αναστολέα της δράσης των ERK1/2, U0126 (**Εικόνα 61**). Η αυξημένη ανίχνευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Flag-HIF-2αS672A ή της άγριου τύπου πρωτεΐνης Flag-HIF-2α παρουσία U0126 στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa και Huh7, θα μπορούσε να αποδοθεί είτε σε μειωμένο ρυθμό πυρηνικής εισαγωγής είτε σε αυξημένο ρυθμό πυρηνικής εξαγωγής. Για να διευκρινιστεί ποια από τις δύο αυτές υποθέσεις είναι έγκυρη, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επώαση με λεπτομυκίνη B (LMB), έναν ειδικό αναστολέα της εξπορτίνης CRM1. Η έκθεση σε LMB δεν επηρέασε τον εντοπισμό του άγριου τύπου HIF-2α ή του φωσφομιμητικού μεταλλάγματος, που παρέμειναν στον πυρήνα (**Εικόνα 61**). Ωστόσο, η θεραπεία με LMB προκάλεσε συσσώρευση της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α που στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης αποκλειστικά στον πυρήνα σε ποσοστό 90% των κυττάρων και κατήργησε τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του άγριου τύπου HIF-2α μετά από έκθεση στον U0126 (**Εικόνα 61**).



Γ)



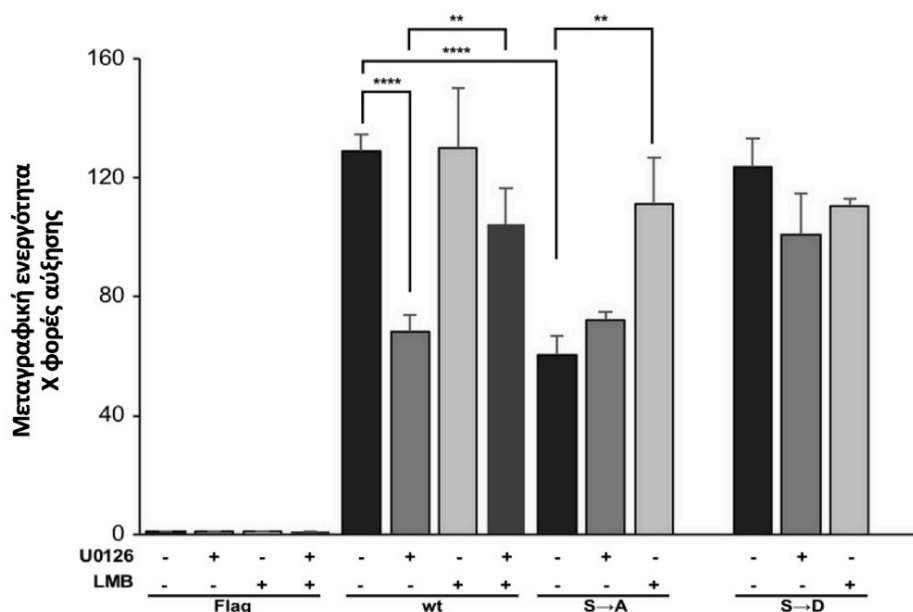
**Εικόνα 61: Υποκυτταρικός εντοπισμός του αγρίου τύπου Flag-HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών του S672A, και S672D υπό την επίδραση ή όχι του αναστολέα της δράσης των ERK1/2, U0126 και του αναστολέα της εξπορτίνης CRM1, LMB. Α), Β) Κύτταρα HeLa ή Huh7 αντίστοιχα, που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, pFLAG-HIF-2α-S672A και pFLAG-HIF-2α-S672D, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Για τη χρώση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε DAPI. Πριν τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επωάστηκαν με 5μM U0126 για 16 ώρες και 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες. Η κλίμακα των άσπρων μπαρών ισοδυναμεί με 10 μm. Γ) Υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων HeLa που παρουσιάζουν πυρηνικό εντοπισμό απουσία ή παρουσία U0126 και λεπτομυκίνης (LMB). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων όπου μετρήθηκαν περίπου 150 διαμολυσμένα κύτταρα ανά συνθήκη. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.**

Τα δεδομένα αυτά, υποδεικνύουν ότι ο HIF-2α μετακινείται διαρκώς μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από την εξπορτίνη CRM1 εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα, εξηγώντας έτσι την παρατηρούμενη μερική μείωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-2.

### 3.1.16 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΞΠΟΡΤΙΝΗΣ CRM1 ΜΕ ΛΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ Β (LMB).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η επανασυσσώρευση της S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α (στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2) στον πυρήνα μετά από αναστολή της CRM1 με LMB, θα μπορούσε επίσης να αποκαταστήσει τη χαμηλή μεταγραφική του δραστηριότητα. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, καθώς και

με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla και επώαστηκαν παρουσία ή όχι του ειδικού αναστολέα της CRM1 (LMB).



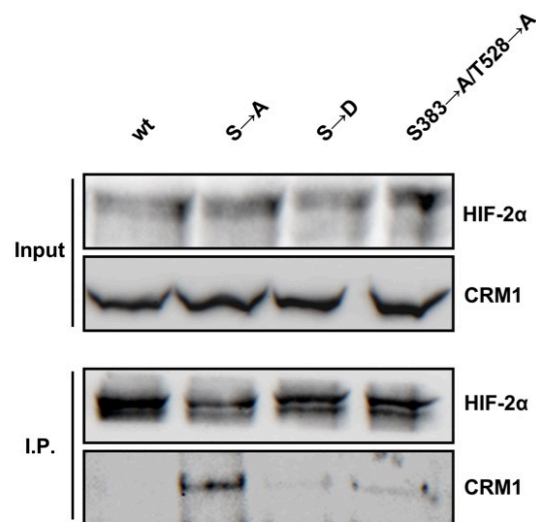
**Εικόνα 62:** Επίδραση του ειδικού αναστολέα της εξπορτίνης CRM1 λεπτομυκίνη B (LMB) στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, μετά από διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla. 4 ώρες πριν τη λύση τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml του ειδικού αναστολέα της εξπορτίνης CRM1 λεπτομυκίνη B (LMB). Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*) P<0,001).

Πράγματι, ενώ η μεταγραφική ενεργότητα του αγρίου τύπου HIF-2α ή του φωσφο-μιμητικού μεταλλάγματος δεν επηρεάστηκε από την επώαση με LMB, η δραστηριότητα της S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α αποκαταστάθηκε και έφθασε σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά της δραστηριότητας του άγριου τύπου HIF-2α (**Εικόνα 62**).

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πρωταρχική αιτία της μερικής απενεργοποίησης της μεταγραφικής δράσης του HIF-2 με μεταλλάξεις που καταργούν της φωσφορυλίωση της HIF-2α υπομονάδας από τις ERK1/2, είναι ο αυξημένος ρυθμός εξαγωγής του HIF-2α από τον πυρήνα.

### 3.1.17 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΠΟΡΤΙΝΗ CRM1.

Έχοντας δείξει με πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από την εξπορτίνη CRM1 εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα, θέλαμε να ελέγξουμε αν η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με την CRM1. Δεδομένου ότι και η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την κινάση CK1δ εμποδίζει την διαμεσολαβούμενη από τη CRM1 πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α (86) θέλαμε να δούμε αν και η φωσφορυλίωση από τη CK1δ επηρεάζει τη δημιουργία του συμπλόκου HIF-2α/CRM1. Για το λόγο αυτό, ο αγρίου τύπου Flag-HIF-2α και οι μεταλλαγμένες μορφές του που είτε δεν φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 (HIF-2αS672A), είτε μιμούνται το φορτίο της φωσφορυλίωσης (Flag-HIF-2α S672D), είτε δεν φωσφορυλιώνονται από τη CK1δ (Flag-HIF-2αS383A/T528A), εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa με παροδική διαμόλυνση και ακολούθως υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου Flag. Η ανάλυση των ανοσοκατακρημισμένων πρωτεϊνών αποκάλυψε μια ισχυρή αλληλεπίδραση της ενδογενούς CRM1 με τη μεταλλαγμένη S672A μορφή του HIF-2α που δεν διατηρεί την ικανότητα φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Εικόνα 63). Αντιθέτως, η CRM1 δεν ανιχνεύεται στα ανοσοκατακρημίσματα των άγριου τύπου HIF-2α, της φωσφομιμητικής S672D μορφής του HIF-2α και της S383A/T528A μορφής που δεν φωσφορυλιώνεται από τη CK1δ (Εικόνα 63).



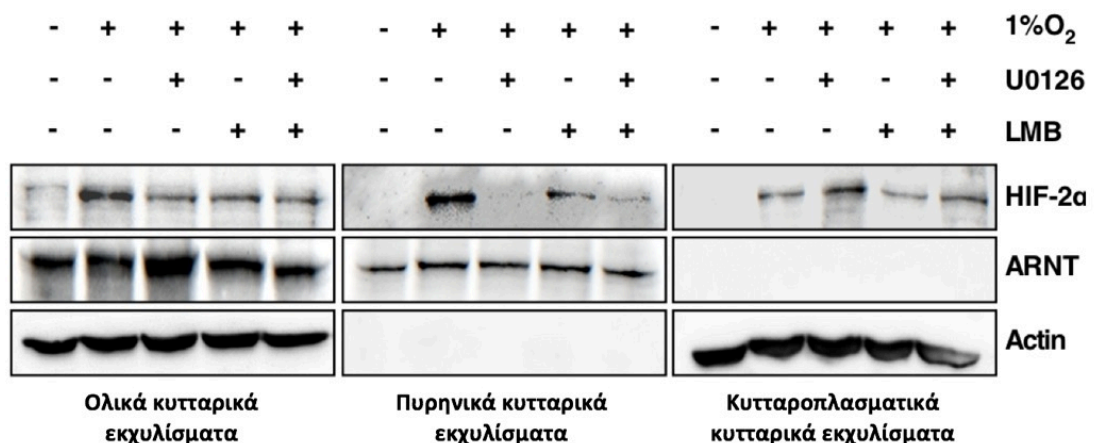
**Εικόνα 63: Επίδραση της αναστολής της ενζυμικής δράσης των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του αγρίου τύπου FLAG-HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών του που είτε καταργούν τη φωσφορυλίωσή του από τις ERK1/2 S672A FLAG-HIF-2α είτε μιμούνται το φορτίο της S672D FLAG-HIF-2α. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα ολικά

κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση των CRM1 και HIF-2α.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης 672 καταργεί την αλληλεπίδραση του HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1, παρεμποδίζοντας έτσι την έξοδό του από τον πυρήνα. Επίσης, φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τη CK1δ ρυθμίζει την διαμεσολαβούμενη από τη CRM1 πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α με τρόπο που δεν περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM1.

### 3.1.18 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΤΩΝ ERK1/2 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HIF-2α.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, αξιολογήθηκε η επίδραση της αναστολής της δράσης των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. Η αναστολή της οδού των ERK1/2 πραγματοποιήθηκε με επώαση κυττάρων HeLa με U0126, τα οποία στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία του αναστολέα της εξπορτίνης CRM1, λεπτομυκίνη B (LMB). Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α παρακολούθηθηκε με τη μέθοδο της βιοχημικής κυτταρικής κλασμάτωσης (Εικόνα 64). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο HIF-2α εντοπίστηκε κυρίως στο πυρηνικό κλάσμα σε υποξία ανεξάρτητα από την έκθεσή του σε LMB. Εν τούτοις, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αφορούν στον εντοπισμό της υπερεκφρασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης S672A Flag-HIF-2α, μετά την αναστολή της δράσης των ERK1/2 με U0126, ο ενδογενής HIF-2α σχεδόν απουσίαζε από το πυρηνικό κλάσμα, εμπλουτίστηκε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα και μετά από επώαση με LMB ανιχνεύτηκε ξανά στο πυρηνικό κλάσμα.

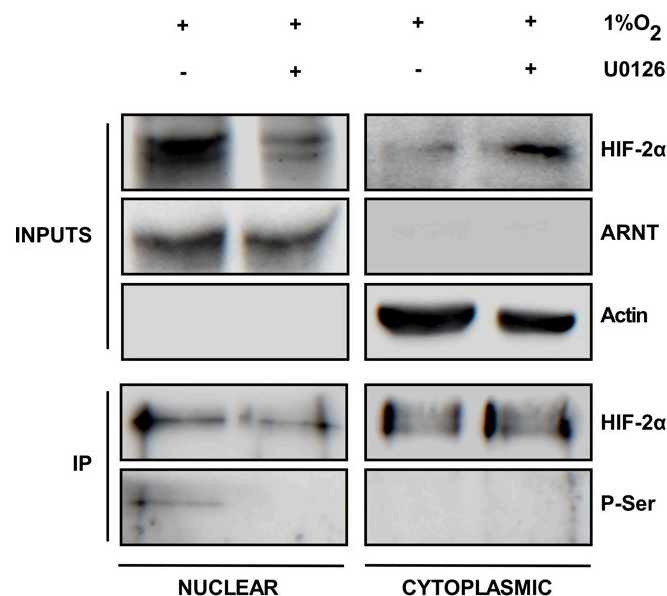


Εικόνα 64: Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-2α. Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι των HIF-2α, ARNT και ακτίνης ολικών, πυρηνικών και

κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa που επώαστηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία U0126 (5μM) για 16 ώρες. Πριν τη λύση, τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml λεπτομυκίνης (LMB) για 4 ώρες.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μειωμένη δράση των ERK1/2 προωθεί την εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα, ενώ η αναστολή της εξπορτίνης CRM1 με LMB επαναφέρει τη συσσώρευση του HIF-2α μέσα στον πυρήνα. Επαληθεύεται έτσι ένας κατευθυνόμενος από τη CRM1 μηχανισμός εξόδου του HIF-2α από τον πυρήνα που ελέγχεται από τη φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2.

Έχοντας δείξει ότι ο ενδογενής HIF-2α σε υποξία όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ανενεργό μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, θέλαμε να ελέγξουμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-2α στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα σε συνθήκες υποξίας και μετά από την αναστολή της οδού των ERK1/2. Έτσι, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με U0126 (5μM) και καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε βιοχημική κλασμάτωση και πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α. Η φωσφορυλίωση του HIF-2α ανιχνεύθηκε με αντίσωμα έναντι της φωσφο-σερίνης στα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά ανοσοκατακρημνίσματα (**Εικόνα 65**). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο HIF-2α σε υποξία εντοπίστηκε κυρίως στο πυρηνικό κλάσμα. Παρουσία του U0126, ο ενδογενής HIF-2α σχεδόν απουσίαζε από το πυρηνικό κλάσμα, και εμπλουτίστηκε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα. Η ανίχνευση της φωσφο-σερίνης του ανοσοκατακρημνισμένου HIF-2α είτε από το πυρηνικό είτε από το κυτταροπλασματικό κλάσμα, έδειξε ότι ο HIF-2α είναι φωσφορυλιωμένος σε υποξία, όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ενεργό και ο HIF-2α εντοπίζεται στον πυρήνα.

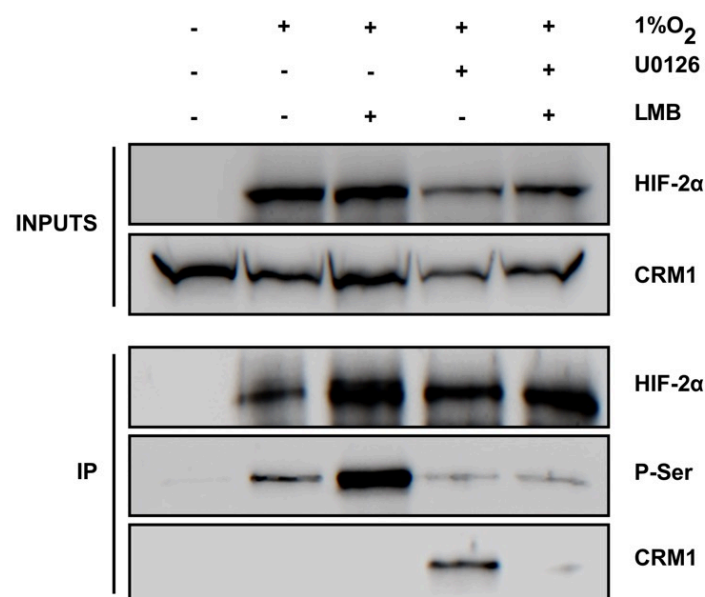




**Εικόνα 65: Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενδογενούς HIF-2α.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι των HIF-2α, ARNT και ακτίνης πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa που επώαστηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία U0126 (5μM) για 16 ώρες και με αντισώματα έναντι του HIF-2α και της φωσφο-σερίνης του ανοσοκατακρημνισμένου HIF-2α από πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κλάσματα.

### 3.1.19 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΤΩΝ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ HIF-2α ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΠΟΡΤΙΝΗ CRM1.

Για να αξιολογήσουμε την επίδραση της αναστολής της δράσης των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με U0126 και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία του αναστολέα της εξπορτίνης CRM1, λεπτομυκίνη B (LMB). Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α. Η ανάλυση των ανοσοκατακρημνισμάτων έδειξε ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 σε υποξία προκαλεί την αποφωσφορυλίωση του HIF-2α και ευνοεί την ισχυρή αλληλεπίδρασή του με την CRM1. Αντίθετα, όταν η οδός των ERK1/2 είναι ενεργή σε υποξία, ο HIF-2α είναι φωσφορυλιωμένος και η αλληλεπίδρασή του με τη CRM1 είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη. Η επώαση των κυττάρων με LMB καταργεί την αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-2α με τη CRM1 σε υποξία ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 και την κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-2α.



**Εικόνα 66: Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1.** Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α.



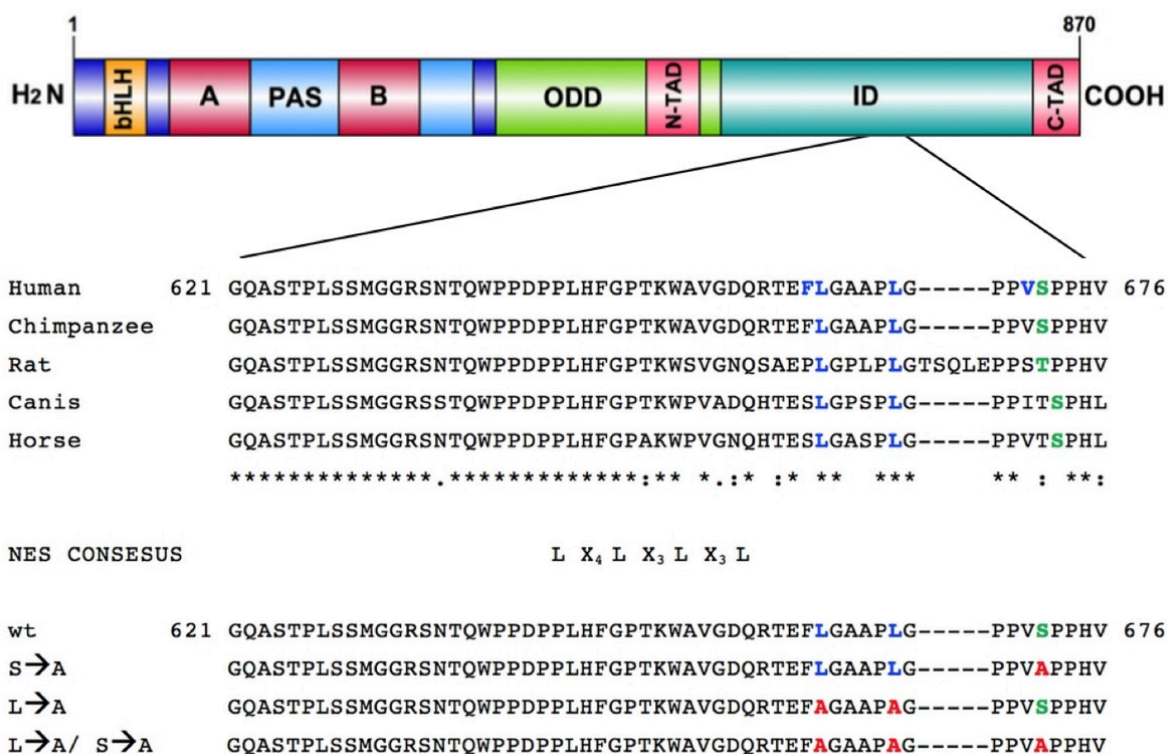
Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία U0126 (5μM) για 16 ώρες. 4 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων, επώαστηκαν με τον αναστολέα της εξπορτίνης CRM1, λεπτομυκίνη B (LMB). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση των HIF-2α, CRM1 και της φωσφο-σερίνης.

Τα δεδομένα αυτά, επιβεβαιώνουν περαιτέρω την υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 καταργεί την αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1 εμποδίζοντας κατά συνέπεια τη έξοδό του από τον πυρήνα (**Εικόνα 66**).

### **3.1.20 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΕΞΑΓΩΓΗΣ ΠΑΡΑΚΕΙΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.**

Για να είναι εφικτή η μεταφορά μιας πρωτεΐνης περίπου μεγαλύτερης των 40kDa από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, είναι απαραίτητη η αναγνώρισή της από την εξπορτίνη CRM1. Η αναγνώρισή της προϋποθέτει την ύπαρξη μιας ή περισσότερων πρωτεϊνικών αλληλουχιών πλούσιες σε λευκίνη οι οποίες ονομάζονται σήματα πυρηνικής εξαγωγής (Nuclear Export Signals, NES). Τα μέχρι τώρα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι όταν ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 στη σερίνη 672, καταργείται η αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1, εμποδίζεται η εξαγωγή του από τον πυρήνα και ο HIF-2α συσσωρεύεται στον πυρήνα και σε σύμπλοκο με τον ARNT, ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων του. Επομένως ο HIF-2α που είναι μια πρωτεΐνη που υπερβαίνει κατά πολύ σε μέγεθος τα 50 kDa, για να εξέλθει από τον πυρήνα θα πρέπει να έχει στην πρωτεϊνική αλληλουχία του ένα ή περισσότερα NES, τα οποία ωστόσο δεν είναι ακόμη χαρακτηρισμένα.

Για να διερευνηθεί η υπόθεση ότι ο HIF-2α περιέχει κάποιο σήμα πυρηνικής εξαγωγής που ρυθμίζεται από τη δράση των ERK1/2, εξετάσαμε την αμινοξική αλληλουχία που γειτνιάζει με τη σερίνη 672. Αναζητήσαμε στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 620 και 680 πιθανά πεπτίδια τα οποία πληρούν το κλασικό μοτίβο αναγνώρισης από τη CRM1, Φ-X<sub>2-3</sub>-Φ-X<sub>2-3</sub>-Φ-X-Φ ( όπου Φ = L, I, V, F, M και X οποιοδήποτε αμινοξύ). Η ανάλυση ανέδειξε την παρουσία υδρόφοβων καταλοίπων που παρότι δεν ταιριάζουν απόλυτα με το μοτίβο, θα μπορούσαν να εξυπηρετούν στην αναγνώριση του HIF-2α από την CRM1 (**Εικόνα 67**). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας 620-680 μεταξύ των ομολόγων του HIF-2α σε διάφορα σπονδυλωτά, που αποκάλυψε ότι τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται σε συντηρημένη θέση (**Εικόνα 67**).



**Εικόνα 67:** Πολλαπλή ομοπαράθεση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας 620-680 του HIF-2α μεταξύ διάφορων ανώτερων οργανισμών. Οι λευκίνες 662 και 667 είναι συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στην εικόνα αναπαρίστανται επίσης η μετατροπή της λευκίνης 662 και της λευκίνης 667 σε αλανίνη με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης.

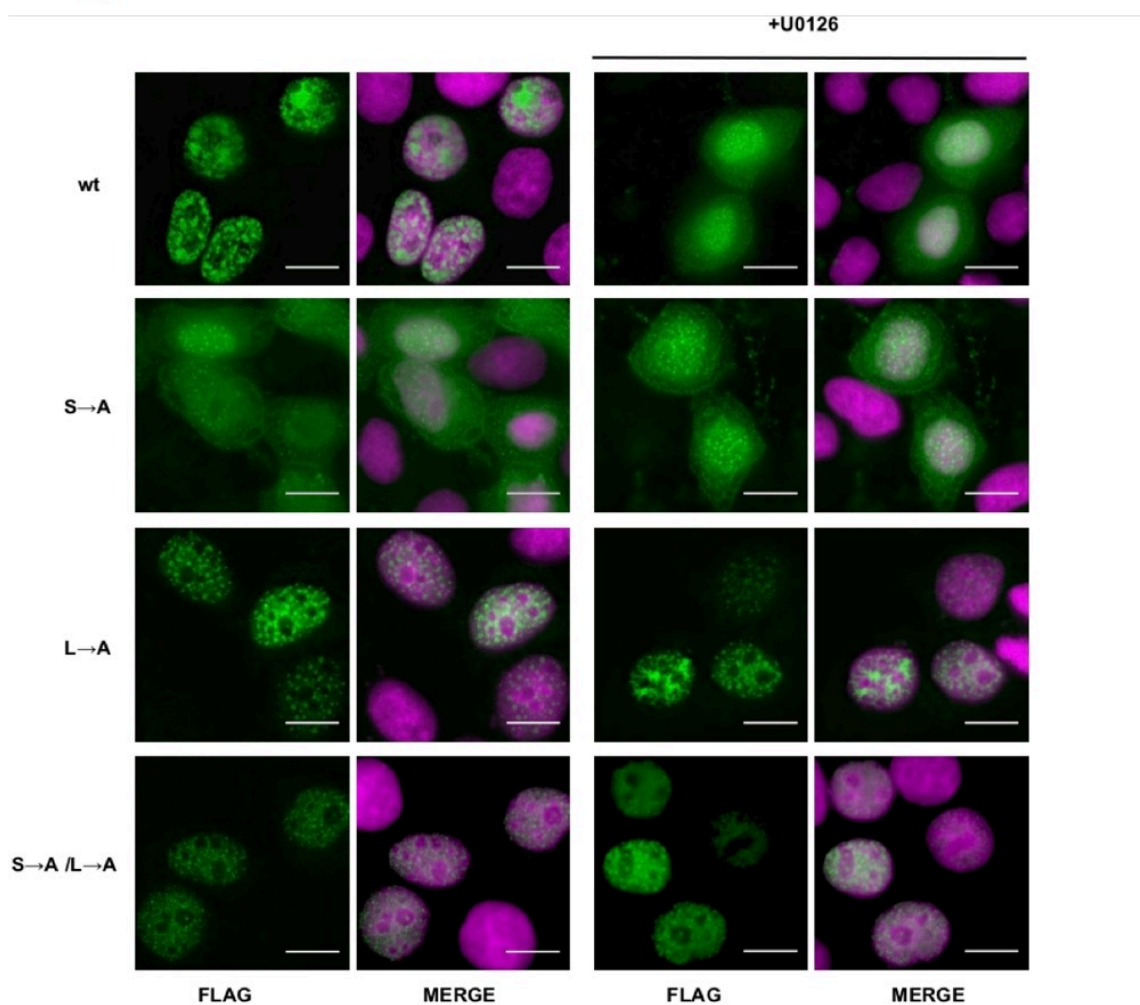
### 3.1.21 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-2α L662/ 677A ΚΑΙ HIF-2A L662A/ L677A/ S672A .

Για να μελετηθεί η λειτουργία αυτής της αλληλουχίας και η πιθανή εξάρτησή της από τη φωσφορυλίωση, κατασκευάσαμε τις μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α, HIF-2α L662A/ L667A (τροποποιημένα κατάλοιπα λευκίνης 662 και 667 σε αλανίνες) και HIF-2α L662A / L667A / S672A (τροποποιημένα κατάλοιπα λευκίνης 662 και 667 και το κατάλοιπο σερίνης 672 σε αλανίνες), με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης (Εικόνα 67). Ο αγρίου τύπου HIF-2α και όλες οι μεταλλαγμένες μορφές του κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης θηλαστικών pFLAG-CMV2 και εκφράστηκαν ως πρωτεΐνες με επίτοπο Flag σε κύτταρα Huh7 και HeLa με παροδική επιμόλυνση.

### **3.1.22 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΛΕΥΚΙΝΗ 662 ΚΑΙ ΛΕΥΚΙΝΗ 667 ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟ Υ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ.**

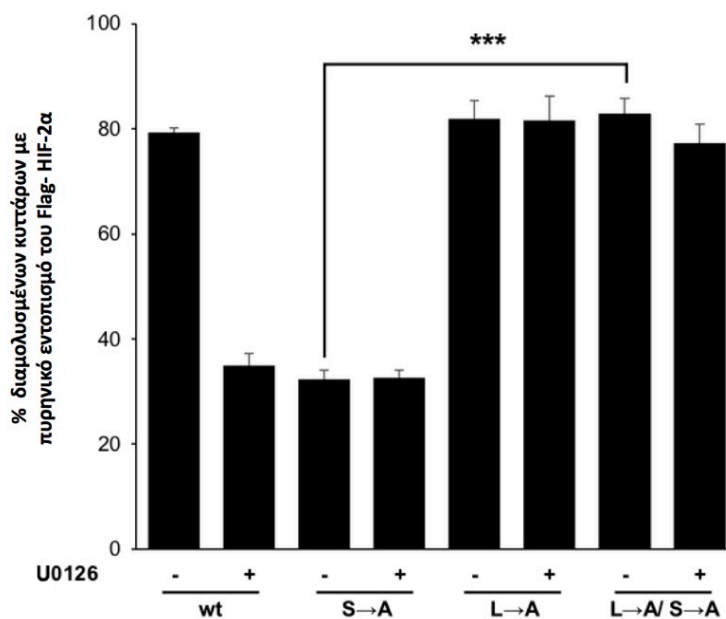
Για να ελέγξουμε την υπόθεση ότι τα υδρόφοβα κατάλοιπα λευκίνη 662 και λευκίνη 667 μπορεί να αποτελούν μέρος ενός σήματος πυρηνικής εξαγωγής, ο αγρίου τύπου Flag-HIF-2α καθώς και οι μεταλλαγμένες μορφές του εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa με παροδική διαμόλυνση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους ανιχνεύθηκε με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (Εικόνες 68). Όπως ήταν αναμενόμενο, η πρωτεΐνη του αγρίου τύπου Flag-HIF-2α παρουσίασε αποκλειστικά πυρηνική κατανομή σε περίπου 80% των διαμολυσμένων κυττάρων και εμφάνισε τόσο πυρηνικό όσο και κυτταροπλασματικό εντοπισμό στον υπόλοιπο κυτταρικό πληθυσμό (Εικόνα 68). Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με U0126, ο αγρίου τύπου ανιχνεύθηκε στον πυρήνα σε περίπου 35% του κυτταρικού πληθυσμού. Ο εντοπισμός της S672A Flag-HIF-2α μεταλλαγμένης μορφής που δεν φωσφορυλιώνεται, ήταν πυρηνικός σε περίπου 30% του κυτταρικού πληθυσμού, γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματική εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Εικόνα 68). Η ταυτόχρονη μετάλλαξη της πιθανής αλληλουχίας NES και της θέσης φωσφορυλίωσης στη μορφή L662A / L667A / S672A Flag-HIF-2α, έδειξε ότι η μορφή αυτή συσσωρεύεται στον πυρήνα σε σχεδόν 80% των διαμολυσμένων κυττάρων, παρά την απουσία της θέσης φωσφορυλίωσης, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα κατάλοιπα L662A και L667A απαιτούνται για την αποτελεσματική εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα. Τέλος, η κατάργηση της πιθανής αλληλουχίας NES στη μεταλλαγμένη μορφή L662A / L667A Flag-HIF-2α διατήρησε, όπως αναμενόταν, τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης στο 80% των διαμολυσμένων κυττάρων (Εικόνα .). Είναι σημαντικό ότι και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α που φέρουν τις μεταλλάξεις λευκίνης σε αλανίνη δεν παρουσίασαν ευαισθησία στον U0126 (Εικόνα 68).

A)



**Εικόνα 68:** Υποκυτταρικός εντοπισμός του αγρίου τύπου **Flag-HIF-2α** και των μεταλλαγμένων μορφών του **L662A/ L667A**, και **L662A/ L667A/ S672A** υπό την επίδραση ή όχι του αναστολέα της δράσης των **ERK1/2**, **U0126**. Α) Κύτταρα HeLa, που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των **pFLAG-HIF-2α-WT** και των μεταλλαγμένων μορφών του **HIF-2α**, **pFLAG-HIF-2α-L662/L667A** και **pFLAG-HIF-2α- L662/L667A/ S672A**, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου **FLAG**. Για τη χρώση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε **DAPI**. Πριν τη μονιμοποίηση τα κύτταρα επώαστηκαν με **5μM U0126** για 16 ώρες. Η κλίμακα (μπάρα κάτω δεξιά) ισοδυναμεί με **10 μm**.

**B)**



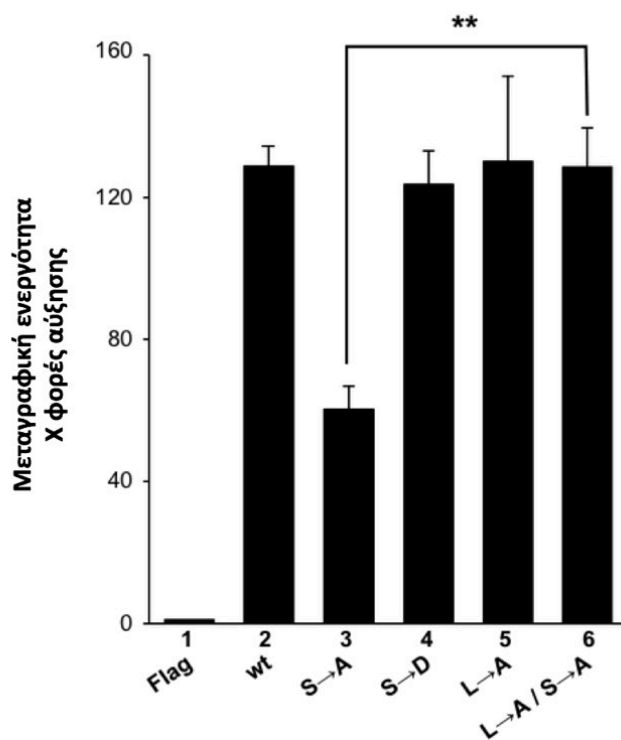
**Εικόνα 68:** Υποκυτταρικός εντοπισμός του αγρίου τύπου Flag-HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών του L662A/ L667A, και L662A/ L667A/ S672A υπό την επίδραση ή όχι του αναστολέα της δράσης των ERK1/2, U0126. **B)** Υπολογισμός του ποσοστού των κυττάρων HeLa που παρουσιάζουν πυρηνικό εντοπισμό απουσία ή παρουσία U0126. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων όπου μετρήθηκαν περίπου 150 διαμολυσμένα κύτταρα ανά συνθήκη. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα.

Τα δεδομένα αυτά, υποδεικνύουν ότι η συντηρημένη υδροφοβή αλληλουχία που συνορεύει με τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 συμπεριφέρεται ως λειτουργικό NES, μόνο όταν η γειτονική θέση της σερίνης 672 δεν τροποποιείται.

### **3.1.23 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΛΕΥΚΙΝΗ 662 ΚΑΙ ΛΕΥΚΙΝΗ 667 ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ**

Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η συσσώρευση της L662A/L667A/S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α που στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης στον πυρήνα, συνοδεύεται από την αποκατάσταση της χαμηλής μεταγραφικής ενεργότητας του μη φωσφορυλιωμένου μεταλλάγματος. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, καθώς και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla και επώαστηκαν παρουσία ή όχι του ειδικού αναστολέα της οδού των ERK1/2, U0126. Πράγματι, ενώ η μεταγραφική ενεργότητα του S672A μεταλλάγματος ήταν 50% χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη του αγρίου τύπου και της φωσφο-μιμητικού S672D HIF-2α μορφών (**Εικόνα 69**), η δραστηκότητα

της μεταλλαγμένης μορφής L662A/L667A/S672A HIF-2α έφτανε σε συγκρίσιμα επίπεδα με τη μεταγραφική ενεργότητα των αγρίου τύπου και S672D μορφών του HIF-2α (Εικόνα 69). Τέλος, η κατάργηση της πιθανής αλληλουχίας NES στη μορφή L662A/L667A διατήρησε, όπως αναμενόταν, τη μεταγραφική ενεργότητα σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του αγρίου τύπου HIF-2α ακόμη και όταν το μονοπάτι των ERK1/2 ήταν ανενεργό (Εικόνα 69).



**Εικόνα 69:** Επίδραση του ειδικού αναστολέα της εξαπορτίνης CRM1 λεπτομυκίνη Β (LMB) στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2, μετά από διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-CMV2, pFLAG-HIF-2α-WT και των μεταλλαγμένων μορφών του. Τα κύτταρα διαμολύθηκαν επίσης με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla. 4 ώρες πριν τη λύση τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 ng/ml του ειδικού αναστολέα της εξαπορτίνης CRM1 λεπτομυκίνη Β (LMB). Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

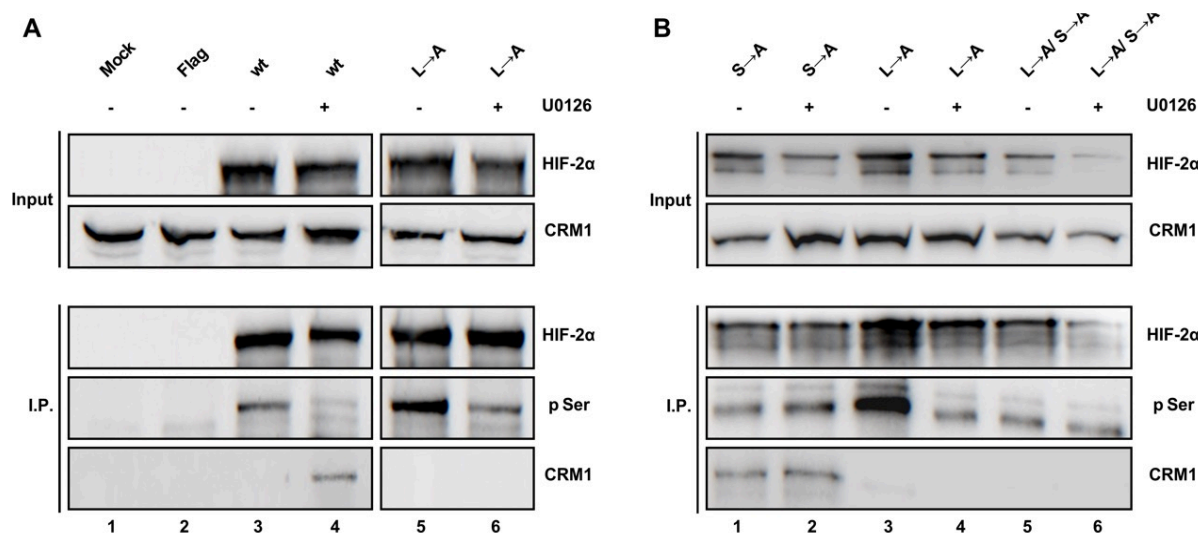
Τα δεδομένα αυτά, υποδεικνύουν ότι η βασική αιτία της μεταγραφικής απενεργοποίησης του HIF-2, όταν η HIF-2α υπομονάδα του στερείται της ικανότητας φωσφορυλίωσης, είναι ο εκτεταμένος αποκλεισμός του HIF-2α από τον πυρήνα λόγω μιας εκτεθειμένης αλληλουχίας που συμπεριφέρεται ως NES.

### 3.1.24 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΛΕΥΚΙΝΗ 662 ΚΑΙ ΛΕΥΚΙΝΗ 667 ΤΟΥ HIF-2α ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΠΟΡΤΙΝΗ CRM1.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο η κατάργηση των λευκινών 662 και 667 που συνορεύουν με τη θέση φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή του με τη CRM1, ο αγρίου τύπου Flag-HIF-2α και οι μεταλλαγμένες μορφές του εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa με παροδική διαμόλυνση παρουσία ή απουσία του U0126 και ακολούθως υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου Flag. Παρότι φαίνεται να ανοσοκατακρημνίστηκαν ίσες ποσότητες των διάφορων μορφών Flag-HIF-2α, η αναστολή της οδού των ERK1/2 και οι μεταλλάξεις του HIF-2α επηρέασαν σημαντικά τόσο την κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-2α όσο και την σύνδεσή του με τη CRM1 (**Εικόνα 70A, 70B**). Ειδικότερα, η επώαση με U0126 μείωσε σημαντικά τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης σε όλες τις μορφές του HIF-2α, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση που μεσολαβείται από τις ERK1/2 αποτελεί μια μείζονος σημασία μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-2α (**Εικόνα 70A** pSer, διαδρομές 3 έως 4 και 5 έως 6). Όταν ο αγρίου τύπου HIF-2α δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, συνδέεται ισχυρά με την ενδογενή CRM1 (**Εικόνα 70A**, διαδρομή 4). Αντιθέτως, φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 καθώς και μεταλλάξεις στις γειτονικές λευκίνες L662A / L667A, καταργούν την δέσμευση του HIF-2α στη CRM1 (**Εικόνα 70**).

Ειδικότερα, η κατάργηση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α, είτε με αναστολή του μονοπατιού των ERK1/2 με U0126 (**Εικόνα 70A** διαδρομές 4 και 6 συγκριτικά με τις διαδρομές 3 και 5, και **70B** διαδρομή 4 συγκριτικά με τη διαδρομή 3), είτε με μεταλλάξεις που καταργούν τη φωσφορυλίωση (**Εικόνα 70B** διαδρομές 1,2 και 5 συγκριτικά με τη διαδρομή 3), μειώνει σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του HIF-2α επιβεβαιώνοντας για άλλη μια φορά ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 αντιπροσωπεύει μια κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-2α. Το γεγονός ότι η επώαση των κυττάρων με U0126 δεν μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α που καταργεί τη φωσφορυλίωση S672A (**Εικόνα 70B** διαδρομή 1 συγκριτικά με τη διαδρομή 2 και διαδρομή 5 συγκριτικά με τη διαδρομή 6) αποδεικνύει in vivo ότι η σερίνη 672 είναι η κύρια και ίσως η μοναδική θέση στόχευσης των ERK1/2. Η CRM1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον HIF-2α όταν δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, είτε λόγω αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 με U0126 (**Εικόνα 70A** διαδρομή 4), είτε λόγω μετάλλαξης που καταργεί τη φωσφορυλίωση της σερίνης 672 (**Εικόνα 70B** διαδρομές 1 και 2). Αντίθετα, η CRM1 δεν

αλληλεπιδρά με τις μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α που καταργούν τα κατάλοιπα λευκίνης L662 και L667 (**Εικόνα 70A** διαδρομή 5, B διαδρομή 3) ακόμη και κάτω από συνθήκες που δεν επιτρέπουν τη φωσφορυλίωση (**Εικόνα 70A** διαδρομή 6, B διαδρομές 4, 5, 6).



**Εικόνα 70: Επίδραση της κατάργησης των υδροφобων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στην αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του αγρίου τύπου FLAG-HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, pFLAG-HIF-2α-S672A, pFLAG-HIF-2α-L662/L667A και pFLAG-HIF-2α-L662/L667A/S672A και επώαστηκαν σε νορμοξία παρουσία ή απουσία του αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2 U0126 (5μM) για 16 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση των CRM1 και HIF-2α.

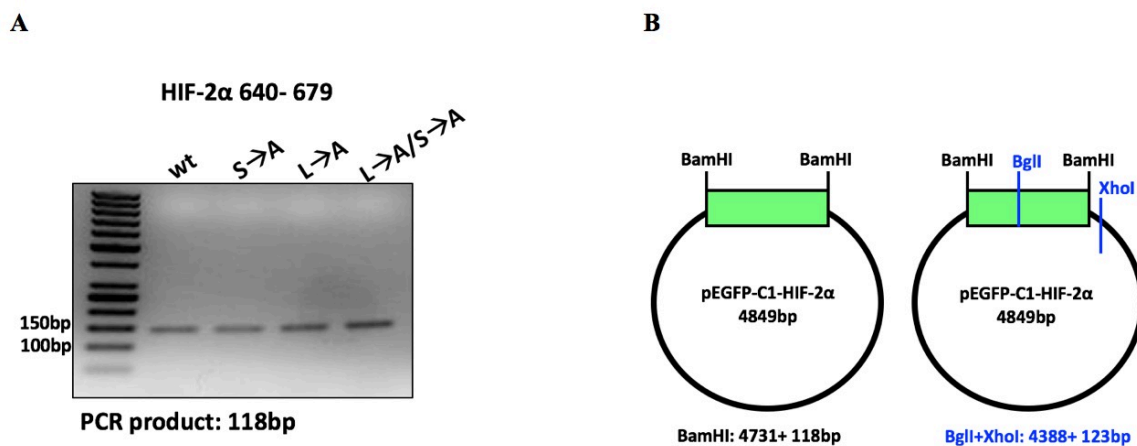
Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα κατάλοιπα λευκίνης L662A και L667A είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1 και μας οδήγησαν στον πιθανό εντοπισμό ενός λειτουργικού NES στον HIF-2α, που είναι ευαίσθητο στη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2.

### 3.1.25 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΛΕΥΚΙΝΗ 662 ΚΑΙ ΛΕΥΚΙΝΗ 667 ΤΟΥ HIF-2Α ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ 640- 679 ΤΟΥ HIF-2α.

Από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι όταν η HIF-2α υπομονάδα δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 στη σερίνη 672, ο HIF-2 στερείται την πλήρη μεταγραφική του ικανότητα λόγω του αποκλεισμού του από τον πυρήνα καθώς γειτονικά της σερίνης 672 βρίσκεται εκτεθειμένη μια αλληλουχία υδροφобων αμινοξέων που είναι αναγκαία για την

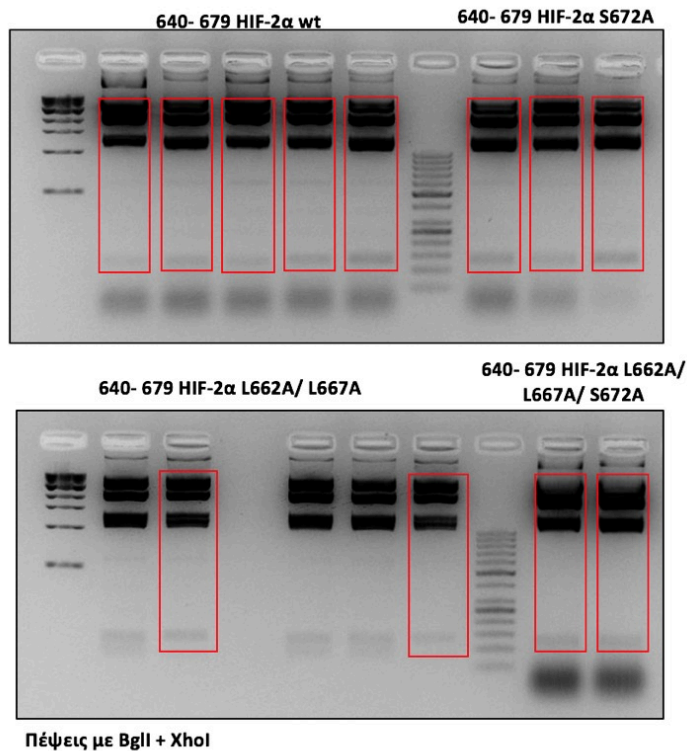
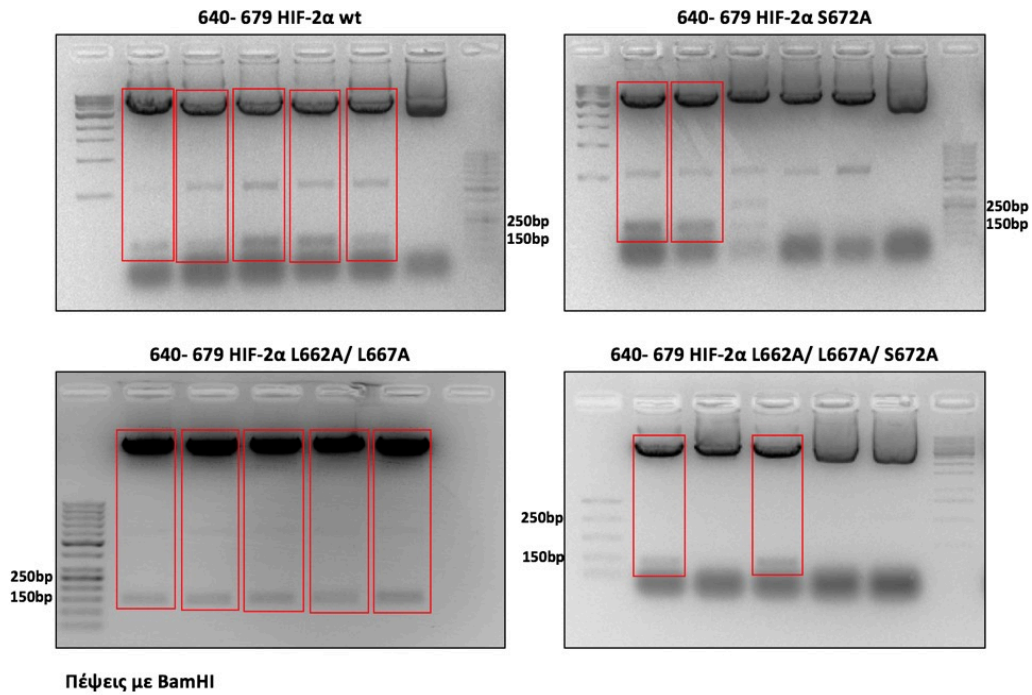


αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α με την CRM1. Προκειμένου να ελέγξουμε εάν η αλληλουχία αυτή των υδρόφοβων αμινοξέων είναι και επαρκής ώστε να αποτελεί ένα λειτουργικό NES του HIF-2α, το τμήμα 640-679 αγρίου τύπου του HIF-2α καθώς και τα μεταλλάγματα S672A-HIF-2α, L662A/L667A-HIF-2α και S672A/L662A/L667A-HIF-2α ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 71) και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα p-EGFP-C1 (Εικόνα 71) για την έκφρασή τους σε κύτταρα θηλαστικών σε σύντηξη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP.



**Εικόνα 71:** Κλωνοποίηση του τμήματος GFP-HIF-2α 640-679 αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών του S672A-HIF-2α, L662A/L667A-HIF-2α και S672A/L662A/L667A-HIF-2α στον πλασμιδιακό φορέα p-EGFP-C1. **A)** Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών cDNA που κωδικοποιούν το τμήμα 640-679 του αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών του S672A-HIF-2α, L662A/L667A-HIF-2α και S672A/L662A/L667A-HIF-2α. **B)** Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων με τις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών και των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού.

Γ

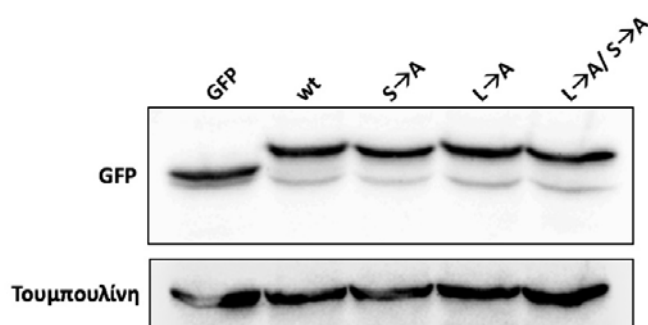


**Εικόνα 71:** Κλωνοποίηση του τμήματος GFP-HIF-2α 640-679 αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών του S672A-HIF-2α, L662A/L667A-HIF-2α και S672A/L662A/L667A-HIF-2α στον πλασμιδιακό φορέα p-EGFP-C1. Γ) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από πέψη των πλασμιδίων p-EGFP-C1-HIF-2α 640-679 αγρίου τύπου, p-EGFP-C1-S672A-HIF-2α 640-679 p-EGFP-C1-

L662A/ L667A-HIF-2 $\alpha$  640-679 p-EGFP-C1-L662A/ L667A/ S672A-HIF-2 $\alpha$  640-679 με τα ενδεικνυόμενα ένζυμα περιορισμού.

### 3.1.26 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ 640- 679 ΤΟΥ HIF-2 $\alpha$ .

Για να διερευνηθεί η πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της επικράτειας 640-679 του HIF-2 $\alpha$ , που είτε στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, είτε στερείται τα υδρόφοβα αμινοξέα L662 και L667 που πιθανώς αποτελούν μέρος μιας λειτουργικής αλληλουχίας NES, είτε και τα δυο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa sp, με πλασμίδια που εκφράζουν τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2 $\alpha$  σε σύντηξη με τη φορορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση Western blot έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης των μεταλλαγμένων μορφών ήταν παρόμοια με εκείνα του αγρίου τύπου HIF-2 $\alpha$ . (Εικόνα 72).

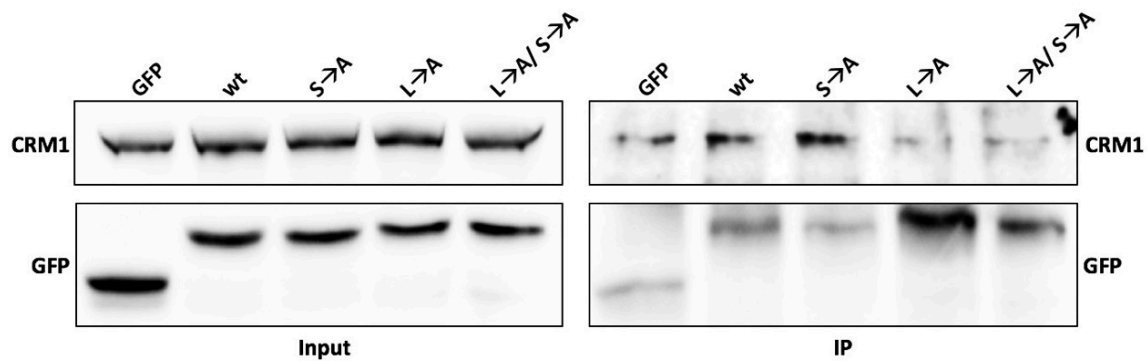


**Εικόνα 72:** Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2 $\alpha$ . Ανοσοαποτύπωση με ορό έναντι της GFP και αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa sp που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pEGFP-C1, του pEGFP-C1-640-679 HIF-2 $\alpha$  αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών του. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της GFP είναι 27kDa, ενώ των 640-679 HIF-2 $\alpha$  τμημάτων σε σύντηξη με την GFP είναι περίπου 31kDa.

### 3.1.27 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ 640- 679 ΤΟΥ HIF-2 $\alpha$ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΠΟΡΤΙΝΗ CRM1.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο η αλληλουχία υδρόφοβων αμινοξέων που συνορεύουν με τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 είναι επαρκής ώστε να αλληλεπιδρά με την εξπορτίνη CRM1 απουσία της φωσφορυλίωσης, ο GFP- 640- 679 HIF-2 $\alpha$  καθώς και οι μεταλλαγμένες μορφές που είτε καταργούν τη φωσφορυλίωση (S $\rightarrow$ A), είτε στη θέση των δύο υδρόφοβων λευκινών (Leu662/667) φέρουν κατάλοιπα αλανίνης ή τέλος ο συνδυασμός τους εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa με παροδική διαμόλυνση και ακολούθως υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με ορό κουνελιού έναντι του επιτόπου GFP (Εικόνα 73). Παρότι φαίνεται να

ανοσοκατακρημνίστηκαν μεγαλύτερες ποσότητες των μορφών GFP-640-679 HIF-2α(L→A)(L→A/ S→A), φαίνεται ότι η CRM1 παρουσιάζει ελάχιστη έως και οριακά ανιχνεύσιμη συγγένεια με τις μορφές αυτές. Αντίθετα, η CRM1 φαίνεται να δεσμεύεται ισχυρά με τον αγρίου τύπου GFP- 640- 679 HIF-2α και ακόμη περισσότερο με το μετάλλαγμα στο οποίο καταργείται η θέση φωσφορυλίωσης GFP-640-679 HIF-2α(S→A).



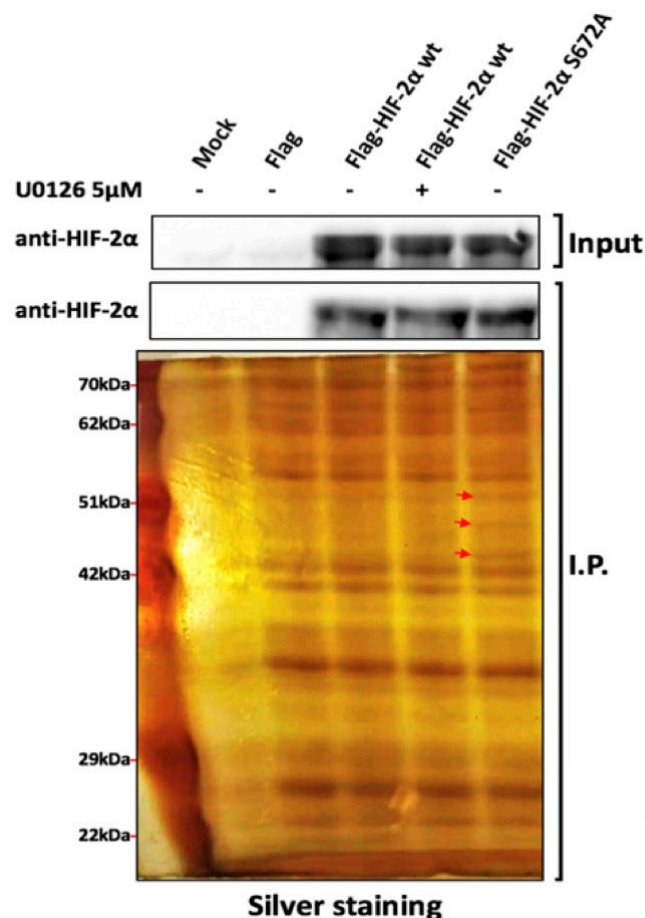
**Εικόνα 73: Επίδραση της κατάργησης των υδρόφοβων καταλοίπων λευκίνη 662 και λευκίνη 667 του HIF-2α στην αλληλεπίδρασή του με την εξπορτίνη CRM1.** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του αγρίου τύπου FLAG-HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-2α, pFLAG-HIF-2α-L662/L667A και pFLAG-HIF-2α-L662/L667A/S672A. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση των CRM1 και HIF-2α.

Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι η αλληλουχία υδρόφοβων αμινοξέων γειτονικά της θέσης φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, είναι επαρκής για να αλληλεπιδρά με την εξπορτίνη CRM1 και πιθανώς να αποτελεί μέρος ενός λειτουργικού σήματος πυρηνικής εξαγωγής NES.

### 3.1.28 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.

Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έδειξαν ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες ERK1/2, μια οικογένεια πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση, ρυθμίζοντας κυτταρικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η επιβίωση. Ειδικότερα, δείξαμε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 στο κατάλοιπο Ser-672 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική του συσσώρευση στον πυρήνα και κατά συνέπεια την πλήρη μεταγραφική του ενεργότητα. Η φωσφορυλίωση αυτή διαφαίνεται ότι αποκρύπτει ένα γειτονικό της σήμα πυρηνικής εξόδου και αποτρέπει έτσι την εξαρτώμενη από τη CRM-1 εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα (228).

Παράλληλα, θέλαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 στη Ser672 εκτός από την υποκυτταρική του κατανομή επηρεάζει και την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του Flag- HIF-2α μετά από υπερέκφραση σε καρκινικά κύτταρα HeLa του αγρίου τύπου Flag-HIF-2α και των μεταλλαγμάτων που είτε καταργούν τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 (Flag- HIF-2αS672A) είτε μιμούνται τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 (Flag-HIF-2αS672D). Οι πρωτεΐνες που συγκατακρημνίστηκαν με τις διαφορετικές μορφές του HIF-2α αναλύθηκαν με SDS PAGE και χρώση με νιτρικό άργυρο (Εικόνα 74).

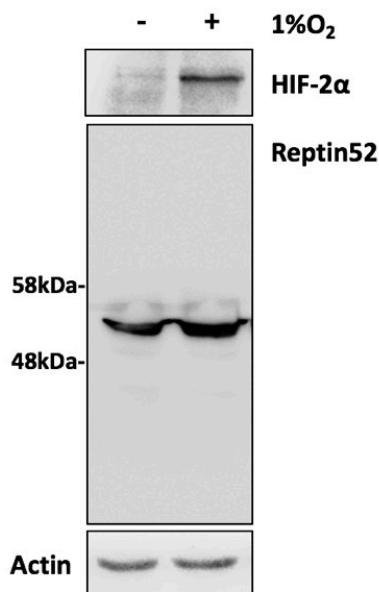


**Εικόνα 74: Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa.** Κύτταρα HeLa, που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση των pFLAG-HIF-2α-WT και της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α, pFLAG-HIF-2α-S672A. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση του HIF-2α. Τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με άργυρο για την ανίχνευση νέων πρωτεϊνών που συγκατακρημνίζονται με τις διάφορες μορφές του HIF-2α. Με κόκκινο βέλος ανιχνεύονται τρεις πρωτεΐνες που συγκατακρημνίζονται με την SA μορφή του HIF-2α με μοριακά βάρη 52kDa, 44 kDa και 42 kDa αντίστοιχα.

Ανιχνεύθηκαν τρεις ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες που συγκατακρημνίζονται μόνο με τη μεταλλαγμένη μορφή Flag- HIF-2αS672A. Οι ζώνες αυτές αποκόπηκαν από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου και στάλθηκαν για ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του κ. Παναγιώτου στο Ινστιτούτο Α. Φλέμινγκ (Βάρη, Αττικής). Από τις πρωτεΐνες που προέκυψαν από την ανάλυση, επιλέχθηκε να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη Ρεπτίνη (Reptin52, RUVBL2, TIP48, TIP49b, Rvb2) με μοριακό βάρος 52kDa. Η Ρεπτίνη είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη ΑΤΡάση της υπεροικογένειας AAA+ (ΑΤΡάσες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες). Η Ρεπτίνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εντοπίζεται, άλλοτε στον πυρήνα και άλλοτε στο κυτταρόπλασμα. Έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου. Ταυτοποιήθηκε αρχικά, ως πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται στο ηπατοκαρκίνωμα και τον καρκίνο του ορθού. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους. Επίσης, αναφέρθηκε ότι όταν η Ρεπτίνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, προάγει την μετανάστευση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

### **3.1.29 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΡΕΠΤΙΝΗΣ.**

Αρχικά, θέλαμε να ελέγξουμε αν η υποξία επηρεάζει την έκφραση της Ρεπτίνης. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης της Ρεπτίνης δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτες μεταβολές σε υποξία (**Εικόνα 75**).

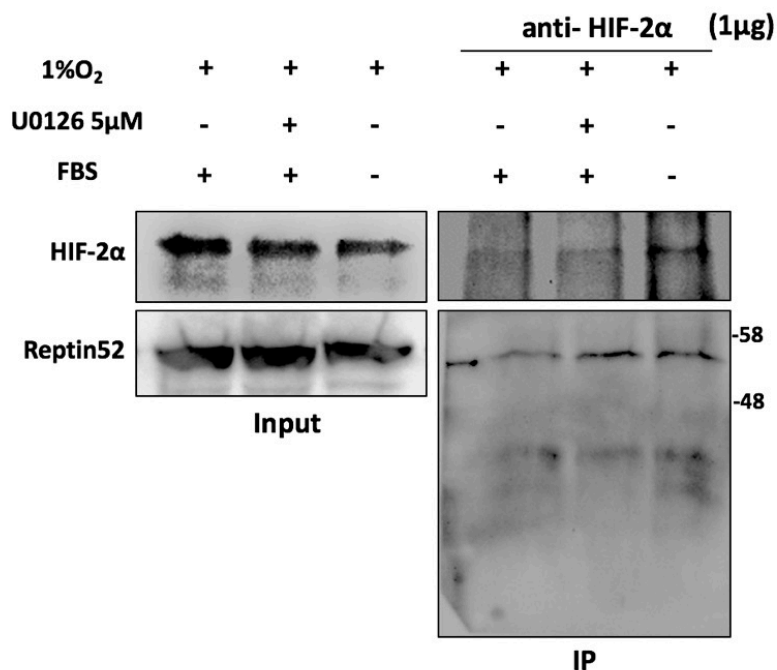


**Εικόνα 75: Επίδραση της υποξίας στην έκφραση της πρωτεΐνης της Ρεπτίνης.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με αντισώματα έναντι των HIF-2α, Ρεπτίνη και ακτίνη ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa που επώαστηκαν σε νορμοξία (21% O<sub>2</sub>) ή υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υποξία δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση της Ρεπτίνης.

### **3.1.30 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΜΕ ΤΗ ΡΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ERK1/2 ΣΤΗΝ ΙΣΧΥ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ.**

Αρχικά, θέλαμε να ελέγξουμε αν η Ρεπτίνη αλληλεπιδρά με τον HIF-2α. Στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης Flag- HIF-2α και των μεταλλαγμένων μορφών Flag- HIF-2α S672A και Flag- HIF-2α S672D που αναλύθηκαν με φασματοσκοπία μαζών οι υποψήφιες πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν (ανάμεσα στις οποίες και η Ρεπτίνη) συγκατακρημνίζονται μόνο με τη μεταλλαγμένη μορφή του HIF-2α που δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, Flag- HIF-2αS672A. Συνεπώς, θέλαμε να ελέγξουμε αν το μονοπάτι των ERK1/2 επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη Ρεπτίνη. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του ενδογενούς HIF-2α σε υποξία παρουσία ή απουσία του αναστολέα του μονοπατιού των ERK1/2 (U0126) και ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western η συγκατακρήμνιση του HIF-2α με τη Ρεπτίνη (**Εικόνα 76**).



**Εικόνα 76: Επίδραση της αναστολής της οδού των ERK1/2 στην αλληλεπίδραση του ενδογενούς HIF-2α με την Ρεπτίνη.** Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε υποξία (1%O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία U0126 (5μM) για 16 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) καθώς και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot για την ανίχνευση του HIF-2α και της Ρεπτίνης.

Τα πειράματα αυτά μας έδειξαν ότι ο HIF-2α αλληλεπιδρά με τη Ρεπτίνη. Επίσης, είδαμε ότι οι δυο πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια όταν το μονοπάτι των ERK1/2 δεν είναι ενεργό (παρουσία U0126).



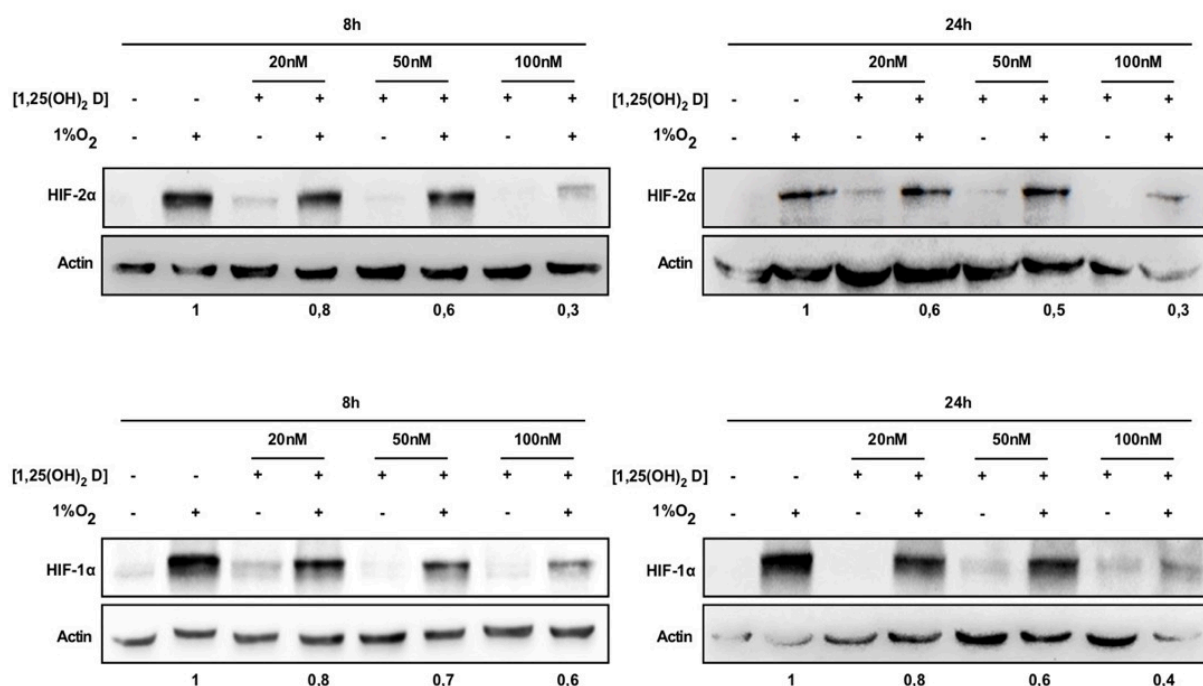
### 3.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2 ΑΠΟ ΤΗΝ 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Η υποξία μπορεί να προάγει την ανάπτυξη όγκων διευκολύνοντας το σχηματισμό νέων αγγείων και τη μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων. Οι επαγόμενοι από την υποξία αυξητικοί παράγοντες (HIF) είναι οι κύριοι ρυθμιστές της προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στη στέρηση οξυγόνου. Οι HIF-α υπομονάδες υπερεκφράζονται σε πολλούς καρκίνους, σχετίζονται με κακή πρόγνωση και γι' αυτό τα τελευταία χρόνια αποτελούν ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους. Η διαλεύκανση και η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του δεύτερου μέλους της οικογένειας και λιγότερο μελετημένου HIF-2 σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποτελέσει ένα νέο σημαντικό εργαλείο για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Παρόλο που υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από τον τελικό βιοδραστικό μεταβολίτη της βιταμίνης D, την 1,25(OH)<sub>2</sub>D, δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν την 1,25(OH)<sub>2</sub>D με τον HIF-2α. Επιπλέον, οι ελάχιστες ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε αυτό το πεδίο, έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Το ηπατοκαρκίνωμα (HCC) είναι ένας τύπος όγκου που η εξέλιξη του σχετίζεται με την παρουσία υποξικού μικροπεριβάλλοντος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη βιταμίνης D αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη του HCC και έχει καταδειχθεί στη βιβλιογραφία η αντι-πολλαπλασιαστική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Τέλος, πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές καταδεικνύουν σημεία σύγκλισης σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και των HIF. Έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D συμμετέχει στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφική δράση των HIF1α και HIF2α υπομονάδων. Συνεπώς, ένα παράδειγμα συνομιλίας της 1,25(OH)<sub>2</sub>D με τους HIF θα μπορούσε αποτελεί η σηματοδοτική οδός των ERK1/2 και άλλων κινασών πρωτεϊνών.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, επιλέξαμε να μελετήσουμε την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, αλλά και να διερευνήσουμε την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας, προκειμένου να τη συγκρίνουμε με εκείνη του HIF-2α χρησιμοποιώντας ως μοντέλο ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7.

### 3.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ HIF- $\alpha$ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση της έκφρασης των HIF- $\alpha$  υπομονάδων, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 20, 50 και 100nM για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι του HIF-2 $\alpha$ , του HIF-1 $\alpha$  και της ακτίνης. Παρατηρείται δόσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών του HIF-1 $\alpha$  και του HIF-2 $\alpha$  στις 8 και στις 24 ώρες υποξίας. Στην νορμοξία δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνών του HIF-1 $\alpha$  και του HIF-2 $\alpha$  ούτε στις 8 ούτε στις 24 ώρες (Εικόνα 77).



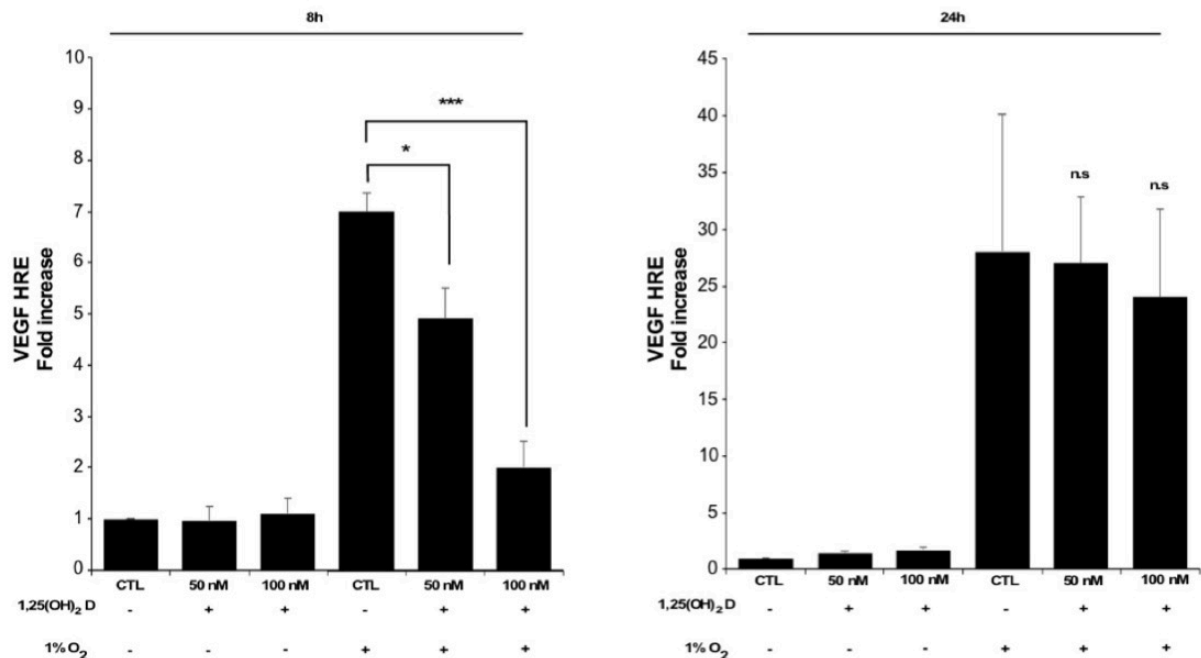
**Εικόνα 77: Επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στην έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2 $\alpha$  και του HIF-1 $\alpha$**   
Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot με αντισώματα έναντι των HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , και ακτίνη ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 20, 50 και 100nM για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Οι αριθμοί κάτω από κάθε διαδρομή είναι οι λόγοι των επιπέδων πρωτεΐνης των HIF-1 $\alpha$ /ακτίνης και HIF-2 $\alpha$ /ακτίνης, όπως προσδιορίστηκαν μετά από ποσοτικοποίηση και αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Τα πειράματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα πρωτεϊνών του HIF-2 $\alpha$  και του HIF1 $\alpha$  μειώνονται με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

### 3.2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ HIF-2 ΚΑΙ HIF-1.

Ακολούθως, θελήσαμε να διευκρινίσουμε εάν η πτώση των επιπέδων των HIF- $\alpha$  μετά από την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 έχει αντίκτυπο στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF με

πειράματα λουσιφεράσης σε κύτταρα Huh7. Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες (**Εικόνα 78**).



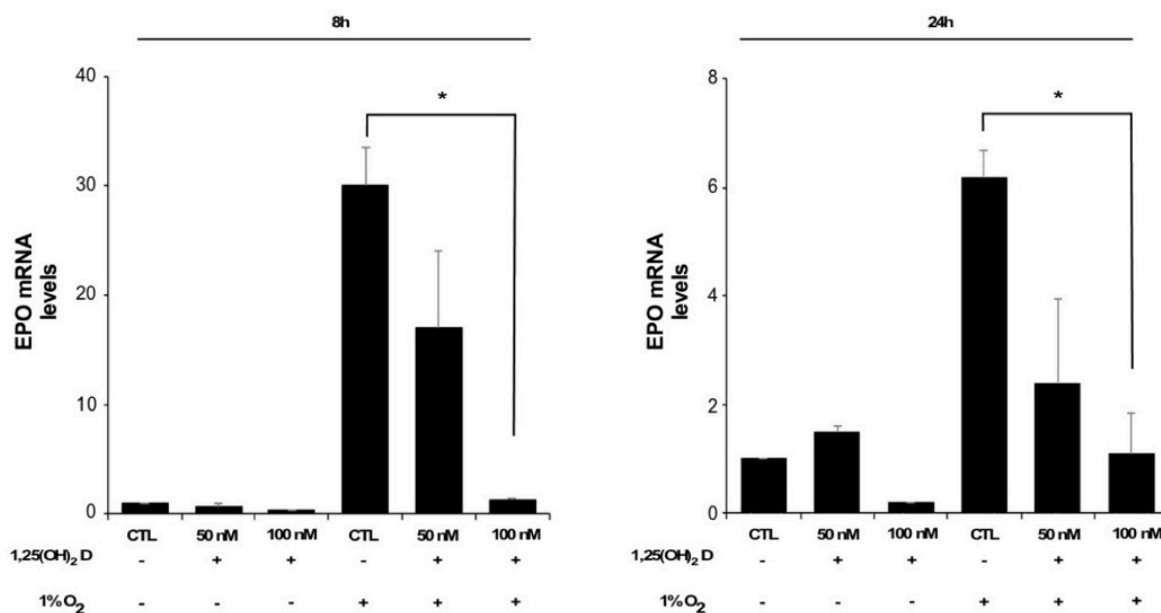
**Εικόνα 78: Επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στην μεταγραφική ενεργότητα των HIF2 και HIF1.** Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των HIF, σε κύτταρα Huh7 που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-5HRE-VEGF και pCI-Renilla και μετά από 24 ώρες επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 50 και 100nM για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Οι τιμές καθορίστηκαν ως ο λόγος της δράσης της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας ως προς τη δράση της λουσιφεράσης της Renilla και αποτελούν το μέσο όρων 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*\*\*) P<0,001).

Παρατηρείται ότι η προσθήκη της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής δράσης των HIF σε 8 ώρες υποξίας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Σε 24 ώρες υποξίας, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> δεν φαίνεται να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF.

### 3.2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ mRNA ΤΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥ HIF-2, EPO ΚΑΙ ΤΟΥ PAI-1 ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΤΟΥ HIF-1, PGK-1 ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR

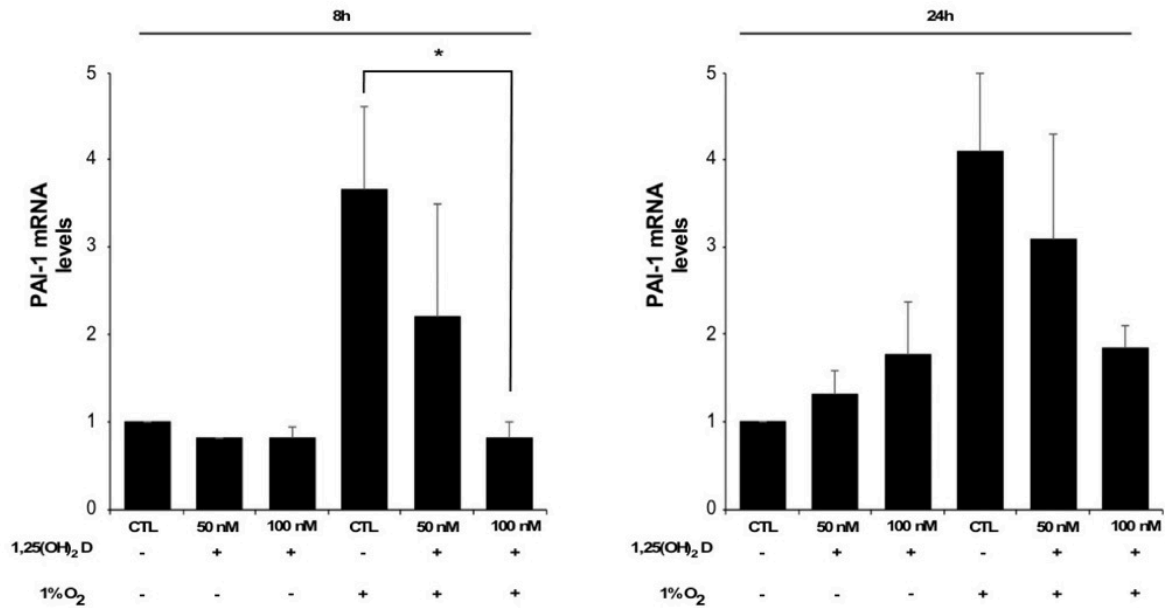
Καθώς στα πειράματα δοκιμασίας της λουσιφεράσης χρησιμοποιούνται τα HRE του VEGF που αποτελεί κοινό γονίδιο στόχο των HIF, τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας που μετρώνται οφείλονται στη δράση και των δύο HIF ισομορφών. Προκειμένου να διευκρινίσουμε ποια HIF ισομορφή επηρεάζεται από την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA ειδικών γονιδίων στόχων τους. Ειδικότερα, ελέγξαμε τη μεταγραφή του mRNA δύο ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2, της ερυθροποιητίνης (*EPO*) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) και ενός ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-1 $\alpha$ , της κινάσης του φωσφογλυκερικού (*PGKI*), με ποσοτική RT-PCR. Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH) $_2$ D, (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O $_2$ ) για 8 και 24 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *EPO*, *PAI-1* και *PGKI* με τη μέθοδο της RT-PCR (Εικόνα 79, 80, 81).



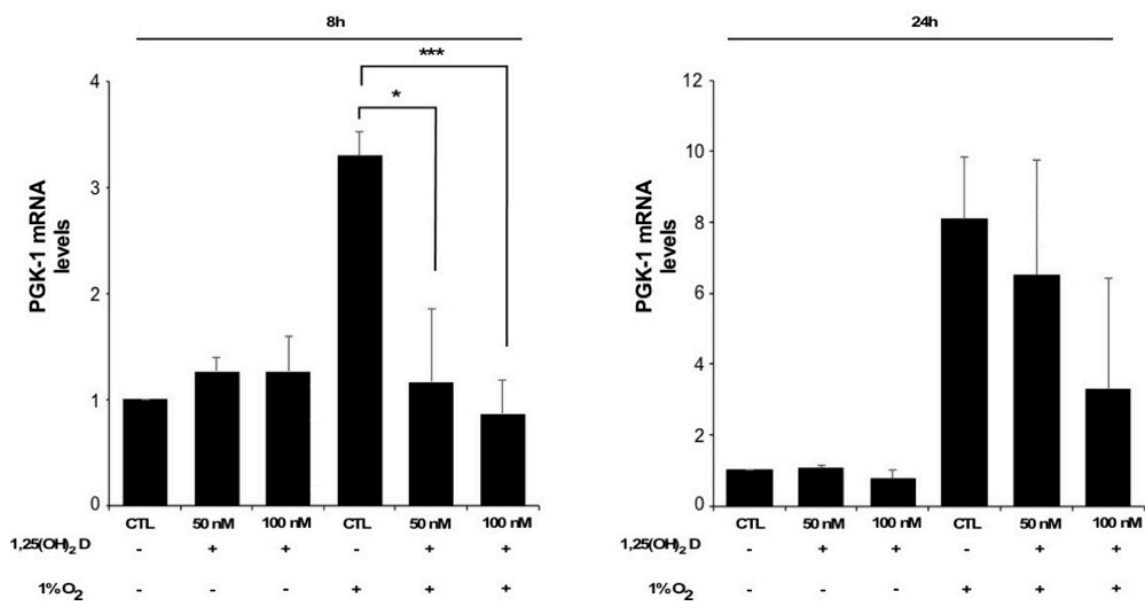
**Εικόνα 79:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *EPO* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH) $_2$ D, (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O $_2$ ) για 8 και 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05).

Ο HIF-2 επάγει 30 φορές τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της *EPO* σε συνθήκες υποξίας στις 8 ώρες και 6 φορές στις 24 ώρες. Η προσθήκη της 1,25(OH) $_2$ D προκαλεί δόσο-εξαρτώμενη πτώση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου της *EPO* τόσο στις 8 όσο και στις 24 ώρες (Εικόνα 79).



**Εικόνα 80:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D, (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρον 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05).

Ο HIF-2 επάγει 3,7 φορές τα επίπεδα mRNA του γονιδίου του *PAI-1* σε συνθήκες υποξίας στις 8 ώρες και 4 φορές στις 24 ώρες. Η προσθήκη της 1,25(OH)<sub>2</sub>D προκαλεί δόσο-εξαρτώμενη πτώση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου της *PAI-1* στις 8 ώρες. Στις 24 ώρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή με την προσθήκη της 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Εικόνα 80).



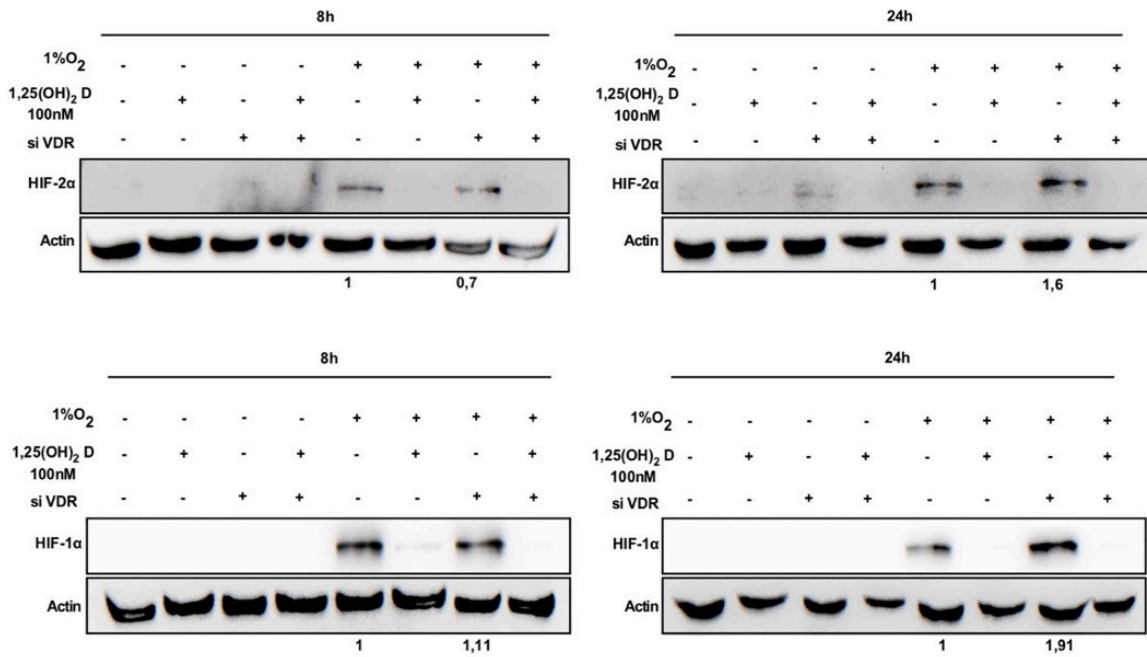
**Εικόνα 81:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PGK-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%  $\text{O}_2$ ) για 8 και 24 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\* $P < 0,05$ ).

Ο HIF-1 επάγει 3,5 φορές τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της *PGK1* σε συνθήκες υποξίας στις 8 ώρες και 8 φορές στις 24 ώρες. Η προσθήκη της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη πτώση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου της *PGK1* στις 8 ώρες. Στις 24 ώρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή με την προσθήκη της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (**Εικόνα 81**).

Συνοπτικά, σε 8 ώρες υποξίας παρουσία της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , παρατηρήθηκε μεγάλη πτώση των επιπέδων mRNA των γονιδίων στόχων του HIF-2 $\alpha$ , *EPO* και *PAI-1*. Η μείωση αυτή εξακολουθεί να παρατηρείται στις 24 ώρες για το γονίδιο της *EPO*, αλλά όχι για τον *PAI-1*, όπου δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή. Όσον αφορά στον έλεγχο της επίδρασης της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στη δράση του HIF-1, στις 8 ώρες υποξίας παρουσία της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1, *PGK-1*. Η μείωση αυτή εξακολουθεί να παρατηρείται στις 24 ώρες, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική.

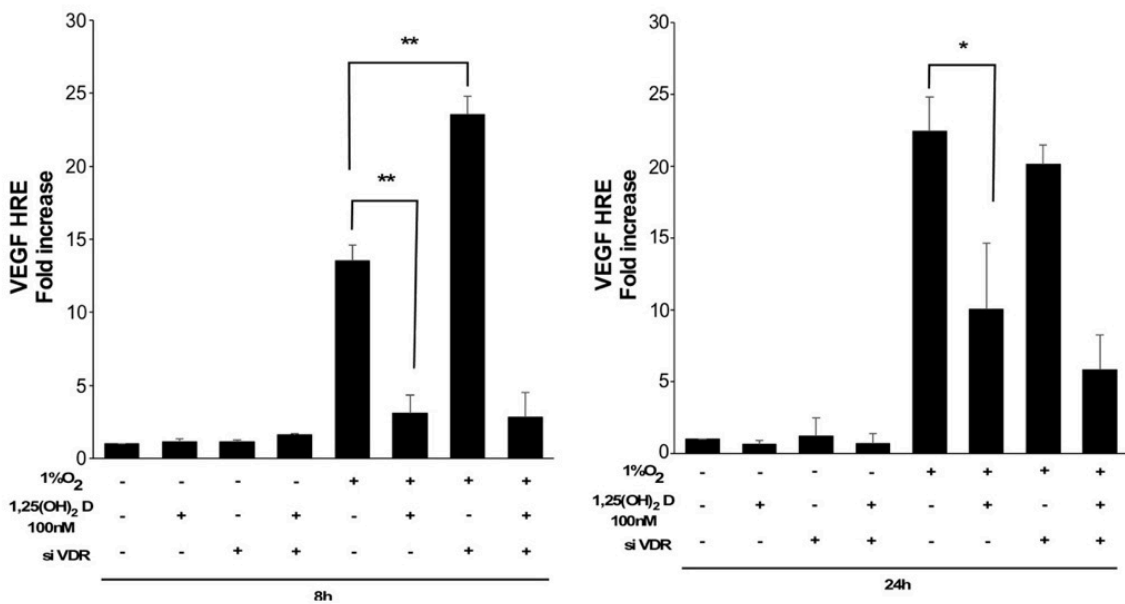
### **3.2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΟΥ VDR $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ HIF- $\alpha$ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ HIF**

Προκειμένου να ελέγξουμε αν η επίδραση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στη ρύθμιση των HIF- $\alpha$  υπομονάδων οφείλεται στη γενωμική της δράση, πραγματοποιήσαμε πειράματα αποσιώπησης του υποδοχέα της βιταμίνης D3 (VDR), σε συνθήκες υποξίας και ελέγχθηκε η επίδραση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF- $\alpha$  και την μεταγραφική ενεργότητα των HIF. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με siRNA-VDR (ή με control siRNA) και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%  $\text{O}_2$ ) για 8 και 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι του HIF-2 $\alpha$ , του HIF-1 $\alpha$  και της ακτίνης (**Εικόνα 82**) και μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα των HIF με τη μέθοδο της λουσιφεράσης (**Εικόνα 83**).



**Εικόνα 82:** Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με siRNA-VDR (ή με control siRNA). 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι του HIF-2α, του HIF-1α και της ακτίνης.

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α σε υποξία με τρόπο που δεν εξαρτάται από τον VDR.



**Εικόνα 83:** Κύτταρα Huh7 διαμολύνθηκαν με siRNA-VDR (ή με control siRNA) και με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-HRE-5x και pCI-Renilla. 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (50 και 100nM) για 1 ώρα, πριν υποβληθούν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

(1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα των HIF με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> μειώνει τη μεταγραφική δράση των HIF σε υποξία με τρόπο που δεν εξαρτάται από τον VDR. Ωστόσο, παρατηρείται ότι η αποσιώπηση του VDR χωρίς την ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής δράσης των HIF.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής των αερόβιων οργανισμών. Η έλλειψη οξυγόνου (υποξία) έχει σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργία των κυττάρων και κατέχει κεντρικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου, ώστε να προσαρμόζονται και να ανταπεξέρχονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Τα κύτταρα που εκτίθενται σε υποξία αποκρίνονται στην ελάττωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου αλλάζοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων δρουν αντιρροπιστικά στις επιπτώσεις της υποξίας. Η επαγωγή των διαφορετικών αυτών γονιδίων από την υποξία, ορισμένα από τα οποία εκφράζονται γενικά και κάποια ιστοειδικά, φαίνεται ότι εξαρτάται από ένα κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται από την υποξία (HIF). Ο HIF-2 αποτελεί το λιγότερο μελετημένο μέλος της οικογένειας των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων και αναδείχθηκε ως ιστοειδικός ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Δρα στον πυρήνα ως ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από μια α υπομονάδα (HIF-2α) η οποία επάγεται από την έλλειψη οξυγόνου και μια συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα τον HIF-1β ή ARNT. Η HIF-2α υπομονάδα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου συντίθεται και αποικοδομείται συνεχώς ενώ σε συνθήκες υποξίας, σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα προκειμένου να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (22). Η HIF-2α υπομονάδα υπόκειται επίσης σε αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, καθώς και μέσω επιλεκτικής αλληλεπίδρασης με μια πληθώρα πρωτεϊνών. Έτσι ρυθμίζεται η πρωτεϊνική της σταθερότητα και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 προσδίδοντας τη δυνατότητα να διαφοροποιείται με τρόπο ευαίσθητο και ειδικό από την HIF-1α υπομονάδα (71).

Η δημιουργία υποξικών περιοχών αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών συμπαγών όγκων ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ της διαθεσιμότητας και της κατανάλωσης οξυγόνου. Οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί απόκρισης στην υποξία μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη όγκων διευκολύνοντας την αγγειογένεση και τη μεταβολική προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIF που αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία υπερεκφράζονται στην πλειοψηφία των καρκίνων ανάμεσα στους οποίους συμπεριλαμβάνεται το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η υποξία συνδέεται με την αγγειοβρίθεια, την αντοχή σε θεραπευτικά σχήματα και τη

ραδιοθεραπεία. Δεδομένου ότι η υπερέκφραση των HIF-α υπομονάδων στους καρκινικούς όγκους σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αντίσταση στη θεραπευτική αγωγή, τα τελευταία χρόνια αποτελούν ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους (180). Σε αυτά τα πλαίσια, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διαλεύκανση και η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του δεύτερου μέλους της οικογένειας των HIF και λιγότερο μελετημένου HIF-2 παράγοντα σε καρκινικά κύτταρα.

#### 4.1 Φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ταυτοποιήθηκε ένας καινούριος μηχανισμός ρύθμισης της δράσης του HIF-2 ο οποίος δεν εξαρτάται από το οξυγόνο. Πιο συγκεκριμένα, δείξαμε ότι η HIF-2α υπομονάδα φωσφορυλιώνεται στην καρβοξυτελική του επικράτεια από τις ERK1/2 σε ένα κατάλοιπο σερίνης στη θέση 672. Περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι η τροποποίηση αυτή, οδηγεί σε συσσώρευση του HIF-2α στον πυρήνα καθώς αποκρύπτει ένα παρακείμενο σήμα πυρηνικής εξαγωγής που εξαρτάται από την εξπορτίνη CRM-1. Έτσι, το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 είναι η πλήρης ενεργοποίηση της μεταγραφικής δράσης του HIF-2.

Ο χαρακτηρισμός αυτού του μηχανισμού βασίστηκε στις εξής πειραματικές παρατηρήσεις:

α) Η αναστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού των ERK1/2 μειώνει την έκφραση των γονιδίων της ερυθροποιητίνης (*EPO*) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) σε συνθήκες υποξίας που αποτελούν ειδικά γονίδια στόχους του HIF-2, χωρίς ταυτόχρονα να μειώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-2α. β) Με πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης, βρέθηκε ότι η ERK2 τροποποιεί το κατάλοιπο της σερίνης στη θέση 672 του HIF-2α. γ) Η κατάργηση της φωσφορυλίωσης της σερίνης 672 μετά από αντικατάσταση της σερίνης 672 από αλανίνη (S672A) αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2, ενώ, αντίθετα, η φωσφο-μιμητική μετάλλαξη του ίδιου καταλοίπου σε ασπαρτικό (S672D) έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της δραστηριότητας του HIF-2. δ) Η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης της HIF-2α υπομονάδας ή την αλληλεπίδρασή της με τον συνενεργοποιητή της μεταγραφής USF2. ε) Πειράματα ανοσοφθορισμού και μεταγραφικής ενεργότητας με τις μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 εμποδίζει τη διαμεσολαβούμενη από την εξπορτίνη CRM-1 εξαγωγή της HIF-2α υπομονάδας από τον πυρήνα και, έτσι, ενισχύει τη μεταγραφική δράση του HIF-2. στ) Επιπλέον, πειράματα ανοσοκαθίζησης του HIF-2α έδειξαν ότι φωσφορυλίωση της σερίνης 672 από τις ERK1/2 καταργεί την

αλληλεπίδραση του HIF-2α με την εξπορτίνη CRM-1 και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζεται η έξοδος του από τον πυρήνα. ζ) Εντοπίστηκε μία συντηρημένη υδρόφοβη αλληλουχία που γειτνιάζει με τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 η οποία συμπεριλαμβάνει τα κατάλοιπα λευκίνης L662 και L667. Πειράματα ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α έδειξαν ότι, η υδρόφοβη αυτή περιοχή συμπεριφέρεται σαν λειτουργικό NES μόνο όταν η σερίνη 672 δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2. η) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του HIF-2α έδειξαν ότι τα κατάλοιπα λευκίνης L662A και L667A είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α με την CRM-1. θ) Η βασική αιτία της μεταγραφικής απενεργοποίησης του HIF-2, όταν η HIF-2α υπομονάδα του στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης, είναι ο εκτεταμένος αποκλεισμός του HIF-2α από τον πυρήνα λόγω μιας εκτεθειμένης αλληλουχίας που συμπεριφέρεται ως NES.

Παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα, υποδείκνυαν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK1/2 ρυθμίζει τη μεταγραφική δράση του HIF-2 με έμμεσο τρόπο, μέσω καλμοδουλίνης (227). Προκειμένου να διαλευκανθεί ο μοριακός μηχανισμός ελέγχου του HIF-2 από τις ERK1/2, ελέγξαμε, αρχικά, τη μεταγραφή του mRNA δύο ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2, της ερυθροποιητίνης (*EPO*) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*), σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 που επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O<sub>2</sub>) με ταυτόχρονη φαρμακολογική αναστολή του μονοπατιού των κινασών ERK1/2. Η αναστολή της σηματοδότησης των ERK1/2 οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των γονιδίων *EPO* και *PAI-1* σε συνθήκες υποξίας, χωρίς ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-2α. Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα, μας έδειξαν ότι το μονοπάτι των ERK1/2 είναι καθοριστικό για την ενεργοποίηση του HIF-2. Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας γνωρίζουμε ότι η HIF-1α ισομορφή της οικογένειας των HIFs φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 σε δυο κατάλοιπα σερίνης εντός της ID επικράτειας της (111, 112). Ωστόσο, όπως προέκυψε από μελέτες συγκριτικής ανάλυσης αλληλουχιών που πραγματοποιήσαμε, οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α δεν εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στην περιοχή αυτή και τα δύο κατάλοιπα σερίνης του HIF-1α που φωσφορυλιώνονται από τις ERK δεν είναι συντηρημένα στη δεύτερη ισομορφή. Συνεπώς, δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν οι ERK1/2 ρυθμίζουν τη μεταγραφική δράση του HIF-2 μέσω φωσφορυλίωσης της HIF-2α υπομονάδας ή με έμμεσο τρόπο, όπως είχε προταθεί σε παλαιότερη μελέτη (227).

Προκειμένου να διερευνηθεί το ενδεχόμενο φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2, ο πλήρους μεγέθους HIF-2α και μικρότερα τμήματά του, υπεβλήθησαν σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης με την ανασυνδυασμένη κινάση p42 (ERK2) και ραδιενεργά σημασμένο

ATP ( $^{32}\text{P}$ ). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων μας έδειξαν ότι ο HIF-2α αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης της p42 (ERK2) κινάσης *in vitro*. Ακόμη, συμπεράναμε ότι η φωσφορυλίωση αυτή εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή της καρβοξυτελικής επικράτειας και μεταξύ των αμινοξέων 620-680. Η μικρή αυτή περιοχή αποτελεί τμήμα της ανασταλτικής επικράτειας ενεργοποίησης της μεταγραφής ID (Inhibitory Domain) του HIF-2α.

Για να καθοριστούν με ακρίβεια οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, αναζητήσαμε στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 620 και 680 πιθανά SP ή TP διπεπτίδια τα οποία πληρούν το κλασικό μοτίβο αναγνώρισης από τις ERK1/2, PX(S/T)P. Η ανάλυση ανέδειξε την παρουσία δύο πιθανών καταλοίπων που ταιριάζουν με το μοτίβο, τη σερίνη 672 και τη θρεονίνη 626. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας 620-680 μεταξύ των ομολόγων του HIF-2α σε διάφορα σπονδυλωτά, που αποκάλυψε ότι και τα δυο αυτά κατάλοιπα είναι συντηρημένα. Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι τα κατάλοιπα σερίνη 672 και θρεονίνη 626 αποτελούν τον στόχο φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2, έγινε μετατροπή των παραπάνω καταλοίπων σε αλανίνη (S672A, T626A). Ο πλήρους μεγέθους αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και οι μορφές που φέρουν τις μεταλλάξεις σε αλανίνη, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης με ανασυνδυασμένη p42 MAPK (ERK2) ή ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Huh7 ως πηγή των κινασών ERK1/2, παρουσία ραδιενεργά σημασμένου ATP. Οι δοκιμές φωσφορυλίωσης έδειξαν ότι η σερίνη 672 αποτελεί τον κυρίαρχο στόχο των ERK1/2 στα πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης του ανθρώπινου HIF-2α και πιθανώς η σερίνη 672 να αποτελεί το μοναδικό κατάλοιπο στόχο των ERK1/2. Το κατάλοιπο σερίνης του HIF-2α που τροποποιείται από τις ERK1/2, η σερίνη 672 (Ser672), είναι συντηρημένο σε όλα τα ομόλογά του HIF-2α στα σπονδυλωτά. Το γεγονός ότι αυτή η συγκεκριμένη σερίνη (Ser672) αντιπροσωπεύει θέση φωσφορυλίωσης, επιβεβαιώνεται περαιτέρω από μία πολύ πρόσφατη φωσφο-πρωτεωμική ανάλυση σε δείγματα ανθρώπινων καρκινικών όγκων μαστού, η οποία συνδέει σωματικές μεταλλάξεις με γεγονότα σηματοδότησης (229). Στη συγκεκριμένη μελέτη, το πεπτίδιο TEFLGAAPLGPPV**S**<sub>672</sub>PPHVSTFK του HIF-2α, ταυτοποιήθηκε ως φώσφο-πεπτίδιο και η σερίνη 672 ως το κατάλοιπο δέκτης της φωσφορικής ομάδας.

Προκειμένου να ελέγξουμε αν η απουσία της φωσφορυλίωσης της σερίνης 672 του HIF-2α από τις ERK1/2 έχει την ίδια επίδραση στη μεταγραφική δράση του HIF-2 με αυτή της αναστολής του μονοπατιού των ERK1/2 στον ενδογενή HIF-2, μελετήσαμε τη μεταγραφική ενεργότητα του μεταλλάγματος S672A του HIF-2α που έχει χάσει την ικανότητα φωσφορυλίωσης, και του μεταλλάγματος S672D του HIF-2α που μιμείται τη φωσφορυλίωση λόγω φορτίου παρουσία ή απουσία του αναστολέα της οδού των ERK1/2, U0126. Η S672A

μεταλλαγμένη μορφή του HIF-2α παρουσίασε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα σε σύγκριση με αυτή του αγρίου τύπου HIF-2α και όμοια με αυτή του αγρίου τύπου HIF-2α παρουσία του U0126. Αντίθετα, η μεταγραφική ενεργότητα του φωσφομιμητικού μεταλλάγματος ήταν παρόμοια με αυτή του HIF-2α αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση του αγρίου τύπου HIF-2α στη σερίνη 672 είναι καθοριστική για τη μεταγραφική του ενεργότητα. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα, συμφωνούν με τα αρχικά μας δεδομένα που αφορούν στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς HIF-2α και προτείνουν ότι η Ser672 αποτελεί βασική θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 τόσο in vitro όσο και in vivo και η τροποποίηση στη θέση αυτή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του HIF-2.

Το γεγονός ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική δράση του HIF-2 θα μπορούσε να οφείλεται στην ανάμιξη της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 σε διεργασίες όπως η σταθερότητα της HIF-2α υπομονάδας, η αλληλεπίδρασή της με συμπαραγόντες της μεταγραφής, καθώς και η μεταβολή του υποκυτταρικού της εντοπισμού. Τα πειραματικά μας δεδομένα απέκλεισαν την υπόθεση ότι ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2α από τις ERK1/2 εμπλέκεται στην πρωτεϊνική του σταθερότητα ή στην αλληλεπίδρασή του με τον μεταγραφικό συμπαραγόντα USF2 που ήταν γνωστό ότι επηρεάζει τη δράση του HIF-2 (21).

Στην προσπάθειά μας να προσδιορίσουμε την αιτία της μειωμένης δράσης της S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α που στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης, παρατηρήσαμε ότι εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, κάτι που παρατηρήσαμε επίσης και για τον αγρίου τύπου HIF-2α σε κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία του αναστολέα U0126. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι η αναστολή της εξόδου από τον πυρήνα με τη χρήση λεπτομυκίνης B (LMB) οδήγησε σε επανασυσσώρευση των παραπάνω πρωτεϊνών στον πυρήνα, γεγονός που υπέδειξε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την ERK1/2 είναι απαραίτητη για τον πυρηνικό εντοπισμό του και τη βασική λειτουργία του ως μεταγραφικός παράγοντας. Οι παρατηρήσεις αυτές, επιβεβαιώθηκαν για τον ενδογενή HIF-2α με πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι ενώ σε συνθήκες αναστολής της σηματοδοτικής οδού των ERK1/2, σημαντική ποσότητα του HIF-2α μετατοπίστηκε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ παρουσία της LMB επανασυσσωρεύτηκε στο πυρηνικό κλάσμα. Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν αναστέλλοντας την CRM1 με LMB η επανασυσσώρευση στον πυρήνα της S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α (που στερείται την ικανότητα φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2) θα μπορούσε να αποκαταστήσει τη χαμηλή μεταγραφική του δραστηριότητα. Το γεγονός ότι η παρουσία LMB

επαναφέρει τη μεταγραφική δράση της S672A μεταλλαγμένης μορφής του HIF-2α σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του αγρίου τύπου HIF-2α, υποδηλώνει ότι η πρωταρχική αιτία της μερικής απενεργοποίησης της μεταγραφικής δράσης του HIF-2 με μεταλλάξεις που καταργούν της φωσφορυλίωση της HIF-2α υπομονάδας από τις ERK1/2, είναι ο αυξημένος ρυθμός εξαγωγής του HIF-2α από τον πυρήνα. Φαίνεται ότι ο HIF-2α μετακινείται διαρκώς μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και ότι η έλλειψη φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από την εξαπορτίνη CRM1 εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα, εξηγώντας έτσι την παρατηρούμενη μερική μείωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-2.

Έχοντας δείξει με πειράματα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού ότι η κατάργηση της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από την εξαπορτίνη CRM1 εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα, θέλαμε να ελέγξουμε αν η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2 επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με την CRM1. Επίσης, δεδομένου ότι και η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την κινάση CK1δ εμποδίζει την διαμεσολαβούμενη από τη CRM1 πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α (86) θέλαμε να δούμε αν και η φωσφορυλίωση από τη CK1δ επηρεάζει τη δημιουργία του συμπλόκου HIF-2α/CRM1. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τη CK1δ ρυθμίζει την διαμεσολαβούμενη από τη CRM1 πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α με τρόπο που δεν περιλαμβάνει την άμεση αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM1, ενώ η φωσφορυλίωση της σερίνης 672 καταργεί την αλληλεπίδραση του HIF-2α με την εξαπορτίνη CRM1, παρεμποδίζοντας έτσι την έξοδό του από τον πυρήνα.

Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της Ser672 από τις ERK1/2 απαιτείται για τη συγκράτηση της HIF-2α υπομονάδας μέσα στον πυρήνα παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM-1. Είναι γνωστό ότι ο έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των μεταγραφικών παραγόντων αποτελεί ένα επιπρόσθετο βήμα πολυπλοκότητας στη ρύθμιση της μεταγραφικής τους δράσης, καθώς επιτρέπει τον συντονισμό τους για την πρόσβαση στους υποκινητές ή τους ενισχυτές των γονιδίων-στόχων τους καθώς και για την στρατολόγηση συνενεργοποιητών ή/και συν-καταστολέων τους ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (230). Όπως έχει δειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις, η αναστολή της πυρηνικής εξαγωγής με φωσφορυλίωση είναι πράγματι ένας αποτελεσματικός τρόπος που εξασφαλίζει την πυρηνική συσσώρευση και την πλήρη ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (230-232).

Παρόλο που ο μηχανισμός εισαγωγής του HIF-2α στον πυρήνα είχε προηγουμένως μελετηθεί (17), η ικανότητά του να μετακινείται εντός και εκτός του πυρήνα, παρέμενε άγνωστη, καθώς η ρύθμιση της πυρηνικής εξαγωγής του δεν είχε διερευνηθεί. Η HIF-2α υπομονάδα υπερβαίνει κατά πολύ το γενικά αποδεκτό μέγεθος παθητικής μεταφοράς πρωτεϊνών μέσω των πυρηνικών πόρων που είναι περίπου 40 kDa (233). Κατά συνέπεια, απαιτούνται ειδικά σήματα

μετακίνησης όπως ένα σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES εκτός από ένα σήμα πυρηνικής εισαγωγής NLS (233). Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2α που γειτνιάζει με τη θέση φωσφορυλίωσης των ERK1/2 αποκάλυψε έναν αριθμό υδρόφοβων καταλοίπων που είναι σχεδόν καθολικά συντηρημένα στα ομόλογά του στα σπονδυλωτά. Η απόσταση των συντηρημένων υδρόφοβων καταλοίπων στην αλληλουχία FLGAAPLGPPV αποκλίνει από την ευρέως προτεινόμενη υδρόφοβη εξαρτώμενη από τη CRM-1 ακολουθία NES ( $\Phi X_{2-3} \Phi X_{2-3} XX\Phi$ , όπου  $\Phi = \text{Leu, Ile, Val, Phe, Met}$  και  $X = \text{οποιοδήποτε αμινοξύ}$ ) (234). Ωστόσο, η αντικατάσταση των καταλοίπων λευκίνης 662 και 667 με αλανίνες, L662A/L667A, αδρανοποίησε αυτήν την πιθανή, άτυπη ακολουθία NES καθώς οδήγησε σε συσσώρευση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α στον πυρήνα και διέγειρε τη μεταγραφική του δράση. Επιπλέον, η αντικατάσταση των λευκινών με αλανίνες καταργεί τη φυσική αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α με τη CRM-1. Όλα αυτά δείχνουν ότι η αλληλουχία FLGAAPLGPPV που συνορεύει με τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 στη Ser672 του HIF-2α, πράγματι αντιπροσωπεύει μια άτυπη αλληλουχία NES η οποία διαμεσολαβεί τη σύνδεση της HIF-2α υπομονάδας στη CRM-1 και την επακόλουθη εξαγωγή του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α από τον πυρήνα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα επίσης ρυθμίζεται μέσω της άμεσης τροποποίησης της HIF-1α υπομονάδας από τις ERK1/2 και της αναστολής της εξαρτώμενης από τη CRM-1 πυρηνικής εξαγωγής (111, 112). Παρά το γεγονός ότι αμφότερες οι θέσεις τροποποίησης από τις ERK1/2 και το σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES του HIF-1α είναι διακριτές από αυτές που ταυτοποιήσαμε στον HIF-2α καθώς βρίσκονται σε μια περιοχή με πολύ μικρή ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ των δυο ισομορφών, η ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 και του HIF-2 από τις ERK1/2 φαίνεται ότι είναι κοινή και περιλαμβάνει τον μηχανισμό πυρηνικής εξαγωγής τους με παρόμοιο τρόπο. Αυτοί οι δυο ρυθμιστικοί μηχανισμοί, παρότι παρόμοιοι, πρέπει να έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα και μετά από διπλασιασμό του αρχέγονου γονιδίου HIF-α και την εμφάνιση των δύο ισομορφών στα σπονδυλωτά (36), σε ένα είδος συγκλίνουσας μοριακής εξέλιξης.

Η ταυτοποιημένη θέση τροποποίησης από τις ERK1/2, η σερίνη 672 (Ser672), καθώς και το άτυπο NES εντοπίζονται στην ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (Inhibitory Domain, ID) του HIF-2α, που βρίσκεται μεταξύ της αμινοτελικής περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής, την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και την καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD (αμινοξέα 830-870). Η επικράτεια ID δεν είναι καλά χαρακτηρισμένη, αλλά έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση των HIFs καθώς η απαλοιφή της αυξάνει τη μεταγραφική δράση τόσο της N-

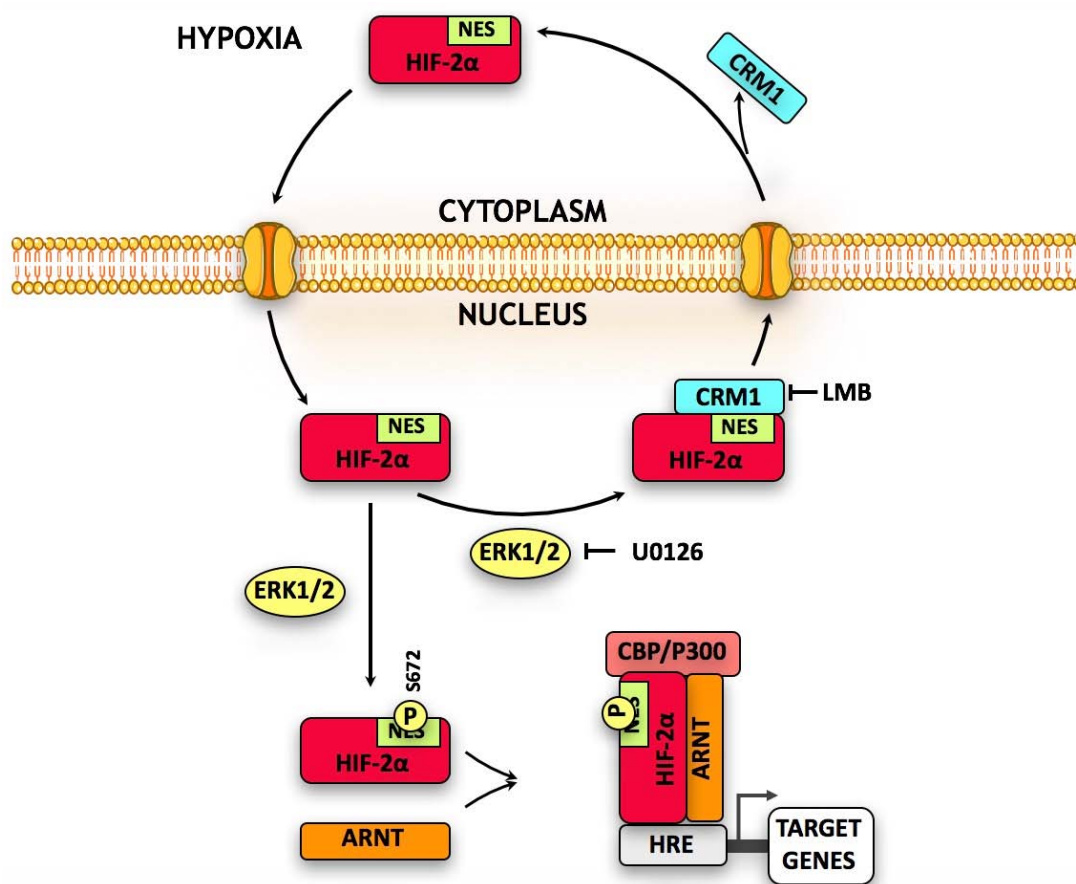
TAD όσο και της C-TAD (**235**). Τα αποτελέσματά μας που δείχνουν ότι η επικράτεια ID περιέχει τόσο μια θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 όσο και ένα εξαρτώμενο από τη CRM-1 σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES, μπορεί να εξηγούν αυτά τα παλαιότερα δεδομένα. Δεδομένου ότι η απαλοιφή του ID θα απομάκρυνε ταυτόχρονα και το σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES θα οδηγούσε σε αύξηση της πυρηνικής συσσώρευσης και επακόλουθη αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-2α ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησης της οδού των ERK1/2.

Όλα τα παραπάνω, υπογραμμίζουν τη λειτουργική σημασία του ελέγχου της υποκυτταρικής κατανομής και των δύο ισομορφών HIF-α ως απόκριση στα επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού των ERK1/2. Ωστόσο, η ρύθμιση της υποκυτταρικής κατανομής του HIF-2α φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκη από αυτή του HIF-1α, καθώς η ERK1/2 είναι η δεύτερη κινάση που εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία. Έχει δειχθεί από την ομάδα μας ότι η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τη CK1δ στα κατάλοιπα Ser383 και Thr528, επίσης επηρεάζει την μετατόπιση του HIF-2α από τον πυρήνα, αναστέλλοντας την διαμεσολαβούμενη από τη CRM-1 πυρηνική εξαγωγή του (**86**). Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε κάποια αμινοξική αλληλουχία που να προσομοιάζει NES κοντά στις θέσεις τροποποίησης από τη CK1δ. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη μορφή του HIF-2α στην οποία έχει καταργηθεί η θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (HIF-2αS672A) αλληλεπιδρά με τη CRM-1 σε αντίθεση με τη μορφή του HIF-2α που στερείται τις θέσεις τροποποίησης από τη CK1δ (HIF-2αS383A/T528A) και δεν συνδέεται με τη CRM-1. Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 ελέγχει άμεσα την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM1 καλύπτοντας ένα παρακείμενο NES, ενώ η τροποποίηση από την CK1δ επηρεάζει έμμεσα την πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α, διευκολύνοντας πιθανώς τη δέσμευση του HIF-2α σε πρωτεΐνες του πυρήνα, που έχει ως αποτέλεσμα την πυρηνική του κατακράτηση (**Εικόνα 84**). Η έλλειψη της τροποποίησης από τη CK1δ θα μπορούσε να μετατοπίσει την ισορροπία περισσότερο προς την πυρηνική εξαγωγή παρά την ασθενή αλληλεπίδραση της CRM-1 με τον φωσφορυλιωμένο HIF-2α από τις ERK1/2. Ομοίως, η έλλειψη της τροποποίησης από τις ERK1/2 θα είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρότερη αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM-1 και την αποτελεσματικότερη πυρηνική εξαγωγή παρά τη φωσφορυλίωση από τη CK1δ. Εναλλακτικά, είναι πιθανό η φωσφορυλίωση από τη CK1δ να διευκολύνει ή και να επιτρέπει την τροποποίηση του HIF-2α από τις ERK1/2 με αποτέλεσμα την έμμεση κατάργηση της λειτουργίας του άτυπου NES και την παραμονή του στον πυρήνα. Τέλος, δεν αποκλείεται η υπόθεση της έμμεσης διαμεσολαβούμενης από τη CRM-1 εξαγωγής του μη φωσφορυλιωμένου HIF-2α από τον πυρήνα μέσω κάποιας πρωτεΐνης συνοδού που φέρει ένα



λειτουργικό NES (236). Σε κάθε περίπτωση, ο ακριβής έλεγχος της μεταγραφικής δράσης του HIF-2α μέσω του εκτοπισμού του από τον πυρήνα περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο κινάσες και, ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ένας σημαντικός και πολύπλοκος μηχανισμός που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αποκαλύψαμε ένα νέο ρυθμιστικό βήμα της ανεξάρτητης από το οξυγόνο δραστηριότητας του HIF-2 που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της HIF-2α υπομονάδας από τις ERK1/2 στο κατάλοιπο σερίνης 672 του HIF-2α. Η φωσφορυλίωση της HIF-2α υπομονάδας από τις ERK1/2 ελέγχει την εξαρτώμενη από τη CRM-1 πυρηνική εξαγωγή του HIF-2α, καλύπτοντας ένα λειτουργικό άτυπο σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) του HIF-2α (Εικόνα 84).



**Εικόνα 84: Προτεινόμενο μοντέλο της ρύθμισης της μετακίνησης του HIF-2α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω φωσφορυλίωσης.**

Σε συνθήκες υποξίας, η HIF-2α υπομονάδα σταθεροποιείται και εισέρχεται στον πυρήνα. Απουσία φωσφορυλίωσης, η δέσμευση της εξαπορτίνης CRM-1 στο σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES που γειτνιάζει με τη Ser672 του HIF-2α, οδηγεί τον HIF-2α στο κυτταρόπλασμα και συνεπώς μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2. Όταν οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τη Ser672, το NES αποκρύπτεται και παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τη CRM-1 και η ακόλουθη εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα. Κατά συνέπεια, η φωσφορυλίωση του HIF-2α από τις ERK1/2, προωθεί την πυρηνική του συσσώρευση και μεγιστοποιεί τη μεταγραφική του δράση. Η εξαρτώμενη από την CK1δ φωσφορυλίωση του HIF-2α στα κατάλοιπα σερίνης Ser383 και Thr528 μπορεί επίσης

να αναστείλει την εξαγωγή του HIF-2α από τον πυρήνα (86), μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του NES του HIF-2α με τη CRM-1. Ο πυρηνικός HIF-2α αλληλεπιδρά με το ARNT για να σχηματίσει το ενεργό ετεροδιμερές HIF-2, το οποίο προσδένεται σε αλληλουχίες HRE στις περιοχές υποκινητή/ενισχυτή των γονιδίων στόχων του (όπως EPO και PAI-1) και να διεγείρει τη μεταγραφή τους.

Τα μέλη της οικογένειας των ERK1/2 είναι εξελικτικά συντηρημένα μέλη της οικογένειας κινασών σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές βιολογικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση και τη φλεγμονή (237). Η δυσλειτουργία των ERK1/2 εμπλέκεται σε μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος (24, 42). Στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ότι οι ERK1/2 τροποποιούν μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων (238, 239), συμπεριλαμβανομένου και του HIF-1α (111, 112). Τα ευρήματά μας προσθέτουν στη λίστα στόχευσης των ERK1/2 και τον HIF-2α συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη συνομιλία μεταξύ της σηματοδοτικής οδού των ERK1/2 και της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Συνολικά, όταν το μονοπάτι των ERK1/2 ενεργοποιείται (π.χ. σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται) προκειμένου τα κύτταρα να προσαρμοστούν στην υποξία, απαιτούν την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση των HIF, η οποία διασφαλίζεται με τη μετατόπιση της ισορροπίας υπέρ της πυρηνικής κατακράτησης της HIF-2α υπομονάδας, (μέσω της παρεμπόδισης της σύνδεσης του HIF-2α με τη CRM-1). Όταν η οδός των ERK1/2 είναι ανενεργή (π.χ. σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου), η επιτυχής προσαρμογή στην υποξία μπορεί να απαιτεί ασθενέστερη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων των HIF ή, εναλλακτικά, μια μη γενωμική, ενδεχομένως κυτταροπλασματική λειτουργία των HIF-α που θα είναι δυνατή με τη μετατόπιση της ισορροπίας υπέρ της πυρηνικής εξαγωγής της HIF-2α υπομονάδας (επιτρέποντας τη σύνδεση του HIF-α με τη CRM-1). Στην περίπτωση του HIF-1α, αναφέρθηκε πρόσφατα μια τέτοια μη γενωμική, κυτταροπλασματική λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 προκαλεί μείωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1 λόγω της μετατόπισης της α υπομονάδας του στο κυτταρόπλασμα. Εκεί ο HIF-1α που εξάγεται από τον πυρήνα, αλληλεπιδρά μέσω της μορταλίνης με άλλες πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης όπως η VDAC1 και η εξοκινάση II σχηματίζοντας, έτσι, ένα αντι-αποπτωτικό σύμπλοκο (240). Αυτό αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο ότι η ρύθμιση του πυρηνικού εκτοπισμού του HIF-2α από τις ERK1/2 μπορεί να χρησιμεύσει όχι μόνο στον διαχείριση της έκφρασης των γονιδίων στόχων του HIF-2, αλλά επίσης και στον έλεγχο κάποιας κυτταροπλασματικής λειτουργίας του HIF-2α. Στη βιβλιογραφία αναδείχθηκε

πρόσφατα ένα τέτοιο παράδειγμα μη-γενωμικής δράσης του HIF-2α που περιλαμβάνει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του HIF-2α με την πρωτεΐνη δέσμευσης στο RNA 4, (RBM4) και με παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, που λειτουργεί σαν ένας διακόπτης ρύθμισης της πρωτεϊνικής σύνθεσης από το οξυγόνο (129, 241). Σε πρόσφατες, αδημοσίευτες, παρατηρήσεις μας βρέθηκε ότι η μεταλλαγμένη μορφή του HIF-2α στην οποία έχει καταργηθεί η θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (σερίνη 672 σε αλανίνη), αλληλεπιδρά ειδικά με την πρωτεΐνη Ρεπτίνη52. Η Ρεπτίνη (Reptin52, RUVBL2, TIP48, TIP49b, Rvb2) είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη ΑΤΡάση της υπεροικογένειας AAA+ (ΑΤΡάσες που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες). Είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εντοπίζεται, άλλοτε στον πυρήνα και άλλοτε στο κυτταρόπλασμα. Έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου. Ταυτοποιήθηκε αρχικά, ως πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται στο ηπατοκαρκίνωμα και τον καρκίνο του ορθού. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι όταν η Ρεπτίνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, προάγει την μετανάστευση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (242). Τα πρώτα πειραματικά δεδομένα της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τη Ρεπτίνη δείχνουν ότι οι δυο πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ανενεργό (παρουσία U0126), γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει τη συμμετοχή του HIF-2α σε κάποιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που σχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η νέα αλληλεπίδραση καθώς και ο ρόλος της στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία θα πρέπει να απαντηθούν πολλά ερωτήματα. Θα πρέπει να αποσαφηνιστεί η επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 στην ισχύ της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τη Ρεπτίνη, ποιες δομικές επικράτειες των πρωτεϊνών συμμετέχουν στον σχηματισμό του συμπλόκου, καθώς και σε ποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα σχηματίζεται. Πρέπει να μελετηθεί η επίδραση της Ρεπτίνης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της. Τέλος, θα πρέπει να εξιχνιαστεί η επίδραση του συμπλόκου HIF-2α/Ρεπτίνης την λειτουργία και προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.

Συνοπτικά, στην πρώτη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ταυτοποιήθηκε ένας καινούριος μηχανισμός ρύθμισης του HIF-2 ανεξάρτητος από το οξυγόνο που περιλαμβάνει τον έλεγχο της εξαγωγής της HIF-2α υπομονάδας από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των ERK1/2 και συνεπώς μπορεί να συνδέσει τη μεταγραφική δράση του HIF-2 με την αυξημένη

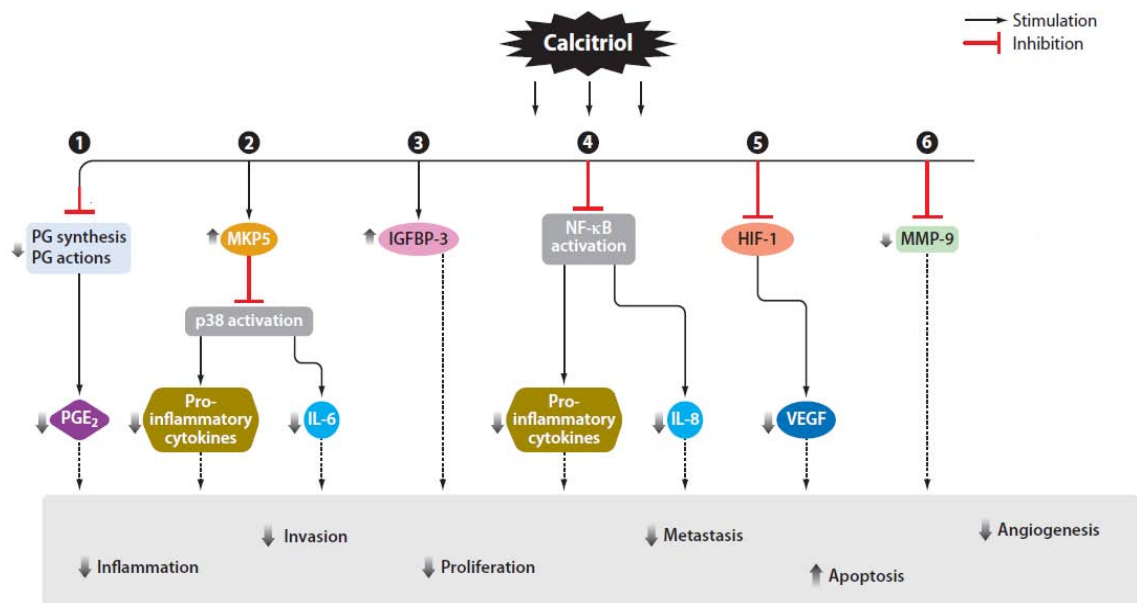
ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Επίσης, ταυτοποιήθηκε μια πλούσια σε λευκίνες υδρόφοβη αλληλουχία του HIF-2α, που περιέχει ένα άτυπο, εξαρτώμενο από τη CRM-1 σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES, η οποία "καλύπτεται" όταν η σερίνη 672 του HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2. Τέλος, ο νέος αυτός μηχανισμός, μας οδήγησε στην αποκάλυψη μια νέας αλληλεπίδρασης του HIF-2α με την Ρεπτίνη 52.

Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι ο HIF-2 διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ηπατοκαρκίνωμα (HCC) και στο νεφρικό καρκίνωμα (RCC) (243) ενώ πολλές ενώσεις που παρεμβαίνουν άμεσα στη λειτουργία του έχουν ελεγχθεί σε πειραματικές δοκιμές ως αντικαρκινικοί παράγοντες αλλά έχουν αποδειχθεί αναποτελεσματικοί (146). Η νέα ρυθμιστική σχέση μεταξύ ERK1/2 και HIF-2 που περιγράφεται στην παρούσα διατριβή παρέχει ένα εναλλακτικό μέσο για τον έλεγχο της δράσης του HIF-2 σε παθολογικές καταστάσεις που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω ως ένας πιθανός στόχος θεραπευτικής παρέμβασης. Παράλληλα, η εξιχνίαση ενός νέου μηχανισμού που βασίζεται σε μία άγνωστη, μέχρι στιγμής, πρωτεϊνική αλληλεπίδραση του HIF-2α θα συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του HIF-2 και τη διαφορική του ρύθμιση από τον HIF-1 στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

## 4.2 Ρύθμιση του HIF-2α από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

Δεδομένου ότι η υπερέκφραση των HIF-α υπομονάδων σχετίζεται με άσχημη εξέλιξη σε πολλούς τύπους καρκίνου, τα τελευταία χρόνια οι HIF αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως στόχοι αντικαρκινικών παρεμβάσεων (181). Υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα που καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της βιταμίνης D (185-188). Η βιοδραστική μορφή της βιταμίνης D είναι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D, που συνδέεται στον υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) και ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων. Οι περισσότερες βιολογικές δράσεις της 1,25(OH)<sub>2</sub>D είναι γενωμικές και διαμεσολαβούνται από τον VDR, που δρα κυρίως ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που περιέχουν στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνης D (VDREs) στην αλληλουχία του υποκινητή τους. Ωστόσο, βιβλιογραφικά δεδομένα αποδίδουν στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D και μη γενωμικές δράσεις, που είναι γρήγορες και περιλαμβάνουν τη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό της PI3K (κινάση της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης) (187), των κινασών MAPK, της CaMKII (κινάση πρωτεϊνών που εξαρτάται από το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης) και της PLC (φωσφολιπάση C) (183). Στόχοι αυτών των κινασών πρωτεϊνών είναι παράγοντες μεταγραφής, για παράδειγμα ο SP1

(πρωτεΐνη ειδικότητας 1), που δεσμεύονται στους υποκινητές γονιδίων στόχων τους και η έκφρασή τους κατά συνέπεια ρυθμίζεται έμμεσα από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Η αντικαρκινική δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D αποδίδεται κυρίως στην αναστολή την ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και διέγερσης της απόπτωσης (190) (Εικόνα 85). Ωστόσο, πολλοί μοριακοί μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D δεν έχουν αποσαφηνιστεί.



**Εικόνα 85:** Σχηματική αναπαράσταση σηματοδοτικών μονοπατιών δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D που διαμεσολαβούν τις αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της (244).

Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές καταδεικνύουν σημεία σύγκλισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τη δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D και των HIF. Ανάμεσα στα πολλά γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων HIF, συγκαταλέγεται και το γονίδιο της δισμουτάσης του υπεροξειδίου 2 (SOD2). Ειδικότερα, η SOD2 είναι γνωστό ότι αποτελεί ειδικό γονίδιο στόχο του HIF-2. Βιβλιογραφικές αναφορές έχουν δείξει ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D επάγει την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων SOD1 και SOD2 σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη LNCaP και PECs (207, 210). Έχει επίσης δειχθεί ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) (203) που έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας σε μεταγραφικό επίπεδο. Έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D εμπλέκεται σημαντικά στη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών πρωτεϊνών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις ERK1/2, οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία των HIF-1α (111, 112) και HIF-2α (228) υπομονάδων.

Συνεπώς, ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης των μονοπατιών της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  με τους HIF θα μπορούσε να αποτελεί η οδός ενεργοποίησης των ERK1/2 ή και άλλων κινασών πρωτεϊνών.

Υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Ειδικότερα, στον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α έχουν ταυτοποιηθεί στοιχεία απόκρισης στη βιταμίνη D (VDREs). Συνεπώς, η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  σε σύμπλοκο με τον ενεργοποιημένο VDR προσδένεται σε αυτά και ελέγχει την έκφραση του HIF-1α. Η πρώτη μελέτη της επίδρασης της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  στον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας πραγματοποιήθηκε το 2007 από τους Shoshan et al. (213). Σε αυτή τη μελέτη, αποκαλύφθηκε ότι ένα σημαντικό μέρος της αντι-αγγειογενετικής δράσης της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  διαμεσολαβείται από τον HIF-1. Ειδικότερα, αναφέρθηκε ότι η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προκαλεί μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης του HIF-1α με επακόλουθη μείωση της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και του ορθού. Έδειξαν ακόμη, ότι η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  δρα αναστέλλοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-1α και την επακόλουθη έκφραση ειδικών γονιδίων στόχων του, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων του VEGF, της ενδοθηλίνης 1 (ET-1) και του μεταφορέα της γλυκόζης 1 (Glut-1) στην καρκινική σειρά κυττάρων του πνεύμονα CL-1. Στην μελέτη αυτή ωστόσο, χρησιμοποιούνται αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  από 0,1 έως 1μM, που απέχουν πολύ από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης που παρατηρούνται στην κυκλοφορία. Αντίθετα, έχει επίσης δειχθεί ότι η  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  επάγει την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία) σε διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα και σε μακροφάγα (245).

Παρόλο που υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από τον τελικό βιοδραστικό μεταβολίτη της βιταμίνης D, την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , δεν υπάρχουν αναφορές που να συνδέουν την  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  με τον HIF-2α. Επιπλέον, οι ελάχιστες ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και συσχετίζουν την δράση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  με την λειτουργικότητα των HIF, έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, του ορθού ή σε κύτταρα του ανοσοποιητικού και πολλές από αυτές μόνο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Το ηπατοκαρκίνωμα (HCC) είναι ένας τύπος όγκου που η εξέλιξή του σχετίζεται με την παρουσία υποξικού μικροπεριβάλλοντος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη βιταμίνης D αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για την εξέλιξη του HCC και έχει καταδειχθεί στη βιβλιογραφία η αντι-πολλαπλασιαστική δράση της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  σε αυτόν τον τύπο καρκινικών κυττάρων (189). Έτσι, η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του δεύτερου μέλους της οικογένειας των HIF και λιγότερο μελετημένου HIF-2 από

την 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε καρκινικά κύτταρα, μπορεί να αποτελέσει ένα νέο σημαντικό εργαλείο για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, στη δεύτερη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, επιλέξαμε να μελετήσουμε την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, αλλά και να διερευνήσουμε την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στη ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας, προκειμένου να τη συγκρίνουμε με εκείνη του HIF-2α χρησιμοποιώντας ως μοντέλο ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα Huh7. Πιο συγκεκριμένα, στόχος μας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση της ενεργής μορφής της βιταμίνης D3, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, στο μονοπάτι ενεργοποίησης των HIF και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης των HIF-α υπομονάδων, της μεταγραφικής τους ενεργότητας και της επαγωγής της έκφρασης ειδικών γονιδίων-στόχων τους.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α υπομονάδων. Για το σκοπό αυτό, ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 επώαστηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 (20nM, 50nM και 100nM), σε νορμοξία και σε υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 8 και 24 ώρες και ελέγχθηκε η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α. Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης και των δύο HIF-α ισομορφών μετά από επώαση των κυττάρων με την 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 σε υποξία και στις δύο χρονικές περιόδους. Στη νορμοξία δεν παρατηρείται καμία μεταβολή των επιπέδων πρωτεΐνης των HIF-α. Η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης των HIF-α υπομονάδων σε υποξία, συμφωνεί με αυτή που είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία από τους (213) για την HIF-1α υπομονάδα. Ωστόσο, στην προηγούμενη μελέτη, χρησιμοποιούνται αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της 1,25(OH)<sub>2</sub>D, (0,1-1μM), που απέχουν πολύ από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης στην κυκλοφορία και από αυτές που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη (20nM-100nM). Να σημειωθεί επίσης ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-1α και HIF-2α μειώνονται σημαντικά μετά από επώαση των κυττάρων Huh7 με μόλις 20nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D σε συνθήκες υποξίας. Ακολούθως, θελήσαμε να διεκρινίσουμε εάν η πτώση των επιπέδων των HIF-α μετά από την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 έχει αντίκτυπο στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF με πειράματα λουσιφεράσης σε κύτταρα Huh7. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η μεταγραφική δράση των HIF αναστέλλεται σημαντικά παρουσία της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 στις 8 ώρες ενώ στις 24 ώρες δεν σημειώνεται στατιστικά σημαντική μεταβολή. Καθώς στα πειράματα δοκιμασίας της λουσιφεράσης χρησιμοποιούνται τα HRE του VEGF που αποτελεί κοινό γονίδιο στόχο των HIF, τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας που μετρώνται οφείλονται στη δράση και των δύο HIF ισομορφών. Προκειμένου να διεκρινίσουμε ποια HIF ισομορφή επηρεάζεται από την επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3

μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA ειδικών γονιδίων στόχων τους. Ειδικότερα, ελέγξαμε τη μεταγραφή του mRNA δύο ειδικών γονιδίων στόχων του HIF-2, της ερυθροποιητίνης (*EPO*) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (*PAI-1*) και ενός ειδικού γονιδίου στόχου του HIF-1α, της κινάσης του φωσφογλυκερικού *PGK1*, με ποσοτική RT-PCR. Στις 8 ώρες υποξίας παρουσία της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, παρατηρήθηκε μεγάλη πτώση των επιπέδων mRNA των γονιδίων στόχων του HIF-2α, *EPO* και *PAI-1*. Η μείωση αυτή εξακολουθεί να παρατηρείται στις 24 ώρες για το γονίδιο της *EPO*, αλλά όχι για τον *PAI-1*, όπου δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή. Όσον αφορά στον έλεγχο της επίδρασης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στη δράση του HIF-1, στις 8 ώρες υποξίας παρουσία της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου του HIF-1, *PGK-1*. Η μείωση αυτή εξακολουθεί να παρατηρείται στις 24 ώρες, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική. Οι διαφορές στην επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στη μεταγραφική ενεργότητα των HIF που παρατηρήσαμε ανάμεσα στις 8 και τις 24 ώρες, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να οφείλεται είτε στον καταβολισμό της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ή και την παραγωγή κάποιου άλλου μεταβολίτη της βιταμίνης.

Τα πειραματικά δεδομένα της δεύτερης ενότητας της διδακτορικής διατριβής, υποδεικνύουν ότι η δράση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> είναι καθοριστικής σημασίας για λειτουργία των HIF σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (**Εικόνα 86**). Τα αποτελέσματά μας συγκλίνουν με αυτά που είχαν προταθεί από τους (213) όσον αφορά στη ρύθμιση της HIF-1α υπομονάδας από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ωστόσο, δείχνουμε για πρώτη φορά ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> επιδρά στη λειτουργία του λιγότερου μελετημένου HIF-2. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Κεχαγιά υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθ. Ιατρικής Χημείας Ανδρέα Τσακάλωφ και μέρος των αποτελεσμάτων παρουσιάστηκε στη μεταπτυχιακή εργασία της κας. Κεχαγιά με τίτλο «Μηχανισμοί της αντι-καρκινικής δράσης της βιταμίνης D: ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 και HIF-2».



ΝΟΡΜΟΞΙΑ	1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25(OH) <sub>2</sub> D	ΥΠΟΞΙΑ	1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25(OH) <sub>2</sub> D
	8 Ωρες	24 Ωρες		8 Ωρες	24 Ωρες
Επίπεδα πρωτεΐνης HIF-1α και HIF-2α	—	—	Επίπεδα πρωτεΐνης HIF-1α και HIF-2α	↓	↓
HIF εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση HRE-VEGF	—	—	HIF εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση HRE-VEGF	↓	—
Επίπεδα mRNA EPO,PAI-1	—	—	Επίπεδα mRNA EPO,PAI-1	↓	—
Επίπεδα mRNA PGK-1	—	—	Επίπεδα mRNA PGK-1	↓	—

**Εικόνα 86 : Σύνοψη των αποτελεσμάτων ρύθμισης της δράσης των HIF από την 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 σε νορμοξία και υποξία.**

Σε νορμοξία, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α υπομονάδων και στη μεταγραφική δράση των HIF. Σε υποξία, η 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α υπομονάδων στις 8 και 24 ώρες. Σε υποξία η 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, μειώνει στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφική δράση των HIF στις 8 ώρες.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό επίδρασης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 στη λειτουργία των HIF. Ειδικότερα, επιδιώξαμε να ελέγξουμε αν η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 στη ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων οφείλεται στη γενωμική της δράση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης του υποδοχέα της βιταμίνης D3 (VDR), σε συνθήκες υποξίας και ελέγχθηκε η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 στα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α και την μεταγραφική ενεργότητα των HIF. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δείχνουν ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης των HIF-α και τη μεταγραφική δράση των HIF σε υποξία με τρόπο που δεν εξαρτάται από τον VDR. Πιθανώς, η επίδραση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 στη λειτουργία των HIF είναι μη γενωμική και περιλαμβάνει την έμμεση ρύθμιση των HIF από κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι που η λειτουργία του ελέγχεται από τα επίπεδα της ορμόνης. Πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2, αποκαλύπτει ότι η 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους μέσω ενεργοποίησης της φωσφατάσης PTEN και επακόλουθη αναστολή του μονοπατιού PI3K/Akt (187). Το μονοπάτι PI3K/Akt είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της μετάφρασης των HIF-α υπομονάδων. Δεδομένου ότι τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν τη ρύθμιση των HIF-α σε επίπεδο πρωτεΐνης, ένα πιθανό σηματοδοτικό μονοπάτι που μπορεί να

εμπλέκεται σε αυτή τη ρύθμιση είναι η οδός PI3K/Akt/mTOR. Ωστόσο, παρατηρείται ότι η αποσιώπηση του VDR χωρίς την ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφικής δράσης των HIF. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού μηχανισμού την μεταγραφικής δράσης των HIF από τον VDR που δεν απαιτεί την πρόσδεση του συνδέτη του 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Μια υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι ο VDR απουσία του συνδέτη του να βρίσκεται καθηλωμένος είτε στον υποκινητή των γονιδίων των HIF-α, ή στους υποκινητές μεταγραφικών στόχων των HIF. Η υπόθεση αυτή μπορεί να ελεγχθεί μελλοντικά με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Έχει επίσης προταθεί, ότι ο VDR δημιουργώντας σύμπλοκο με την πρωτεΐνη IKKβ, οδηγεί σε απενεργοποίηση του NF-κB, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί ενεργοποιεί μεταγραφικά τον HIF-1(246). Το γεγονός ότι παρατηρούμε αύξηση της δράσης των HIF μετά από την αποσιώπηση του VDR μπορεί να εξηγείται από αυτόν τον μηχανισμό. Σε κάθε περίπτωση, τόσο ο μηχανισμός δράσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, όσο και του VDR στη λειτουργία των HIF χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D είναι καθοριστικής σημασίας για την λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων HIF σε συνθήκες υποξίας. Έτσι, θεωρούμε ότι είναι πολύ σημαντικό να συνεχιστεί η μελέτη της επίδρασης της 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στους HIF και για την πλήρη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που προσδίδουν στην 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> αντικαρκινικές ιδιότητες σε κύτταρα που βρίσκονται και επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kumar H, Choi DK. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm.* 2015,2015:584758.
2. Samanta D, Prabhakar NR, Semenza GL. Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2017,9(4).
3. 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 U S A.* 1995,92(12):5510-4.
4. 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(3):205-13.
5. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997,11(1):72-82.
6. 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 U S A.* 1997,94(9):4273-8.
7. Iyer NV, Leung SW, Semenza GL. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* 1998,52(2):159-65.
8. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002,295(5556):858-61.
9. Hoffman DW, Query CC, Golden BL, White SW, Keene JD. RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991,88(6):2495-9.
10. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol.* 2010,72:625-45.
11. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int Rev Cytol.* 2005,242:157-213.
12. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005,37(3):535-40.
13. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev.* 1997,63(1):51-60.
14. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 1997,272(13):8581-93.
15. Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem.* 1996,271(35):21262-7.
16. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell.* 2007,18(11):4528-42.
17. Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene.* 2001,20(12):1435-44.
18. Beaudry M, Hidalgo M, Launay T, Bello V, Darribere T. Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. *J Cell Sci.* 2016,129(15):2887-96.

19. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003,17(2):271-3.
20. Taylor SE, Bagnall J, Mason D, Levy R, Fernig DG, See V. Differential sub-nuclear distribution of hypoxia-inducible factors (HIF)-1 and -2 alpha impacts on their stability and mobility. *Open Biol.* 2016,6(9).
21. Pawlus MR, Wang L, Murakami A, Dai G, Hu CJ. STAT3 or USF2 contributes to HIF target gene specificity. *PLoS One.* 2013,8(8):e72358.
22. Martin AS, Castaneda Patlan MC, Robles Flores M. The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance. *Journal of Cell Signaling.* 2017,02(03).
23. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J.* 2005,19(11):1396-406.
24. Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep.* 2015,12(2):2411-6.
25. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001,287(4):808-13.
26. Zhang P, Yao Q, Lu L, Li Y, Chen PJ, Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* 2014,6(6):1110-21.
27. Hankinson O. Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol Sci.* 2008,103(1):1-3.
28. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008,15(4):678-85.
29. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2008,1783(3):394-404.
30. Mandl M, Depping R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol Med.* 2014,20:215-20.
31. Mandl M, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K. Hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta) is upregulated in a HIF-1alpha-dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013,434(1):166-72.
32. Wolff M, Jelkmann W, Dunst J, Depping R. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics. *Cell Physiol Biochem.* 2013,32(4):849-58.
33. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2018,233(12):9087-98.
34. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008,30(4):393-402.
35. Loenarz C, Schofield CJ. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci.* 2011,36(1):7-18.
36. Rytönen KT, Storz JF. Evolutionary origins of oxygen sensing in animals. *EMBO Rep.* 2011,12(1):3-4.
37. Chowdhury R, McDonough MA, Mecinovic J, Loenarz C, Flashman E, Hewitson KS, et al. Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases. *Structure.* 2009,17(7):981-9.

38. Shen C, Kaelin WG, Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2013,23(1):18-25.
39. Masson N, Singleton RS, Sekirnik R, Trudgian DC, Ambrose LJ, Miranda MX, et al. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep.* 2012,13(3):251-7.
40. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001,107(1):43-54.
41. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 2003,22(16):4082-90.
42. Kim SY, Yang EG. Recent Advances in Developing Inhibitors for Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylases and Their Therapeutic Implications. *Molecules.* 2015,20(11):20551-68.
43. Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol.* 2002,80(4):421-6.
44. Aragones J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, et al. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet.* 2008,40(2):170-80.
45. Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Kiss J, Aragones J, Mazzone M, et al. Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2010,138(3):1143-54 e1-2.
46. Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol.* 2006,26(22):8336-46.
47. Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, Cullen D, Bronson RT, Kaelin WG, Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood.* 2008,111(6):3236-44.
48. Takeda K, Fong GH. Prolyl hydroxylase domain 2 protein suppresses hypoxia-induced endothelial cell proliferation. *Hypertension.* 2007,49(1):178-84.
49. Oriowo B, Thirunavukkarasu M, Selvaraju V, Adluri RS, Zhan L, Takeda K, et al. Targeted gene deletion of prolyl hydroxylase domain protein 3 triggers angiogenesis and preserves cardiac function by stabilizing hypoxia inducible factor 1 alpha following myocardial infarction. *Curr Pharm Des.* 2014,20(9):1305-10.
50. Oliver KM, Taylor CT, Cummins EP. Hypoxia. Regulation of NFkappaB signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res Ther.* 2009,11(1):215.
51. Lee B, Kwon E, Kim Y, Kim JH, Son SW, Lee JK, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates HIF-1 and TREM-1 via mTOR signaling. *Immunol Lett.* 2015,163(1):14-21.
52. Place TL, Domann FE. Prolyl-hydroxylase 3: Evolving Roles for an Ancient Signaling Protein. *Hypoxia (Auckl).* 2013,2013(1):13-7.
53. Klotzsche-von Ameln A, Prade I, Grosser M, Kettelhake A, Rezaei M, Chavakis T, et al. PHD4 stimulates tumor angiogenesis in osteosarcoma cells via TGF-alpha. *Mol Cancer Res.* 2013,11(11):1337-48.
54. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004,279(37):38458-65.
55. Minamishima YA, Moslehi J, Padera RF, Bronson RT, Liao R, Kaelin WG, Jr. A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol.* 2009,29(21):5729-41.

56. Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2008,1(1):53-68.
57. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009,417(1):1-13.
58. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 2005,1(6):401-8.
59. Brown ST, Nurse CA. Induction of HIF-2alpha is dependent on mitochondrial O2 consumption in an O2-sensitive adrenomedullary chromaffin cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008,294(6):C1305-12.
60. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 2007,12(2):108-13.
61. Block K, Gorin Y, Hoover P, Williams P, Chelmicki T, Clark RA, et al. NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression. *J Biol Chem.* 2007,282(11):8019-26.
62. Yuan G, Khan SA, Luo W, Nanduri J, Semenza GL, Prabhakar NR. Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia. *J Cell Physiol.* 2011,226(11):2925-33.
63. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol.* 2008,217(3):674-85.
64. Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, et al. Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009,106(4):1199-204.
65. Samanta D, Semenza GL. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biol.* 2017,13:331-5.
66. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010,24(5):491-501.
67. Cui J, Duan B, Zhao X, Chen Y, Sun S, Deng W, et al. MBD3 mediates epigenetic regulation on EPAS1 promoter in cancer. *Tumour Biol.* 2016,37(10):13455-67.
68. Mohlin S, Hamidian A, von Stedingk K, Bridges E, Wigerup C, Bexell D, et al. PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2015,75(21):4617-28.
69. Moniz S, Bandarra D, Biddlestone J, Campbell KJ, Komander D, Bremm A, et al. Cezanne regulates E2F1-dependent HIF2alpha expression. *J Cell Sci.* 2015,128(16):3082-93.
70. Nakazawa MS, Eisinger-Mathason TS, Sadri N, Ochocki JD, Gade TP, Amin RK, et al. Epigenetic re-expression of HIF-2alpha suppresses soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun.* 2016,7:10539.
71. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2011,12(1):9-22.
72. Gao W, Li JZ, Chan JY, Ho WK, Wong TS. mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. *ISRN Otolaryngol.* 2012,2012:953089.
73. Nayak BK, Feliars D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, et al. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene.* 2013,32(26):3147-55.
74. Toschi A, Edelstein J, Rockwell P, Ohh M, Foster DA. HIF alpha expression in VHL-deficient renal cancer cells is dependent on phospholipase D. *Oncogene.* 2008,27(19):2746-53.
75. Percy MJ, Sanchez M, Swierczek S, McMullin MF, Mojica-Henshaw MP, Muckenthaler MU, et al. Is congenital secondary erythrocytosis/polycythemia caused by

- activating mutations within the HIF-2 alpha iron-responsive element? *Blood*. 2007,110(7):2776-7.
76. Zimmer M, Ebert BL, Neil C, Brenner K, Papaioannou I, Melas A, et al. Small-molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell*. 2008,32(6):838-48.
77. Zimmer M, Lamb J, Ebert BL, Lynch M, Neil C, Schmidt E, et al. The connectivity map links iron regulatory protein-1-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor-2a translation to the anti-inflammatory 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Cancer Res*. 2010,70(8):3071-9.
78. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science*. 2009,324(5932):1289-93.
79. Chen R, Dioum EM, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J Biol Chem*. 2011,286(16):13869-78.
80. Chen R, Xu M, Hogg RT, Li J, Little B, Gerard RD, et al. The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *J Biol Chem*. 2012,287(36):30800-11.
81. Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001,2(3):202-10.
82. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*. 2010,38(6):1922-31.
83. To KK, Sedelnikova OA, Samons M, Bonner WM, Huang LE. The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J*. 2006,25(20):4784-94.
84. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*. 2002,277(26):23508-14.
85. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004,383(Pt. 3):429-37.
86. Pangou E, Befani C, Mylonis I, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. HIF-2alpha phosphorylation by CK1delta promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci*. 2016,129(22):4213-26.
87. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*. 2010,123(Pt 17):2976-86.
88. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cell Signal*. 2015,27(6):1129-40.
89. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002,298(5600):1912-34.
90. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell*. 2000,100(1):113-27.
91. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004,117(6):699-711.
92. Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res*. 2011,2011:329098.
93. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011,75(1):50-83.

94. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007,26(22):3279-90.
95. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*. 1999,19(4):2435-44.
96. Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv*. 2014,32(1):40-52.
97. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*. 2011,2(3):195-209.
98. Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? *J Biol*. 2006,5(5):13.
99. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 1993,268(20):14553-6.
100. Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*. 1999,13(2):163-75.
101. Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E. Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem*. 2001,276(45):41755-60.
102. Whitehurst AW, Wilsbacher JL, You Y, Luby-Phelps K, Moore MS, Cobb MH. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002,99(11):7496-501.
103. Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, Livnah O, Seger R. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2011,31(17):3515-30.
104. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2011,1813(9):1619-33.
105. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 2006,24(1):21-44.
106. Cesari F, Brecht S, Vintersten K, Vuong LG, Hofmann M, Klingel K, et al. Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol Cell Biol*. 2004,24(1):294-305.
107. Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem*. 2011,80:437-71.
108. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol*. 2002,4(8):556-64.
109. Okazaki K, Sagata N. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J*. 1995,14(20):5048-59.
110. Morton S, Davis RJ, McLaren A, Cohen P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J*. 2003,22(15):3876-86.
111. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem*. 2008,283(41):27620-7.
112. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, 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):33095-106.
113. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008,9(10):747-58.



114. Asano E, Maeda M, Hasegawa H, Ito S, Hyodo T, Yuan H, et al. Role of palladin phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in cell migration. *PLoS One*. 2011,6(12):e29338.
115. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*. 1997,137(2):481-92.
116. Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hu CJ. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF2alpha) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2012,32(22):4595-610.
117. Befani C, Mylonis I, Gkotinakou IM, Georgoulas P, Hu CJ, Simos G, et al. Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013,45(11):2359-68.
118. Muller JM, Cahill MA, Rupec RA, Baeuerle PA, Nordheim A. Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *Eur J Biochem*. 1997,244(1):45-52.
119. Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*. 2006,66(11):5641-7.
120. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem*. 2005,280(14):14240-51.
121. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005,6(8):635-45.
122. Nilsson MB, Zage PE, Zeng L, Xu L, Cascone T, Wu HK, et al. Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1alpha and HIF-2alpha in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors. *Oncogene*. 2010,29(20):2938-49.
123. Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000,97(7):3260-5.
124. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*. 2003,17(9):1115-29.
125. Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, et al. HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*. 2008,14(6):435-46.
126. Koh MY, Lemos R, Jr., Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*. 2011,71(11):4015-27.
127. Koh MY, Nguyen V, Lemos R, Jr., Darnay BG, Kiriakova G, Abdelmelek M, et al. Hypoxia-induced SUMOylation of E3 ligase HAF determines specific activation of HIF2 in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2015,75(2):316-29.
128. Chen L, Uchida K, Endler A, Shibasaki F. Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. *J Biol Chem*. 2007,282(17):12707-16.
129. Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, Fabian MR, et al. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature*. 2012,486(7401):126-9.
130. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*. 1998,12(21):3320-4.

131. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000,97(15):8386-91.
132. Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*. 2002,8(7):702-10.
133. Doedens A, Johnson RS. Transgenic models to understand hypoxia-inducible factor function. *Methods Enzymol*. 2007,435:87-105.
134. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008,9(4):285-96.
135. Lin TY, Chou CF, Chung HY, Chiang CY, Li CH, Wu JL, et al. Hypoxia-inducible factor 2 alpha is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the zebrafish embryo. *PLoS One*. 2014,9(7):e101980.
136. Gruber M, Mathew LK, Runge AC, Garcia JA, Simon MC. EPAS1 Is Required for Spermatogenesis in the Postnatal Mouse Testis. *Biol Reprod*. 2010,82(6):1227-36.
137. Zimmermann C, Stevant I, Borel C, Conne B, Pitetti JL, Calvel P, et al. Research resource: the dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Mol Endocrinol*. 2015,29(4):627-42.
138. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010,299(1):F1-13.
139. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, et al. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*. 2005,105(8):3133-40.
140. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*. 2003,102(5):1634-40.
141. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*. 2007,117(4):1068-77.
142. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2006,26(37):9471-81.
143. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J*. 2004,18(12):1462-4.
144. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*. 2011,589(Pt 6):1251-8.
145. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. 2010,116(16):3039-48.
146. Zhao J, Du F, Shen G, Zheng F, Xu B. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell Death Dis*. 2015,6:e1600.
147. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*. 2005,25(13):5675-86.
148. Menrad H, Werno C, Schmid T, Copanaki E, Deller T, Dehne N, et al. Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*. 2010,51(6):2183-92.
149. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009,106(50):21306-11.

150. Xue X, Shah YM. Hypoxia-inducible factor-2alpha is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis*. 2013,34(1):163-9.
151. Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, Mino-Kenduson M, et al. HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer. *Int J Cancer*. 2009,124(4):763-71.
152. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*. 2013,35(11):965-73.
153. Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, Dang LH. Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1alpha and HIF-2alpha target genes. *Mol Cancer*. 2010,9:293.
154. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*. 2003,278(9):7520-30.
155. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem*. 2003,278(47):46230-40.
156. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006,6(7):521-34.
157. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*. 2002,64(2):326-33.
158. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 2004,276(1):101-10.
159. Sato M, Tanaka T, Maemura K, Uchiyama T, Sato H, Maeno T, et al. The PAI-1 gene as a direct target of endothelial PAS domain protein-1 in adenocarcinoma A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004,31(2):209-15.
160. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, et al. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009,106(26):10684-9.
161. Le Bras A, Lionneton F, Mattot V, Lelievre E, Caetano B, Spruyt N, et al. HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene*. 2007,26(53):7480-9.
162. Befani C, Liakos P. Hypoxia upregulates integrin gene expression in microvascular endothelial cells and promotes their migration and capillary-like tube formation. *Cell Biol Int*. 2017,41(7):769-78.
163. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009,114(2):469-77.
164. Luan Y, Gao C, Miao Y, Li Y, Wang Z, Qiu X. Clinicopathological and prognostic significance of HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in small cell lung cancer. *Pathol Res Pract*. 2013,209(3):184-9.
165. Wang HX, Qin C, Han FY, Wang XH, Li N. HIF-2alpha as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet Mol Res*. 2014,13(2):2817-26.
166. Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, et al. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*. 2009,119(8):2160-70.
167. Carew JS, Esquivel JA, 2nd, Espitia CM, Schultes CM, Mulbaier M, Lewis JD, et al. ELR510444 inhibits tumor growth and angiogenesis by abrogating HIF activity and disrupting microtubules in renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2012,7(1):e31120.

168. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*. 2003,3(4):363-75.
169. Puppo M, Battaglia F, Ottaviano C, Delfino S, Ribatti D, Varesio L, et al. Topotecan inhibits vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity induced by hypoxia in human neuroblastoma by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha. *Mol Cancer Ther*. 2008,7(7):1974-84.
170. Selvarajah J, Nathawat K, Moumen A, Ashcroft M, Carroll VA. Chemotherapy-mediated p53-dependent DNA damage response in clear cell renal cell carcinoma: role of the mTORC1/2 and hypoxia-inducible factor pathways. *Cell Death Dis*. 2013,4:e865.
171. Scheuermann TH, Li Q, Ma HW, Key J, Zhang L, Chen R, et al. Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol*. 2013,9(4):271-6.
172. Scheuermann TH, Stroud D, Sleet CE, Bayeh L, Shokri C, Wang H, et al. Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2. *J Med Chem*. 2015,58(15):5930-41.
173. Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, Guo Y, Bruick RK, Gardner KH. Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009,106(2):450-5.
174. Guan Y, Reddy KR, Zhu Q, Li Y, Lee K, Weerasinghe P, et al. G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1alpha and HIF-2alpha and block tumor growth. *Mol Ther*. 2010,18(1):188-97.
175. Joshi S, Singh AR, Durden DL. Pan-PI-3 kinase inhibitor SF1126 shows antitumor and antiangiogenic activity in renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015,75(3):595-608.
176. Kong HS, Lee S, Beebe K, Scroggins B, Gupta G, Lee MJ, et al. Emetine promotes von Hippel-Lindau-independent degradation of hypoxia-inducible factor-2alpha in clear cell renal carcinoma. *Mol Pharmacol*. 2010,78(6):1072-8.
177. Fath DM, Kong X, Liang D, Lin Z, Chou A, Jiang Y, et al. Histone deacetylase inhibitors repress the transactivation potential of hypoxia-inducible factors independently of direct acetylation of HIF-alpha. *J Biol Chem*. 2006,281(19):13612-9.
178. Gonzalez-Flores A, Aguilar-Quesada R, Siles E, Pozo S, Rodriguez-Lara MI, Lopez-Jimenez L, et al. Interaction between PARP-1 and HIF-2alpha in the hypoxic response. *Oncogene*. 2014,33(7):891-8.
179. Neelam S, Brooks MM, Cammarata PR. Lenticular cytoprotection. Part 1: the role of hypoxia inducible factors-1alpha and -2alpha and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell survival in hypoxia. *Mol Vis*. 2013,19:1-15.
180. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016,539(7627):112-7.
181. Wallace EM, Rizzi JP, Han G, Wehn PM, Cao Z, Du X, et al. A Small-Molecule Antagonist of HIF2alpha Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2016,76(18):5491-500.
182. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005,97(1-2):93-101.
183. Lindh JD, Bjorkhem-Bergman L, Eliasson E. Vitamin D and drug-metabolising enzymes. *Photochem Photobiol Sci*. 2012,11(12):1797-801.
184. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016,8(3):135.
185. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. 2010,31(12):1027-34.
186. Narayanan R, Sepulveda VA, Falzon M, Weigel NL. The functional consequences of cross-talk between the vitamin D receptor and ERK signaling pathways are cell-specific. *J Biol Chem*. 2004,279(45):47298-310.

187. Huang J, Yang G, Huang Y, Zhang S. Inhibitory effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells through the downregulation of HDAC2. *Oncol Rep.* 2017,38(3):1845-50.
188. Doroudi M, Plaisance MC, Boyan BD, Schwartz Z. Membrane actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> are mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in bone and cartilage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015,145:65-74.
189. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014,14(5):342-57.
190. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control.* 2005,16(2):83-95.
191. Pilz S. Vitamin D and cancer: current evidence and future perspective. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013,13(1):2-3.
192. Gonzalez-Sancho JM, Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Palmer HG, Munoz A. Effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 2006,26(4A):2669-81.
193. Moreno J, Krishnan AV, Feldman D. Molecular mechanisms mediating the anti-proliferative effects of Vitamin D in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005,97(1-2):31-6.
194. Stewart LV, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004,229(4):277-84.
195. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer J.* 2010,16(1):1-9.
196. Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, Weigel NL. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G<sub>1</sub>. *Endocrinology.* 1997,138(4):1491-7.
197. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, Swami S, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: role of anti-inflammatory activity. *J Bone Miner Res.* 2007,22 Suppl 2:V74-80.
198. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D<sub>3</sub> leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 1996,10(2):142-53.
199. Yang ES, Burnstein KL. Vitamin D inhibits G<sub>1</sub> to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem.* 2003,278(47):46862-8.
200. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology.* 2000,141(1):10-7.
201. Reitsma PH, Rothberg PG, Astrin SM, Trial J, Bar-Shavit Z, Hall A, et al. Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. *Nature.* 1983,306(5942):492-4.
202. Rohan JN, Weigel NL. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G<sub>1</sub> accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2009,150(5):2046-54.
203. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2008,18(1):3-10.
204. Lucia MS, Torkko KC. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. *J Urol.* 2004,171(2 Pt 2):S30-4; discussion S5.
205. Mantovani A, Pierotti MA. Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett.* 2008,267(2):180-1.
206. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase

- phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res.* 2006,66(8):4516-24.
207. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005,65(17):7917-25.
208. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant.* 2006,21(4):889-97.
209. Harant H, Wolff B, Lindley IJ. 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 decreases DNA binding of nuclear factor-kappaB in human fibroblasts. *FEBS Lett.* 1998,436(3):329-34.
210. Yu XP, Bellido T, Manolagas SC. Down-regulation of NF-kappa B protein levels in activated human lymphocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995,92(24):10990-4.
211. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995,1(1):27-31.
212. Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003,2(10):803-11.
213. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabeesh NJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007,6(4):1433-9.
214. Lambert JR, Kelly JA, Shim M, Huffer WE, Nordeen SK, Baek SJ, et al. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol.* 2006,208(3):566-74.
215. Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, Seto E, Krishnan AV, Brooks JD, et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004,92(3):131-41.
216. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003,17(14):2115-7.
217. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 2008,453(7196):807-11.
218. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007,18(12):4691-7.
219. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005,19(11):2685-95.
220. Phillips TA, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Ion gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. *J Bacteriol.* 1984,159(1):283-7.
221. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem.* 2007,20(6):995-1006.
222. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976,72:248-54.
223. J.H. M. Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. *Anal Biochem.* 1981,117:307-10.

224. Hunter T. Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues. *Curr Opin Cell Biol.* 1989,1(6):1168-81.
225. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005,6(4):279-84.
226. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001,25(4):402-8.
227. Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem.* 1999,274(47):33709-13.
228. Gkotinakou IM, Befani C, Simos G, Liakos P. ERK1/2 phosphorylates HIF-2alpha and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling. *J Cell Sci.* 2019,132(7).
229. Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature.* 2016,534(7605):55-62.
230. Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004,317(2):545-50.
231. Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2002,22(16):5835-45.
232. Zhang Y, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science.* 2001,292(5523):1910-5.
233. Gorlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999,15:607-60.
234. Bernhofer M, Goldberg T, Wolf S, Ahmed M, Zaugg J, Boden M, et al. NLSdb-major update for database of nuclear localization signals and nuclear export signals. *Nucleic Acids Res.* 2018,46(D1):D503-D8.
235. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem.* 1997,272(31):19253-60.
236. Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA.* 2001,7(9):1348-61.
237. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 2012,92(2):689-737.
238. Monje P, Hernandez-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem.* 2005,280(42):35081-4.
239. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012,66(2):105-43.
240. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci.* 2017,130(2):466-79.
241. Timpano S, Uniacke J. Human Cells Cultured under Physiological Oxygen Utilize Two Cap-binding Proteins to recruit Distinct mRNAs for Translation. *J Biol Chem.* 2016,291(20):10772-82.
242. Mao Y-Q, Houry WA. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2017,4.
243. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology.* 2012,55(2):622-33.
244. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011,51:311-36.

245. Lee SH, Jeong HM, Han Y, Cheong H, Kang BY, Lee KY. Prolyl isomerase Pin1 regulates the osteogenic activity of Osterix. *Mol Cell Endocrinol.* 2015,400:32-40.
246. Chen Y, Zhang J, Ge X, Du J, Deb DK, Li YC. Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kappaB activation by interacting with IkappaB kinase beta protein. *J Biol Chem.* 2013,288(27):19450-8.