

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΙΑΣ

10

ΚΑΛΟΕΙΔΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ
ΦΟΙΤΗΤΗ ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

*ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ: ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-1 α*

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ
31/07/02
2399

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2002

ερ. ειλ. 1019002



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

Αριθ. Εισ.: 1592/1
Ημερ. Εισ.: 3-2-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2002
ΚΑΛ

*Η παρούσα πτυχιακή πειραματική εργασία εκπονήθηκε στο
Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής
Σχολής Λάρισας υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του
Επίκουρου καθηγητή Γεώργιου Σίμου*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Επίκουρος καθηγήτρια	Γεωργιάτσου Ελένη
Λέκτορας	Παρασκευά Ευφροσύνη
Επίκουρος καθηγητής	Σίμος Γεώργιος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην πτυχιακή αυτή εργασία, πέρα από την προσωπική μου προσπάθεια, θεωρώ καθοριστική και την συνεισφορά συγκεκριμένων προσώπων χωρίς την αρωγή των οποίων δεν θα μπορούσε να ευοδωθεί η συγκεκριμένη προσπάθεια.

Μεταξύ των προσώπων αυτών θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω, πρώτα και κύρια, τον επ. καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο, ο οποίος και είχε την επίβλεψη της εργασίας αυτής, για την άοκνη καθοδήγηση τις επανειλημμένες παρατηρήσεις και την καθοριστική βοήθεια, που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Η παρουσία του, εκτός του ότι συνετέλεσε καθοριστικά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, έγινε και αφορμή για την απόκτηση πολύτιμης εμπειρίας και γνώσης.

Αναμφισβήτητα, μοναδική και πολύτιμη υπήρξε και η συμπαράσταση της υπευθύνου του εργαστηρίου Βιοχημείας και πρόεδρο του τμήματος ΠΣΕ Ιατρικής Βιοχημείας αν. καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Σοφία Μπονάνου την οποία οφείλω να ευχαριστήσω και για όλη την πολυσήμαντη προσφορά της κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, επιθυμώ να ευχαριστήσω την επ. καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας και ερευνητικό μέλος του Εργαστηρίου Βιοχημείας κ. Έλενα Γεωργάτσου για τις εύστοχες παρατηρήσεις και την βοήθεια της κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Επίσης το μέλος της τριμελούς επιτροπής Λέκτορα Φυσιολογίας κ. Ευφροσύνη Παρασκευά η οποία και μας έδωσε πολύτιμες συμβουλές καθώς και από την οποία δανειστήκαμε πέρα από την εμπειρία στα συγκεκριμένα πειράματα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και κάποια αντιδραστήρια που αφορούσαν την ιμφορτίνη snouprortin-1.

Τέλος, δε θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα ερευνητικά μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας κ.κ. : Παρασκευή Μηνά, Μάνο Βενιέρη, Ρασσέλ Κοέν, Τριανταφύλλου Νατάσσα για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Ιδιαίτερα, δε, την ερευνήτρια κ. Παρασκευή Μηνά η οποία με προθυμία και υπευθυνότητα ανάλαβε την καθοδήγηση μου κατά τη διάρκεια πολλών πειραμάτων, ειδικά στο ξεκίνημα της εργασίας μου όπου και με μεγάλη υπομονή απαντούσε στις συνεχείς ερωτήσεις και απορίες μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 1
SUMMARY	σελ. 2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ 3
Α) ο HIF-1α και η σχέση του με την υποξία	σελ 3
Β) Γονίδια στόχοι του HIF-1α	σελ. 5
Γ) Μηχανισμοί μεταγωγής του σήματος της υποξίας και ενεργοποίησης του HIF-1α	σελ 6
Δ) Ο HIF-1α είναι απαραίτητος κατά την εμβρυογένεση	σελ. 8
Ε) Ο HIF-1α σχετίζεται με την προαγωγή της καρκινογένεσης	σελ. 9
ΣΚΟΠΟΣ	σελ. 12
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	σελ. 13
Α) Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	σελ. 13
Β) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	σελ. 13
Γ) Παραλαβή και καθαρισμός από την πηκτή αγαρόζης θραύσματος DNA.	σελ. 15
Δ) Παρασκευή κυττάρων E.Coli δεκτικών(competent) στην εισαγωγή πλασμιδίων.	σελ. 17
Ε) Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμίδιο (αντίδραση λιγάσης).	σελ. 18
ΣΤ) Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων (E.Coli).	σελ. 19
Ζ) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini-preparation).	σελ. 19
Η) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midi-Preparation).	σελ. 20
Θ) Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσω IPTG σε E.Coli.	σελ. 22
Ι) Πηκτές πολυακρυλαμιδίου - ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE).	σελ. 23
ΙΑ) Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western-blotting)	σελ. 28
ΙΒ) Επώαση με αντίσωμα – ανοσοενζυμικοί μέθοδοι (χρωματική αντίδραση και μέθοδος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας-ECL).	σελ. 30

ΙΓ) Καθαρισμός ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας.	σελ. 31
ΙΔ) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων.	σελ. 33
ΙΕ) πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης.	σελ 34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 36
Α) Υποκλωνοποίηση του αναγνωστικού πλαισίου (ORF) του γονιδίου του HIF-1α από το protA-pQE-60 στο pQE-60.	σελ. 36
Β) Μετασηματισμός των E.Coli με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pQE-60+HIF-1α και protA-pQE-60 + HIF-1α – επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α .	σελ. 44
Γ) Επανάληψη του πειράματος επαγωγής του HIF-1α και επιπλέον επαγωγή της έκφρασης της snourportin-1.	σελ. 46
Δ) καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας.	σελ. 49
Δ1) καθαρισμός της snourportin-1	σελ. 49
Δ2) καθαρισμός του protA-HIF-1α	σελ. 52
Δ3) καθαρισμός του HIF-1α	σελ. 54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-1α είναι ένα πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από 826 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος, περίπου, 93kD. Ο HIF-1α επίσης, αποτελεί τη μία από τις δύο υπομονάδες- η άλλη είναι ο HIF-1β - που συναποτελούν το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, ο οποίος, ρυθμίζει την κυτταρική απόκριση στην υποξία.

Στην παρούσα πειραματική εργασία, εκφράσαμε τον HIF-1α σε βακτήρια, *Escherichia Coli* και πιο συγκεκριμένα στο κυτταρικό στέλεχος (strain) BLR/Rep4. Ως όχημα μεταφοράς και έκφρασης στα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήσαμε τα πλασμίδια pQE60 και pQE60-protA (zprQE60). Η έκφραση στα πλασμίδια αυτά μας εξασφάλισε μια ακολουθία έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο των ανασυνδυασμένων χμαιρικών πρωτεϊνών, που κατασκευάσαμε. Επιπλέον, η πρωτεΐνη, που εκφράστηκε στο zprQE60, περιείχε και την περιοχή της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus*, η οποία και προσδένεται με την CL περιοχή των IgG αντισωμάτων, στο αμινοτελικό της άκρο, για την ανοσοενζυμική της ανίχνευση. Για την έκφραση του HIF-1α κατασκευάστηκαν δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το cDNA του γονιδίου του (insert) χρησιμοποιώντας το pQE60 και δύο με το zprQE60. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και δύο κατασκευές, όπου το zprQE60 είχε ανασυνδυαστεί με το cDNA της snp1 και snp1-26-353 (δύο μορφές της snurportin-1, εκ των οποίων η snurportin-1-26-353 έχει μια απαλοιφή των 26 πρώτων αμινοξέων), για να έχουμε έναν πιλότο στα πειράματα επαγωγής της έκφρασης και καθαρισμού των HIF-1α και protA- HIF-1α.

Μετά το μετασχηματισμό των κυττάρων BLR/Rep4 και την καλλιέργεια τους ακολούθησε η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών με ισοπρόπυλο-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG), και ο καθαρισμός τους σε στήλες Ni-NTA-αγαρόζη. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμίδης και η ανίχνευση των ζωνών έγινε με τη χρώση Coomassie blue, με ECL και με χρωματική αντίδραση.

Παρατηρήσαμε ότι τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-1α-protA, εκφράστηκαν στα *E.Coli* αλλά σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με τη snurportin. Σε ότι δε αφορά τον καθαρισμό αυτών, ο HIF-1α-protA, αποδείχτηκε πιο διαλυτός από τον HIF-1α και ανακτήθηκε έστω και σε μικρή ποσότητα από τη στήλη καθαρισμού και μάλιστα καθαρή από προσμίξεις. Ο HIF-1α παρέμεινε στο ίζημα και κάποια μόνο πρωτεολύματα του ανιχνεύτηκαν στα κλάσματα μετά την ανάκτηση της στήλης. Οι δύο, τέλος, μορφές των snurportins καθαρίστηκαν με επιτυχία και χωρίς προσμίξεις στα κλάσματα ανάκτησης της στήλης.



SUMMARY

Hypoxia-Inducible-Factor-1 (HIF-1), is a transcription factor which is activated by hypoxia and involved in the adaptive response of the cell to oxygen deprivation. HIF-1 is a heterodimer consisting of HIF-1 α and HIF-1 β . HIF-1 α is a polypeptide that consists of 826 amino-acids and its molecular weight is approximately 93kD.

In this work, we expressed HIF-1 α in *Escherichia Coli* bacteria, in the strain BLR/Rep4. The orf cDNA containing the ORF of HIF-1 was cloned into the BamHI-BamHI sites of pQE60, in order to be expressed with a carboxy-terminal 6-His tag and also into the BamHI-BamHI sites of zzpQE60 expressed with an amino-terminal protA tag and a carboxy-terminal 6-His tag. The protA tag IgG- CL binding of protein A (z,z), are useful for the immunoenzymatic detection and the 6-His tag for the purification of the recombinant proteins that we expressed. We also expressed one other protein snp1 (snurportin-1), the cDNA of which was cloned into the BamHI-BamHI sites of zzpQE60 so that we could have a pilot during the induction of the expression and the purification of the recombinant proteins.

After the transformation of the BNR/Rep4 cells with the constructs we had made, we induced the expression adding IPTG (isopropyl- β -D thiogalactopyranoside) in the bacterial cultures. For the purification of the proteins, we used Ni-NTA agarose columns, because of their binding capacity to the 6- His tag. At this step using SDS-PAGE and Western blotting, we detect a sufficient quantity of snurportins and a small quantity of HIF-1 α and zzHIF-1 α .

After the analysis of the purification fractions by SDS-PAGE and the immunoenzymatic detection (Western blotting), we observed that the method we had used was completely successful for the recombinant snurportin but not for the other two proteins (HIF-1 α and zzHIF-1 α), even though a small amount of soluble zzHIF-1 α could be purified. Binding to the columns was not optimal for zzHIF-1 α , while HIF-1 was confers probably insoluble.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A) Ο HIF-1α και η σχέση του με την κυτταρική και ιστική υποξία.

Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο εσωτερικό ενός κυττάρου πρέπει, απαραίτητα, να ρυθμίζεται σε ένα φυσιολογικό εύρος τιμών. Βιοχημικές αντιδράσεις, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση, χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την παραγωγή ATP και τη σύνθεση απαραίτητων βιομορίων ενώ παράλληλα στα μιτοχόνδρια δημιουργούνται οι βλαπτικές δραστικές ρίζες (ROS: reactive oxygen species), οι οποίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλαγές στη δομή του πυρηνικού DNA αλλά και στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια του κυττάρου. Είναι προφανές ότι σε ένα τόσο πολυπαραγοντικό σύστημα, όπως η ομοιοστασία του οξυγόνου, εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί και πολλά βιομόρια. Ταυτόχρονα, διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται και καθορίζουν αυτή τη δυναμική ισορροπία ανάλογα με τα ερεθίσματα, που το κύτταρο δέχεται, και ανάλογα με την ιστολογική του προέλευση.

Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου μειωθεί σε τιμές κατώτερες των φυσιολογικών, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται υποξία. Ο HIF-1 αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος σε συνθήκες υποξίας, ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων, δηλαδή, τη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια παραγωγή ενέργειας (ATP) μέσω της γλυκόλυσης (αναερόβια μεταβολική οδός) αλλά και την αύξηση της ερυθροποίησης (μέσω της ερυθροποιητίνης: EPO) και της αγγειογένεσης (μέσω του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου: EGF) σε μια προσπάθεια του κυττάρου και του οργανισμού να αντιρροπίσει την έλλειψη οξυγόνου.

Ο HIF-1α, μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 93 kD και 826 αμινοξέα, αποτελεί την μια από τις δύο υπομονάδες, που συναποτελούν το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1. Η άλλη υπομονάδα είναι ο HIF-1β με μοριακό βάρος 91-94 kD και 774-789 αμινοξέα. Και οι δύο αυτές υπομονάδες περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο basic-helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS) ακολουθίες, οι οποίες και θεωρούνται απαραίτητες τόσο για το διμερισμό τους, όσο και για την πρόσδεση στο πυρηνικό DNA. Επίσης και οι δύο περιλαμβάνουν ακολουθίες NLS (σήματα πυρηνικού εντοπισμού) για μεταφορά στον πυρήνα. Επιπλέον, ο HIF-1α περιέχει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD: transactivation domain), προς το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου (αμινοξέα 531-537 και 786-826), οι οποίες ενέχονται, αντίστοιχα, στη σταθερότητα του μορίου και στην αλληλεπίδραση του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως ο CBP/p300, SRC-1 και TIF2 (εικόνα 1). Η ομόφωνη αλληλουχία DNA για τον HIF-1α – δηλαδή η περιοχή δέσμευσης στο DNA – είναι η εξής: 5'-RCGTG-3'. (Semenza, 2001).

Ο HIF-1β, η άλλη υπομονάδα του HIF-1α ονομάζεται και ARNT (AhR nuclear translocator), δηλαδή μεταγωγέας στον πυρήνα του σήματος των αρυλο-υδρογονανθράκων. Η

ονομασία αυτή είναι και η πρώτη που του είχε δοθεί επειδή είχε, αρχικά, αναγνωριστεί ως η μία από τις δύο υπομονάδες, που απαρτίζουν το μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος σχηματίζεται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα διοξινών και γενικότερα των αρυλο-υδρογονανθράκων (aryl hydrocarbon receptor : AhR).(Hoffman et al.1991). Ο ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον HIF-1β, είναι απαραίτητος για τη σύνδεση με το DNA και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων -στόχων του HIF-1 αλλά όχι για τη μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα. (Gassmann et al., 1997, Kallio et al., 1998, Chilov et al., 1999)

Επίσης, ο HIF-1β, αποτελεί μια συχνά απαντώμενη υπομονάδα σε πολλά διαφορετικά ετεροδιμερή και η σύνθεση του είναι σταθερή ανεξάρτητα από τις μεταβολές στη συγκέντρωση του οξυγόνου. Αντίθετα, ο HIF-1α είναι μοναδικός για τον HIF-1 και η έκφραση του είναι στενά συνδεδεμένη με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου και πιο συγκεκριμένα η πτώση της συγκέντρωσης του οξυγόνου οδηγεί στην εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και ταυτόχρονα στην αύξηση της ποσότητας του HIF-1 και της ενεργότητας αυτού. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε ακραίες συνθήκες ισχαιμίας, όπως ο NK-κΒ, AP1 και p53, ενεργοποιούνται μόνο όταν η μερική πίεση του οξυγόνου είναι <0.15 mm Hg. Ο χρόνος ημίσειας ζωής για τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας είναι λιγότερο από πέντε λεπτά και ο HIF-1α ουβικιτιώνεται και πρωτεολύεται στα πρωτεοσώματα του κυττάρου, γεγονός που αναστέλλεται σε συνθήκες υποξίας.

Εκτός από τον HIF-1α, δύο άλλες υπομονάδες των bHLH-PAS μεταγραφικών παραγόντων, ο HIF-2α και ο HIF-3α, σχηματίζουν ετεροδιμερή με μια β υπομονάδα (ARNT, ARNT2 ή ARNT3), δημιουργώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF-2 και HIF-3. Η έκφραση των παραγόντων αυτών παρ' ότι παρατηρείται σε λιγότερους ιστούς απ' ότι ο HIF-1, επάγεται επίσης από την υποξία αλλά είναι λιγότερο καλά χαρακτηρισμένη. Ο HIF-2 ή EPAS βρέθηκε, αρχικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα και πιθανόν να ενέχεται στην ιστοειδική απόκριση των κυττάρων αυτών στην υποξία. Ένα αξιοσημείωτο δεδομένο, σε ότι αφορά την οικογένεια των PAS πρωτεϊνών και ειδικότερα την περιοχή PAS είναι ότι αποτελεί κοινή περιοχή για διαφορετικές πρωτεΐνες που εκφράζονται και στα τρία βασίλεια (Αρχαιοβακτήρια, Βακτήρια και Ευκαρυωτικούς Οργανισμούς) και οι οποίες, αφού αλληλεπιδράσουν με συμπαραγόντες (χρωμοφόρα, αίμη ή FAD), λειτουργούν ως αισθητήρες είτε για το φως, είτε για τη συγκέντρωση του οξυγόνου, είτε για την ενεργειακή και οξειδωτική (redox) κατάσταση του κυττάρου. Το PAS, άλλωστε, αποτελεί το ακρόνυμο τριών τέτοιων πρωτεϊνών : Per, Arnt και Sim, που πρωτοανακαλυφθήκαν.

Γ/ Γονίδια στόχοι του HIF-1

Όπως αναφέρθηκε ο HIF-1α ενισχύει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την αναερόβια παραγωγή ενέργειας αλλά και τη μεταφορά οξυγόνου. Τα γονίδια αυτά δίνονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1

ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ HIF-1	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<u>A/Μεταφορά οξυγόνου – ερυθροποίηση:</u> Ερυθροποιητίνη (EPO) Τρανσφερίνη (μεταφορά σιδήρου) Υποδοχέας τρανσφερίνης	Firth et al., (1994), Semenza et al.,(1994) Rolfs et al., (1997) LOk and Ponka (1999), Tacchini et al., (1999)
<u>B/ Μεταφορά οξυγόνου: αγγειογένεση και αγγειακός τόνος:</u> Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) Υποδοχέας VEGF (Flt-1) Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου -1 Ενδοθηλίνη-1 Συνθάση του νιτρικού οξέος (παραγωγή NO) Οξυγενάση της αίμης I (παραγωγή CO) Αδρενομεδουλίνη Α1β- αδρενεργικός υποδοχέας	Forsythe et al. (1996), Levy et al. (1995), Liu et al (1995) Gerber et al. (1997) Kietzmann et al. (1999) Hu et al. (1998) Melillo et al. (1995), Palmer et al. (1998) Lee et al. (1997) Nguyen and Claycomb (1999) Eckhart et al. (1997)
<u>Γ/ αναερόβια παραγωγή ενέργειας – είσοδος της γλυκόζης:</u> Φωσφοφρουκτοκινάση L Αλδολάση A Δευδρογενάση 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδης Φωσφογλυκερική κινάση 1 Ενολάση 1 Γαλακτική δευδρογενάση A Μεταφορέας γλυκόζης 1	Semenza et al. (1994) Semenza et al. (1994, 1996) Graven et al. (1999) Firth et al. (1994), Okino et al. (1998) Semenza et al. (1995) Firth et al. (1995) Ebert et al. (1995), Okino et al. (1998)
<u>Δ/ αυτορύθμιση της λειτουργίας του HIF-1 :</u> P35s _H (ανταγωνιστής του συμπλόκου των CBP/p300)	Bhattacharya et al. (1999)
<u>Ε/ άλλα γονίδια:</u> Ινσουλινομορφου αυξητικού παράγοντα προσδένουσα πρωτεΐνη -1 Ρετροτρανσποσόνιο VL30	Tazuke et al. (1998) Esters et al. (1995)

Δ) Μηχανισμοί μεταγωγής του σήματος της υποξίας: και ενεργοποίησης του HIF-1α

Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί ως παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούνται σε συνθήκες υποξίας (AP-1, NF-kB, HIF-1) [Faller 1999]. Ανάμεσα τους, ο HIF-1, είναι ο πιο ικανός ενισχυτής για την έκφραση γονιδίων, όπως τα γονίδια που αφορούν γλυκολυτικά ένζυμα, ο VEGF και η ερυθροποιητίνη (EPO). Ενώ, όμως, η αλληλουχία αμινοξέων του HIF-1α, η οποία ενέχεται στην αποικοδόμηση του, παρουσία οξυγόνου (ODDD: oxygen dependent degradation domain), έχει εντοπιστεί και βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 429 και 608 (αλληλουχία PEST πλούσια σε pro-ser-thr), ο μηχανισμός, που σε συνθήκες υποξίας, προκαλεί τη μειωμένη ουβικιτινίωση του παρέμνε αδιευκρίνιστος. Το δεδομένο της PAS περιοχής από νωρίς εισήγαγε την υποψία για μια αιμοπρωτεΐνη που θα περιέχει σίδηρο και αίμη και θα ρυθμίζει απ'ευθείας την σταθεροποίηση του HIF-1α και την αποφυγή της ουβικιτινίωσης του.

Τελικά, όπως, δείχθηκε, σχετικά πρόσφατα, για την αποικοδόμηση του HIF-1α, σε συνθήκες νορμοξίας, είναι απαραίτητος ο σχηματισμός ενός συμπλόκου πρωτεϊνών στο οποίο συμμετέχει και η pVHL (von-Hippel-Lindau tumor suppressor protein), συστατικό της E3 πρωτεϊνο-ουβικιτινο-λιγάσης και το οποίο αναγνωρίζει την περιοχή ODDD (συγκεκριμένα υπεύθυνα θεωρούνται τα αμινοξέα 556-574) και προσδέεται σε αυτήν. [Maxwell et al., 1999, Cockman et al. 2000, Kamura et al., 2000]. Τελευταία, βρέθηκε ότι την αναγνώριση από το συγκεκριμένο συμπλόκο με την pVHL του HIF-1α και την επακόλουθη πρωτεόλυση του στα πρωτεοσώματα, ρυθμίζει η υδροξυλίωση δυο καταλοίπων προλίνης (pro-402 και pro-564 στον ανθρώπινο HIF-1α) [Ivan et al., 2001, Mason et al., 2001]. Μελέτες πάνω στη διαμόρφωση των προπυλο-υδροξυλασών (PHDs) και γενετικές προσεγγίσεις κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν τρεις ισομορφές (PHD1, PHD2, PHD3), σε ό,τι αφορά τον ανθρώπινο ένζυμο με ομόλογες πρωτεΐνες και για άλλους οργανισμούς [Epstein et al., 2001, Bruick and McKnight 2001]. Επίσης βρέθηκε ότι τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην οικογένεια των σίδηρο- και 2-οξυγλουταρικό-οξυγενασών [Ivan et al., 2001, Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2001]. Αυτό ερμηνεύει τα αποτελέσματα πειραμάτων με συνθήκες υποξίας καθώς και πειραμάτων, που επάγουν την ενεργοποίηση του HIF-1α με τη χρήση κοβαλτίου και ενώσεων που δεσμεύουν το σίδηρο (δεσφερριτοξαμίνη) δεδομένου ότι σε Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις το μοντέλο ενεργοποίησης του HIF-1α περιλαμβάνει τη διαφυγή δηλαδή του HIF-1α από τη διαδικασία της πρωτεόλυσης στα πρωτεοσώματα και τη μεταφορά και δράση του στον πυρήνα.

Ένα άλλο ένζυμο, μια ασπαργινο-υδοξυλάση (AHD), η οποία και αυτή ανήκει στην ίδια οικογένεια οξυγενασών με τις PHDs. Η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης (Asn-803) στην προς το καρβόξυτελικό άκρο TAD περιοχή του HIF-1α εμποδίζει την αλληλεπίδραση του

HIF-1α με την p300 και κατ'έκταση την δημιουργία του συμπλόκου ενεργοποίησης της μεταγραφής [Kirsty et al., 2002].

Επίσης, η σταθεροποίηση του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα φαίνεται να αποτελεί ένα από τα καθοριστικά βήματα πριν την ενεργοποίηση και τη μεταφορά του στον πυρήνα. Εκεί ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων, αφού πρώτα διμεριστεί, με την άλλη υπομονάδα τον HIF-1β ή ARNT. (εικόνα 2) Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από συγκεκριμένα πειράματα, όπου σε πειραματόζωα με μεταλλάξεις οι οποίες αναστέλλουν την ουβικιτινίωση του HIF-1α, ο HIF-1α παραμένει ενεργός ακόμα και σε συνθήκες νορμοξίας.[Minet et al., 2001].

Σχετικά, τέλος, με την αποικοδόμηση του HIF-1α στα πρωτεοσώματα, τελευταία έχειδειχθεί ότι μπορεί να συμβεί όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα του κυττάρου και μάλιστα από το ίδιο σύμπλοκο (pVHL-E3). Η θεωρία αυτή, όπως υποστηρίζεται, εξηγεί και τον εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [Berra et al., 2001].

Ρύθμιση του HIF-1α από κινάσες.

Η πρώτη ένδειξη ότι ο HIF-1α αποτελεί μια φωσφοπρωτεΐνη, προήλθε από τους Wang and Semenza, [Semenza, Wang, 1998] οι οποίοι χρησιμοποιώντας την τεχνική EMSA (electrophoretic mobility shift essay) έδειξαν ότι στην περίπτωση κατά την οποία πυρηνικό εκχύλισμα Hep3B κυττάρων τα οποία είχαν επωαστεί σε συνθήκες υποξίας κατεργαστεί με φωσφατάση το σύμπλοκο DNA /HIF-1α διασπάται. Προχωρώντας, η ίδια ομάδα έδειξε ότι ο αναστολέας των κινασών σερίνης –θρεονίνης, αμινοπουρίνη-2, και ένας αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης (genistein), καθώς επίσης και ο αναστολέας της φωσφατάσης σερίνης –θρεονίνης μπορούν να αναστείλουν την πρόσδεση του HIF-1α στο DNA καθώς και τη σταθεροποίηση του μορίου HIF-1α .[Wang, Semenza, Jiang 1995]

Φαίνεται, λοιπόν, ότι πολλές διαφορετικές κινάσες και διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην ρύθμιση του HIF-1α, τόσο σε ότι αφορά την ενεργοποίηση του, όσο και τη μεταφορά του στον πυρήνα, την αλληλεπίδραση με τον HIF-1β, τους άλλους συνενεργοποιητές και την ίδια την ενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Είναι επίσης πολύ πιθανό διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια να κινητοποιούνται σε διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης κύτταρα και σε διαφορετικούς οργανισμούς, καθώς και διαφορετικές αλληλεπιδράσεις και συνενεργοποιητές ανάλογα με τα γονίδια, που κάθε φορά, επάγεται η μεταγραφή τους.[Minet et al., 2001]. Για παράδειγμα ένας τέτοιος μηχανισμός ενεργοποίησης των MAP κινασών σε συνθήκες υποξίας έχει αναλυθεί ικανοποιητικά από τους Conrand et al., 1999, σε PC12 κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι κύτταρα φαιοκυτοχρωματώματος και έχουν προέλθει από αρουραίους. Με συγκεκριμένα πειράματα οι ερευνητές αυτοί έδειξαν την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της p38/SAP κινάσης σε συνθήκες υποξίας, σε συνδιασμό με την είσοδο του ασβεστίου για τη συγκεκριμένη πάντα κυτταρική σειρά.

Σε συνθήκες υποξίας το γονίδιο της υδροξυλάσης της τυροσίνης υπερεκφράζεται [Raymond et al., 1997, Norris et al., 1995]. Το γονίδιο της TH (tyrosine hydroxylase) συμμετέχει στη σύνθεση των κατεχολαμινών στο καρωτιδικό σώμα και έτσι σηματοδοτεί την προσαρμογή του αναπνευστικού συστήματος. Το γονίδιο αποτελεί στόχο τόσο για τον HIF-1α όσο και για τον AP-1 σε συνθήκες υποξίας. Εν τούτοις όταν τα PC12 κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό, που στερείται ασβεστίου, η επαγωγή της έκφρασης του TH γονιδίου δεν παρατηρείται. [Faller et al., 1999, Raymond et al., 1997]. Αυτό δείχνει, επίσης, ότι η είσοδος του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα συνδέεται έμμεσα με τη μεταγραφική απάντηση στην υποξία (για τα συγκεκριμένα κύτταρα), πολύ πιθανόν μέσω μηχανισμών που περιέχουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των p38 και ERK κινασών. Πάντως σχέση μεταξύ της εισόδου του ασβεστίου και της ενεργοποίησης της οδού των MAP κινασών δεν έχει δειχτεί. [Minet et al., 2001].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των Raf-1/ERK κινασών είναι μια ακόμη περίπτωση, που συνδέεται με την αντιυποξική απάντηση και πιο συγκεκριμένα με την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του VEGF. Επίσης, ένας αναστολέας της σηματοδοτικής οδού των PI-3K/Akt, μπορεί να αναστείλει την έκφραση του γονιδίου του VEGF. Συγκεκριμένα πειράματα, έδειξαν ότι η υποξία εκκινεί την ενεργοποίηση των ERK και PI-3K σε διαφορετικά κύτταρα. Εντούτοις, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν η οδός ενεργοποίησης των ERK και PI-3K/Akt συμμετάχει σε όλες τις περιπτώσεις απάντησης στην υποξία. Δυο πιθανές θεωρίες συσχετίζουν τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια με την είσοδο του ασβεστίου αλλά και με την αυξημένη παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια σε συνθήκες, πάντα υποξίας. Το πιθανότερο είναι ο τρόπος ενεργοποίησης να διαφέρει από ιστό σε ιστό ενώ η ενεργοποίηση του HIF-1α στην πορεία μεταγωγής του σήματος είναι παρούσα στους περισσότερους ιστούς και κυτταρικές σειρές, που έχουν ερευνηθεί. [Minet et al., 2001].

Συμπερασματικά, τα διάφορα μοντέλα ενεργοποίησης του HIF-1α που έχουν προταθεί δεν δίνουν μια πλήρη απάντηση στο ζητούμενο. Επιπλέον κάποιες θεωρίες φαίνεται να αλληλοσυγκρούονται, όπως αυτή που προϋποθέτει τη μείωση των ROS μέσω της NADPH οξειδοαναγωγής με εκείνη που προϋποθέτει την αύξηση των ROS από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, πάντα σε συνθήκες υποξίας. Η ανακάλυψη των υδροξυλασών προλίνης σε συνδιασμό με την υδροξυλάση της ασπαραγίνης φαίνεται ένα ελκυστικό μοντέλο, που ταυτόχρονα απαντά και στα πειράματα με τη χρήση κοβαλτίου και στο ακαριαίο της απάντησης στην υποξία, μέσω της ενεργοποίησης του HIF-1α .

Γ/ Ο HIF-1α είναι απαραίτητος κατά την εμβρυογένεση

Σε ποντίκια ομόζυγα ως προς μια συγκεκριμένη μετάλλαξη, η οποία προκαλεί απώλεια της λειτουργικότητας του HIF-1α (loss of function), παρατηρήθηκε ο θάνατος κατά την εμβρυογένεση οφειλόμενος σε αγγειακές βλάβες της εμβρυονικής κυκλοφορίας. Στα

πειραματόζωα αυτά, η αγγειογένεση ξεκινάει φυσιολογικά αλλά την ένατη ημέρα μια αξιοσημείωτη αναστροφή της κατάστασης λαμβάνει χώρα στο ενδοθήλιο των αγγείων και πιο συγκεκριμένα στην κεφαλική περιοχή. Η αγγειακή αυτή βλάβη οφείλεται στο θάνατο προμεταναστευτικών και μεταστανευτικών νευρικών κεφαλικών κυττάρων (cephalic cells). Τα μεσεκχυματικά αυτά κύτταρα είναι οι προγεννήτορες των περικυττάρων, τα οποία περικύτταρα είναι απαραίτητα για την ακεραιότητα των αγγείων στο συγκεκριμένο στάδιο της εμβρυογένεσης. Το συμπέρασμα αυτού του πειράματος είναι ότι ο θάνατος των μεσεκχυματικών κυττάρων και στη συνέχεια του εμβρύου οφείλεται στην έλλειψη του HIF-1α. (Semenza, 2000)

Δ/ Ο HIF-1α σχετίζεται και με την προαγωγή της καρκινογένεσης.

Η μετατροπή ενός όγκου σε ένα θανατηφόρο φαινότυπο, στον οποίο τα κύτταρα αποκτούν επιθετικές και μεταστατικές ιδιότητες, προϋποθέτει την προσαρμογή των κυττάρων αυτών στην υποξία. Κύτταρα όγκου στα οποία έχει προκληθεί εξάλειψη του γονιδίου του HIF-1α έχουν δώσει αποτελέσματα αξιοσημείωτης μείωσης της ανάπτυξης και της αγγειογένεσης τους όταν ενέθηκαν σε υγιή ποντίκια. Μεταξύ διαφόρων σειρών καρκινικών κυττάρων του προστάτη τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένα (Chandel, N. S., 2000, Ushio-Fukai, 1999). Μεταλλάξεις οι οποίες ενεργοποιούν ογκογονίδια – για παράδειγμα το v-src - ή αδρανοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια

- όπως το VHL – σχετίζονται με την αυξημένη έκφραση του HIF-1α, καθώς και με την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων, που κωδικοποιούν για γλυκολυτικά ένζυμα και για τον VEGF. (Semenza, 2000)

Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α σε νεοπλασίες μπορεί ακόμη να προκύψουν και από αυτοκρινείς παράγοντες ανάπτυξης. Ο IGF-2 επάγει την έκφραση του HIF-1α ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου του IGF-2. Επιπλέον ο IGF-2 είναι το γονίδιο του οποίου η απορύθμιση σχετίζεται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου στον οποίο έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α. (Semenza, 2000 Zhong et al., 1999)

Συνεπώς ο HIF-1α παρουσιάζεται υπερεκφρασμένος σε κακοήθεις όγκους είτε ως αποτέλεσμα φυσιολογικών προσαρμογών (υποξία) είτε ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλαγών. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στην υπόθεση ότι η αναστολή του HIF-1α είναι πολύ πιθανό να αποτελέσει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση στην ασθένεια του καρκίνου, ιδιαίτερα αν συνδυαστεί με αναστολείς της αγγειογένεσης, οπότε να υπάρξει ένα ακόμα μεγαλύτερο θεραπευτικό παράθυρο σχετιζόμενο πάντα με τη στέρηση της οξυγόνωσης των καρκινικών κυττάρων.

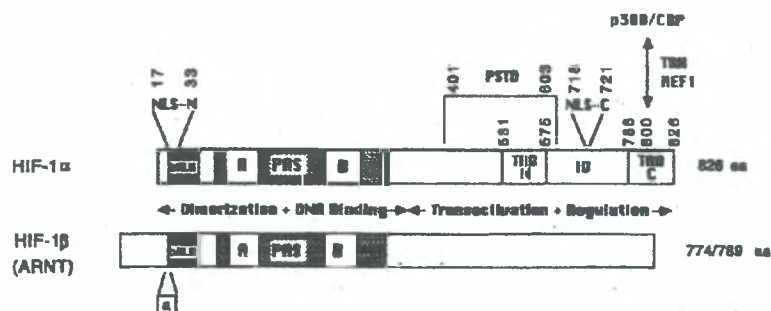


FIG. 1. Structure of HIF-1. Important functional domains of the HIF-1 α and HIF-1 β subunits are indicated as follows: a, alternate exon encoding 15 amino acids (aa) in HIF-1 β ; bHLH, basic-helix-loop-helix domain; ID, inhibitory domain; NLS-N and NLS-C, amino- and carboxyl-terminal nuclear localization signal; PAS, Per-ARNT-Sim homology domain with internal A and B repeats; PSTD, proline-serine-threonine-rich protein stability domain; TAD-N and TAD-C, amino- and carboxyl-terminal transactivation domain; REF-1, redox factor 1; TRX, thioredoxin.

εικόνα 1: οι δύο υπομονάδες του HIF-1: HIF-1 α και HIF-1 β (ARNT) και οι περιοχές που έχουν ταυτοποιηθεί σε αυτές, όπως η κοινή περιοχή PAS για τις δύο υπομονάδες υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό στον πυρήνα και τη σύνδεση με το πυρηνικό DNA. Επίσης, κοινή περιοχή που έχει βρεθεί, είναι και η αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελεί το σήμα μεταγωγής στον πυρήνα (NLS). Μοναδικές περιοχές για το HIF-1 α είναι οι δύο περιοχές TAD υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση του με τους συνενεργοποιητές της μεταγραφής και η περιοχή PSTD υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τη pVHL και το σύμπλοκο ουβικιτινίωσης. Στην περιοχή PEST βρίσκονται και τα κατάλοιπα προλίνης (περιοχή ODD) η υδροξυλίωση των οποίων καθορίζει την τύχη του HIF-1 α σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του οξυγόνου στο κύτταρο.

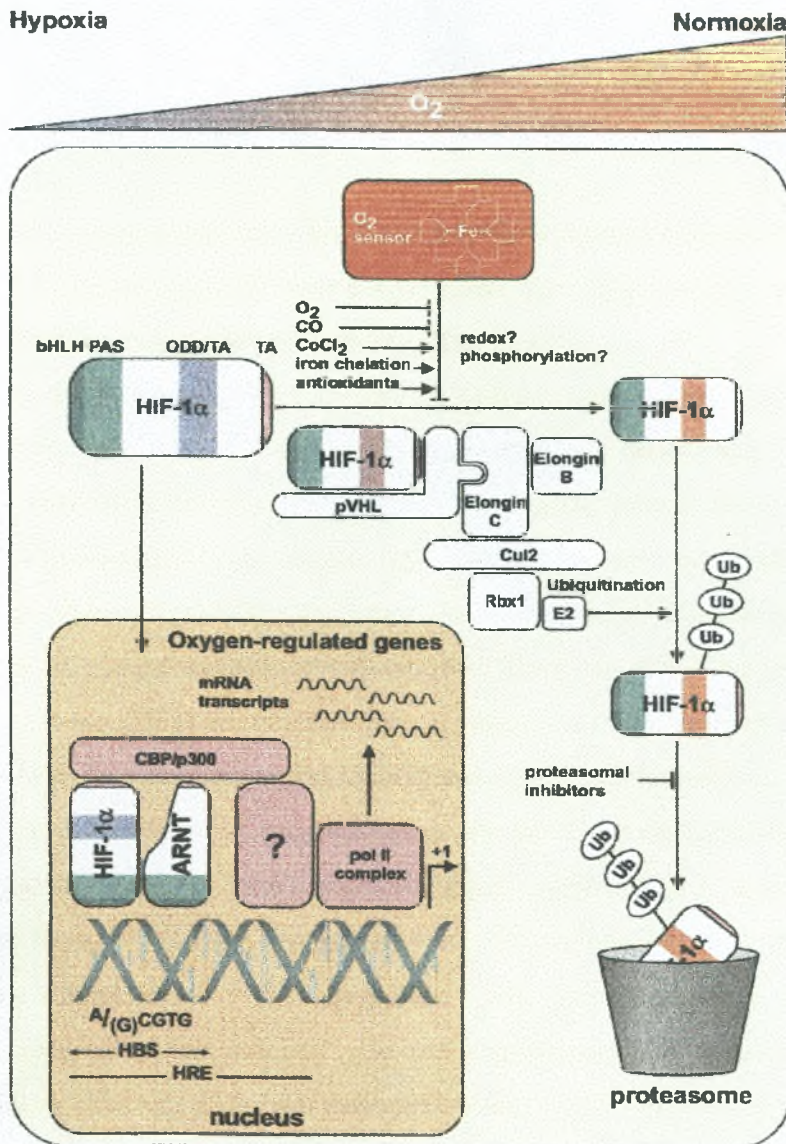


Fig. 1. Hypothetical model of oxygen sensing, signalling and gene regulation. Under hypoxic conditions, the ODD/TA domain of HIF-1 α (blue) is stable and allows nuclear translocation and gene regulation. Under normoxic conditions, the ODD/TA domain (orange) obtains a signal from an unknown oxygen sensor which targets HIF-1 α for proteolytic degradation via ubiquitination by an incompletely characterized complex containing the pVHL tumour suppressor protein. See text for details. ARNT, aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator; bHLH, basic-helix-loop-helix; CBP, CREB binding protein (CBP and p300 are two related transcriptional coactivators with histone acetyltransferase activity); Cul2, cullin 2; E2, unknown ubiquitin-conjugating enzyme; HBS, HIF-1 binding site; HRE, hypoxia-response element; ODD, oxygen-dependent degradation domain; PAS, Per-AhR/ARNT-Sim domain (see text); pol II, RNA polymerase II; pVHL, von-Hippel-Lindan tumour suppressor protein; Rbx1, a RING-finger protein; TA, transactivation domain; Ub, ubiquitin; +1 indicates the transcriptional start site.

εικόνα 2: σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου ρύθμισης της ενεργοποίησης της μεταγραφής μέσω του HIF-1 α . Σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1 α πρωτεολύεται μέσω του συμπλόκου της pVHL ενώ σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται η σύνδεση με το σύμπλοκο ουβικιτινίωσης και ο HIF-1 α οδηγείται στον πυρήνα. Εκεί, αφού ετεροδιμεριστεί με το HIF-1 β και με τη βοήθεια των συνενεργοποιητών της μεταγραφής εκκινεί τη μεταγραφή γονιδίων των οποίων τα προϊόντα – οι πρωτεΐνες δηλαδή – έχουν σα στόχο την προσαρμογή και επιβίωση του κυττάρου.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός των πειραμάτων, που περιγράφονται στην παρούσα εργασία, είναι η έκφραση και απομόνωση του HIF-1α, της μιας εκ των δύο υπομονάδων που συναποτελούν το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, σε βακτήρια και συγκεκριμένα στο είδος E. Coli.

Η παραγωγή του ανασυνδιασμένου HIF-1α σε καθαρή μορφή είναι απαραίτητη στην κατασκευή αντισωμάτων για τον HIF-1α σε πειραματόζωα (κουνέλια). Η κατασκευή αντισωμάτων για τον HIF-1α από το Εργαστήριο Βιοχημείας μπορεί να συμβάλει στην πραγμάτωση διαφόρων πειραμάτων με σκοπό την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία. Έτσι, για παράδειγμα, μπορεί να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες, είτε με χρωματογραφία συγγένειας (πχ μέσω του protA-tag μπορεί να γίνει η καθήλωση του HIF-1α σε σφαιρίδια και στη συνέχεια η επώαση με εκχυλίσματα κυττάρων), είτε με ανοσοκαθίζηση του HIF-1α από κύτταρα και ιστούς, που έχουν υποστεί υποξία.

Επίσης μπορούν να μελετηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια φωσφορυλίωσης του HIF-1α από κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα μόρια (p38/p44). Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ανασυνδιασμένο HIF-1α, και επωάζοντας τον με φυσιολογικά ή υποξικά κύτταρα παρουσία ραδιενεργά σημασμένου ATP, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αμινοξική αλληλουχία των φωσφοπεπτιδίων και στη συνέχεια των καταλοίπων, που τροποποιούνται. Ένα, τέλος, πιθανό αντικείμενο μελέτης, μέσω του ανασυνδυασμένου HIF-1α, είναι ο τρόπος εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα και πως ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας.

Για όλους αυτούς τους λόγους, η έκφραση του ανασυνδυασμένου HIF-1α θεωρείται εξαιρετικά ενδιαφέροντα – αφού δεν αναφέρεται παρόμοια επιτυχημένη προσπάθεια στη βιβλιογραφία – και χρήσιμη στο μέλλον στην προσπάθεια διερεύνησης μηχανισμών που αφορούν τον HIF-1α και την υποξία.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

A/ Πέψη με ένζυμα περιορισμού (digest)

A1/ Αρχή της μεθόδου- υλικά

Τα ένζυμα περιορισμού ή ενδονουκλεάσες περιορισμού (restriction enzymes), αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες – μήκους τεσσάρων έως έξι νουκλεοτιδίων συνήθως – και υδρολύουν ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό και στις δύο αλυσίδες του DNA στα άκρα αυτών (Stryer, 1989) Έχουν μεγάλη εξειδίκευση και απαιτούν συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH για τη δράση τους. Κατά την παρασκευή των διαλυμάτων, που θα επωαστούν με ένα ή περισσότερα ένζυμα, γίνεται, ανάλογα, με την ποσότητα του DNA στο διάλυμα, υπολογισμός της απαραίτητης ποσότητας ενζύμου, με βάση τις δραστικές μονάδες αυτού (ένα unit καταλύει την αντίδραση πέψης ενός μg DNA) , της ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και BSA, αν χρειάζεται και τέλος, επιλογή της θερμοκρασίας στην οποία το ένζυμο έχει τη μέγιστη δραστικότητα.

A2/ Παρασκευή διαλύματος πέψης:

Για την παρασκευή ενός διαλύματος πέψης 5 μl πλασμιδιακού DNA το οποίο έχει προέλθει μέσω της τεχνικής απομόνωσης της QIAGEN και η οποία περιγράφεται στις παραγράφους Z/ και H/ μπορεί να χρησιμοποιηθεί το παρακάτω πειραματικό πρωτόκολλο:

DNA	5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (10 x)	5 μl
Ένζυμο	2 μl
Νερό (δix απεσταγμένο)	33 μl

Στη συνέχεια τα σωληνάκια με τα διαλύματα της πέψης επωάζονται στους 37 °C για μιάμιση ώρα.

Τα ένζυμα, που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα, που αντιστοιχούν, σε κάθε ένζυμο, είναι της N.E.BIOLABS .

B/ Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

B1/ αρχή της μεθόδου

Η πηκτές αγαρόζης σχηματίζονται με τον πολυμερισμό της αγαρόζης σε χαμηλές θερμοκρασίες (θερμοκρασίες περιβάλλοντος). Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος του πολυμερούς, εξαρτάται

από τη συγκέντρωση της αгарόζης. Πιο συγκεκριμένα, μια πηκτή 2% αгарόζη έχει μικρότερους πόρους από μια πηκτή 1% αгарόζη (Maniatis et al., 1989).

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου η ρυθμιστική ικανότητα και η συγκέντρωση είναι σημαντικές, για την ταχύτητα και την ομαλότητα

της μετακίνησης του DNA στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε TAE (0.04 M Tris-acetate, 0.001M EDTA) pH 8

Στο ρυθμιστικό διάλυμα προστίθεται και βρωμιούχο αιθίδιο, μια χρωστική η οποία διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA και επειδή φθορίζει κάτω από υπεριώδεις ακτίνες «βάφει» το DNA. Βέβαια, στο σημείο αυτό, να σημειώσουμε ότι γι' αυτήν ακριβώς την ιδιότητα της η συγκεκριμένη ουσία θεωρείται καρκινογόνος. Ακόμα, πριν προστεθεί στο διάλυμα της πηκτής το βρωμιούχο αιθίδιο πρέπει η θερμοκρασία σε αυτό να είναι κάτω από τους 60 °C

Από 10 mg/ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (stock), προσθέτουμε τόσο όγκο στην πηκτή, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.5 µg/ml.

Τα δείγματα, που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, αναμιγνύονται με διάλυμα χρωστικής, η οποία περιλαμβάνει συγκεκριμένες χρωστικές ουσίες, που κινούνται προς την άνοδο, έτσι ώστε να ελέγχεται και οπτικά η ηλεκτροφόρηση και κάποια ουσία (π.χ. γλυκερόλη ή φικόλη), που αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος και διευκολύνει την ομαλή εναπόθεση του στις εγκοπές.

Πιο συγκεκριμένα η σύσταση του διαλύματος είναι η εξής:

0.25 % κυανούν της βρωμοφαινόλης

0.25 % κυανούν του ξυλενίου

30 % γλυκερόλη

Τα τμήματα του DNA κινούνται μέσα στην πηκτή προς το θετικό πόλο αφού το DNA είναι φορτισμένο αρνητικά (λόγω της ραχοκοκαλιάς των φωσφορικών), με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των ζευγών βάσεων (bp) ή ισοδύναμα του μοριακού τους βάρους.

Κατά την ανάλυση DNA σε πηκτές αгарόζης χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μριακών βαρών διάλυμα DNA φάγου (250 µg/ml), 4 µl κομμένου με τα περιοριστικά ένζυμα Hind-III και EcoR-I

Ανάλογα με το ποσοστό αгарόζης στην πηκτή έχουμε μέγιστη δυνατότητα διαχωρισμού σε διαφορετικές περιοχές μεγεθών ως εξής:

Πίνακας 1

Ποσοστό αγαρόζης (%)	Διαχωρισμός μεταξύ μεγεθών (bps)
0.3	5000 – 60000
0.6	1000 – 20000
0.7	800 – 10000
0.9	500 - 7000
1.2	400 - 600
1.5	200 - 300
2.0	100 - 200

Πειραματική διαδικασία:

Ένα διάλυμα πέψης 50 μl αφού παρασκευαστεί και επωαστεί, όπως περιγράφεται στην παράγραφο Α/ αναμιγνύεται με διάλυμα χρωστικής (κυανούν της βρωμοφαινόλης) όγκου 20 μl .

Δείγμα διαλύματος DNA φάγου λ κομμένου με τα ένζυμα Hind-III και EcoR-I όγκου 4 μl αναμιγνύεται με 5 μl διαλύματος βρωμοφαινόλης.

Τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή αγαρόζης 1% στις κατάλληλες εγκοπές και ηλεκτροφορούνται για μία ώρα, περίπου, - έως ότου το ,μέτωπο της χρωστικής φτάσει την άκρη της πηκτής- υπό σταθερή τάση 100 V.

Στη συνέχεια η πηκτή μεταφέρεται στο φωτογραφικό μηχάνημα όπου με τη χρήση UV ακτινοβολίας οι ζώνες του DNA φθορίζουν - λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου - και έτσι εκτυπώνονται στη μεμβράνη (φίλμ) της φωτογραφικής μηχανής.

Γ/ Παραλαβή από την πηκτική αγαρόζη και καθαρισμός του cDNA του HIF-1α.

Τα διαλύματα και οι στήλες, που χρησιμοποιήθηκαν είναι της QIAGEN

Πειραματική διαδικασία- Αρχή της μεθόδου

1. Αφαίρεση του κομματιού το οποίο περιέχει το τμήμα cDNA (insert), που μας ενδιαφέρει, από την πηκτική, με την προσεκτική χρήση μιας λεπίδας νυστεριού. Στο στάδιο αυτό, προσπαθούμε να αφαιρέσουμε όσο γίνεται περισσότερη αγαρόζη στα όρια του «θραύσματος», που μας ενδιαφέρει, με τις λιγότερες απώλειες σε DNA.
2. Ζυγίζουμε το κομμάτι της πηκτικής, που αφαιρέσαμε, αφού το μεταφέρουμε σε ένα διαλυτή σωλήνα (erpendorf) των 2 ml. Στο σωλήνα αυτό προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα QG με όγκο τριπλάσιο από τον όγκο που προκύπτει αν εκφράσουμε τα mg του τμήματος της πηκτικής σε μl. Εάν το κομμάτι της πηκτικής υπερβαίνει τα 400 mg οφείλουμε να το μοιράσουμε σε δύο erpendorfs των 2 ml. Στην περίπτωση μας τα κομμάτια που αφαιρέθηκαν είχαν μάζα:
 Δ1 → 250 mg
 Δ2 → 200 mg
 Επομένως προσθέσαμε 750 μl διαλύματος QG στο καθένα θεωρώντας ελάχιστη τη διαφορά έτσι ώστε να έχουμε πρακτικά τον ίδιο όγκο στους δύο σωλήνες.
3. Ακολούθησε επώαση στους 50 °C για 10 min, έτσι ώστε να λειώσει εντελώς το κομμάτι της πηκτικής, ενώ το χρώμα στο σωλήνα ήταν κίτρινο όπως και το χρώμα του ρυθμιστικού διαλύματος σημείο που υποδεικνύει ότι το pH βρίσκεται στα επιθυμητά όρια ($pH \leq 7.5$). δηλαδή όσο και το διάλυμα QG. Σε περίπτωση διαφορετικού χρώματος το pH πρέπει να ρυθμιστεί στα επιθυμητά όρια, έτσι ώστε να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η κατακράτηση του DNA από τη στήλη.
4. Προσθέσαμε διάλυμα ισοπροπανόλης όγκου αντίστοιχου με τη μάζα του digest εκφραζόμενη σε μl (1 mg → 1 μl), δηλαδή 250 μl και στους δύο σωλήνες. Η ισοπροπανόλη αυξάνει της απόδοση της ανάκτησης DNA για τμήματα >4 kb ή <500 bp, και το τμήμα, που μας ενδιαφέρει, έχει μήκος ≈ 6000 bp άρα έπρεπε να προστεθεί.
5. Τοποθετήθηκαν δύο στήλες QIA quick σε δύο σωλήνες συλλογής του εκλυόμενου προϊόντος.
6. Η εισαγωγή των διαλυμάτων με το DNA στις αντίστοιχες στήλες έγινε σε δύο στάδια διότι είχαμε 1 ml περίπου διαλύματος DNA και οι στήλες είχαν χωρητικότητα 800 μl περίπου. Σε κάθε στάδιο εισαγωγής ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 1 min έτσι ώστε το DNA να προσδεθεί στη στήλη.
7. Μετά τη φυγοκέντρηση, αδειάσαμε τους σωλήνες συγκέντρωσης του εκλυόμενου διαλύματος και στη συνέχεια τους τοποθετήσαμε πάλι κάτω από τις δύο στήλες.

8. Προσθέσαμε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος QG και φυγοκεντρήσαμε πάλι στις 14000 rpm για 1 min. στο στάδιο αυτό απομακρύνονται όλα τα εναπομείναντα ίχνη της αгарόζης.
9. Ακολούθησε έκλουση της στήλης και πλύση αυτής με 0.75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE. Στη συνέχεια φυγοκεντρήσαμε στις 14000 rpm για 1 min .
10. Αδειάσαμε τους σωλήνες συγκέντρωσης και φυγοκεντρήσαμε πάλι για 1 min στις 14000 rpm.
11. Τοποθετήσαμε τις στήλες σε δύο καθαρούς σωλήνες (eppendorfs) των 1.5 ml.
12. Για την έκλουση της στήλης του DNA από τις στήλες χρησιμοποιήσαμε 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB (10 μM TRIS -Cl, pH 8.5). Περιμέναμε 1 min, για να ολοκληρωθεί η ανάκτηση του DNA και φυγοκεντρήσαμε αυτές στη συνέχεια για 1 min στις 14000 rpm.

Δ/ Μέθοδος παρασκευής κυττάρων (E.Coli) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδίων

Πειραματική διαδικασία – αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για να κατασκευάσουμε κύτταρα E.Coli ικανά να δεχτούν (δεκτικά) την εισαγωγή πλασμιδίων μέσω της τεχνικής του μετασχηματισμού που περιγράφεται στην παράγραφο ΣΤ/. Η διαδικασία, που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

Καταρχήν φτιάχνουμε τα παρακάτω διαλύματα σε κατάλληλη ποσότητα :

TYM-I	TFB-I pH 7	TFB-II pH 7
2% tryptone	30 mM KOAc	10 mM MOPS
0.5% yeast extract	50 mM MnCl ₂	75 mM CaCl ₂
0.1 M Na Cl	100 mM KCl	10 mM KCl
10 mM MgSO ₄	10 mM CaCl ₂	20% glycerol
	15% glycerol	

Και στη συνέχεια:

1. Από μια καλλιέργεια των 5 ml όπου έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα μας, σε θρεπτικό υλικό TYM όλο το προηγούμενο βράδυ, στο οποίο περιέχεται και το αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής για τα συγκεκριμένα κύτταρα, αφαιρούμε 30 μl και τα μεταφέρουμε σε 3 ml του ίδιου διαλύματος (TYM + αντιβιοτικό). Δηλαδή κάνουμε αραιώση της καλλιέργειας 1:100. Αφήνουμε να κύτταρα μετά την αραιώση να αναπτυχθούν για 2-3 ώρες στους 37 °C.

2. Από τα 3 ml + 30 μl , καλλιέργειας, που αναπτύχθηκαν για 2-3 ώρες μεταφέρουμε 500 μl σε 100 ml TYM και αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD) φτάσει την τιμή 0.4 (η απορρόφηση μετρείται στα 600 nm).
3. Στη συνέχεια μοιράζουμε τα 100 ml σε δύο σωλήνες (falcons) των 50 ml και φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5 min στους 4 °C.
4. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 50 ml TFB I.
5. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 10 min.
6. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα στις 3000 rpm , για 5 min στους 4 °C .
7. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 4 ml TFB II.
8. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για μία ώρα.
9. Μοιράζουμε το διάλυμα με τα κύτταρα ανά 200 μl σε 20 eppendorfs και τα αποθηκεύουμε στους -80 °C.

Ε/ Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμίδιο (ligation)

Για την εισαγωγή ενός τμήματος cDNA (insert), σε ένα πλασμίδιο, το οποίο θα λειτουργήσει ως όχημα μεταφοράς για την έκφραση μιας πρωτεΐνης σε ένα μικροοργανισμό, χρησιμοποιείται το ένζυμο λιγάση του DNA. Οι λιγάσες DNA καταλύουν τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα σε ελεύθερα 3'-OH και 5'-P άκρα του DNA. Συνεπώς τα ένζυμα αυτά μπορούν να ενώσουν τα δυο ελεύθερα άκρα που προέκυψαν από τη δράση μιας ενδονουκλεάσης και να δημιουργηθεί ένα πάλι ένα ακέραιο δίκλωνο DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι βέβαια και η συνεκτικότητα των άκρων, που πρόκειται να ενωθούν, δηλαδή η συμπληρωματικότητα των αζωτούχων βάσεων των δυο αντίστοιχων τμημάτων DNA.

Επίσης η αναλογίων πλασμιδίου : insert επιλέχθηκε να είναι, περίπου, 1:3 και ανάλογα προσδιορίστηκε και ποσότητα της λιγάσης. Χρησιμοποιήθηκαν: το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4 και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα , της N.E.BIOLABS.

Πειραματική διαδικασία:

Για την εισαγωγή 1 μl DNA από midi-preparation στο πλασμίδιο pQE60 κατασκευάστηκε το εξής διάλυμα 20 μl :

Νερό δις απεσταγμένο:	15.5 μl
Πλασμίδιο pQE60 κομμένο με BamH-I	0.5 μl
Εισαγόμενο τμήμα DNA με τα συνεκτικά άκρα:	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης T4 (10 ^x)	2 μl
Λιγάση T4:	1 μl

Η πείραμα εισαγωγής του DNA τμήματος στο πλασμίδιο φορέα έκφρασης ολοκληρώθηκε με επώαση του διαλύματος στους 17 °C έως την επόμενη ημέρα.

ΣΤ/ Μετασηματισμός κυττάρων E. coli.

Κύτταρα, που έχουν καταστεί δεκτικά (competent) στην εισαγωγή πλασμιδίων με κάποια διαδικασία, όπως αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο Γ/, μπορούν να μετασηματιστούν με την εξής τεχνική:

1. από το διάλυμα με το προϊόν της ligation (διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο Δ/, 10 μl μεταφέρονται σε σωλήνα, που περιέχει, 100 μl competent cells και παραμένουν στο πάγο για 30 min.
2. ακολουθεί θερμικό σοκ για 2 min στους 42 °C
3. μεταφορά και παραμονή στον πάγο για 5 min.
4. προσθέτουμε 1 ml θρεπτικό υλικό LB και αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στους 37 °C για 30 min.
5. φυγοκεντρούμε το σωλήνα με τα κύτταρα (spin 11000 rpm) και στη συνέχεια πετάμε το υπερκείμενο (≈ 900 μl) και επαναδιαλύουμε το ίζημα με τα κύτταρα έτσι ώστε να το απλώσουμε σε τριβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό (LB) συν το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.
6. τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C έως την επόμενη ημέρα (overnight)

Ζ/ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (mini-preparation).

Την επόμενη ημέρα της επώασης των τριβλίων, στα οποία και συντελέστηκε ο μετασηματισμός των βακτηριδίων με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pQE60, γίνεται η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από όσες αποικίες συνολικά αναπτύχθηκαν στα τριβλία έχει προστεθεί αντιβιοτικό επιλογής). Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε, είναι η εξής:

1. Μεταφέρουμε σε κατάλληλους σωλήνες 3 ml LB medium (θρεπτικό μέσο), το οποίο περιέχει και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής –για το συγκεκριμένο πλασμίδιο αμπικιλίνη–σε συγκεκριμένη αναλογία (1:1000) έτσι ώστε τελική συγκέντρωση να είναι 20 μg/ml
2. Στους σωλήνες αυτούς – εννέα συνολικά – μεταφέρονται με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι αντίστοιχες αποικίες, που είχαν αναπτυχθεί. Οι σωλήνες αυτοί με τις οδοντογλυφίδες

αφήνονται να επωαστούν στο δονούμενο επωαστήρα (37 °C και 300 rpm) για περίπου 18 ώρες (overnight).

3. Τα 3 ml της καλλιέργειας την επόμενη ημέρα μεταφέρονται , σε δυο στάδια, σε εννέα συνολικά erpendorfs με ενδιάμεση φυγοκέντρηση για 1 min στις 14000 rpm.

4. Πετάμε όλο το υπερκείμενο.

5. Στα erpendorfs προσθέτουμε 400 μl STET. Το διάλυμα STET παρασκευάζεται ως εξής:

Για 100 ml STET:

• 0.1 M NaCl	10.0 ml
• 10 mM Tris-Cl (pH 8.0)	1.0 ml
• 1 mM EDTA (pH 8.0)	0.2 ml
• 5 % Triton x 100	5.0 ml
• d H ₂ O	83.8 ml

6. Επαναίωση των βακτηρίων στο STET και παραμονή για 10 min σε Κ.Σ.

7. Προσθέτουμε 5 μl λυσοζύμη και αφήνουμε για 1min σε Κ.Σ.

8. Μεταφέρουμε τα erpendorfs στους 100 °C για 1min.

9. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 14000 rpm σε Κ.Σ.

10. Αφαιρούμε το ίζημα με οδοντογλυφίδα και το πετάμε.

11. Προσθέτουμε 200 μl H₂O και 600 μl ισοπροπανόλη.

12. Ανάδευση στο vortex.

13. Αφήνουμε για 10 min στους -20 °C.

14. Φυγοκεντρούμε για 10 min στις 11000 rpm στους 4 °C και στη συνέχεια πετάμε το υπερκείμενο.

15. Προσθέτουμε 1 ml 70 % αιθανόλη.

16. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 11000 rpm στους 4 °C και πετάμε το υπερκείμενο.

17. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl d H₂O.

Η/ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MIDI PREPARATION).

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας, δηλαδή, από καλλιέργειες βακτηρίων 100 ml, έγινε αφού βεβαιωθήκαμε για την ορθότητα των κατασκευών μας και με σκοπό να έχουμε ακόμα καθαρότερο πλασμιδιακό DNA και σε μεγαλύτερη ποσότητα – σε σχέση με τη μικρής κλίμακας απομόνωση. Με το DNA αυτό μπορούμε αφού επιβεβαιωθούμε και πάλι - συνήθως με μια πολλαπλή πέψη – για την ορθότητα των κατασκευών μας, να μετασχηματίσουμε κύτταρα, στους κλώνους των οποίων, θα επάγουμε την έκφραση της πρωτεΐνης, που μας ενδιαφέρει.

Πειραματική διαδικασία – αρχή της μεθόδου:

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος τα διαλύματα και οι στήλες της QIAGEN (Πιν. 2)

Πιο αναλυτικά:

1. μεταφέρουμε μια αποικία από κύτταρα, που έχουν μετασχηματιστεί με την κατασκευή που μας ενδιαφέρει, σε σωλήνα που περιέχει 2-5 ml με θρεπτικό υλικό (LB medium + αμπικιλίνη). Τα κύτταρα επωάζονται για 8 ώρες στους 37 °C στο δονούμενο επωαστήρα.
2. αραιώνουμε την αρχική καλλιέργεια 1:500 στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (LB medium + αμπικιλίνη) και σε όγκο 100 ml. Αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στους 37 °C για 12-16 ώρες (έως την επόμενη ημέρα) στο δονούμενο επωαστήρα.
3. την επόμενη ημέρα μοιράζουμε την καλλιέργεια των 100 ml σε δύο σωλήνες (falcon) των 50 ml και απομονώνουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 15 min στους 4 °C.
4. επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος P1 στο οποίο έχουμε προσθέσει RNAαση για την πέψη του RNA .
5. προσθέτουμε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος P2 ανακινούμε 4-5 φορές τους σωλήνες και τους αφήνουμε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. προσθέτουμε 4 ml διαλύματος P3 το οποίο βρίσκεται στους -4°C ανακατεύουμε ξανά αναποδογυρίζοντας 4-5 φορές τους σωλήνες και τους μεταφέρουμε στον πάγο για 15 min.
7. φυγοκεντρούμε τους σωλήνες στις 4000 rpm και για 30 min στους 4°C και μεταφέρουμε το υπερκείμενο με το DNA σε καθαρούς σωλήνες
8. φυγοκεντρούμε, πάλι στις 4000 rpm και για 15 min στους 4°C και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέους σωλήνες αφού το περάσουμε από μια γάζα ώστε να καθαριστεί από τυχόν ανεπιθύμητες προσμίξεις.
9. γίνεται η προετοιμασία της στήλης – μία στήλη για κάθε σωλήνα – με την εισαγωγή σε αυτήν 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος QBT και αφήνουμε όλη την ποσότητα να τρέξει από τη στήλη.
10. προσθέτουμε το υπερκείμενο με το DNA από το στάδιο (8) στις στήλες καθαρισμού και αφήνουμε όλο το διάλυμα να περάσει από τη ρητίνη της στήλης.
11. πλένουμε τις στήλες χρησιμοποιώντας από δύο φορές διάλυμα QC όγκου 4 ml .
12. ακολουθεί η έκλυση του πλασμιδιακού DNA από τις στήλες χρησιμοποιώντας 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος QF για κάθε στήλη.
13. η κατακρήμιση του DNA γίνεται με την προσθήκη 70% του όγκου, που περιέχεται σε κάθε σωλήνα , διαλύματος ισοπροπανόλης. Αναμιγνύουμε τα διαλύματα στους σωλήνες

και φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C. Προσεκτικά αφαιρούμε και πετάμε το υπερκείμενο.

14. επαναϊωρούμε το ίζημα – πρακτικά το DNA που έχουμε απομονώσει - σε 2 ml διαλύματος αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσεκτικά, χωρίς να πειράζουμε το ίζημα, αφαιρούμε και πετάμε το υπερκείμενο.
15. στεγνώνουμε το ίζημα – το πλασμιδιακό DNA δηλαδή – για 5-10 min και το επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο δις απεσταγμένου νερού. Για παράδειγμα καταλήγουμε να έχουμε δύο σωλήνες (erpendorf) με 50 μl στον καθένα διαλύματος DNA. Τους σωλήνες αυτούς τους αποθηκεύουμε στους -20 °C .

ΙΑ/ Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσω IPTG σε E.Coli

ΙΑ/ Αρχή της μεθόδου:

Το IPTG ή ισοπροπυλο-θειογαλακτοζιδίου είναι ένας επαγωγέας της μεταγραφής των γονιδίων, του οπερονίου της λακτόζης (lac O). Φυσιολογικά η μονάδα αυτή στο E.Coli ρυθμίζει την παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης και άλλων δύο πρωτεϊνών, που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γαλακτόζης βασική πηγή ανθρακικών αλυσίδων και ενέργειας για το μικροοργανισμό αυτό. Το IPTG συνδέεται με την κατασταλτική πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από συγκεκριμένη περιοχή του οπερονίου και η οποία εμποδίζει τη μεταγραφή των δομικών γονιδίων, (π.χ. β-γαλακτοσιδάση), , επάγοντας τη μεταγραφή.

Τα πλασμίδια pQE60 και zprQE60 (ή pQE60-protA) περιέχουν δύο τέτοιες μονάδες (lac O) και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α με IPTG. Τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν ανήκουν στη σειρά (strain) BLR/REp4 και θεωρούνται κατάλληλα για την επαγόμενη μέσω IPTG έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (το πλασμίδιο Rep4 εκφράζει την κατασταλτική πρωτεΐνη, που δεσμεύει το IPTG). Επιπλέον, έχουν αντίσταση στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, ιδιότητα που θα χρησιμοποιήσουμε για την επιλογή των σωστών αποικιών σε συνδιασμό με την αντίσταση του pQE-60 στην αμπικιλίνη.

ΙΑ2 / Πειραματική διαδικασία:

- ❖ Αφού γίνει η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο Δ/ ώστε τα κύτταρα BLR/REp4 να καταστούν δεκτικά στην εισαγωγή πλασμιδίων, κάνουμε το μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών με τα πλασμίδια που περιέχουν το cDNA τμήμα της πρωτεΐνης που θέλουμε να εκφράσουμε.

- ❖ Την επόμενη ημέρα αφού τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν σηκώνουμε 4-5 αποικίες από κάθε τριβλίο με τα μετασηματισμένα κύτταρα και τις μεταφέρουμε σε αντίστοιχους γυάλινους σωλήνες που περιέχουν 5-7 ml LB medium + αμπικιλίνη + καναμυκίνη.
- ❖ Τα κύτταρα επωάζονται όλο το βράδυ στους 37 °C στο δονούμενο επωαστήρα .
- ❖ Την επόμενη ημέρα 5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρονται σε 100 ml LB medium + αμπικιλίνη + καναμυκίνη και αφήνονται να πολλαπλασιαστούν έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει την τιμή 0.7.
- ❖ Στη συνέχεια από τα 100 ml τα 5 ml μεταφέρονται για επώαση στους 25 °C στο δονούμενο επωαστήρα για δύο ώρες. Στα κύτταρα αυτά δε θα γίνει επαγωγή της έκφρασης με IPTG. Τα υπόλοιπα 95 ml μεταφέρονται και αυτά στο δονούμενο επωαστήρα για επίσης δύο ώρες στους 25 °C αφού, όμως, προστεθεί σε αυτά ποσότητα IPTG τόση ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mM .
- ❖ Κατά τη διάρκεια της επώασης παρατηρούμε τη μεταβολή της οπτικής πυκνότητας ανά μισή ώρα.
- ❖ Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της επώασης απομονώνουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στους 4°C και στις 3000 rpm για 5 min.
- ❖ Πετάμε το υπερκείμενο.
- ❖ Επαναιωρούμε σε νερό τις απεσταγμένο και φυγοκεντρούμε πάλι στους 4°C στις 3000 rpm για 5 min.
- ❖ Πετάμε το υπερκείμενο και αποθηκεύουμε τα κύτταρα στους -20°C. Στη φάση αυτή και πριν το πάγωμα 2 ml αφαιρούνται για να αναλυθούν με SDS-PAGE.

IE/ Πηκτές πολυακρυλαμίδης – ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

B1/ Αρχή της μεθόδου

Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό πρωτεϊνών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ηλεκτροφόρες πολυακρυλαμίδης, στις οποίες οι πρωτεΐνες κινούνται διαμέσου των πόρων της ηλεκτροφόρης κάτω από την επίδραση σταθερού ηλεκτρικού πεδίου και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος ή σωστότερα το ηλεκτρικό καθαρό φορτίο μορίου προς την τριβή αυτού (Q / T), όπου το T εξαρτάται γενικά από το σχήμα και το μέγεθος του μορίου.

Οι ηλεκτροφόρες πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται ως αποτέλεσμα του συμπολυμερισμού με N,N-μεθύλενο-δις-ακρυλαμίδιο. Το μονομερές του ακρυλαμίδιο και το αντιδραστήριο της

διασταύρωσης, είναι σταθερά από μόνα τους έστω και αναμιγμένα ενώ πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη ενός συστήματος, που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Έτσι, προστίθεται ένας συνδυασμός από ρυθμιστικό διάλυμα, μονομερές, αντιδραστήριο διασταύρωσης και ορισμένες φορές και την πρωτεΐνη, στα δοχεία ηλεκτροφόρησης (σωλήνας ή δοχείο) και προκαλείται ο πολυμερισμός με την προσθήκη ενός συστήματος ελευθέρων ριζών στο δοχείο. Οι βιοχημικοί χρησιμοποιούν ή χημικές ή φωτοχημικές πηγές ελευθέρων ριζών. Στη χημική μέθοδο μια ουσία, που προκαλεί τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, όπως υπερθειικό αμμώνιο (APS), προστίθεται με τον καταλύτη N,N-τατραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Στη φωτοχημική μέθοδο το APS αντικαθίσταται από μια φωτοευαίσθητη ουσία (ριβοφλαβίνη), που δίνει ελεύθερες ρίζες με ακτινοβολία φωτός UV. Υπάρχουν πολλοί τρόποι, που χρησιμοποιούν διάφορες συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου, APS και TEMED καθώς και χρόνους πολυμερισμού.

Συνήθως χρησιμοποιείται η χημική μέθοδος για να φτιάξουμε πηκτές όταν δεν υπάρχουν βιολογικά μόρια και η πιο ήπια φωτοχημική διαδικασία, χρησιμοποιείται με τα βιολογικά μακρομόρια παρόντα κατά τη δημιουργία της πηκτής. Το σπουδαιότερο είναι ότι, οποιαδήποτε μέθοδος και αν χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό πηκτών πολυακρυλαμιδίου πρέπει να ακολουθηθεί επακριβώς. Επαναλήψιμοι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί απαιτούν ομοιόμορφες συνθήκες δημιουργίας των πηκτών.

Η σύγχρονη βιβλιογραφία περιέχει πολλές διαδικασίες ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού σε πηκτή. Ορισμένες χρησιμοποιούν πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό τη μορφή της ηλεκτροφόρησης ασυνεχούς πηκτής ή της ηλεκτροφόρησης πηκτής παρουσία SDS. Οι ανάλογες διαδικασίες περιγράφονται στη συνέχεια.

Μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής (disc- gel electrophoresis): Καταρχήν σήμερα πλέον, αντί για πολυμερισμό σε σωλήνα, προτιμάται συνήθως ο πολυμερισμός σε πλάκα η οποία σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια, ανάμεσα στα οποία και γίνεται ο πολυμερισμός των πηκτών συσσώρευσης και διαχωρισμού. Παράλληλα με τη πήξη της πηκτής συσσώρευσης, γίνεται και ο σχηματισμός των ειδικών θέσεων («τσεπάκια» ή «πηγαδάκια»), με τη χρήση μιας «χτένας», στα οποία και τοποθετούνται τα δείγματα. Με τον τρόπο αυτό και σε αντίθεση με τους σωλήνες περισσότερα του ενός δείγματα πρωτεϊνών μπορούν να διαχωριστούν ταυτόχρονα σε μια πηκτή. Το όλο σύστημα ονομάζεται ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli από τον πρώτο Άγγλο βιοχημικό, που το πρωτοεφάρμοσε (Laemmli, 1970).

Αραιά διαλύματα πρωτεϊνών εισέρχονται στο σύστημα από την επάνω στιβάδα, που έχει μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου (πηκτή συσσώρευσης ή stacking gel) pH 6.9. Η κάτω στιβάδα αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) pH 8.8 μεγαλύτερης

συγκέντρωσης σε πολυακρυλαμίδιο. Το όλο σύστημα βρίσκεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης pH 8.3.

Η διαφορά δυναμικού, που εφαρμόζεται, απαιτεί τη ροή ρεύματος με τη μορφή ιόντων στο σύστημα της πηκτής. Η ροή των ιόντων στα οποία ανήκουν και οι πρωτεΐνες που θα διαχωριστούν περιγράφεται από την εξίσωση :

$$(εφαρμοζόμενη τάση) * (καθαρό φορτίο μορίου)$$

$$[1] \text{ Κινητικότητα μορίου} = \frac{\text{-----}}{\text{(τριβή του μορίου)}}$$

Από την εξίσωση 1 προκύπτει ότι μεγαλύτερο φορτίο αυξάνει την κινητικότητα ενώ μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και ελαττώνει την κινητικότητα. Αρχικά τα ανιόντα γλυκίνης, που μεταφέρουν ένα μέσο φορτίο 0.1 σε pH 8.3 κινούνται μέσα στο δείγμα και στην πηκτή συσσώρευσης. Εκεί λόγω της αλλαγής του pH από 8.3 σε 6.9 αλλάζει η κινητικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα γλυκίνης κινούνται πιο αργά από τις πρωτεΐνες στο συγκεκριμένο πηκτώμα – οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερο ανιονικό φορτίο – και έτσι συμβάλλουν στη συσσώρευση των πρωτεϊνών μεταξύ τους και στην επιστοιβάξη τους στα όρια των δύο πηκτών. Τα ιόντα χλωρίου τέλος κινούνται λόγω μεγέθους πιο γρήγορα από τα άλλα μόρια και στις δύο πηκτές.

Όταν οι πρωτεΐνες εισέρχονται στην πηκτή διαχωρισμού, αλλάζει και η κινητικότητά τους, αφενός μεν λόγω της αλλαγής του pH – από 6.9 σε 8.3 – αφετέρου δε λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή διαχωρισμού. Έτσι, οι πρωτεΐνες κινούνται πιο αργά από τα ιόντα της γλυκίνης και να διαχωρίζονται ανάλογα πλέον με το μοριακό τους βάρος.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτές με SDS : Τα συστήματα ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου με δωδεκανοθειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate : SDS), χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν και να χαρακτηρίσουν τον αριθμό και το μέγεθος των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών τους σε ένα δείγμα. Αρχικά το παρασκεύασμα της πρωτεΐνης αντιδρά με μια περίσσεια μιας διαλυτής θειόλης (R-SH ή μερκαπτοαιθανόλη) και SDS. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η περίσσεια R-SH ανάγει όλους τους δεσμούς S-S που υπάρχουν στις πρωτεΐνες και το απορρυπαντικό SDS ενώνεται με όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης και καταργεί όλες τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτά έχει σαν αποτέλεσμα την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Η ανιονική

αποδιαταγμένη σε σύμπλοκο με SDS πρωτεΐνη διαχωρίζεται, τότε ηλεκτροφορητικά σε ένα περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος, που έχειθειόλη και SDS, συν μια υψηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου. Το SDS, που ενώνεται με τις πρωτεΐνες, δίνει ένα σταθερό λόγο φορτίου προς μάζα (τριβή) για όλες τις πρωτεΐνες και τις αλυσίδες τους ενώ η συγκέντρωση της πηκτικής επιδρά ως ένα μοριακό κόσκινο οπότε το ιζώδες και το μέγεθος των πόρων της πηκτικής καθορίζουν την κινητικότητα. Έτσι, η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου, είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Τα συστήματα πηκτικής, τέλος, SDS είναι χρήσιμα για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, καθαρά παρασκευάσματα πρωτεϊνών, μπορούν αμέσως να αναλυθούν και να διαπιστωθεί η ομοιογένεια τους, δηλαδή, να δούμε εάν κατά το χρωματισμό τους δημιουργούνται αχνές ζώνες άλλων συστατικών. Ακόμη καθαρές πρωτεΐνες μπορούν να αναλυθούν για να διαπιστωθεί ο αριθμός των υπομονάδων τους.

Θ2/ Πειραματική διαδικασία:

ΥΛΙΚΑ:

Ορθογώνια τζάμια μήκους 12 cm, ύψους 10 cm, διαχωριστικά (spacers) πάχους 0.75 mm, συσκευή ηλεκτροφόρησης, τροφοδοτικό σταθερής τάσης και συνεχούς ρεύματος, σύριγγα Hamilton.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

1) Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτικής διαχωρισμού (4 x):

0.375 M Tris-HCl pH 8.8

2 mM EDTA

0.1 % SDS

2) Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτικής συσσώρευσης(4 x) :

0.125 M Tris – HCl pH 6.8

2 mM EDTA

0.1 % SDS

3) 2 % πολυακρυλαμίδιο

4) 30 % ακρυλαμίδιο / 0.8 % δις ακρυλαμίδιο

5) υπερθειϊκό αμμώνιο (APS)

6) TEMED

7) Ρυθμιστικό διάλυμα δοχείου ηλεκτροφόρησης :

50 mM Tris

0.38 M γλυκίνη

0.1 % SDS

2 mM EDTA

8) Ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο προστίθενται τα δείγματα πρωτεϊνών πριν εισαχθούν στα πηγαδάκια(4 x loading buffer) :

250 mM Tris-HCl pH 6.8

9.2 % SDS

40 % γλυκερόλη

0.2 % (w/v) βρωμοφαινόλη μπλε

100 mM DDT (προστίθεται λίγο πριν την προετοιμασία των δειγμάτων)

9) διάλυμα χρωματισμού της πηκτής

0.5 % Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) σε καθαρή (100%) αιθανόλη

20% οξικό οξύ

αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1

10) διάλυμα αποχρωματισμού της πηκτής :

30 % αιθανόλη

10% οξικό οξύ

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

- πρώτα παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού – ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση ακρυλαμίδιου – ως εξής :

	8%	10%	12%
30% ακρυλαμίδιο	2.7 ml	3.33 ml	4 ml
4 x διάλυμα διαχωρισμού	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
νερό δις απεσταγμένο	4.85 ml	4.15 ml	3.5 ml
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl
10 % APS	40 μl	40 μl	40 μl

Αφού μεταφέρουμε το διάλυμα διαχωρισμού στο χώρο ανάμεσα στα ορθογώνια γυάλινα πλαίσια όπου θα σχηματιστεί η πηκτή διαχωρισμού, γεμίζουμε τον εναπομείναντα χώρο – ύψους 2 περίπου cm έως τα όρια των δύο ορθογώνιων γυάλινων πλαισίων – με νερό, για τον καλύτερο πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου. Το νερό αυτό αδειάζουμε στη συνέχεια , όταν σχηματιστεί η πηκτή διαχωρισμού (χρόνος πολυμερισμού 15-20 min).



- Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή συσσώρευσης ως εξής :

30 % ακρυλαμίδιο	1.2 ml
ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής συσσώρευσης	2.0 ml
νερό δις απεσταγμένο	4.7 ml
10 % APS	50.0 μ l
TEMED	50.0 μ l

Αφού μεταφερθεί το διάλυμα εντός των ορθογώνιων γυάλινων πλαισίων, πάνω από την πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται η πλαστική χτένα, για το σχηματισμό των θέσεων «φορτώσεως» των δειγμάτων και περιμένουμε να πολυμεριστεί το ακρυλαμίδιο. Ο χρόνος αναμονής είναι περίπου 10-15 min.

Στη συνέχεια προσεκτικά αφαιρούμε τη «χτένα» και ξεπλένουμε τα «πηγαδάκια» με νερό.

- Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των δειγμάτων η οποία γίνεται ως εξής:
αναμιγνύουμε το κάθε δείγμα με τον κατάλληλο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (4 x loading buffer).

Μεταφέρουμε τα δείγματα στους 95 °C για 3 min

- Τέλος, φορτώνουμε τα δείγματα στα «πηγαδάκια» και συνδέουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το τροφοδοτικό για να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση. Η τάση ρυθμίζεται στα 150 Volts και το «τρέξιμο» των δειγμάτων διαρκεί περίπου μία ώρα έως ότου το μπλε μέτωπο φτάσει στην κάτω άκρη της πηκτής.
- Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολουθεί το βήσιμο της πηκτής με το διάλυμα Coomassie Blue τουλάχιστον για μισή ώρα σε συσκευή ανάδευσης. Το συγκεκριμένο διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές.
- Το ξέπλυμα της πηκτής από το διάλυμα βαφής γίνεται με το διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής, το οποίο ανανεώνεται 2-3 φορές και για χρόνο, περίπου, 45 min, έως ότου καθαρίσει η πηκτή και εμφανιστούν οι έγχρωμες οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες.
- Το στέγνωμα της πηκτής μπορεί να γίνει αφού την τοποθετήσουμε σε διηθητικό χαρτί και την καλύψουμε με διαφανή μεμβράνη, στη συσκευή ξήρανσης (1 hour, 70 °C).

II/ Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Western Blotting)

III/ αρχή της μεθόδου – υλικά

Για τη μεταφορά των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της BIORAD και η μέθοδος semi-dry :SD,(ημι-στέγνης) ηλεκτροφορητικής μεταφοράς.

Βάσει της μεθόδου οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην πηκτή μετακινούνται προς την άνοδο(+), κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού τους φορτίου και δεσμεύονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Το ρυθμιστικό διάλυμα για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Bjerrum and Schafer-Nielsen transfer bufer) κατασκευάστηκε ως εξής:
48 mM Τρις 39 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, 1.3 mM SDS
το pH πρέπει να είναι περίπου 9.2 και δεν προσθέτουμε οξύ ή βάση για να ρυθμίσουμε αυτό.
- Ponceau S 0.2% :χρησιμοποιήσαμε διάλυμα του εμπορίου που περιείχε:
2% ponceau
30% τριχλωρο-οξικό οξύ
30% σουλφοσαλικυλικό οξύ
το διάλυμα αυτό το αραιώσαμε 1:10 ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση (0.2 %).
- Phosphatae Buffer Saline (PBS) pH 7.5: σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό διαλύουμε:
11.5 g disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (80 mM)
2.96 g sodium dihydrogen orthophosphate (20 mM)
5.84 g sodium chloride (100 mm)
- PBS- T : 0.1% Tween 20 στο διάλυμα PBS
- διάλυμα κορεσμού μεμβράνης (membrane blocking agent): 5 g άπαχου αφυδατωμένου γάλακτος σε 100 ml PBS-T.
- HRP- δεύτερο αντίσωμα: η αραιώση του αντισώματος είναι 1:1000 (HRP: horse radish peroxide)

Πειραματική διαδικασία:

- ❖ Βγάζουμε την πηκτή από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τη μεταφέρουμε στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για περίπου 15 min.
- ❖ Μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε διάλυμα μεταφοράς για επίσης 15 min, αφού κοπεί στις διαστάσεις της πηκτής.
- ❖ Στη συσκευή μεταφοράς τοποθετούμε με την ακόλουθη σειρά:

1. τρία διηθητικά χαρτιά, που έχουμε κόψει στις διαστάσεις της πηκτής και έχουμε πρωτότερα εμβαπτίσει στο διάλυμα μεταφοράς. Αφαιρούμε τις τυχόν φυσαλίδες αέρα με μια γυάλινη ράβδο.
 2. τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που είχαμε μεταφέρει στο διάλυμα μεταφοράς. Πάλι αφαιρούμε με τον ίδιο τρόπο τις φυσαλίδες αέρα.
 3. την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που είχαμε μεταφέρει στο διάλυμα μεταφοράς.
 4. τρία διηθητικά χαρτιά, που έχουμε κόψει στις διαστάσεις της πηκτής και έχουμε εμβαπτίσει στο διάλυμα μεταφοράς. Αφαιρούμε, πάλι, τις φυσαλίδες αέρα.
- ❖ Κλείνουμε τη συσκευή – η κάθοδος (-) βρίσκεται στο άνω μέρος – και τη συνδέουμε με το τροφοδοτικό. Εφαρμόζουμε συνεχή τάση 10 V για μία ώρα.
 - ❖ Μετά το πέρας της μεταφοράς αποσυνδέουμε από το τροφοδοτικό, ανοίγουμε τη συσκευή και μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε διάλυμα ronceau 0.2%, για 1 min.
 - ❖ Αφαιρούμε το διάλυμα ronceau 0.2% και ξεπλένουμε τη μεμβράνη με νερό. Οι ζώνες με τις πρωτεΐνες εμφανίζονται τότε με κόκκινο χρώμα. Σημειώνουμε τις ζώνες, που μας ενδιαφέρουν και κόβουμε τη μεμβράνη στο ένα άκρο (συνήθως το κάτω δεξιό), ώστε να γνωρίζουμε στη συνέχεια τον προσανατολισμό της.
 - ❖ Ξεπλένουμε με PBS έως ότου φύγει η μεμβράνη αποχρωματιστεί εντελώς.
 - ❖ Μπλοκάρουμε τις πρωτεΐνες της μεμβράνης με το διάλυμα κορεσμού της μεμβράνης ώστε να μην υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση με άλλες ουσίες για μία ώρα στον αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου. Εναλλακτικά το μπλοκάρισμα μπορεί να γίνει στους $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως την επόμενη ημέρα.
 - ❖ Ξεπλένουμε με PBS-T αλλάζοντας το διάλυμα τρεις φορές :
Την πρώτη φορά μετά από επώαση στον αναδευτήρα για 15 min
Τις άλλες δύο μετά από επώαση στον αναδευτήρα 5 min

ΙΑ/Επώαση με αντίσωμα – ανοσοενζυμικές μέθοδοι (χρωματική αντίδραση και

Ενισχυμένη χημειοφωταίνεια (ECL: Enhanced Chemie Luminescence)

Υλικά- αρχή της μεθόδου:

Χρησιμοποιήκαν τα εξής αντισώματα για την ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών:

1. αντίσωμα PAP- HRP (rabbit): το ενζυμοσύνδετο αυτό αντίσωμα συνδέεται με την περιοχή z της protA. Το αραιώσαμε πριν την επώαση 1:1000 σε PBS-T
2. αντίσωμα αντί-HIF-1α (rabbit). Το αραιώσαμε 1:200 σε PBS-T
3. δεύτερο ενζυμοσύνδετο (goat-anti- rabbit) αντίσωμα για το αντί-HIF-1α το αραιώσαμε 1:5000 PBS-T

επίσης τα παρακάτω διαλύματα και όργανα:

1. τα διαλύματα ανίχνευσης σήματος 1 και 2 της ECL περιέχουν τη λουμινόλη η οποία όταν οξειδώνεται εκπέμπει φωτεινή ακτινοβολία (φωταύγεια)
2. τα διαλύματα στερέωσης και εμφάνισης των φιλμς.
3. η συσκευή (κασέτα) έκθεσης του φιλμ
4. ένα γυάλινο πλαίσιο περίπου 15 x 15 cm
5. διάλυμα χρωματικής αντίδρασης:
σε 1 ml μεθανόλη διαλύουμε 10 μl γλωροναφθόλη

Πειραματική διαδικασία (ECL):

1. μετά το ξέπλυμα της μεμβράνης με PBS-T , την επόμενη ημέρα επωάζουμε με το πρώτο αντίσωμα για 1-3 ώρες ή έως την επόμενη ημέρα στους -4°C .
2. ξεπλένουμε με PBS-T για μισή ώρα αλλάζοντας ενδιάμεσα το διάλυμα 3 φορές.
3. προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα και επωάζουμε με αυτό τη μεμβράνη για 1 ώρα.
4. ξεπλένουμε με PBS-T για μισή ώρα αλλάζοντας ενδιάμεσα το διάλυμα 3 φορές.

Στο σκοτεινό θάλαμο:

5. επωάζουμε χωρίς ανάδευση τη μεμβράνη για 1 λεπτό, με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης, αφού τα αναμειξουμε σε αναλογία 1:1.
6. τοποθετούμε τη μεμβράνη πάνω στο γυαλί και την καλύπτουμε με Saran-Wrap.
7. τοποθετούμε το γυάλινο πλαίσιο με τη μεμβράνη στη κασέτα και από πάνω τοποθετούμε ένα φιλμ της ECL. Κόβουμε την αντίστοιχη γωνία του φιλμ.
8. ακολουθεί η πρώτη έκθεση του φιλμ για 5-15 min και αν χρειαστεί μετά από 10-15 min και δεύτερη για 15 min
9. τέλος εμφανίζουμε και στερεώνουμε το φιλμ περνώντας το από τα αντίστοιχα διαλύματα για 15 min, το ξεπλένουμε με νερό και το στεγνώνουμε στον αέρα.

Στη συνέχεια μετά την ECL ή ανεξάρτητα από αυτήν αφού μπλοκάρουμε τη μεμβράνη, μπορεί να γίνει η χρωματική ανίχνευση ως εξής:

- στο διάλυμα χρωματικής αντίδρασης προσθέτουμε 9 ml PBS και 10 μl H_2O_2 30%.
- Επωάζουμε για 20 min ή έως να δούμε τις ζώνες που μας ενδιαφέρουν.
- Ξεπλένουμε με PBS.

ΙΕ/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ

Αρχή της μεθόδου

Πρωτεΐνες ανασυνδιασμένες όπως στην περίπτωση μας ο HIF-1α μπορούν να καθαριστούν από ένα ομογενοποίημα πρωτεϊνών με τη χρήση της τεχνικής, που ονομάζεται χρωματογραφία συγγένειας. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα ενός μορίου να σχηματίζει χημικό σύμπλοκο με κάποιο στοιχείο της στήλης και άρα να παραμένει στη σταθερή φάση μιας χρωματογραφικής στήλης, καθώς διέρχεται μέσω αυτής. Στη συνέχεια το μόριο, που μας ενδιαφέρει ανακτάται από τη στήλη μέσω ενός διαλύματος, το οποίο περιέχει μια ένωση ή ένα μόριο με μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με το μόριο που θέλουμε να εκλούσουμε.

Οι στήλες, που χρησιμοποιήθηκαν, φέρουν νικέλιο το οποίο και σχηματίζει χηλική ενώση με το ημιδαζόλιο των έξι ιστιδινών (6His-tag). Η επιλογή έγινε επειδή η χημική πρωτεΐνη που κατασκευάσαμε είτε μέσω του pQE60 είτε μέσω του pQE60 -protA, περιείχε στο καρβόξυτελικό της άκρο μια ουρά έξι ιστιδινών (6-His-tag). Το μοντέλο καθαρισμού εξηγείται παραστατικά στην εκ. 3.

Η/ Πειραματική διαδικασία

ΟΡΓΑΝΑ

Χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Στήλες NTA-Sepharose
- 2) Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Συσκευή υπερήχων

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- 1) Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer:LB):

50 mM Tris-Cl pH 7.4

200 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη

- 2) διάλυμα refablock: 10 mg σκόνης εμπορίου σε 1 ml νερό και στη συνέχεια αραιώση 1:1000
- 3) αναστολέας πρωτεασών (protease inhibitor)
- 4) διάλυμα ημιδαζολίου 2.5 M (stock)
- 5) διάλυμα σουκρόζης 2.5 M

ΕΚΤΕΛΕΣΗ

- Τα κύτταρα, που βρίσκονται στην κατάψυξη (-20 °C), επαναιωρούνται σε 5 ml διαλύματος λύσης (1), στο οποίο έχουν προστεθεί διάλυμα (2) 0.1 mg/ml .

- Όλα τα διαλύματα πριν και μετά τη λύση των κυττάρων καθώς και κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους βρίσκονται σε πάγο.
- Τα κύτταρα στη συνέχεια λύνονται με τη χρήση υπερήχων οι οποίοι εφαρμόζονται ανά 10 sec και έχουν διάρκεια επίσης 10 sec. Οι υπερήχοι εφαρμόζονται με τον τρόπο αυτό 20 φορές (είκοσι κύκλοι).
- Απομάκρυνση και φύλαξη 100 μl από το διάλυμα με τα λυμένα κύτταρα (total extract : TE) σε ξεχωριστό σωλήνα (erpendorf) των 1.5 ml .
- Φυγοκέντρωση στη ψυχόμενη φυγόκεντρο των λυμένων κυττάρων αφού μοιραστούν σε σωλήνες (erpendorfs) των 2 ml (11000 rpm , 4 °C , 15 min)
- Από το συνολικό υπερκείμενο (S) όγκου 5 ml τα 100 μl μεταφέρονται σε ξεχωριστό σωλήνα (erpendorf) των 1.5 ml .
- Το ίζημα (pellet: P) επαναιωρείται σε 5 ml διαλύματος λύσης και από αυτό το διάλυμα 100 μl μεταφέρονται σε σωλήνα (erpendorf) των 1.5 ml
- Ακολουθεί η προετοιμασία της στήλης με τη μεταφορά σε αυτήν 200 ml NTA ρητίνης και ξέπλυμα με 10 ml διαλύματος λύσης.
- Στη συνέχεια εισάγουμε από το πάνω μέρος της στήλης το συνολικό υπερκείμενο - εκτός από τα 100 μl που έχουμε κρατήσει - και το αφήνουμε να επωαστεί μαζί με τη στήλη για 1.5 hours με συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία 4 °C .
- Ακολουθεί έκλυση της στήλης - πάντα στους 4 °C - και το εκλούμενο διάλυμα (flow through: FT) συλλέγεται σε γυάλινο σωλήνα (\approx 5 ml). Από αυτό 100 μl μεταφέρονται σε σωλήνα (erpendorf) των 1.5 ml.
- Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με 20 ml διαλύματος λύσης.
- Έκλυση της στήλης με 5 ml διαλύματος ημιδαζολίου 20 mM σε διάλυμα λύσης.
- Συλλογή εκλουόμενων κλασμάτων ανά 1 ml (W1-W5)
- Έκλυση της στήλης με 3 ml διαλύματος ημιδαζολίου 200 mM σε διάλυμα λύσης.
- Συλλογή εκλουόμενων κλασμάτων ανά 1 ml (E1-E3)
- Τα κλάσματα καθαρισμού αποθηκεύονται στους -20 °C , αφού προστεθεί σε αυτά διάλυμα σουκρόζης (stock) τόσου όγκου, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 250 mM.

ΙΣΤ/ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στην παρούσα πειραματική εργασία, καλλιεργήσαμε κύτταρα *Escherichia Coli* σε υγρά και στερεά θρεπτικά μέσα σε θερμοκρασία 37 ° C αλλά και 29 ° C στα πειράματα επαγωγής έκφρασης. Το θρεπτικό υλικό, που χρησιμοποιήσαμε ονομάζεται LB -medium και το παρασκευάσαμε ως εξής:

Σε 1 λίτρο δις απεσταγμένο νερό διαλύουμε:

10 g bacto tryptone: προκύπτει από την πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα πρωτεϊνών βακτηριακών κυττάρων.

5 g bacto-yeast-extract: εκχύλισμα από κύτταρα ζύμης και βακτηρίων.

10 g NaCl

20 g agar. Το άγαρ προστίθεται στο θρεπτικό μέσο στην περίπτωση που θα γίνουν οι καλλιέργειες σε τριβλία (στερεό θρεπτικό μέσο)

το θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο και τα τριβλία πριν απλωθούν αποστειρώνονται με ακτινοβολία UV για μισή ώρα.

Τα αντιβιοτικά επιλογής προστίθενται αφού η θερμοκρασία του LB -medium κατέβει στους 55 ° C. Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο LB -medium είναι:

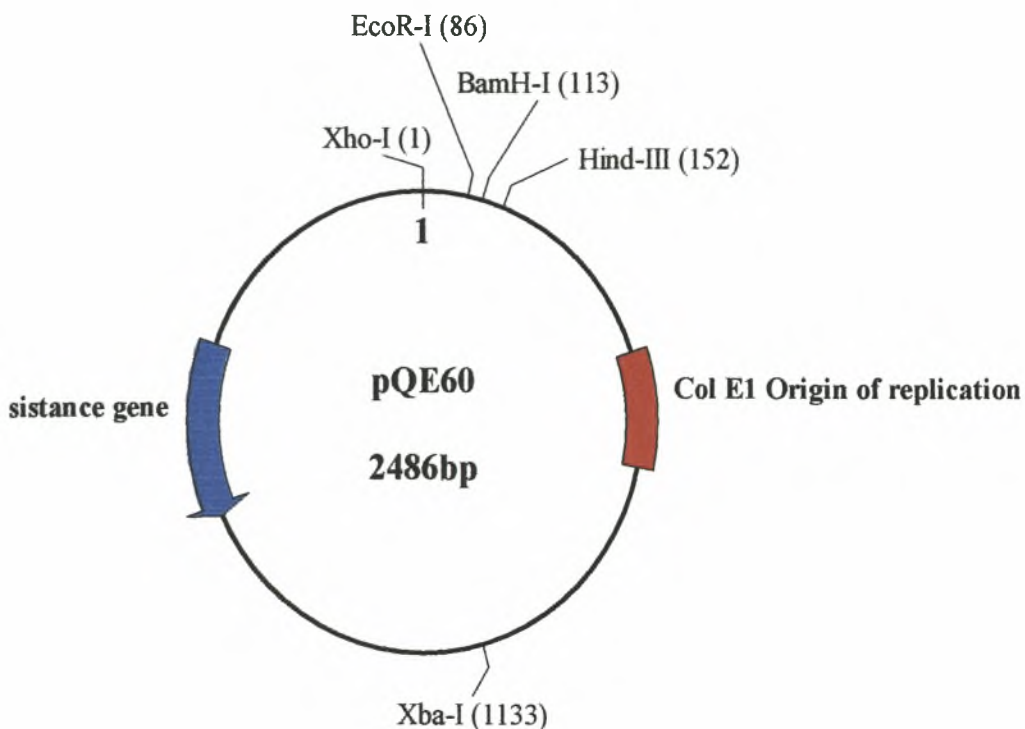
Για την αμπικιλλίνη: 20 µg/ml

Για την καναμυκίνη: 10 µg/ml

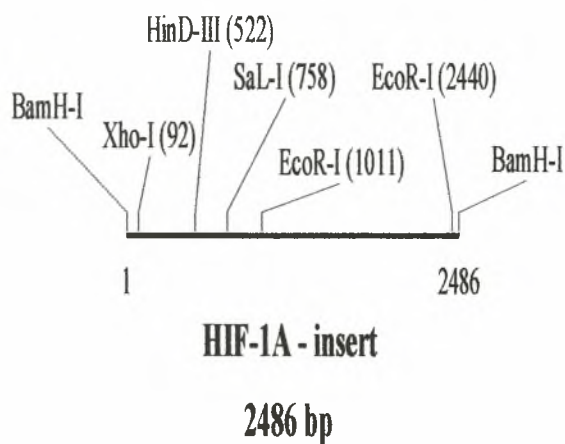
ΙΖ/ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ: pQE60 και zzbQE60

Τα πλασμίδια, που χρησιμοποιήσαμε, φέρουν από την εταιρία που τα παρασκευάζει (QIAGEN), τις κατάλληλες προδιαγραφές για τα πειράματα μας, δηλαδή την περιοχή με τις θέσεις πέψης με διαφορετικά ένζυμα (MCS: Multiple Clonig Site) το 6-His tag και το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλλίνη. Επιπλέον το zzbQE60 φέρει μετά τη θέση ATG (κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής) και το αναγνωστικό πλαίσιο για την έκφραση του πολυπεπτιδίου (protA), που θα χρησιμοποιήσουμε για την ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών που εισάγονται σε αυτό (HIF-1α και snurportins).

Στα επόμενα σχήματα δείχνονται το pQE60 με τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήσαμε και το τμήμα του γονιδίου του HIF-1α (insert), με τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε για τον έλεγχο του προσανατολισμού του μετά την εισαγωγή στο pQE60.

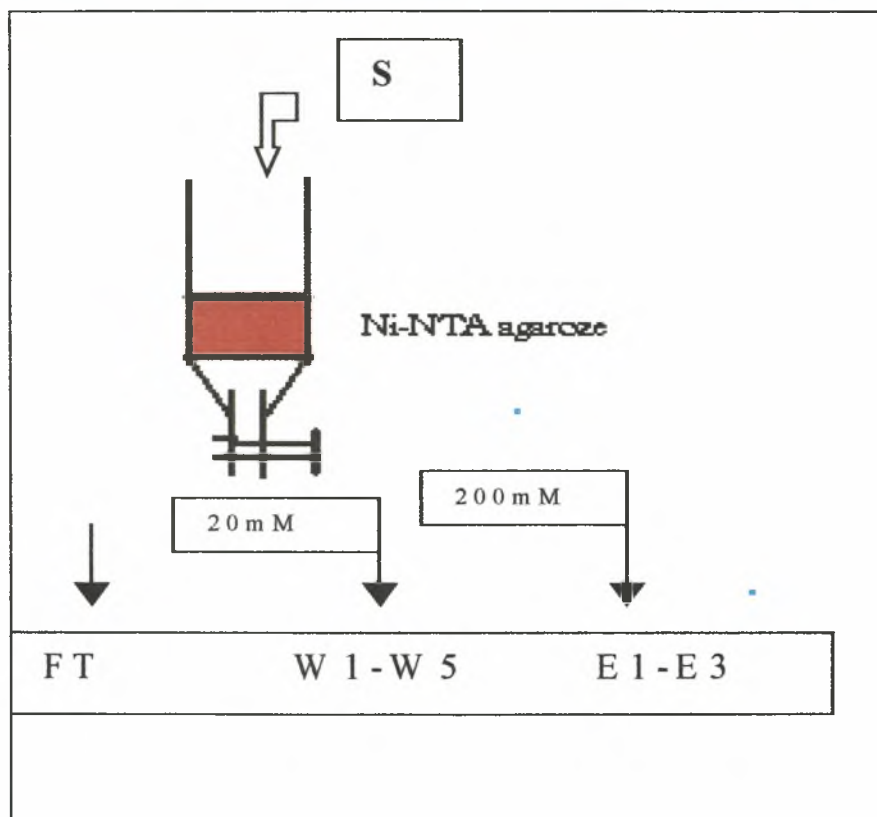
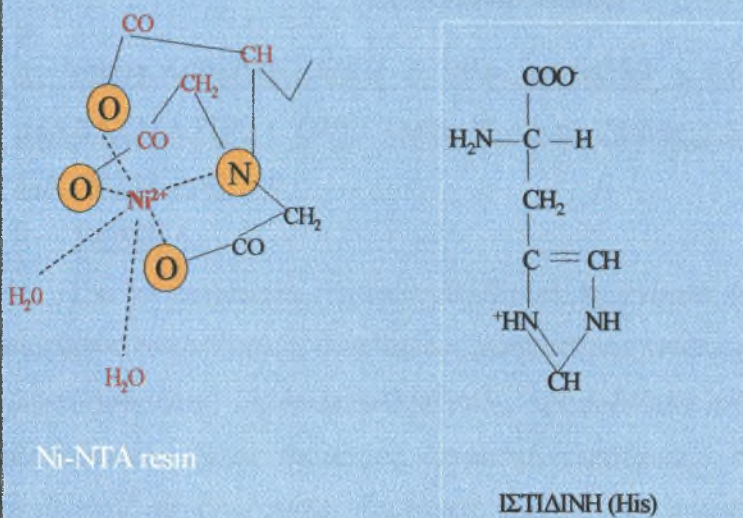


εικόνα 1: το πλασμίδιο pQE60 και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα πειραματική εργασία



εικόνα 2: το cDNA τμήμα του HIF-1α που εισήχθει στο pQE60 και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ- ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ HIF-1α



Εικόνα 3: η ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη συγκρατείται στη στήλη καθαρισμού μέσω του ημιδαζολικού δακτυλίου των έξι ιστιδινών (6His-tag). Ο ημιδαζολικός δακτύλιος σχηματίζει με κάθε ιόν νικελίου δύο δεσμούς και συγκρατείται ισχυρά στη στήλη. Η ανάκτηση από τη στήλη της πρωτεΐνης γίνεται με 200mM ημιδαζολίου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

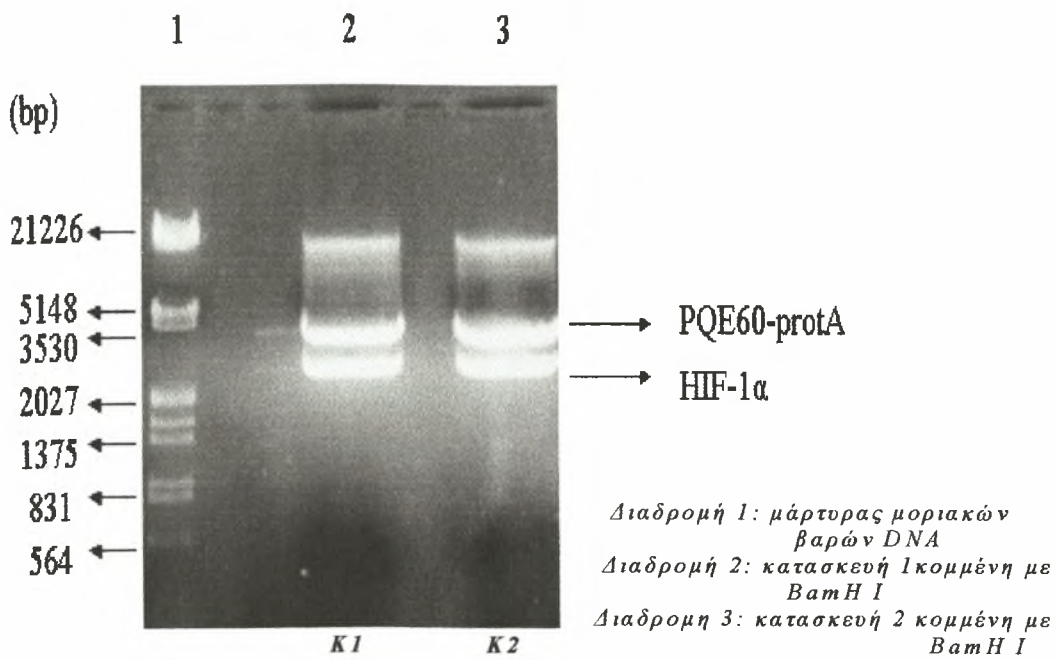
1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ (SUBCLONING) ΤΟΥ ΑΝΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΔΙΑΒΑΣΜΑΤΟΣ (ORF: Open Reading Frame) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ HIF-1 α ΣΤΟ ΠΑΣΜΙΔΙΟ pOE60

ΓΕΝΙΚΑ:

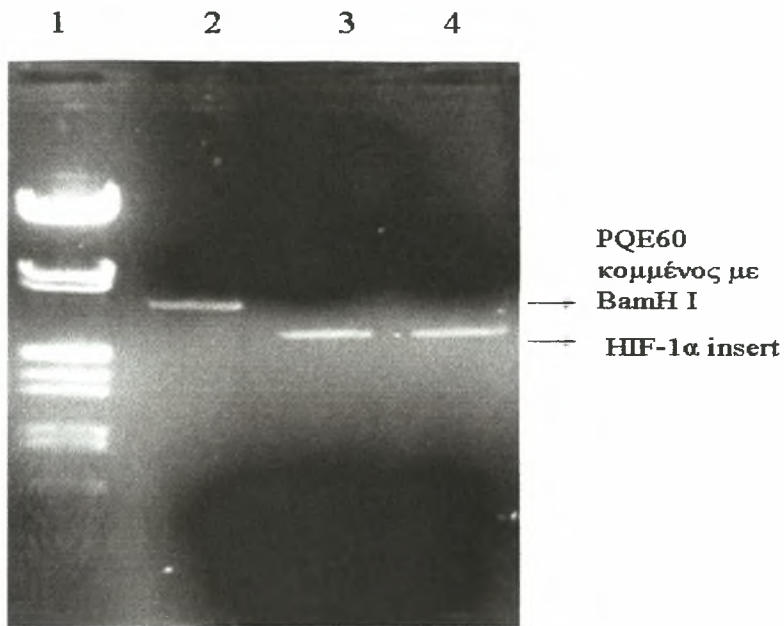
Για τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν τα όργανα (φυγόκεντρος θερμοκρασίας δωματίου, ψυχόμενη φυγόκεντρος, δονούμενος επωαστήρας, συσκευή ηλεκτροφόρησης αγαρόζης, συσκευή ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου, τροφοδοτικά συνεχούς ρεύματος, φούρνος επώασης, ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας, συσκευή υπερήχων, συσκευή αποστείρωσης, φωτογραφικό μηχάνημα, αντιδραστήρια, αυτόματες πιπέτες κλπ) του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής της Λάρισας.

1.1/ ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΤΟΥ ORF ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ HIF-1 α ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ pOE60-protA + HIF-1 α

Το τμήμα του γονιδίου του HIF-1 α , απομονώθηκε από τις κατασκευές, που είχαν γίνει με το pQE60-protA (zppQE60). Έγινε πέψη του απομονωμένου-καθαρού πλασμιδιακού DNA (5 μ l από midi preparation των κατασκευών 1 και 2, που στο εξής θα ονομάζονται **K₁** και **K₂**) με 2 μ l από το περιοριστικό ένζυμο BamH-I. Τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και ακολούθησε φωτογράφιση και αφαίρεση του τμήματος της πηκτής με το ORF τμήμα του HIF-1 α . Το λιώσιμο των δύο τμημάτων της πηκτής (\approx 200 mg το κάθε τμήμα) και ο καθαρισμός των DNA τμημάτων έγιναν όπως περιγράφεται στην παράγραφο ΜΕΘ.Γ/. Στην εικόνα 1 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση μετά την πέψη και στην εικόνα 2 η ηλεκτροφόρηση μετά τον καθαρισμό του DNA τμήματος του HIF-1 α , δηλαδή επιβεβαιώνουμε ότι με τον καθαρισμό απομονώσαμε το DNA τμήμα που μας ενδιαφέρει. Το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου του HIF-1 α , στη συνέχεια θα ονομάζεται για συντομία **insert**



Εικόνα 1: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% δειγμάτων από δύο κατασκευές (K_1 και K_2) pQE60-protA+HIF-1α προερχόμενες από διαφορετικές καλλιέργειες *E.Coli*

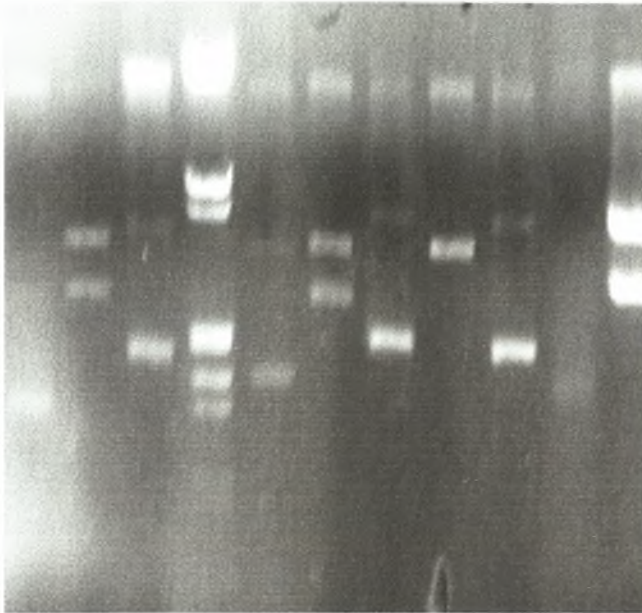
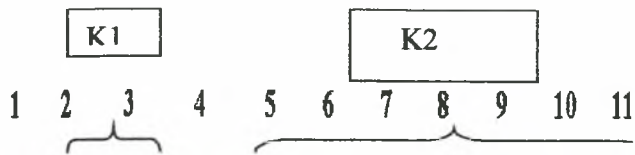


Εικόνα 2: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, δειγμάτων DNA 1 μl από τα τμήματα, που αφαιρέθηκαν από τις κατασκευές K₁ και K₂ μαζί με 0.5 μl από το pQE60

1.2/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΟΥ INSERT ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pQE60

Ακολούθησε η εισαγωγή των δύο insert, που απομονώσαμε από δυο διαφορετικούς κλώνους μετασηματισμένων κυττάρων με το pQE60-protA + HIF-1α, σε ένα άλλο πλασμίδιο το pQE60. Με τον τρόπο της επανεισαγωγής τμήματος του HIF-1α σε άλλα πλασμίδια ελέγχουμε ταυτόχρονα και το ίδιο το insert Η εισαγωγή και ο μετασηματισμός πάντα σε κύτταρα TOP 10 δεκτικά (ΜΕΘ.Δ/), έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως και για το zzpQE60 (αντίδραση λιγάσης) και μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε πέψη με το BamH-I.

Μετά την ηλεκτροφόρηση του κομμένου πλασμιδιακού DNA και τη φωτογράφιση της πηκτής παρατηρήσαμε ότι (εικόνα 3):



διαδρομή 1- διαδρομή 3: δείγματα από τον ανασυνδιασμό του insert της K_1 με το pQE60

διαδρομή 5 – διαδρομή 10 : δείγματα από τη ligation του insert της K_2 με το pQE60

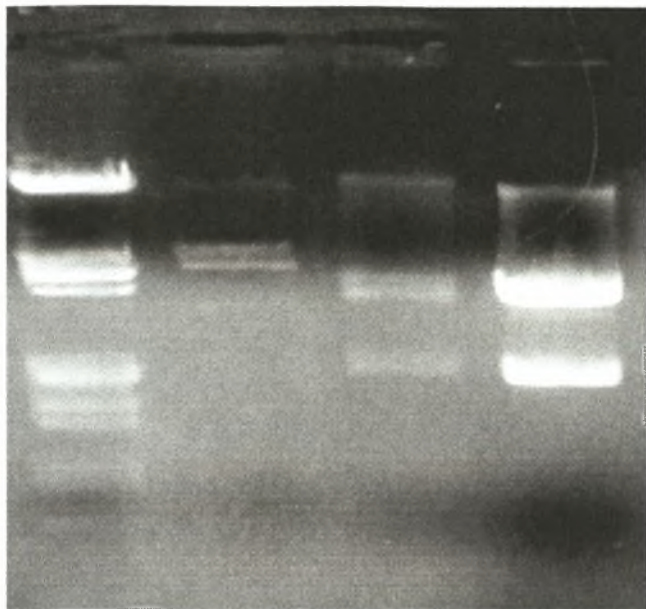
διαδρομή 4: μάρτυρας μοριακών βαρών DNA

διαδρομή 11: δείγμα από την κατασκευή K_1 (pQE60-protA +HIF-1α)

Εικόνα 3: Πέψη με *Bam*H I πλασμιδιακού DNA που προήλθε από mini-preps των αποικιών, που αναπτύχθηκαν μετά το μετασχηματισμό των κυττάρων. Αναλόγησαν 2 μ l DNA από τις mini-preparation και 0.5 μ l από την K_1 (το διάλυμα με την K_1 είναι προϊόν midi-preparation) σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Από τις εννέα αποικίες που συνολικά αναπτύχθηκαν μετά το μετασχηματισμό - η επιλογή έγινε μέσω αμπικιλίνης - σε δύο , και μάλιστα μία για κάθε ένα από τα δύο insert που απομονώθηκαν από τις K_1 και K_2 , περιέχεται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pQE60 + HIF-1α). Μένει να εξετάσουμε τον προσανατολισμό των τμημάτων που εισήχθησαν. Ο προσανατολισμός ελέγχεται με νέα πέψη των δύο υποψήφιων κατασκευών, που ονομάζουμε K_3-2 και K_4-2 με το περιοριστικό ένζυμο HIND-III

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (εικ. 4)



διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

διαδρομή 2: δείγμα DNA, που αντιστοιχεί στην κατασκευή $K_3 -2$ μετά από πέψη με Hind III

διαδρομή 3: δείγμα DNA που αντιστοιχεί στην κατασκευή $K_4 -2$ μετά από πέψη με Hind III

διαδρομή 4: δείγμα DNA που αντιστοιχεί στην κατασκευή (pQE60-protA +HIF-1α), μετά από πέψη με Hind III .

Εικόνα 4: πέψη με Hind III DNA από mini-preparations για έλεγχο του προσανατολισμού του insert. Αναλόγησαν 2 μ l DNA από τις mini-preparations και 0.5 μ l DNA της K_1 σε πηκτή αγαρόζης 1%.

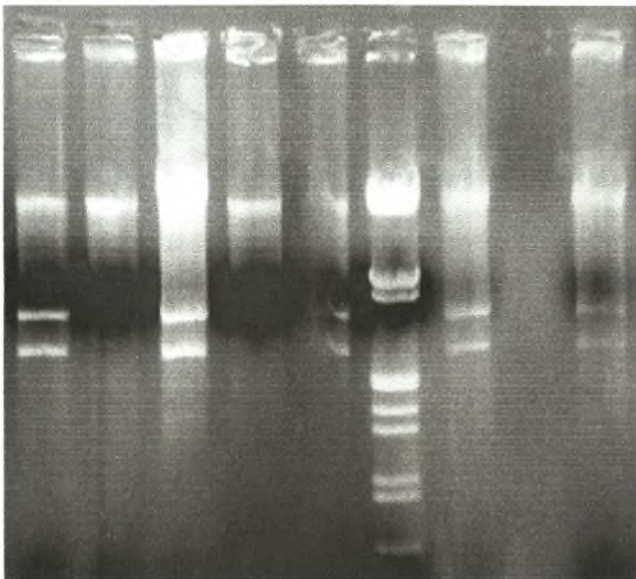
Αποδείχθηκε ότι σωστή κατασκευή ήταν η μια από τις δύο υποψήφιες (συγκεκριμένα αυτή που είχαμε ονομάσει $K_4 -2$) και που στο εξής θα ονομάζουμε κατασκευή K_4 γιατί μόνη αυτή από τις δύο κατά την ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης δίνει τα σωστά θραύσματα. Επειδή, θέλαμε να έχουμε δύο κατασκευές για το pQE60, μια για το κάθε insert ,επιχειρήσαμε, πάλι, μετασχηματισμό με την κατασκευή $K_3 -2$, με το σκεπτικό ότι σε κάποια από τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια στατιστικά θα υπήρχε και ο σωστός προσανατολισμός. Αποικίες, όμως, δεν αναπτύχθηκαν αυτή τη φορά και αποφασίσαμε να ξανακάνουμε σύνδεση του pQE60 με το insert , που δεν έδωσε αποικίες με το σωστό προσανατολισμό.

Παράλληλα, κάνουμε απομόνωση μεσαίας κλίμακας (midi preparation), από καλλιέργεια βακτηρίων με την κατασκευή K_3 (Μεθ.Z/) και νέα πολλαπλή πέψη με διαφορετικά ένζυμα για να επιβεβαιώσουμε ότι η κατασκευή μας έχει το σωστό προσανατολισμό (εικ8 και εικ.9).

Από τον νέο συνδυασμό του pQE60 με το insert και μετά το μετασχηματισμό και τις καλλιέργειες των κυττάρων γίνεται πάλι απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA και πέψη αυτού με το περιοριστικό ένζυμο BamH-I. Μετά την ηλεκτροφόρηση διαπιστώνουμε ότι

έχουμε πέντε αποικίες, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pQE60 + HIF-1α. Σε αυτό το πείραμα έγιναν δύο διαφορετικά διαλύματα στα οποία επωάστηκε το πλασμίδιο με το cDNA τμήμα του HIF-1α και το ένζυμο λιγάση DNA. Στο δεύτερο διάλυμα διπλασιάσαμε την ποσότητα του cDNA, που θα εισαγάγαμε στο πλασμίδιο, για να αυξήσουμε τα ποσοστά επιτυχίας (2.5 μl και 5 μl insert, αντίστοιχα, με 1 μl pQE60). Τελικά, από το δεύτερο διάλυμα πήραμε τρεις αποικίες ενώ από το πρώτο δύο, στις οποίες και περιέχονταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pQE60 + HIF-1α (εικ. 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Διαδρομές 1-5: δείγματα DNA, που αντιστοιχούν στη 2^η ligation, κομμένα με BamH I

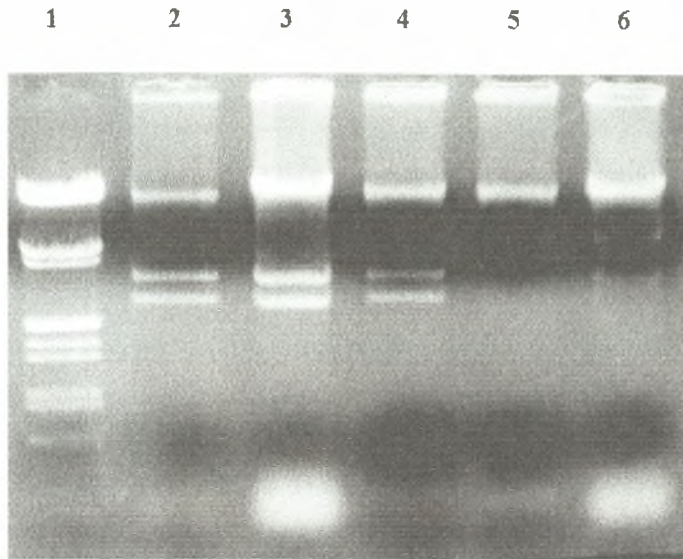
Διαδρομή 6: δείκτης μοριακών βαρών DNA

Διαδρομές 7-9: δείγματα DNA, που αντιστοιχούν στη 1^η ligation, κομμένα με BamH I.

Εικόνα 5: πέψη με BamH I δειγμάτων DNA από mini-preparations κοτάρων από τις αντίστοιχες αποικίες E.Coli που αναπτύχθηκαν μετά την αντίδραση λιγάσης και το μετασχηματισμό των E.Coli. Αναλύθηκαν 2 μl πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% μετά την πέψη με το BamH I

Ακολουθεί πέψη με το Xho-I, έτσι ώστε, να ελέγξουμε τον προσανατολισμό του HIF-1α στις πέντε κατασκευές που πήραμε. Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, φαίνεται, από τη

σύγκριση των θραυσμάτων DNA , ότι τα δείγματα στις διαδρομές 5 και 6 αντιστοιχούν, πιθανότατα, στην κατασκευή με το σωστό προσανατολισμό του insert.



Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

Διαδρομές 2-4: δείγματα DNA , που αντιστοιχούν στην 2^η ligation , κομμένα με Xho I .

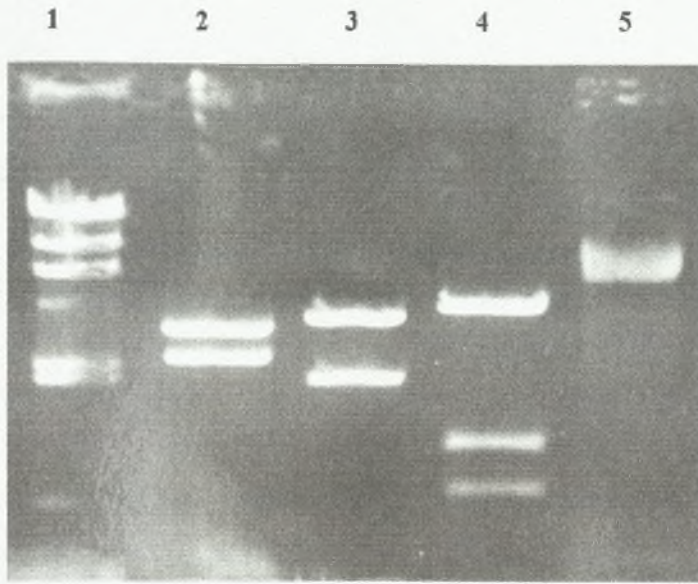
Διαδρομές 5-6: δείγματα DNA, που αντιστοιχούν στην 1^η ligation, κομμένα

με Xho I .

Εικόνα 6: πέψη με Xho I δειγμάτων DNA από mini-preparations για την επιβεβαίωση της ορθότητας των κατασκευών. Αναλύθηκαν 2 μ l DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Εμείς θέλουμε μία κατασκευή ακόμα, εκτός της K_4 , έτσι επιλέγουμε την κατασκευή που έχει αναλυθεί στις διαδρομή 5 για γίνει μετασχηματισμός, καλλιέργεια των 100 ml και απομόνωση μεσαίας κλίμακας (midi-preparation).

Μετά τη midi-preparation ακολούθησε πολλαπλή πέψη με διαφορετικά ένζυμα για να επιβεβαιώσουμε ότι η κατασκευή μας περιέχει το insert με το σωστό προσανατολισμό.



διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

διαδρομή 2: πέψη DNA με BamH-I

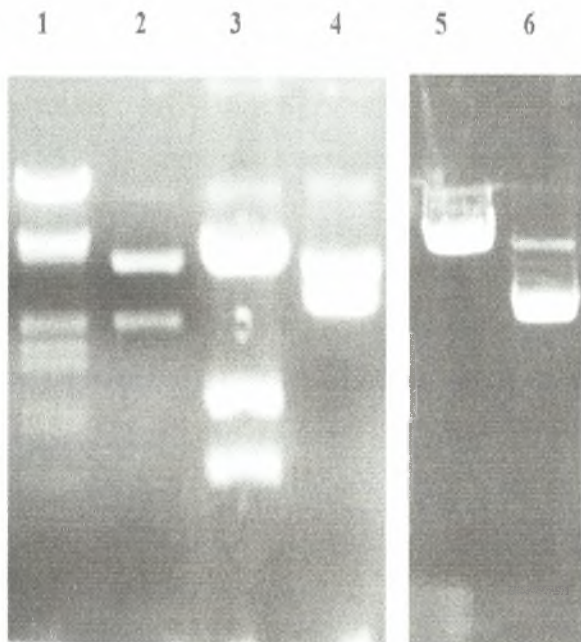
διαδρομή 3: πέψη DNA με EcoR-I

διαδρομή 4: πέψη DNA με Hind-III

διαδρομή 5: πέψη DNA με Xho-I

Εικόνα 7: πολλαπλή πέψη με τέσσερα διαφορετικά ένζυμ – *BamH-I*, *EcoR-I*, *Hind-III* και *Xho-I* – μετά από *mid-preparation*. Αναλύθηκε 0.5 μ l DNA - μετά την πέψη - σε κάθε διαδρομή σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Στην επομένη εικόνα βλέπουμε την πολλαπλή πέψη, που αφορά την επιβεβαίωση για την κατασκευή K_4 αφού προηγήθηκαν ο μετασχηματισμός κυττάρων *E.Coli*, η καλλιέργεια και η *mid-preparation*.



διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

διαδρομή 2: πέψη DNA με Hind-III

διαδρομή 3: πέψη DNA με EcoR-I

διαδρομή 4: πέψη DNA με BamH-I

διαδρομή 5: πέψη DNA με Xho I

διαδρομή 6: ταυτόχρονη πέψη DNA με Xba-I Sal-I

Εικόνα 8: πολλαπλή πέψη δειγμάτων DNA από *mid-preparation* με τα περιοριστικά ένζυμα: *Hind-III*, *EcoR-I*, *BamH-I*, *Xho I* και *Xba-I + Sal-I*.

Τελικά, είχαμε καταλήξει σε τέσσερις κατασκευές, τις οποίες και είχαμε απομονώσει με midi-preparation από καλλιέργειες των 100 ml και στις οποίες υπήρχε το insert , που μας ενδιέφερε, με το σωστό προσανατολισμό:

Δύο για το πλασμίδιο zzpOE60 : K1 και K2 και

Δύο για το πλασμίδιο pOE60 : K3 και K4

Με τις κατασκευές αυτές θα μετασχηματίσουμε κύτταρα E.Coli ειδικά για την επαγωγή της έκφρασης με IPTG .

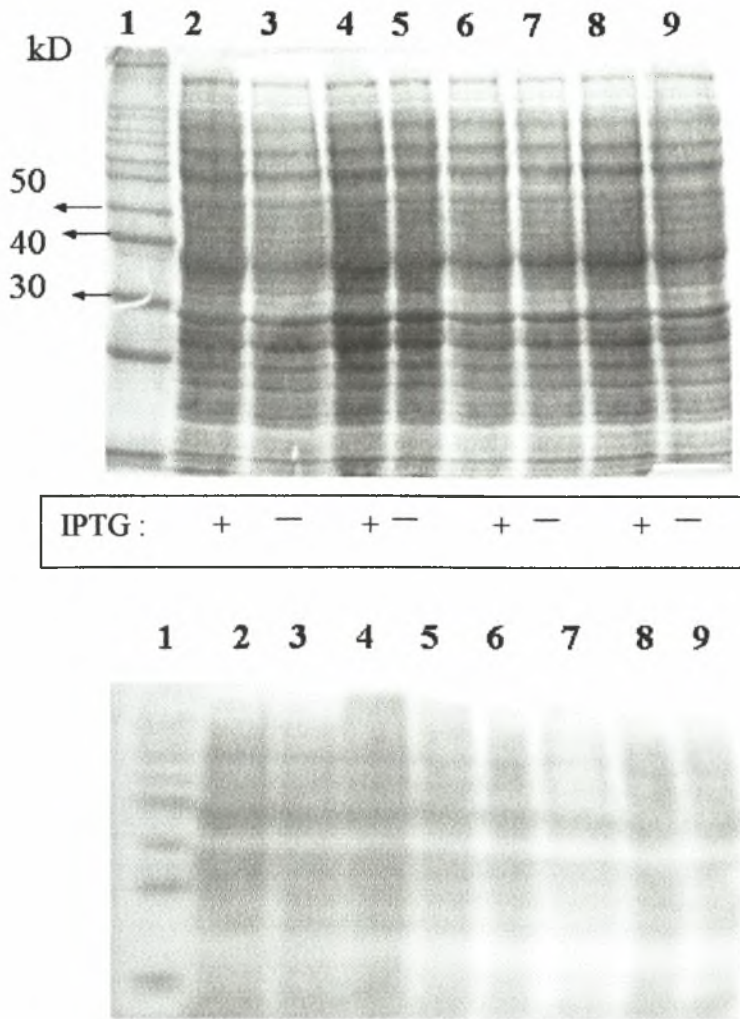
2./ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ zzpOE60 + HIF-1α ΚΑΙ pOE60 + HIF-1α (κατασκευές K₁ – K₄) ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ BLR pREp4 (E. Coli) ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α

ΓΕΝΙΚΑ: Τα κύτταρα BLR/REp4 φέρουν το πλασμίδιο REp4 το οποίο περιέχει, όπως και το pQE-60, το οπερόνιο της λακτόζης. Έτσι η επαγωγή έγινε με το IPTG όπως εξηγείται και στη μεθοδολογία.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ:

Αφού έγινε ο μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών με τις κατασκευές K₁ – K₄ ,στη συνέχεια, έγιναν οι καλλιέργειες, οχτώ συνολικά - τέσσερις με τη προσθήκη IPTG στο θρεπτικό μέσο και τέσσερις χωρίς IPTG – και με χρόνο επώασης δύο ώρες, όπως περιγράφεται στη ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ. Στα 2 ml, που αφαιρέθηκαν μετά το πέρας της επώασης από κάθε καλλιέργεια, έγινε φυγοκέντρηση και το κυτταρικό ίζημα θερμάνθηκε με το loading buffer στους 95°C – λύση των κυττάρων και αποδιάταξη πρωτεϊνών – και οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμίδης.

Τα δείγματα έτρεξαν σε δύο πηκτές 10% ακρυλαμίδιου. Στη μία έγινε χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie Blue και στη άλλη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση με Ponceau S . Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 9



διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών.

Διαδρομή 2: pQE60 +HIF-1α (K₄) με IPTG.

Διαδρομή 3: pQE60 +HIF-1α (K₄) χωρίς IPTG.

Διαδρομή 4: pQE60 +HIF-1α (K₃) με IPTG.

Διαδρομή 5: pQE60 +HIF-1α (K₃) χωρίς IPTG.

Διαδρομή 6: zzpQE60 +HIF-1α (K₂) με IPTG.

Διαδρομή 7: zzpQE60 +HIF-1α (K₂) χωρίς IPTG.

Διαδρομή 8: zzpQE60 +HIF-1α (K₁) με IPTG.

Διαδρομή 9: zzpQE60 +HIF-1α (K₁) χωρίς IPTG

Εικόνα 9: ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% δειγμάτων πρωτεϊνών. Αναλύθηκαν 15 μl δείγματος από διάλυμα 100 μl πρωτεΐνης +40 μl 4xloading buffer. Στην πάνω φωτογραφία δείχνεται η χρώση με Coomassie Blue της πρώτης πηκτής και στην κάτω η χρώση με Ponceau S μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε πηκτή νιτροκυτταρίνης της δεύτερης πηκτής.

Όπως παρατηρούμε (εικόνα 9), στη θέση που θα έπρεπε να παρατηρήσουμε την επαγωγή της έκφρασης δηλαδή μια ζώνη έντονη στα ≈ 93 kD, στα δείγματα που αντιστοιχούν σε καλλιέργειες που προσθέσαμε IPTG, δεν παρατηρούμε τίποτα τέτοιο. Επίσης, δεν παρατηρούμε και καμιά διαφορετική ζώνη οπουδήποτε μεταξύ των διαφορετικών διαδρομών των δειγμάτων.

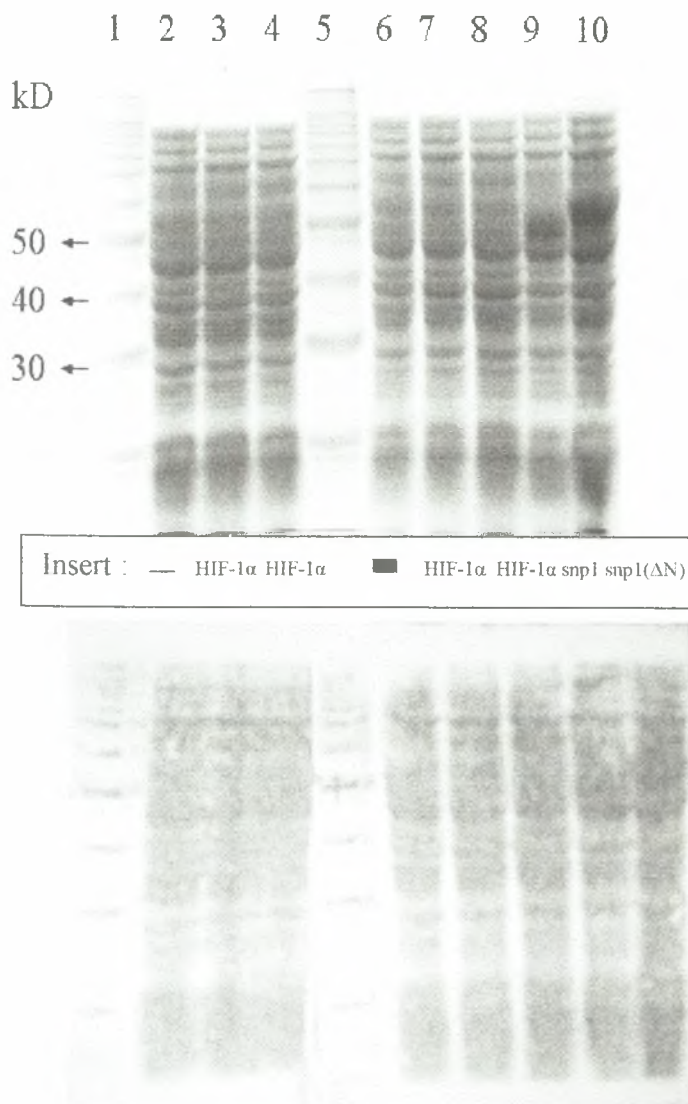
Συμπεραίνουμε ότι, ο HIF-1α δεν εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα με την προσθήκη IPTG ή/και ταυτόχρονα η μικρή ποσότητα που εκφράζεται ίσως και να πρωτεολύεται. Επίσης στο στάδιο αυτό δεν γνωρίζουμε εάν λειτουργεί η μέθοδος της επαγωγής με το IPTG, που χρησιμοποιήσαμε αν και στο παρελθόν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί, με επιτυχία, για τα συγκεκριμένα κύτταρα.

Επειδή, ούτε η χρωματική αντίδραση, που έγινε μετά από επώαση της μεμβράνης με το ενζυμοσύνδετο αντίσωμα PAP έδωσε ένδειξη χρώματος, αποφασίσαμε να ξαναγίνει το πείραμα, αναλύοντας ταυτόχρονα στην ίδια πηκτή και κάποιους συγκεκριμένους μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, αποφασίσαμε να αναλύσουμε δείγματα από κύτταρα με τα πλασμίδια pQE60 και zzpQE60 χωρίς το insert, καθώς και πρωτεΐνες από κύτταρα της ίδιας σειράς (BLR/REp4), που είχαν στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης snp1: Snurportin 1 (Paraskeva et al., 1999), μετασχηματισμένα με πλασμίδια, που περιέχουν το insert για την έκφραση της snp1. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε και να συγκρίνουμε τις ζώνες μετά την ανάλυση των πρωτεϊνών και να ελέγξουμε τη μέθοδο της επαγωγής με το IPTG.

2.2/ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ HIF-1α ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ SNP1

Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον, δύο κατασκευές: μια για τη snp1 και μία για την snp1-26-359. Η δεύτερη εκφραζόμενη δίνει μια πρωτεΐνη με την ίδια αμινοξική αλληλουχία με την πρώτη, με μόνη διαφορά μια απαλοιφή των πρώτων 25 αμινοξέων. Και οι δύο εισήχθησαν με το πλασμίδιο zzpQE60 και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των κυττάρων BLR/REp4. Αφού έγινε ο μετασχηματισμός των κυττάρων με τις κατασκευές αυτές, που μας έδωσε η κ. Παρασκευά, έγιναν καλλιέργειες με κύτταρα μετασχηματισμένα με τις κατασκευές K₁-K₄ αλλά και με τις καινούργιες για την snurportin-1 και snurportin-1(23-359) καθώς και καλλιέργειες με κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμίδια pQE60 και zzpQE60 χωρίς το insert (συνολικά οχτώ).

Μετά την επαγωγή της έκφρασης, που έγινε πάλι με IPTG, τη φυγοκέντρηση 2 ml καλλιέργειας και την ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμίδης – έγιναν πάλι σε δύο πηκτές 10% σε ακρυλαμίδιο - ακολούθησε το βάψιμο της μιας πηκτής με Coomassie Blue και η μεταφορά της άλλης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση με Ponceau S. Τα αποτελέσματα δείχνονται στην εικόνα 10



διαδρομές 1 και 5: δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών

διαδρομή 2: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με το pQE60 χωρίς το insert

διαδρομή 3: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60 + HIF-1α (K₄)

διαδρομή 4: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60 + HIF-1α (K₃)

διαδρομή 6: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60-protA χωρίς το insert

διαδρομή 7: Δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60-protA + HIF-1α (K₂)

διαδρομή 8: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60-protA + HIF-1α (K₁)

διαδρομή 9: δείγμα πρωτεϊνών από κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60-protA + snp1-26-359

διαδρομή 10: δείγμα πρωτεϊνών με κύτταρα μετασχηματισμένα με pQE60-protA + snp1

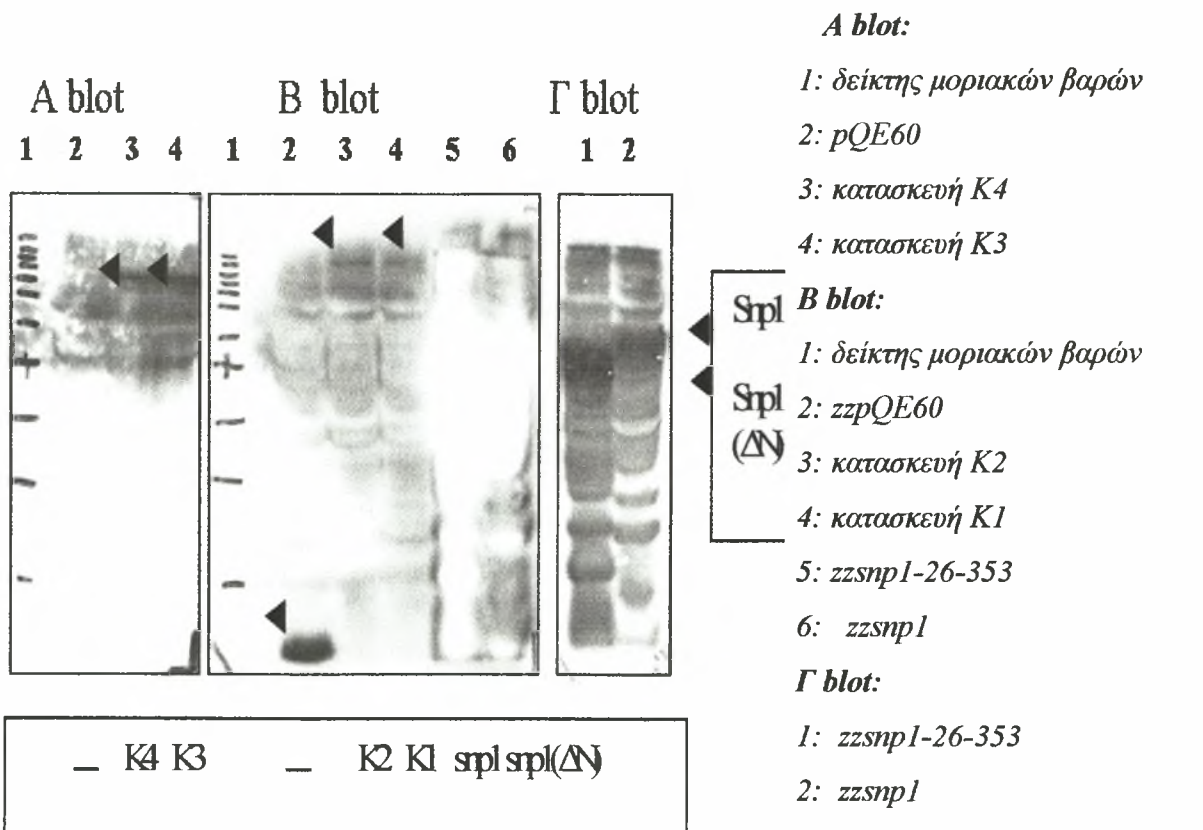
εικόνα 10: αναλύθηκαν δείγματα πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Από 100 μl δείγματος πρωτεϊνών που αναμείχθηκαν με 40 μl 4x loading buffer αναλύθηκαν 15 μl στην πάνω φωτογραφία δείχνεται η χρώση Coomassie Blue και στην κάτω η χρώση Ponceau S

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 10, σε ότι αφορά την έκφραση του HIF-1α, δεν παρατηρούμε κάποια διαφορά στις ζώνες, μεταξύ των μετασχηματισμένων κυττάρων και των κυττάρων, που περιείχαν τα πλασμίδια pQE60 και zzpQE60 χωρίς το insert. Αντίθετα, σε ότι αφορά την έκφραση των δύο snurportins παρατηρούμε ότι υπάρχει επαγωγή της έκφρασης τους. Άρα η μέθοδος της επαγωγής με IPTG, που χρησιμοποιήσαμε ήταν επιτυχής και αναζητήσαμε σε άλλα αίτια την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Στην εικόνα 10 βλέπουμε, επίσης, τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη μέσω της χρώσης Ponceau S και προφανώς η μεταφορά είναι ικανοποιητική. Στη συνέχεια, κόψαμε τη μεμβράνη σε τρία τμήματα. Στο πρώτο τμήμα (τμήμα Α), έγινε επώαση καταρχήν με το αντίσωμα αντι HIF-1α και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα το goat- anti-rabbit-HRP αντίσωμα. Η ανίχνευση του αντιγόνου (HIF-1α) έγινε μέσω της ECL.

Στο δεύτερο τμήμα (τμήμα Β), έγινε επώαση με το ενζυμοσύνδετο αντίσωμα PAP και ανίχνευση του αντιγόνου (prot A) με τη μέθοδο της ECL

Στο τρίτο τμήμα (τμήμα Γ) , έγινε επώαση με το ενζυμοσύνδετο αντίσωμα PAP και ανίχνευση του HRP μέσω της χρωματικής αντίδρασης.(εικ. 11)



εικόνα 11: στα τμήματα Α και Β της μεμβράνης έγινε ανίχνευση του z αντιγόνου της protA με ECL ενώ στο τμήμα Γ έγινε με χρωματική αντίδραση ανίχνευση του ίδιου αντιγόνου. Το έντονο σήμα στην περιοχή των snurportins (B blot) «έκαψε» το φιλμ

Παρατηρήσαμε ότι οι ανασυνδιασμένες snurportin-1 και snurportin-1(23-359) εκφράζονται σε ικανοποιητικές ποσότητες, δηλαδή η επαγωγή της έκφρασης είναι επιτυχής, ενώ οι πρωτεΐνες HIF-1α και zz HIF-1α εκφράζονται μεν αλλά σε μικρές ποσότητες.

3./ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SNP1 SNP1-26-353 , HIF-1α , HIF-1α –PROT-A

3.1/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ SNURPORTINS (SNURPORTIN 1 ΚΑΙ SNURPORTIN 1-26-359).

Πρώτα, επιχειρήσαμε να καθαρίσουμε τη snurportin-1 και snurportin-1(23-359) από το κυτταρικό ίζημα των αντίστοιχων καλλιέργειών, στις οποίες και είχε γίνει επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών. Επιλέξαμε να ξεκινήσουμε με αυτές τις πρωτεΐνες για να έχουμε μια αρχική εμπειρία της μεθόδου καθαρισμού την οποία θα χρησιμοποιούσαμε στη συνέχεια για τον καθαρισμό του HIF-1α και HIF-1α –protA. Και οι δύο μορφές της snurportin-1 φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια ακολουθία έξι ιστιδινών και επομένως χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες στήλες με το νικέλιο, όπως και στην περίπτωση των HIF-1α και HIF-1α –protA.

Ξεκινήσαμε να απομονώσουμε τις δύο snurportins από τις καλλιέργειες των 100 ml στις οποίες και είχε γίνει η επαγωγή της έκφρασης. Αν αφαιρέσουμε τα 2 ml από όπου προήλθαν και οι πρωτεΐνες, που αναλύθηκαν αρχικά ο καθαρισμός έγινε από καλλιέργειες των 98 ml που είχαν επωαστεί για δύο ώρες με 1 mM IPTG.

Μεταφέραμε σε κολώνα της BIORAD 200 μl NTA- ρητίνη και στη στήλη αυτή κατακρατήθηκαν οι πρωτεΐνες που θέλαμε να απομονώσουμε. Αφού συλλέξαμε τα διάφορα κλάσματα, αναλύσαμε αυτά σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% :

Για τα κλάσματα TE, P, S και FT αναμίξαμε 100 μl δείγματος με 30 μl 4x loading buffer και «φορτώσαμε» στα πηγαδάκια της πηκτής από 10 μl .

Για τα κλάσματα W1, W2, W5, E1, E2, E3 αναμίξαμε 60 μl δείγματος με 20 μl 4x loading buffer και μεταφέραμε στα πηγαδάκια της πηκτής από 10 μl .

Το υπόλοιπο της ποσότητας όλων των δειγμάτων αφού αναμείχθηκε με τόσο όγκο διαλύματος σουκρόζης 2,5 M (stock), ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 250 mM, μεταφέρθηκε στους -20 °C .

Κατά την ανάλυση προετοιμάστηκαν 100 μl από τα κλάσματα TE, P, S και FT με 30 μl 4 x loading buffer και 60 μl από τα κλάσματα W1-W3, E1-E3 με 20 μl 4 x loading buffer και

τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια 10 μl. Μετά την ανάλυση σε δύο πηκτές πολυκρυλαμιδίου ακολούθησαν στη μία χρώση με Coomassie Blue και στην άλλη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση με Ponceau S.

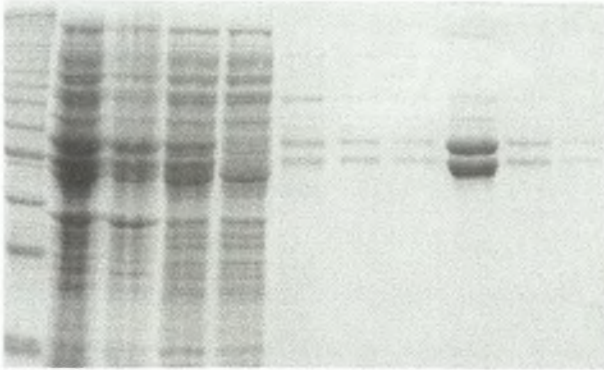
Μετά την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων καθαρισμού, όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 12 (χρώση Coomassie Blue), οι δύο πρωτεΐνες ανακτήθηκαν σε καθαρή μορφή στο κλάσμα καθαρισμού E1.

Η μεμβράνη επώαστηκε με το ενζυμοσύνδετο αντίσωμα PAP για δύο ώρες και ακολούθησε ανίχνευση της snurportin -1 και snurportin-1(23-359) με τη μέθοδο της ECL και στη συνέχεια με τη χρωματική αντίδραση. Και με τις δύο μεθόδους επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη των snurportins σε μεγάλο ποσοστό στα κλάσματα καθαρισμού και ιδιαίτερα στο κλάσμα E1.

Αποφασίσαμε εφόσον η μέθοδος καθαρισμού ήταν επιτυχής να την εφαρμόσουμε και για τον καθαρισμό των HIF-1α και HIF-1α -protA .

Coomassie Blue

M TE P S FT W1 W2 W5 E1 E2 E3

*M*: δείκτης μοριακών βαρών*TE*: ολικό κλάσμα*P*: ίζημα*S*: υπερκείμενο*FT*: εκλούμενο κλάσμα*W1, W2, W5*: κλάσματα 1^{ης}

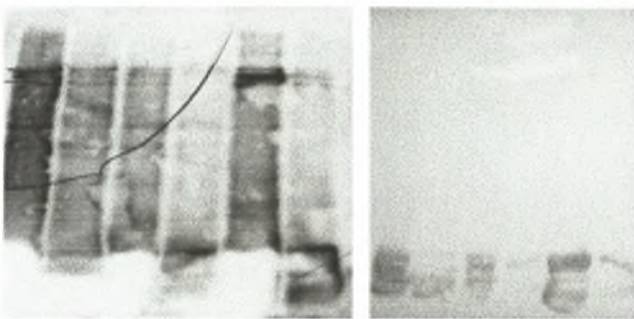
ανάκτησης με 20 mM

ημιδαζόλιο

E1-E3: κλάσματα 2^{ης}

ανάκτησης με 200 mM ημιδαζόλιο

TE P S FT E1 E2 TE P S FT E1 E2



ECL

(έκθεση του φιλμ 15 min)

Χρωματική αντίδραση

Εικόνα 12: ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% δειγμάτων από τα κλάσματα καθαρισμού της snourortin και ανοσοενζυματική ανίχνευση μετά τη μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

3.2/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ HIF-1 α -protA (zz HIF-1 α)

καθαρισμός πρωτεΐνης- ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων καθαρισμού- μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Ο καθαρισμός του HIF-1 α -protA έγινε όπως ακριβώς και ο καθαρισμός της snouprotin . Το κυτταρικό ίζημα από 98 ml επαναιωρήθηκε σε 5 ml διαλύματος λύσης και ακολούθησαν η λύση με υπερήχους και η φυγοκέντρηση του λυμένου διαλύματος. Τα μη λυμένα κύτταρα καθιζάνουν μετά τη φυγοκέντρηση ενώ οι πρωτεΐνες των λυμένων κυττάρων βρίσκονται στο υπερκείμενο (S). Περνώντας, έτσι το υπερκείμενο από τη στήλη καθαρισμού και επώζοντας με αυτή για 1.5 ώρες ο HIF-1 α -protA προσδέθηκε στη στήλη μέσω της ακολουθίας των έξι ιστιδινών που φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο.

Ακολούθησε η ανάκτηση του HIF-1 α -protA μετά την έκλυση των 5 ml (FT), που επώστηκαν με τη στήλη, με διάλυμα 5 ml ημιδαζολίου 20 mM (W1-W5) και στη συνέχεια 3 ml διαλύματος 200 mM (E1-E5).

Στη συνέχεια 100 μ l από τα κλάσματα TE, P, S και FT προετοιμάστηκαν με 40 μ l 4 % loading buffer και 60 μ l από τα κλάσματα W1, W3, W5 και E1-E3 προετοιμάστηκαν με 20 μ l 4 % loading buffer. Τα δείγματα (10 μ l) από τα αντίστοιχα διαλύματα αναλύθηκαν σε δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου 8 % και ακολούθησαν η χρώση Coomassie Blue, στη μία και η μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης της άλλης .

Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά και η ανάλυση επαναλήφθηκε αυξάνοντας τις ποσότητες των δειγμάτων σε 25 μ l . Παράλληλα αναλύσαμε και ένα δείγμα (5 μ l) από το E1 κλάσμα καθαρισμού των snouprotins

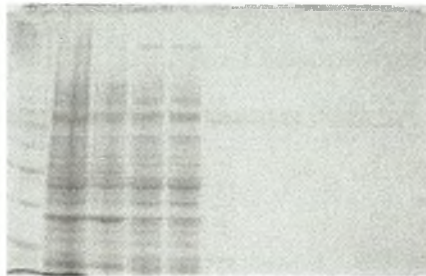
Μετά την ανάλυση στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου ακολούθησε χρώση Coomassie Blue στη μία, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση Ponceau S της άλλης. Η μεμβράνη επώστηκε με το ενζυμοσύνδετο αντίσωμα PAP για δύο ώρες και ακολούθησαν αντίδραση με ECL και χρωματική αντίδραση.

Τα αποτελέσματα δείχνονται στην εικόνα 13

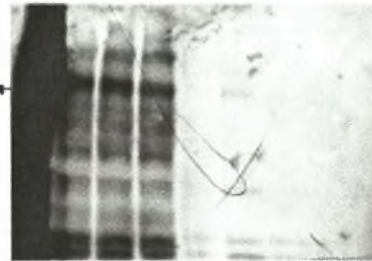
Coomassie Blue

ECL 2 (χρόνος έκθεσης φιλμ 15')

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



2 3 4 5 6 7 8 9 10



zzHIF-1α

2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



zzHIF-1α

zzHIF-1α

SnpI



ECL 1 (χρόνος έκθεσης φιλμ 5')

χρωματική αντίδραση

- 1,10: δείκτες μοριακών βαρών
 2: ολικό κλάσμα
 3: ίζημα
 4: υπερκείμενο
 5: εκλούμενο κλάσμα
 6: κλάσμα 1^{ης} ανάκτησης με 20 mM ημιδαζόλιο (W5)
 7-9: κλάσματα 2^{ης} ανάκτησης με 200 mM ημιδαζόλιο (E1-E3)
 11: κλάσμα E1 από τον καθαρισμό των snurportins (E1)

εικόνα 13: ανάλυση των κλασμάτων καθαρισμού του HIF-1α-protA σε πηκτές πολυακρυλαμίδης 8% και ανίχνευση αυτού μετά από επώαση με το αντίσωμα PAP-HRP για την protA

με βάση τα πειραματικά αυτά δεδομένα συμπεράναμε ότι:

- Μια μικρή ποσότητα του HIF-1α-protA υπάρχει σε διαλυτή μορφή στο κλάσμα E1 (διαδρομή 7). Άρα ο HIF-1α-protA μπορεί να καθαριστεί ολόκληρος και σε

διαλυτή μορφή αν και τα ποσοστά ανάκτησης του στο συγκεκριμένο πείραμα είναι μικρά.

- Το ποσοστό λύσης των κυττάρων είναι επίσης μικρό, εφόσον σημαντική ποσότητα του HIF-1α –protA ανιχνεύεται στο ίζημα (P) στη διαδρομή 3.
- Ένα, επίσης, σημαντικό ποσοστό του HIF-1α – protA δεν προσδένεται στη στήλη και ανιχνεύεται στο κλάσμα έκλουσης (FT) στη διαδρομή 5.

3.3/ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HIF-1α

Καθαρισμός της πρωτεΐνης- ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου των κλασμάτων καθαρισμού – μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης- ανοσοενζυμική ανίχνευση με ECL και χρωματική αντίδραση

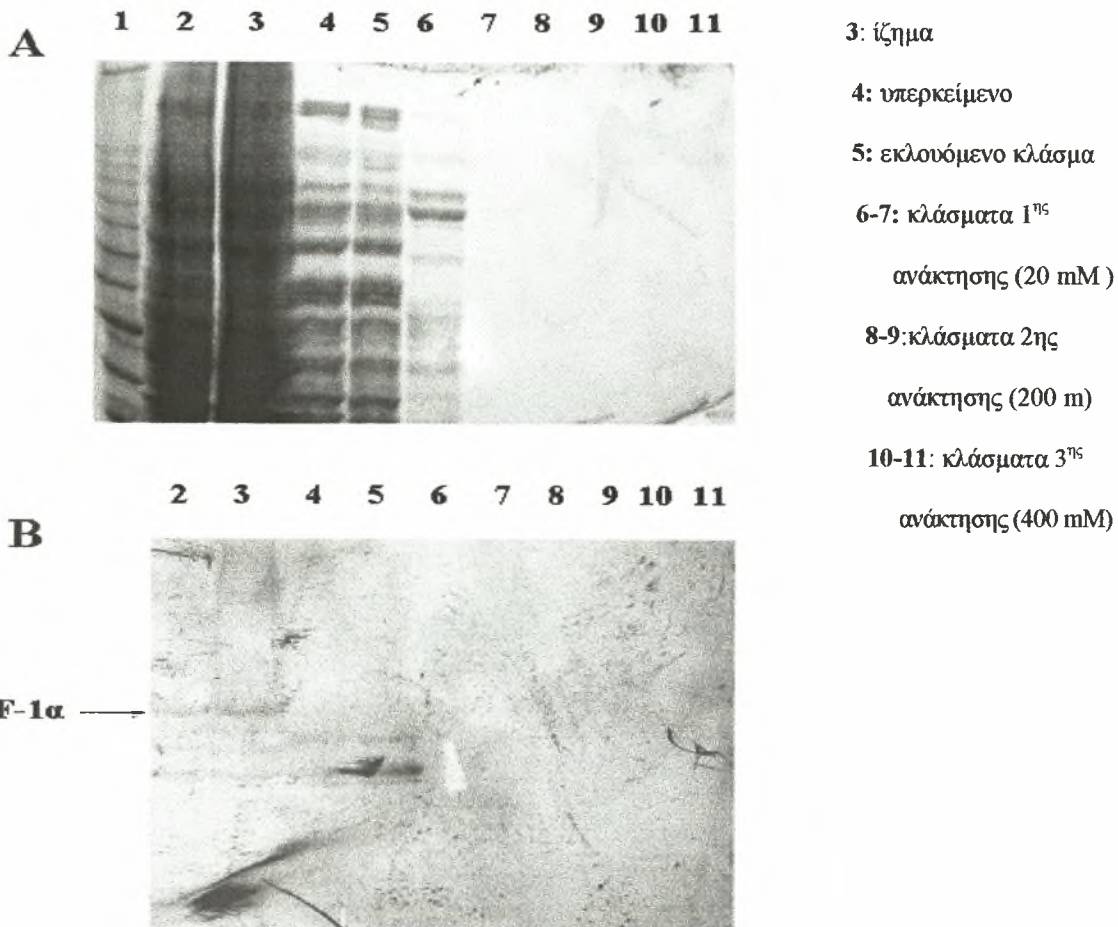
Τα παραπάνω πειραματικά βήματα έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως και για τον HIF-1α – protA, με τη διαφορά ότι κατά τη συλλογή των δειγμάτων καθαρισμού έγινε ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη με τρία διαλύματα ημιδαζολίου: 20 mM , 200 mM και 400 mM . Επίσης για την ανίχνευση του HIF-1α η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών επώαστηκε αρχικά με το πρώτο αντίσωμα αντί – HIF-1α (rabbit) για όλο το βράδυ στους 4 ° C και την επόμενη ημέρα για δύο ώρες με το δεύτερο αντίσωμα goat-anti-rabbit-HRP.

Από τα κλάσματα ολικό, ίζημα, υπερκείμενο και εκλουόμενο διάλυμα παρασκευάστηκαν δείγματα από 100 μl κλάσματος + 30 μl 4 x loading buffer.

Από τα κλάσματα W1,W5, E1,E2, E'1, E'2 παρασκευάστηκαν δείγματα από 100 μl κλάσματος + 20 μl 4 x loading buffer

Τα αποτελέσματα δείχνονται στην εικόνα 14

Coomassie Blue



ECL (έκθεση του φιλμ 15')

Εικόνα 14: δείγματα από τα κλάσματα καθαρισμού του HIF-1α αναλυμένα σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% και ανοσοενζυμική ανίχνευση του HIF-1α (ECL) αναλυθηκαν 25 μl από τα παρασκευασμένα δείγματα

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήσαμε ότι:

- Ένα σημαντικό ποσοστό των κυττάρων και σε αυτή την πειραματική προσπάθεια δε λύθηκε.
- Ο HIF-1α ανιχνεύεται στα κλάσματα ολικό και ίζημα ενώ στα κλάσματα υπερκείμενο και εκλουόμενο κλάσμα κάποια πρωτελυματα αυτού.

Άρα ο HIF-1α σε αντίθεση με το HIF-1α -protA δεν είναι διαλυτός πιθανόν λόγω της αδυναμίας σωστής αναδίπλωσης στα κύτταρα E.Coli και δε φαίνεται να είναι δυνατή η απομόνωση του.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να εκφράσουμε το cDNA τμήμα του HIF-1α σε κύτταρα E.Coli και να απομονώσουμε την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις κατασκευές: δύο με τον pQE60 και δύο με τον pQE60 – protA. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως πλότοι στα πειράματα έκφρασης και καθαρισμού και δύο κατασκευές του pQE60 –protA με το cDNA τμήμα των snurportins. Μετά την έκφραση και τον καθαρισμό των χημικών πρωτεϊνών καταλήξαμε ότι:

Ο ανασυνδυασμένος HIF-1α και HIF-1α -protA εκφράζονται στα κύτταρα BLR/REp4 αλλά η επαγωγή της έκφρασης με το IPTG δεν ήταν η προσδοκώμενη. Ο διπλασιασμός από 1μM σε 2 mM δεν ήταν αρκετός για να οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης. Ίσως μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης IPTG να επιφέρει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης, ιδιαίτερα αν συνδυαστεί με ιδανικότερες συνθήκες επώασης των βακτηρίων. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι δεν μπορέσαμε να επιτύχουμε θερμοκρασία επώασης στο δονούμενο επωαστήρα χαμηλότερη από 29 °C, ενώ θερμοκρασίες 25 °C ή χαμηλότερες θεωρείται ότι βελτιώνουν το ποσό έκφρασης μιας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Επίσης, το σχετικά μεγάλο μέγεθος του HIF-1α (93 kD) και η αμινοξική αλληλουχία αυτού είναι πιθανόν να συμβάλουν στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε αντίθεση με τις σνουπορτινες ου είναι αρκετά μικρότερες πρωτεΐνες.

Σε ότι αφορά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης μπορέσαμε να καθαρίσουμε τον HIF-1α -protA -και βέβαια τις snurportins- αλλά όχι τον HIF-1α. Είναι πιθανό, η protA να βοηθάει στη σωστή διαμόρφωση του μορίου και έτσι ο HIF-1α -protA να είναι περισσότερο διαλυτός από τον HIF-1α. Το πρόβλημα, άλλωστε, της έλλειψης μετά- μεταφραστικών τροποποιήσεων στα προκαρυωτικά κύτταρα ήταν κάτι που αναμέναμε να επηρεάσει τα πειράματά μας. Πάντως και για τις δύο χημικές πρωτεΐνες, ένα μεγάλο ποσοστό παραμένει στο ίζημα και ένα μεγάλο ποσοστό δεν προσδένεται στη στήλη. Αυτό που μπορεί να βελτιωθεί σχετικά εύκολα είναι ο τρόπος λύσης των κυττάρων με ένα μικρότερο ρύγχος, για παράδειγμα, κατά την εφαρμογή των υπερήχων ή/και με αύξηση των κύκλων και των χρόνων, που οι υπέρηχοι εφαρμόζονται. Επίσης, θεωρήσαμε σκόπιμο να γίνει δοκιμή της έκφρασης του HIF-1α μέσω άλλων πλασμιδίων τόσο σε βακτήρια όσο και σε κύτταρα ζυμομύκητα ή κύτταρα θηλαστικών. Η χρήση διαφορετικού tag (GST) και διαφορετικών πλασμιδίων και μικροοργανισμών μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης και πιο διαλυτές πρωτεΐνες.

Γενικά η έκφραση και ο καθαρισμός μιας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης δεν είναι μια τυποποιημένη διαδικασία αλλά μια ερευνητική προσπάθεια, που άλλοτε επιτυγχάνεται εύκολα και άλλοτε πολύ δύσκολα, από τη στιγμή που, πολλά σημεία σε ότι αφορά το μεταβολισμό και τη βιοχημεία ακόμα και απλών μικροοργανισμών, όπως το κολοβακτηρίδιο E.Coli, παραμένουν άγνωστα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berra E., Roux D., Darren E., Pouyssegur R. & J. (2001) Hypoxia-inducible factor-1 α escapes O₂ - driven proteosomal degradation irrespective of its sub cellular localization : nucleus or cytoplasm. *EMBO reports* 2, 615-620.
2. Bhattacharya, S. Michels, C. L., Leung, M. K., Arany, Z. P., Kung, A. L., and Livingston, D. M., (1999). Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev.* 13, 64-75.
3. Conrad, P. W., Freeman, T. L., Beimer-Johnson, D., Milhorn, D. (1999). EPAS1 activation during hypoxia requires p24/p44 MAPK. *J. Biol. Chem.* 274, 33709-33713.
4. Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, A., Rodriguez, A. M., Schumacker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize HIF-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *Biol. Chem.* 275, 25130-25138.
5. Ebert, B. L., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J., (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J Biol. Chem.* 270, 29083-29089.
6. Estes, S. D., Stoler, D. L., and Anderson, G. R., (1995). Anoxic induction of a sarcoma virus-related VL30 retrotransposon is mediated by cis-acting element which binds hypoxia-inducible factor-1 and an anoxia-inducible factor. *J. Virol.* 69, 6335-6341.
7. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. (2001) HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-8.
8. Faller D. (1999) endothelial cell responses to hypoxic stress *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 74-84.
9. Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase-1 and lactate

dehydrogenase a genes: similarities with the erythropoietin 3 enhancer. *Proc.Natl. Acad. USA* 91, 6496-6500.

10. Forsythe, J. A., Jiang. B. H., Lyer, N. V. Agani, F. Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16. 4604-4613.
11. Gassman M., Kvietikova I, Rolfs A.,Wenger R.H. (1997) Oxygen and dioxin regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int.* 51, 567-74.
12. Gerber, h. P., Condorelli, F., Park, J. and Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt but not Flk1/KDR, is up regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.
13. Hu, J., Discher, D. J., Bishopric, N. H. and Webster, K. A. (1998). Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal inducible factor 1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 894-899.
14. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanka H, Poellinger L (1998) Signal transduction in hypoxic cells inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1-alpha. *EMBO J.* 17, 6573-86.
15. Kietzmann T., Roth, U. and Jungerman, K. (1999). Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94, 4177-4185.
16. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K., Ogura T., D'Acquisto F., Addeo R., Makuuchi M., Esumi H. (2000) Hypoxia response element of the human endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95, 189-97.
17. Kirsty S. Hewitson, Luke A. McNeill, Madeline V. Riordan, Ya-Min Tian, Alex N. Bullocks. Richard W. Welford, 6 others, Christopher J. Schfield (2002) Hypoxia Inducible Factor (HIF) asparagin hydroxylation is identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin

structural family JBC Papers in Press. Published on May 31 2002 as Manuscript C200273200.

18. Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Lyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L., and Choi, A. M., (1997). Hypoxia inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 5375-5381.
19. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. and Goldberg, M. A.. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333-13340.
20. Liu, Y., Cox, C. R., Morita, T. and Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638-643.
21. Lok, C. N. and Ponka, P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 24147-24152
22. Maniatis, Sambrook, Fritsch (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*
23. Maxwell, P.H., Woesener, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., 5 others and Ratcliffe, P.J. (1999) the tumor suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen- dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
24. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W., and Varesio, L. (1995). A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* 182, 1683-1693.
25. Minet E., Michel G., Mottet D., Raes M., Michiels C. (2001) transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation.
26. Nguyen, S. V., and Claycomb, W. S., (1999). Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 382-386.
27. Norris, M. L., Millhorn, D. E., Beitner-Johnson, D. E. (1995). Hypoxia-induced protein binding to O₂ responsive sequences tyrosine hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 270 23774-2379.

28. Paraskeva E., Izaurreald E., Bischoff, Huber J., Kutay U., Hartmann E., Luhrmann R., Gorlich D. (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *The Journal of Cell Biology* 145, 255-264.
29. Raymond R., Millhorn D. (1997) regulation of tyrosine Hydroxylase gene expression during hypoxia: role of Ca²⁺ and PKC *Kidney Int.* 51, 536-541.
30. Rolfs, A., Kvietikova, L., Gassmann, M. and Wenger, R. H. (1997). Oxygen regulated transferrin expression is mediated by hypoxia inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055-20062.
31. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H.M. and Wang, G. L., (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763
32. Semenza, G.L.(2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. A. Physiol* 88: 1474-1480
33. Semenza G.L. (2001) HIF-1, O₂ and the three PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107, 1-3.
34. Stryer L., *Biochemistry* (1988)
35. Tacchini L Bianchi L Bernelli- Zazzera A and Cairo G. (1999). Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1 mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 24142-24146.
36. Tazuke, S. I., Mazure, N. M., Sugawara, J., Carland. G., Faessen, G. H., Suen, L. F., Irwin, J. C., Powell, D. R., Glaccia, A. J., and Gludice, L. C., (1998). Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10188-10193.
37. Ushio-Fukai, M. Alexander, R. W., Akers, M., Yin, Q. Fujio, Y., Walsh, K., Griendling, K. K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/ protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22699-22704.
38. Wang, G. L. and Semenza, G. L.(1993a). characterization of hypoxia inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268, 21513-21518



ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

~~Τηλ. 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077
565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057239