

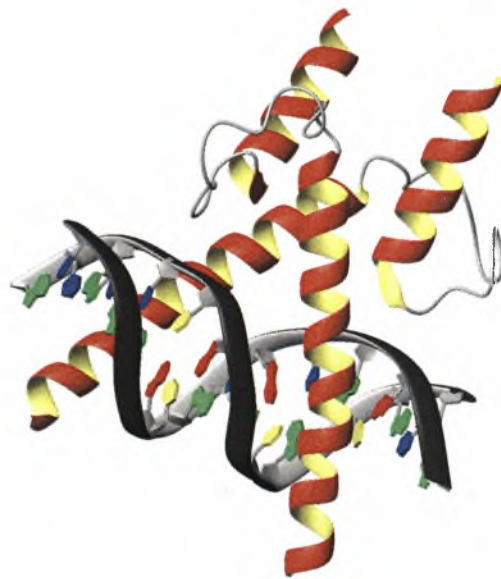


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ 348-826 ΤΟΥ ΕΠΑΓΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )**



**ΒΟΥΡΚΟΥ ΕΡΓΙΝΑ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

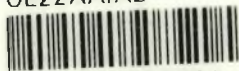
**ΛΑΡΙΣΑ 2008**



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

Αριθ. Εισ.: 6592/1  
Ημερ. Εισ.: 20-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2008  
ΒΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087331

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

### Υπεύθυνος Καθηγητής:

Κοντού Μαρία

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

### Μέλη τριμελούς επιτροπής:

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

**Ευχαριστίες:** Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Κοντού Μαρία, υπό την επίβλεψη της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Χαχάμη Γεωργία από το εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής, Π.Θ., για την παροχή των μετασχηματισμένων κυττάρων και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, Π.Θ., Σταθόπουλο Κωνσταντίνο για τις πολύτιμες υποδείξεις του. Η βοήθεια της ερευνήτριας του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Δρ. Βλάσση Μεταξία υπήρξε πολύτιμη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την βοήθεια που προσέφερε τόσο για την λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού όσο και για την ερμηνεία και επεξεργασία αυτών. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τη Σταματίνα Γιαννούλη και την Ζωή Καρούλια, υποψήφιας διδάκτορες του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1. Υποξία και HIF-1.....	8
1.1.1. Απόκριση των κυττάρων στην υποξία.....	8
1.1.2. Γονίδια στόχοι του HIF-1.....	9
1.2. Δομή του HIF-1 .....	10
1.3. Ρύθμιση του HIF-1.....	12
1.3.1. Αποικοδόμηση HIF-1.....	12
1.3.2. Ενεργοποίηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας.....	14
1.4. Ρύθμιση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα.....	18
1.4.1. Ρύθμιση του HIF-1α μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων.....	18
1.4.2. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS).....	20
1.4.3. Αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες.....	21
1.4.4. Δεσφериοξαμίνη και Κοβάλτιο.....	22
1.4.5. Αρνητική ρύθμιση του HIF-1α από άλλους παράγοντες.....	22
1.5. Κλινική σημασία του HIF-1α.....	23
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	27
3.1.1. Αντιδραστήρια.....	27
3.1.2. Κύτταρα και πλασμιδιακοί φορείς.....	27
3.1.3. Βιοχημικά υλικά.....	28
3.1.4. Υλικά χρωματογραφίας.....	28
3.1.5. Θρεπτικά μέσα.....	28
3.1.6. Αντιβιοτικά.....	28
3.1.7. Όργανα.....	29
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
3.2.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826.....	29
3.2.2. Καθαρισμός πρωτεάσης TEV.....	34
3.2.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826.....	35
3.2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS- PAGE).....	37
3.2.5. Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford.....	39
3.2.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατα Western (western blotting).....	40
3.2.7. Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού.....	43

<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2. Καθαρισμός πρωτεΐνης TEV.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4. Δομική μελέτη της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 με τη χρήση         Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωϊσμού.....</b>	<b>59</b>
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>62</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>64</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 (HIF-1), είναι ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής και ο παράγοντας κλειδί της απόκρισης των κυττάρων στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Αποτελείται από δυο υπομονάδες, την HIF-1α και HIF-1β (ή ARNT), οι οποίες έχουν δυο χαρακτηριστικές περιοχές, μια περιοχή με μοτίβο έλικας- θηλιάς- έλικας (bHLH) καθώς και μια περιοχή PAS. Οι bHLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό των δυο υπομονάδων και την σύνδεση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, ενώ η περιοχή PAS εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών. Το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α περιέχει επίσης μια περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ODD) και δυο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, τις N- TAD και C- TAD, οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στη σύνδεση άλλων συν-ενεργοποιητών όπως p300/CBP.

Υπο φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (normoxia), ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης από τις προλυλο- υδροξυλάσες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δέσμευση της VHL πρωτεΐνης στην ODD περιοχή του HIF-1α. Η δέσμευση αυτή οδηγεί τον HIF-1α σε ουβικουιτινώση και αποικοδόμηση μέσω της 26S υπομονάδας του πρωτεασώματος. Επιπλέον, η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης από την πρωτεΐνη FIH- 1 εμποδίζει τη δέσμευση των μεταγραφικών συν- ενεργοποιητών στον HIF-1α και τον καθιστά μεταγραφικά ανενεργό. Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου (hypoxia), εξασθενίζει η δράση των προλυλο- υδροξυλασών, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δέσμευση των pVHL στον HIF-1α και η μετέπειτα αποικοδόμησή του. Ταυτόχρονα, σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται η δράση της πρωτεΐνης FIH- 1, με αποτέλεσμα η Asn803 να μην υδροξυλιώνεται και να παραμένει ελεύθερη για τη δέσμευση των μεταγραφικών συν- ενεργοποιητών στον HIF-1α. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην αναστολή της δράσης των προλυλο- υδροξυλασών και των υδροξυλασών ασπαραγίνης παραμένουν ασαφή. Ο σταθερός πλέον HIF-1α καθίσταται ικανός να εισέλθει στο πυρήνα και να διμεριστεί με τον ARNT, επάγοντας την έκφραση πλήθους γονιδίων.

Η ρύθμιση του HIF-1α συμβαίνει σε πολλαπλά επίπεδα όπως στην ενεργοποίηση του HIF-1α και σταθεροποίησή του, στην δημιουργία ετεροδιμερούς με τον HIF-1β και την επικείμενη επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, κ.α. Ο HIF-1α ως μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εμπλέκεται στην έκφραση πλήθους γονιδίων υπόκειται και ο ίδιος σε μια σειρά μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που σαν σκοπό έχουν την ρύθμιση της λειτουργίας του. Οι τροποποιήσεις αυτές συμβαίνουν στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α, όπου εδράζονται η ODD περιοχή και οι δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD και C-TAD).

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και απομόνωση του καρβοξυτελικού τμήματος 348-826 του HIF-1 $\alpha$ , προκειμένου να γίνει μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης ( $\alpha$ - έλικα,  $\beta$ - φύλλο,  $\beta$ - στροφή) με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

## ABSTRACT

The Hypoxia- Inducible Factor 1 (HIF-1) is the major transcriptional activator and the key mediator of the cellular response to low oxygen availability. HIF-1 consists of two subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  (or ARNT), that have two characteristic domains, a basic domain with pattern helix-loop-helix (bHLH) as well as a PAS domain. The bHLH domains are responsible for the dimerization of the two subunits and for the DNA binding, while region PAS is involved in interaction between various proteins. In addition, HIF-1 $\alpha$  contains an oxygen-dependent degradation (ODD) domain and two transactivation domains, N-TAD and C-TAD. These two latter domains are considered that they are involved in the contact of other co-activators as p300/CBP.

Under normoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  undergoes hydroxylation at two specific proline residues in the ODD domain by prolyl hydroxylases, which leads to an engagement of VHL protein in the ODD domain. This interaction between HIF-1 $\alpha$  and pVHL, leads HIF-1 $\alpha$  to an immediate ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome proteolysis. Additionally, hydroxylation of an asparaginyl residue by FIH- 1 blocks the transcriptional activity of HIF-1 due to inhibition of its interaction with co-activators. In contrast, under hypoxic conditions, abolition of prolyl hydroxylation results in HIF-1 $\alpha$  stabilization by preventing the engagement of VHL protein in the HIF-1 $\alpha$  and subsequent degradation. In addition, inhibition of asparaginyl hydroxylation at Asn803 allows the interaction of HIF-1 with co-activators. However, the exact mechanisms underlying prolyl and asparaginyl hydroxylases inhibition are not completely understood. Stabilized HIF-1 $\alpha$  can then be translocated into the nucleus where it heterodimerized with HIF-1 $\beta$ . The HIF-1 $\alpha$ /  $\beta$  dimer binds to DNA and induces expression of its target genes by recruiting transcriptional co-activators.

Regulation of HIF-1 $\alpha$  occurs at multiple levels such as protein stabilization, transcriptional activation, dimerization with HIF-1 $\beta$ , interaction with other proteins, post-translational modifications and nuclear translocation. HIF-1 $\alpha$  as a transcriptional factor, which is involved in the expression of various genes,

undergoes post-translational modifications. This modifications occur at C-terminal of HIF-1 $\alpha$ , where the ODD domain exists and the two transactivation domains, N-TAD and C-TAD.

Aim of the present study is the over-expression and purification of the C-terminal of HIF-1 $\alpha$  which contains the amino acids 348-826, for studying his structural features with Circular Dichroism (CD) spectroscopy.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Υποξία και HIF-1

### 1.1.1. Απόκριση των κυττάρων στην υποξία

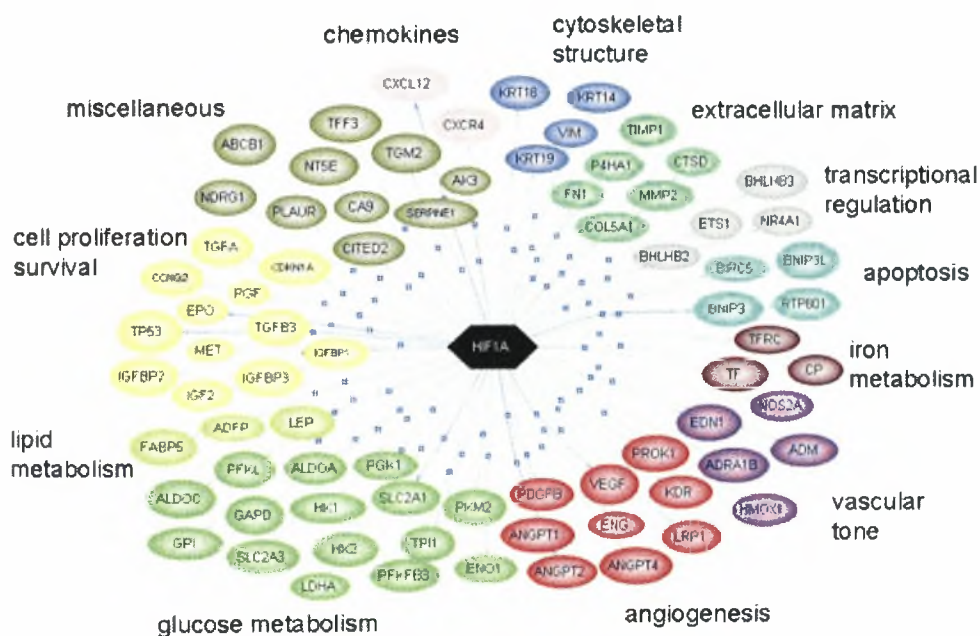
Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση όλων των αερόβιων οργανισμών. Η ομοιοστασία του οξυγόνου στον οργανισμό είναι αυστηρά ελεγχόμενη για το λόγο ότι πρέπει να διατηρηθούν τα ενδοκυττάρια επίπεδά του εντός στενών ορίων. Ο οργανισμός απαιτεί το οξυγόνο για πολλές μεταβολικές διεργασίες. Ωστόσο, η έκθεση σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υπεροξία) είναι τοξική, λόγω σχηματισμού των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Επίσης, εκτεταμένες περιόδους σε έλλειψη οξυγόνου (υποξία) ή μικρές περιόδους σε πλήρη απουσία οξυγόνου (ανοξία) έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργία των κυττάρων και θέτουν σε κίνδυνο την επιβίωσή τους. Ο έλεγχος λαμβάνει χώρα τόσο σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Στον έλεγχο αυτό, εμπλέκονται πολυάριθμοι μηχανισμοί, οι οποίοι δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης οξυγόνου. Ωστόσο, οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ακόμα γνωστοί. Θεωρείται πως μια πρωτεΐνη, η οποία περιέχει μια προσθετική ομάδα αίμης, δρά ως αισθητήρας οξυγόνου (Goldberg et al., 1988). Ωστόσο, η ύπαρξή της δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Σύμφωνα με άλλες μελέτες (Chandel et al., 2000 και Michiels et al., 2002), θεωρείται ότι σαν αισθητήρες οξυγόνου δρουν τα ίδια τα μιτοχόνδρια, αυξάνοντας τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το PI3K μονοπάτι. Ωστόσο, μελέτες σε κύτταρα που δεν περιείχαν ενεργά μιτοχόνδρια έδειξαν ότι τα κύτταρα έχουν φυσιολογική απόκριση στις μεταβολές στη συγκέντρωση οξυγόνου (Bardos et al., 2005). Τα ερωτήματα που συνεχίζουν να υπάρχουν για τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα αισθάνονται τις μεταβολές στη συγκέντρωση οξυγόνου είναι αρκετά και χρήζουν ιδιαίτερης μελέτης.

Τα κύτταρα αποκρίνονται στη μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου με αλλαγές στην έκφραση ορισμένων γονιδίων. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων δρουν αντιρροπιστικά μειώνοντας τις επιπτώσεις της υποξίας, προάγοντας κυρίως τον αναερόβιο μεταβολισμό και αυξάνοντας την ερυθροποίηση, το ρυθμό αναπνοής, την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση. Συγκεκριμένα, η μετάβαση από την αερόβια στην αναερόβια γλυκόλυση μεσολαβείται με την επαγωγή της έκφρασης γλυκολυτικών ενζύμων και μεταφορέων γλυκόζης, ενώ η ερυθροποίηση προάγεται με την αυξημένη παραγωγή ερυθροποιητίνης (EPO). Ο ρυθμός αναπνοής αυξάνεται με την επαγωγή της έκφρασης του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης, ένα ένζυμο κλειδί για το σχηματισμό των κατεχολαμινών. Η επαγωγή των γονιδίων που

κωδικοποιούν για τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και την επαγωγίμη συνθάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS) οδηγούν σε αυξημένη αγγειογένεση και αγγειοδιαστολή. Η επαγωγή από την υποξία των διαφορετικών αυτών γονιδίων, φαίνεται ότι εξαρτάται απο ένα κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, τον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1).

### 1.1.2. Γονίδια στόχοι του HIF-1

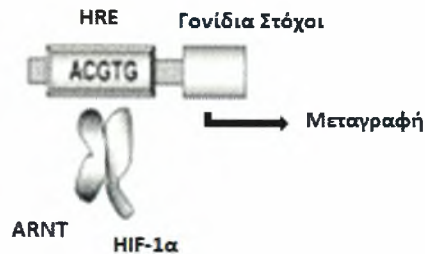
Ο HIF-1 επάγει την μεταγραφή περισσότερων από 60 γονιδίων (Semenza et al., 2003) και ο αριθμός αυτός συνεχώς αυξάνεται (εικόνα 1). Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται γονίδια των οποίων τα προϊόντα επιδρούν σε λειτουργίες όπως η ερυθροποίηση και η μεταφορά σιδήρου στους ιστούς, γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αύξηση και λειτουργία του αγγειακού συστήματος και την προσαρμογή του αγγειακού τόνου. Επιπλέον, ο HIF-1 επάγει γονίδια των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στον αναερόβιο μεταβολισμό και την παραγωγή ATP. Τέλος, επιδρά στην μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 1. Γονίδια στόχοι του HIF-1α.

Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των γονιδίων είναι ότι περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE

(Hypoxia Response Elements), στα οποία συνδέεται ο HIF-1. Τα HRE εντοπίζονται μέσα στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων του HIF-1 και περιέχουν την αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' (Semenza et al., 1996), που είναι και το κατεχογόν στοιχείο σύνδεσης στον HIF-1 (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Στοιχεία απόκρισης στην υποξία HRE.

## 1.2. Δομή του HIF-1

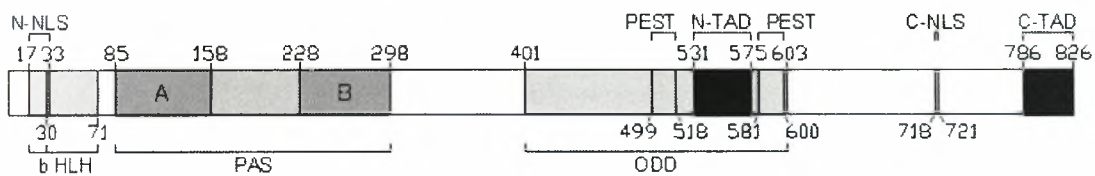
- **Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές δύο bHLH- PAS πρωτεϊνών**

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 είναι ένα ετεροδιμερές συγκροτημένο από ένα από τα τρία είδη α υπομονάδων (HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α) και μια β υπομονάδα (HIF-1β). Η υπομονάδα HIF-1α αποτελεί το σπουδαιότερο μέλος των α υπομονάδων. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του HIF-1α στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 (14q21-q24), ενώ του HIF-1β στο χρωμόσωμα 1 (1q21). Οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β περιέχουν δυο χαρακτηριστικές περιοχές, μια περιοχή με μοτίβο έλικας- θηλιάς- έλικας (bHLH: basic Helix- Loop- Helix) καθώς και μια περιοχή PAS. Το όνομα της περιοχής PAS προήλθε από τα πρώτα μέλη της οικογένειας που έγιναν γνωστά: των γονιδίων period (Per) και single- minded (Sim) της *Drosophila* και των γονιδίων aryl hydrocarbon receptor (AHR) και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) των θηλαστικών. Η περιοχή PAS περιέχει δυο εσωτερικές ομόλογες υποπεριοχές τις A και B που έχουν βασικά αμινοξέα και οι οποίες εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών. Οι HLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό του HIF-1α με τον HIF-1β, ενώ η βασική περιοχή αμινοξέων (αα 4-27) είναι απολύτως αναγκαία για τη σύνδεση του διμερούς στο DNA. Ο διμερισμός αυτός είναι απαραίτητος καθώς ο HIF-1α δεν μπορεί από μόνος του να προσδεθεί στο DNA, προκειμένου να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

- **HIF-1α**

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων (εικόνα 3) με μέγεθος 100-120 kDa. Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει μια περιοχή βασικών αμινοξέων (αα 17-30),

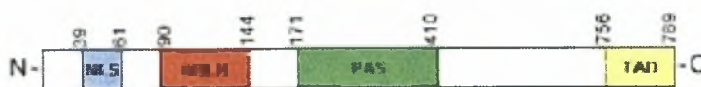
την HLH περιοχή (αα 31-71) και την περιοχή PAS (αα 85-298) με τις A (αα 85-158) και Β (αα 228-298) υποπεριοχές. Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται δυο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, οι N- TAD (N- terminal transactivation domain, αα 531- 575) και C- TAD (C- terminal transactivation domain, αα 786- 826) (Pugh et al., 1997), οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στη σύνδεση άλλων συν-ενεργοποιητών όπως p300/CBP και Ref-1. Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει επίσης μια περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α (Huang et al., 1998) σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ODD: oxygen dependent degradation domain, αα 401- 603) και η οποία περιέχει δυο μοτίβα PEST, περιοχές δηλαδή πλούσιες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T) (αα 499- 518 και 581- 600). Επιπλέον, ο HIF-1α περιέχει δύο σηματοδοτικές αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear localization signals) τα N- NLS (αα 17- 33) και C- NLS (αα 718- 721). Το C-NLS φαίνεται να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο για την εισαγωγή του HIF-1α στο πυρήνα, ενώ το N-NLS είναι λιγότερο σημαντικό (Kallio et al., 1998).



Εικόνα 3. Δομή HIF-1α.

- **HIF-1β**

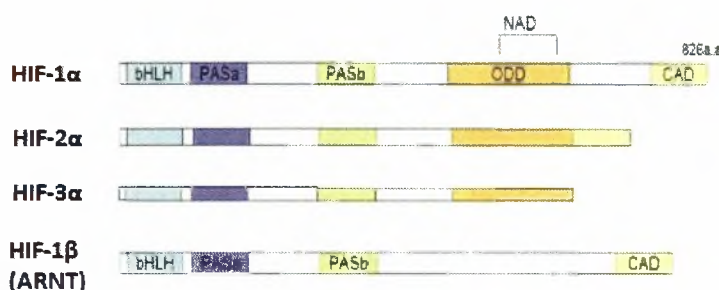
Ο HIF-1β ονομάζεται και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) διότι είναι ταυτόσημος με την πρωτεΐνη ARNT, η οποία έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με τον παράγοντα AHR προς σχηματισμό του λειτουργικού υποδοχέα της διοξίνης. Απαντάται σε δυο ισομορφές των 774 και 789 αμινοξέων, οι οποίες εμφανίζουν μεγέθη 92 και 94 kDa αντίστοιχα. Οι δύο αυτές ισομορφές διαφέρουν σε ενα εξόνιο μήκους 45 βάσεων (Wang et al., 1995a). Ο HIF-1β εκφράζεται ιδι�σύστατα και η ενεργοποίησή του δεν επηρεάζεται από την διαθεσιμότητα οξυγόνου. Και ο ARNT περιέχει περιοχές bHLH (αα 90-144) και PAS (αα 171- 410) καθώς και μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο της C- TAD (αα 756- 789) (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Δομή HIF-1β.

- Άλλοι HIFs

Εκτός του HIF-1α υπάρχουν άλλα δυο μέλη της οικογένειας των α υπομονάδων του HIF-1, τα οποία έχουν και αυτά τις χαρακτηριστικές περιοχές bHLH και PAS (εικόνα 5). Ο HIF-2α γνωστός και ως EPAS1 (Endothelial PAS domain protein 1) ή ως HLF (HIF- like factor) και ο HIF-3α. Και οι δύο σχηματίζουν ετεροδιμερή με έναν από τα μέλη της οικογένειας ARNT: ARNT (HIF-1β), ARNT2 ή ARNT3 (BMAL/MOP3). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες μεταξύ τους και αποικοδομούνται σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου με όμοιο τρόπο με αυτόν του HIF-1α, όμως ο ειδικός ρόλος τους δεν είναι λεπτομερώς γνωστός. Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α παίζει σημαντικό ρόλο σε μερικούς κυτταρικούς τύπους, όπως στα μακροφάγα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και στην ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου των νεφρών. Από τον HIF-3α απουσιάζει η περιοχή C-TAD και περιγράφεται ως αρνητικός ρυθμιστής.



Εικόνα 5. Δομή HIFs.

### 1.3. Ρύθμιση του HIF-1

Η ρύθμιση της δραστηριότητας του HIF-1 γίνεται από την α υπομονάδα και κυρίως μέσω της πρωτεϊνικής σταθερότητας. Συγκεκριμένα, υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, αν και οι δυο υπομονάδες του HIF-1 (HIF-1α και ARNT) μεταγράφονται και μεταφράζονται συνεχώς, ο HIF-1 δεν είναι ενεργός εξαιτίας της ταχείας αποικοδόμησης του HIF-1α. Στην υποξία, η αποικοδόμηση αναστέλλεται, ο HIF-1α σταθεροποιείται, εισάγεται στον πυρήνα όπου εκεί αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα του ARNT μέσω των bHLH- PAS περιοχών και προσδένονται στο DNA. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρά με διάφορους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.

#### 1.3.1. Αποικοδόμηση HIF-1

Σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, ο HIF-1α ουβικουιτινιώνεται και αποικοδομείται μέσω της 26S υπομονάδας του

πρωτεασώματος (Kallio et al., 1999). Στην ουβικουιτινίωση του HIF-1α κύριο ρόλο παίζει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel- Lindau (pVHL), η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με την ODD περιοχή του HIF-1α (Bonicalzi et al., 2001). Η VHL αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Elongin B (ELB), Elongin C (ELC), Cullin 2 (CUL2) και RBX1 σχηματίζοντας έτσι το σύμπλεγμα της E3 λιγάσης που προκαλεί τελικά την ουβικουιτινίωση του HIF-1α. Η απενεργοποίηση της VHL σχετίζεται με το σύνδρομο Von Hippel- Lindau, μιας κληρονομικής μορφής καρκίνου, η οποία χαρακτηρίζεται από συνεχή έκφραση του HIF-1α εξαιτίας της μη ουβικουιτινίωσης και μη αποικοδόμησής του.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ VHL και HIF-1α εξαρτάται από το οξυγόνο. Η σύνδεση HIF-1α/VHL προϋποθέτει μια μεταμεταφραστική τροποποίηση, την υδροξυλίωση των προλινών στις θέσεις 402 και 564 του HIF-1α, η οποία πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου. Η υδροξυλίωση των προλινών οδηγεί σε δέσμευση της VHL στην ODD περιοχή και σε επακόλουθη ουβικουιτινίωση του HIF-1α (εικόνα 6). Τα αμινοξέα στις θέσεις 402 και 564 βρίσκονται σε μια αμινοξική περιοχή με μοτίβο LXXLAP. Έχει βρεθεί πως η Leu 562 της συγκεκριμένης περιοχής είναι απαραίτητη για την υδροξυλίωση της Pro 564 (Ivan et al., 2001). Σε συνθήκες υποξίας, η υδροξυλίωση δεν συμβαίνει εξαιτίας μείωσης του οξυγόνου και ο VHL δεν δεσμεύεται στον HIF-1α, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α.

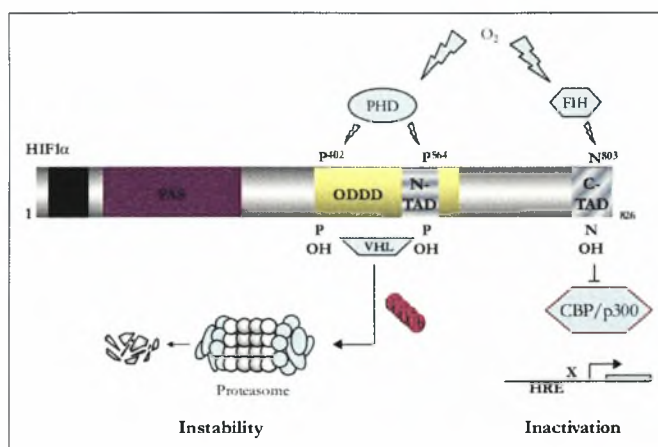
#### ▪ HIF-1α προλυλο- υδροξυλάσες

Η υδροξυλίωση των προλινών της ODD περιοχής του HIF-1α καταλύεται από τις HIF-1α προλυλο- υδροξυλάσες (Schofield et al., 2004). Τα ένζυμα αυτά είναι μέλη της υπεροικογένειας των διοξυγενασών, περιέχουν  $Fe^{2+}$  και απαιτούν κετογλουταρικό και ασκορβικό για τη δράση τους. Το μοριακό οξυγόνο αποτελεί υπόστρωμα των ενζύμων αυτών, ενώ τα παραπροϊόντα της αντίδρασης είναι το  $CO_2$  και το ηλεκτρικό οξύ.

Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν αρχικά σαν προϊόντα του γονιδίου *egl-9* του *Caenorhabditis elegans*. Αργότερα ανακαλύφθηκαν τρία ομόλογα της *Egl-9* στα θηλαστικά, οι λεγόμενες PHDs 1, 2 και 3 (PH- domain containing proteins) και η PHD 4. Αυτά τα τέσσερα ένζυμα διαφέρουν στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους. Η PHD1 ανιχνεύεται αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD2 στο κυτταρόπλασμα, ενώ η PHD3 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο πυρήνα. Σε μελέτες, η αποσιώπηση της PHD2 βρέθηκε να σταθεροποιεί τον HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες (Berra et al., 2003), ενώ αντίστοιχη αποσιώπηση των PHD1 και PHD3 δεν είχε καμία επίδραση, δείχνοντας πως πιθανόν το κύριο ένζυμο για την υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α είναι η PHD2. Όλα αυτά τα ένζυμα υδροξυλιώνουν την Pro 564, ενώ μόνο οι PHD1 και 2 υδροξυλιώνουν την Pro 402.

### ▪ Υδροξυλίωση ασπαραγίνης

Εκτός από την υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α, λαμβάνει χώρα και μια άλλη υδροξυλίωση παρουσία μοριακού οξυγόνου που είναι η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης στη θέση 803 του καρβοξυτελικού άκρου του HIF-1α. Η υδροξυλίωση αυτή γίνεται από την πρωτεΐνη FIH- 1 (Factor Inhibiting HIF-1, παράγοντας αναστολής του HIF-1), η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α. Η FIH- 1 όπως και οι PHDs απαιτούν οξυγόνο και κετογλουταρικό για τη δράση τους. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης αυτής στο καρβοξυτελικό άκρο εμποδίζει τη δέσμευση της p300 στον HIF-1α, με αποτέλεσμα να μένει μεταγραφικά ανενεργός (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Αποικοδόμηση του HIF-1α από της PHDs και απενεργοποίησή του από τις FIHs.

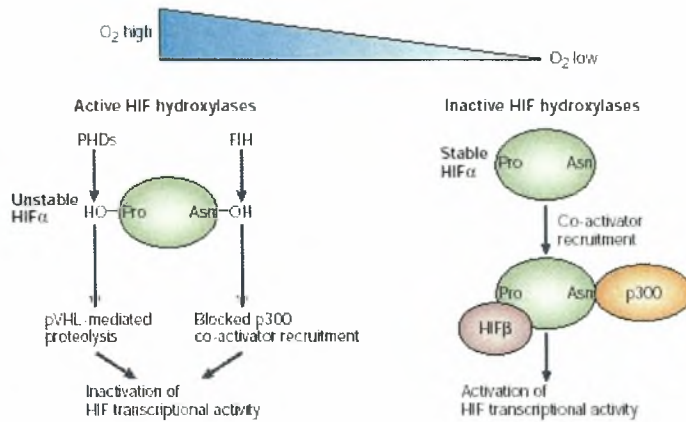
### 1.3.2. Ενεργοποίηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας

Για την ενεργοποίηση του HIF-1 υπό συνθήκες υποξίας, απαιτείται η σταθεροποίηση του HIF-1α και η μετέπειτα εισαγωγή του στον πυρήνα, όπου εκεί αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα του ARNT μέσω των bHLH- PAS περιοχών και προσδένονται στο DNA.

#### 1.3.2.1. Σταθεροποίηση του HIF-1α

Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου, εξασθενίζει η δράση των προλυλο- υδροξυλασών, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δέσμευση των pVHL στον HIF-1α και η μετέπειτα αποικοδόμησή του. Ταυτόχρονα, σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται η δράση της πρωτεΐνης FIH- 1, με αποτέλεσμα η Asn803 να μην υδροξυλιώνεται και να παραμένει ελεύθερη για τη δέσμευση του μεταγραφικού συν- ενεργοποιητή CBP/p300 στον HIF-1α. Η δέσμευση αυτή καθιστά τον HIF-1α μεταγραφικά ενεργό (εικόνα 7). Ωστόσο, αν και ο μηχανισμός της σταθεροποίησης

και της ρύθμισης του HIF-1α είναι γνωστός, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην αναστολή της δράσης των προλυλο- υδροξυλασών και των υδροξυλασών της ασπαραγίνης παραμένουν ασαφή.



Εικόνα 7. Σταθεροποίηση του HIF-1α υπό συνθήκες υποξίας.

### 1.3.2.2. Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα

Για την ενεργοποίηση του HIF-1 απαιτείται η εισαγωγή του HIF-1α στον πυρήνα και ο διμερισμός του με τον ARNT (εικόνα 8). Θεωρείται ότι η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα αποτελεί ένα στάδιο ελέγχου του HIF-1α από την υποξία (Kallio et al., 1998), ωστόσο υπάρχει και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει πως η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα είναι συνεχής και ανεξάρτητη τόσο από την ύπαρξη του VHL, όσο και από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στο κύτταρο (Groulx et al., 2002).

Η επιλεκτικότητα της εισόδου των πρωτεϊνών στον πυρήνα στηρίζεται στην ύπαρξη των σηματοδοτικών αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Σύμφωνα με μελέτες, έχουν ταυτοποιηθεί δυο NLS στο εσωτερικό του HIF-1α (Kallio et al., 1998), ένα στο αμινοτελικό άκρο (αα 17-33) και ένα στο καρβοξυτελικό άκρο (αα 719- 723). Το αμινοτελικό NLS θεωρείται ότι καταστέλλεται από την PAS B περιοχή του HIF-1α, ενώ το καρβοξυτελικό NLS είναι πιθανώς απενεργοποιημένο σε φυσιολογικά κύτταρα. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η υποξία δεν είναι απαραίτητη για την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα, αλλά η σταθεροποίησή του είναι αρκετή για τη μεταφορά της πρωτεΐνης. Επίσης, θεωρούν ότι το καρβοξυτελικό NLS αποτελείται από δυο περιοχές βασικών αμινοξέων (αα 719- 723 και 754- 757) και όχι από μία και μάλιστα ότι τα ενδιάμεσα αμινοξέα (αα 724- 753) είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του NLS (Luo et al., 2001).

Ακόμα, είναι γνωστό ότι για να ξεκινήσει η διαδικασία μεταφοράς στο πυρήνα, πρέπει τα NLS να αναγνωριστούν από ειδικές πρωτεΐνες υποδοχείς. Η μεγαλύτερη τάξη των πρωτεϊνικών υποδοχέων μεταφοράς είναι η οικογένεια των ιμπορτινών β, οι οποίες επιτρέπουν τη διέλευση των πρωτεϊνών μέσα από το κανάλι



των πυρηνικών πόρων. Ωστόσο, αν και στον HIF-1α έχουν χαρακτηριστεί τα δυο NLS, δεν έχει μέχρι στιγμής βρεθεί αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις ιμπορτίνες α και β, οι οποίες είναι γνωστό ότι αναγνωρίζουν τα NLS αυτού του τύπου.

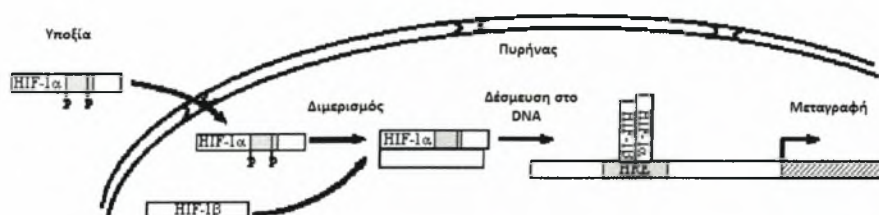
Τα ερωτήματα που συνεχίζουν να υπάρχουν είναι αρκετά, όπως αν και πως η υποξία ενεργοποιεί την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα, ποιά είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη - υποδοχέας μεταφοράς που οδηγεί τον HIF-1α στους πυρηνικούς πόρους και στη συνέχεια στο εσωτερικό του πυρήνα και επίσης πως επηρεάζουν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α την αναγνώρισή του από τους μηχανισμούς πυρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς.

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

- Ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT

Ο HIF-1α δε μπορεί από μόνος του να συνδεθεί σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο. Αντίθετα, παρουσία του ARNT, ο HIF-1α μπορεί να ετεροδιμεριστεί μαζί του και να συνδεθούν στο DNA (εικόνα 8). Καθοριστικό ρόλο για το διμερισμό των δυο παραγόντων διαδραματίζουν οι περιοχές bHLH και PAS (ιδιαίτερα η PAS-A υποπεριοχή). Ενώ η βασική περιοχή αμινοξέων (αα 4-27) είναι απολύτως αναγκαία για τη σύνδεση στο DNA.

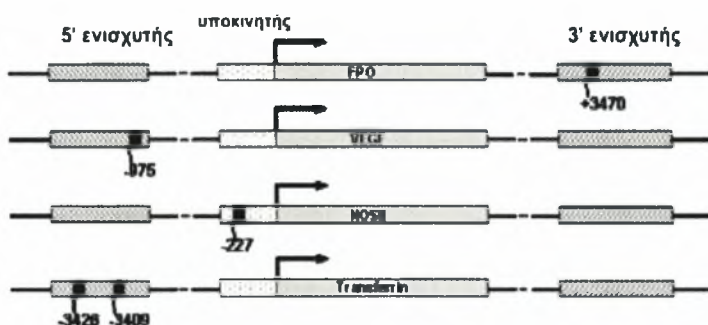
Μελέτες υποστηρίζουν πως κατά το διμερισμό του με τον ARNT, ο HIF-1α υπόκειται σε μια αλλαγή διαμόρφωσης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβοξυτελικών περιοχών των δυο υπομονάδων του HIF-1 πιθανόν επιδρούν τόσο στη στερεοδιαμόρφωσή τους όσο και στην ικανότητα σύνδεσής τους στο DNA παρόλο που δεν συμμετέχουν άμεσα σε αυτόν. Μέχρι στιγμής όμως, ο ακριβής ρόλος των καρβοξυτελικών τμημάτων των δυο μορίων στη σύνδεση στο DNA αποτελεί ένα μεγάλο ερώτημα. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α δε μπορεί να πάρει την κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση κατά το διμερισμό του με τον ARNT απουσία της πρωτεΐνης Hsp90, ενώ ακόμα δεν είναι γνωστό αν κάποιοι άλλοι παράγοντες, όπως οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α έχουν κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδρασή του με τον ARNT και στη σύνδεση του ετεροδιμερούς στο DNA.



Εικόνα 8. Ετεροδιμερισμός του HIF-1α με τον ARNT και δέσμευση στο DNA

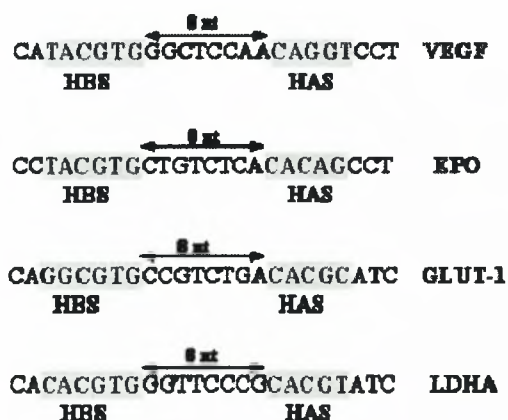
- Δέσμευση ετεροδιμερούς στο DNA

Προκειμένου ο HIF-1 να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, πρέπει να συνδεθεί σε μια περιοχή του DNA τους που είναι γνωστή ως HRE (Hypoxia Response Elements). Τα HRE εντοπίζονται μέσα στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων του HIF-1 (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Εντοπισμός στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HRE) σε διάφορα γονίδια στόχους του HIF-1.

Η περιοχή HRE περιέχει την αλληλουχία (A/G)CGTG, η οποία είναι το κατεξοχήν στοιχείο σύνδεσης στο HIF-1 και ονομάζεται HBS (Hypoxia Binding Site). Θεωρείται ότι το στοιχείο HBS είναι η ελάχιστη αλληλουχία που απαιτείται για τη σύνδεση του HIF-1 στο DNA. Η πλειονότητα των γονιδίων στόχων του HIF-1 περιέχουν και μια άλλη χαρακτηριστική αλληλουχία που ονομάζεται HAS (HIF-1 Ancillary Sequence) και η οποία εντοπίζεται μέσα στην HRE περιοχή, 8 με 9 νουκλεοτίδια εμπρός ή πίσω από τα HBS. Η HAS είναι μια ατελής ανάστροφη επανάληψη του HBS, η οποία θεωρείται απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων από τον HIF-1 (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) των VEGF, EPO, GLUT-1 και LDHA

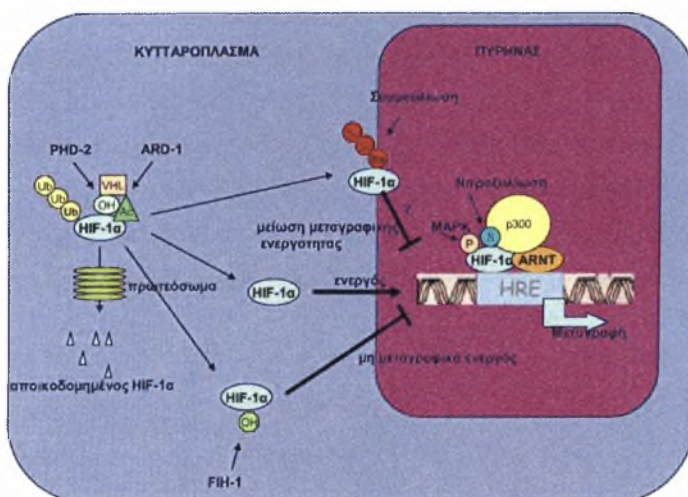
## 1.4. Ρύθμιση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα

### 1.4.1. Ρύθμιση του HIF-1α μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων

Η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων εμπλέκει αρκετές τροποποιήσεις των μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών του μεταγραφικού μηχανισμού. Αλλαγές στο εξωκυττάριο περιβάλλον προκαλούν την εκκίνηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία προκαλούν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό εντοπισμό, τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, τη σταθερότητα, τη σύνδεση στο DNA και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων που τις φέρουν. Ο HIF-1α ως μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εμπλέκεται στην έκφραση πλήθους γονιδίων υπόκειται και ο ίδιος σε μια σειρά μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που σαν σκοπό έχουν την ρύθμιση της λειτουργίας του (εικόνα 11). Οι τροποποιήσεις αυτές συμβαίνουν στο καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α, όπου εδράζονται η ODD περιοχή και οι δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD και C-TAD).

#### ➤ Υδροξυλίωση και Ουβικουιτινίωση

Η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις προλυλο- υδροξυλάσες είναι το κλειδί για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες. Επιπλέον, η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 803 καθιστά τον HIF-1α μεταγραφικά ανενεργό. Μια άλλη τροποποίηση που επίσης αναφέρθηκε είναι η πολυουβικουιτινίωση του HIF-1α από το σύμπλεγμα της E3 λιγάσης που ως αποτέλεσμα έχει την αναγνώριση του HIF-1α από το πρωτεάσωμα και την αποικοδόμησή του. Ωστόσο, πρόσφατα προτάθηκε και ένας άλλος μηχανισμός αποικοδόμησης του HIF-1α με ουβικουιτινίωση από την MDM2 E3 λιγάση, η οποία πιθανον προκαλεί την ουβικουιτινίωσή του μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την p53 (Ravi et al., 2000).



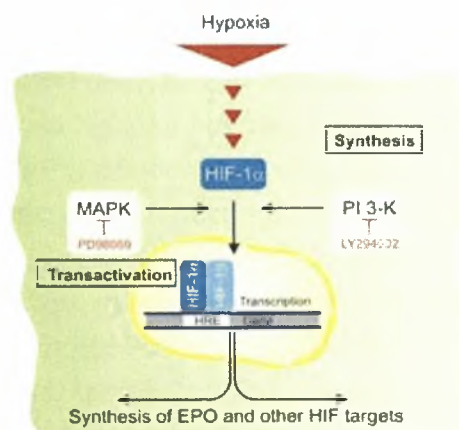
Εικόνα 11. Επίδραση μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στις λειτουργίες του HIF-1α.

### ➤ Ακετυλίωση

Πιστεύεται ότι ο HIF-1α ακετυλιώνεται από την ARD-1 (Arrest Defective-1 protein) και μάλιστα η τροποποίηση αυτή φαίνεται να μεγιστοποιεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την VHL οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη αποικοδόμηση του HIF-1α (Jeong et al., 2002). Η ακετυλίωση συμβαίνει στη λυσίνη 532 της ODD περιοχής. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση ή η διακοπή της έκφρασης της ARD-1 με siRNA δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-1α (Fisher et al., 2005).

### ➤ Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων είναι ένας από τους σπουδαιότερους μηχανισμούς ρύθμισης της ενεργότητάς τους. Η άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p42/44 MAPK αναφέρθηκε από διάφορες ερευνητικές ομάδες και φαίνεται να παίζει ρόλο μετά τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε υποξία (εικόνα 12). Με in vitro μελέτες δείχθηκε πως πιθανόν το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α (αα 531-826) είναι αυτό το οποίο φωσφορυλιώνεται από την MAPK, αν και οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης δεν είναι γνωτές (Minet et al., 2000 και Sang et al., 2003). Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες δείχθηκε ότι οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης είναι οι σερίνες 641 και 643 (Mylonis et al., 2006). Η παρατηρούμενη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAP κινάσες δε φαίνεται να επιδρά στη σταθεροποίηση του HIF-1α αλλά αυξάνει την μεταγραφική του ικανότητα. Ένας πιθανος μηχανισμός που εξηγεί την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι ίσως η αποδοτικότερη σύνδεση της φωσφορυλιωμένης μορφής του HIF-1α στον ARNT. Έχει επίσης προταθεί, πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAP κινάσες οδηγεί σε αυξημένη αγχιστεία του με την p300 με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργοποίησης (Richard et al., 1999), αν και πρόσφατα δείχθηκε πως η φωσφορυλίωση της p300 από την MAP κινάση είναι αυτή η οποία αυξάνει τη σύνδεση της p300 στο C- TAD του HIF-1α (Sang et al., 2003). Η ίδια μελέτη διευκρινίζει πως το C- TAD δεν φωσφορυλιώνεται άμεσα και πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α γίνεται μεταξύ των αμινοξέων 530-744. Μια άλλη πιθανή δράση της φωσφορυλίωσης μπορεί να είναι η ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα, ωστόσο τα ερωτήματα που συνεχίζουν να υπάρχουν είναι αρκετά.



Εικόνα 12. Ρόλος των κινασών στη ρύθμιση του HIF-1α.

### ➤ Σουμουλίωση

Ο HIF-1α περιέχει 3 αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, στις θέσεις Lys 391, 477 και 532. Η σουμουλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση, η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων. Ο ρόλος της σουμουλίωσης στον HIF-1α δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, όμως πιστεύεται πως η τροποποίηση αυτή δρα αρνητικά στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Brahimi-Horn et al., 2005).

### ➤ S- Νιτροζυλίωση

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) έχει δειχθεί να αυξάνει αλλά και να μειώνει τη σταθεροποίηση του HIF-1α και η δράση του φαίνεται να εξαρτάται άμεσα τόσο από την συγκέντρωσή του όσο και από το είδος των κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπό συνθήκες υποξίας, το NO αναστέλλει την σταθεροποίηση του HIF-1α και την μετέπειτα μεταγραφική του ενεργοποίηση. Από την άλλη πλευρά όμως, έχει δειχθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, το NO προκαλεί την σταθεροποίηση του HIF-1α, γεγονός που πιθανόν εμπλέκει το μονοπάτι των MAP κινασών και το PI3K/Act μονοπάτι (Brune et al., 2001). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως ο HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στη κυστεΐνη 800. Πιστεύεται πως η τροποποίηση αυτή ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την p300 και έτσι αυξάνεται η μεταγραφική ενεργότητά του (Yasinska et al., 2003).

## 1.4.2. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS)

Τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας αποτελεί ο ρόλος των ελευθέρων ριζών (ROS) στη σταθερότητα του HIF-1α. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν πως τα μιτοχόνδρια δρουν σαν αισθητήρες οξυγόνου, αυξάνοντας τη δημιουργία ROS στην

υποξία, προκαλώντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία οδηγούν σε επαγωγή του HIF-1α (Chandel et al., 2000). Έκθεση κυττάρων σε ουσίες που παράγουν ROS όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το βανάδιο, το χρώμιο, η ακτινιβολία, ο TNFα και η υπερέκφραση της NAD(P)H οξειδάσης-1, οδηγούν σε σταθεροποίηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί πως η σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες ανοξίας δεν απαιτεί τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και πως κύτταρα που δεν περιέχουν ενεργά μιτοχόνδρια δείχνουν να έχουν κανονική απόκριση στην υποξία (Bardos et al., 2005).

Επίσης, μη υποξικά ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες επάγουν τον HIF-1α μέσω κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών με μηχανισμούς που εμπλέκουν την παραγωγή ROS. Πιθανόν, τα ROS επιδρούν στον HIF-1α μέσω της επαγωγής σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το PI3K μονοπάτι ή οι MAP κινάσες που είναι γνωστό πως ενεργοποιούνται από τα παραπάνω μη υποξικά ερεθίσματα (Kietzmann et al., 2005).

### 1.4.3. Αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες

Η επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων (Feldser et al., 1999), όπως η ινσουλίνη, οι IGF-1, IGF-2, EGF και ο PDGF, κυτοκινών (Hellwing-Burgel et al., 1999) όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και ο TNFα, αγγειακών ορμονών (Richard et al., 2000), όπως η αγγειοτενσίνη και η θρομβίνη και ικτών πρωτεϊνών οδηγούν σε επαγωγή και ενεργοποίηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του HIF-1α δεν αναστέλλεται, αντίθετα παρατηρείται αύξηση είτε της σύνθεσης είτε κυρίως της μετάφρασης του mRNA του, η οποία είναι ικανή να οδηγήσει σε συσσώρευση της πρωτεΐνης. Μελέτες έδειξαν πως η αύξηση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α εμπλέκει την PI-3K (κινάση της 3- φωσφατιδυλο- ινοσιτόλης). Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και η πρόσδεση αυτή είναι το εναρκτήριο σήμα για μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων. Αποτέλεσμα αυτών των φωσφορυλιώσεων είναι η ενίσχυση του μεταφραστικού μηχανισμού.

Ακόμα, οι αυξητικοί παράγοντες και οι αγγειοδραστικές ορμόνες ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών. Οι γνωστότερες MAP κινάσες είναι οι ERK. Η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων κινασών γίνεται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων της τυροσίνης, των RAS/RAF και MEK κινασών. Χρησιμοποιώντας αναστολείς αυτού του μονοπατιού παρατηρείται μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα παραμένουν ανέπαφα. Ωστόσο, οι p42-44 MAP κινάσες φωσφορυλιώνουν τον παράγοντα eIF- 4E, ενώ φαίνεται να δρουν και στην απενεργοποίηση της 4E- BP1 και στην φωσφορυλίωση της p70<sup>S6k</sup>. Για αυτό το λόγο θεωρείται πως το μονοπάτι των MAP κινασών μπορεί

να δρα και στην αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-1α με μηχανισμό παρόμοιο με αυτό της PI3K.

#### 1.4.4. Δεσφериοξαμίνη και Κοβάλτιο

Εκτός από την υποξία, ο HIF-1α επάγεται και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου υπό την επίδραση διαφόρων ουσιών. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως ενώσεις που προκαλούν αναστολή των προλυλο- υδροξυλασών (π.χ. η διμεθυλοξαλική γλυκίνη) οδηγούν στη σταθεροποίηση του HIF-1α εξαιτίας της μη υδροξυλίωσης και άρα της μη πρωτεόλυσής του από το πρωτεάσωμα. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν και διάφοροι χημικοί παράγοντες όπως η δεσφериοξαμίνη, οι οποίοι δεσμεύουν το Fe<sup>2+</sup> που απαιτούν οι υδροξυλάσες του HIF-1α, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως δισθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο προκαλούν επαγωγή του HIF-1α. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρα το κοβάλτιο δεν είναι πλήρως γνωστός. Πιθανόν το κοβάλτιο να αντικαθιστά το σίδηρο στο ενεργό κέντρο των υδροξυλασών, με αποτέλεσμα να αναστέλλονται τα ένζυμα αυτά και να επάγεται η σταθεροποίηση του HIF-1α.

#### 1.4.5. Αρνητική ρύθμιση του HIF-1α από άλλους παράγοντες

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που προκαλούν αρνητική ρύθμιση του HIF-1α τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες υποξίας. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν ελάττωση της ενεργότητας του HIF-1α και της μεταγραφής του καθώς και μείωση της σταθερότητάς του. Οι πιο γνωστοί αρνητικοί ρυθμιστές του HIF-1α, εκτός από τις προλυλο- υδροξυλάσες, τις VHL και τις FIH-1 που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι και η CITED2, η p53 πρωτεΐνη και ο PTEN.

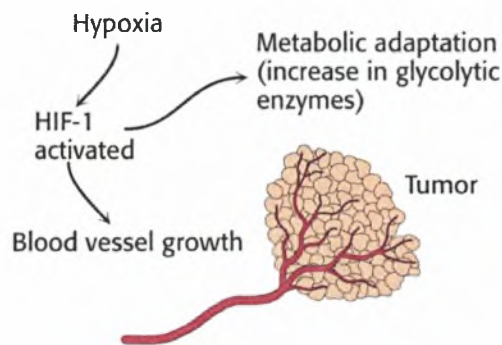
Σύμφωνα με μελέτες έχει βρεθεί ότι η CITED2 συνδέεται με την πρωτεΐνη p300 και αναστέλλει έτσι την σύνδεσή της με τον HIF-1α, με αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας (Freedman et al., 2003). Η ογκοκατασταλτική p53 πρωτεΐνη από την μεριά της φαίνεται να αλληλεπιδρά και αυτή με την p300, με αποτέλεσμα να μειώνεται η σταθερότητα του HIF-1α. Σε συνθήκες υποξίας, τα επίπεδα της p53 αυξάνονται δραματικά με συνέπεια να ανταγωνίζονται με τον HIF-1α για μια θέση δέσμευσης στη πρωτεΐνη p300. Σε συνθήκες έντονης υποξίας, τα επίπεδα της p53 αυξάνονται ακόμα περισσότερο. Στη συνέχεια, η p53 αποικοδομείται αλληλεπιδρώντας με την MDM2 και θεωρείται ότι η σύνδεση p53/MDM2 προκαλεί και την αποικοδόμηση του HIF-1α. Τέλος, έχει

βρεθεί ότι η υπερέκφραση του PTEN φαίνεται να δρα ανασταλτικά στο μονοπάτι PI3K, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α.

## 1.5. Κλινική σημασία του HIF-1α

### HIF-1α και καρκίνος

Η υποξία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των αυξανόμενων όγκων και των μεταστάσεων που προκαλούν και οφείλεται κυρίως στη μη επαρκή αιμάτωση του όγκου (εικόνα 13). Για αυτό το λόγο, στα περισσότερα είδη όγκων παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα HIF-1α. Γενετικές μεταβολές σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια καθώς και αυξητικοί παράγοντες ή κυτοκίνες φαίνεται να επάγουν τον HIF-1α. Η ενεργοποίηση του HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται, όπως προαναφέρθηκε, με την αγγειογένεση και τη μεταβίβαση από τον αερόβιο στον αναερόβιο μεταβολισμό. Η επαγωγή της αγγειογένεσης στους όγκους έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αιμάτωσή τους και την περαιτέρω αύξησή τους, ενώ η επαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού έχει ως αποτέλεσμα την προσαρμογή των όγκων σε υποξικό περιβάλλον. Ο βαθμός έκφρασης των υποξικών παραγόντων σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου, την αγγειογένεση και τη θνησιμότητα.



Εικόνα 13. Επαγωγή όγκου από τον HIF-1.

Συνεπώς, ο HIF-1α φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου και έτσι φαντάζει ένας ιδανικός δυνητικός στόχος αντικαρκινικής θεραπείας, καθώς περιλαμβάνει πολλά βήματα που μπορούν να αποτελέσουν αντικείμενο στοχευμένης θεραπείας.

Εκτός από τους παράγοντες που προκαλούν αναστολή του HIF-1α (PHDs, VHL, FIH-1, ARD-1, CITED2, p53 και PTEN) υπάρχουν και άλλες χημικές ουσίες, οι οποίες έχει δειχθεί ότι τον αναστέλλουν, και μπορούν να αποτελέσουν την βάση για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι ουσίες αυτές είναι:



- **2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME2):** Η 2-ME2 είναι ένα φυσικό παράγωγο της 17β-οιστραδιόλης, η οποία αναστέλλει την αγγειογένεση και την αύξηση διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων και επάγει την απόπτωσή τους. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί της δράσης της 2-ME2 δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η 2-ME2 επηρεάζει τον πολυμερισμό της σωληνίνης και κατ'επέκταση την αύξηση της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων (εικόνα 14). Η δέσμευση της 2-ME2 στους μικροσωληνίσκους έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του HIF-1α και επομένως την αναστολή της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF.

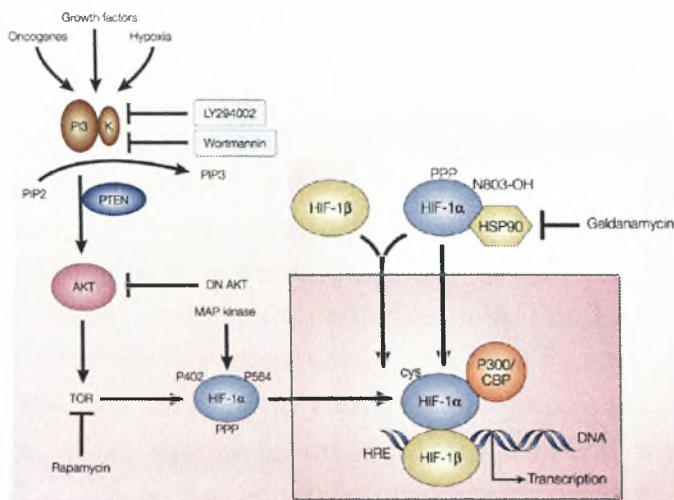


Εικόνα 14. Επίδραση της ME2 στον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα.

- **LY294002, Ραπαμυκίνη και Βορτμανίνη:** Οι ουσίες αυτές είναι αναστολείς του μονοπατιού PI3K (εικόνα 15). Η PI3K καταλύει την φωσφορυλίωση φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη πρωτεΐνη Act. Η φωσφορυλιωμένη Act εν συνεχεία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη mTOR. Η mTOR αυξάνει την μετάφραση του mRNA του HIF-1α.

- **Γκελνταναμυκίνη:** Η ουσία αυτή αναστέλλει το σχηματισμό του μοριακού συνοδού Hsp90 (εικόνα 15). Ο HIF-1α δε μπορεί να πάρει την κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση κατά το διμερισμό του με τον ARNT απουσία της πρωτεΐνης Hsp90.

- **PD98059:** Η ουσία αυτή είναι ένας αναστολέας των MAP κινασών, με αποτέλεσμα την ελάττωση της μεταγραφικής ικανότητας του HIF-1α.



**Εικόνα 15.** Απεικόνιση υποψήφιων ουσιών για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο το μονοπάτι ενεργοποίησης του HIF-1α.

Πολλά από αυτά τα πιθανά αντικαρκινικά δεν έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές. Ενώ, ήδη ένα πλήθος φαρμακευτικών παραγόντων με στόχο την οδό της υποξίας βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και κλινικών δοκιμών με ενθαρρυντικά πρώτα αποτελέσματα (πίνακας 1).

<b>Ουσίες που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές</b>		<b>Ουσίες που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές</b>	
<b>Αναστολείς HIF-1</b>	<b>Στόχος</b>	<b>Αναστολείς HIF-1</b>	<b>Στόχος</b>
17- AAG	Hsp90	PD 98059	MEK
2- ME2	Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων	Radicalol Geldanamycin	Hsp90
BAY 43-9006	RAF κινάση	KF58333	Hsp90
ZD-1839	EGFR κινάση τυροσίνης	PX-12	Thioredoxin 1
CCI- 779	mTOR	Pleurotin	Thioredoxin 1

**Πίνακας 1.** Υποψήφια αντικαρκινικά με στόχο την οδό της υποξίας σε κλινικές και μη δοκιμές.

## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο επαγώμενος από την υποξία παράγοντας-1, όπως είναι γνωστό, είναι ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής και ο παράγοντας κλειδί της απόκρισης των κυττάρων στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η ρύθμιση του HIF-1α όπως διαπιστώθηκε διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τη σωστή απόκριση του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας και συμβαίνει σε πολλαπλά επίπεδα όπως στην ενεργοποίηση του HIF-1α και σταθεροποίησή του, στην δημιουργία ετεροδιμερούς με τον HIF-1β και την επικείμενη επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, κ.α. Για το λόγο αυτό, η μελέτη των μοριακών μηχανισμών ενεργοποίησης του HIF-1α έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών, όχι μόνο για την παραγωγή νέας γνώσης σχετικά με τη λειτουργία του αλλά και για την κατανόηση και αντιμετώπιση πολλών ανθρωπίνων ασθενειών στις οποίες φαίνεται να εμπλέκεται ο HIF-1α, όπως ο καρκίνος. Το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α φαίνεται να είναι αυτό που διαδραματίζει το καθοριστικό ρόλο στη ρύθμισή του, αφού σε αυτό εδράζονται οι περιοχές ODD που οδηγούν τον HIF-1α σε αποικοδόμηση υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι περιοχές C-NLS οι οποίες φαίνεται να κατευθύνουν τον HIF-1α στον πυρήνα καθώς και οι περιοχές C-TAD και N-TAD οι οποίες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων.

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η υπερέκφραση και η απομόνωση του καρβοξυτελικού τμήματος 348-826 του HIF-1α το οποίο βρίσκεται σε σύντηξη με την ετικέτα σήμανσης GST. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αγκιστείας με επίτοπο GST (GSH- beads, glutathione- Sepharose 4B, Amersham), και χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με τη χρήση του προσροφητή MonoQ (HiTrap Sepharose Column). Στη συνέχεια, στόχος της εργασίας ήταν η απομάκρυνση της ετικέτας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της TEV πρωτεάσης, η οποία αναγνωρίζει ειδικά ένα επταπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται μεταξύ της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 και της GST, προκαλώντας την πρωτεόλυση του GST από αυτήν. Για το σκοπό αυτό, έγιναν προσπάθειες υπερέκφρασης και απομόνωσης της TEV πρωτεάσης με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας  $Ni^{2+}$  TED. Έπειτα, αφού καθορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 με την TEV πρωτεάση για την πλήρη αποκοπή των GST, επιχειρήθηκε η απομάκρυνση των GST ετικετών και της TEV πρωτεάσης από την HIF1α 348-826, με στήλη GSH και  $Ni^{2+}$  TED αντίστοιχα. Τελικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 (α- έλικα, β- φύλλο, β- στροφή) με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

## **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1. ΥΛΙΚΑ**

#### **3.1.1. Αντιδραστήρια**

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

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

Η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεάση TEV και την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία καθώς και η επίστρωση τρυβλίων με μετασηματισμένα κύτταρα με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς για την κάθε πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε από την Χαχάμη Γεωργία στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

### 3.1.3. Βιοχημικά υλικά

Στη διάρκεια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα Anti-GST goat antibody (1: 3000, Amersham), Anti- Goat (1: 5000, Jackson Immunoresearch), Anti- HIF1 $\alpha$  Monoclonal antibody (1:1000, BD Transduction Laboratories), Anti-Mouse (1: 3000, BioRad) , Polyclonal Anti- HIF1 $\alpha$  (1: 3000), Anti-Rabbit HRP (1: 3000) και το γάλα της nonfat dry milk Carnation της Nestle, France.

### 3.1.4. Υλικά χρωματογραφίας

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

### 3.1.5. Θρεπτικά μέσα

- Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth)

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το μέσο LB Broth σε υγρή μορφή, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στο πίνακα 2.

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

Πίνακας 2. Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου(LB Broth).

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Broth 20g
- NaCl 10g
- ddH<sub>2</sub>O 1L

Ακολουθεί αποστείρωση πριν τη χρήση του.

### 3.1.6. Αντιβιοτικά

Για την παρασκευή stock χλωραμφαινικόλης 100mg/ml, 100mg χλωραμφαινικόλης (Sigma) διαλύονται σε 1ml absolute ethanol, ενώ για την

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

### 3.1.7. Όργανα

Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R erppendorf, μινι- φυγόκεντρος τύπου erppendorf centrifuge 5415D, συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad), συσκευή ηλεκτρομεταφοράς για western blotting (semidry transfer system, Wealtec Yrdimes), φωτόμετρο (Spectronic Instruments, Spectronic® 20 Genesys), φωτόμετρο UV (Spectronic Unicam Genesys 10UV), Vortex (MS2 Minishaker, IKA®), αναδευτήρας τύπου GFL 3015, πεχάμετρο (744 pH Meter, Ω. Metrohm) και ζυγός (KERN, Ew).

## 3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826

Τα γονίδια της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 που πρόκειται να εκφραστούν κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει κατάλληλους προαγωγείς που επιτρέπουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή (εικόνα 16). Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη), και μετέπειτα με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.



Εικόνα 16. Πρωτεΐνη σύντηξης με GST.

#### 3.2.1.1. Διαδικασία υπερέκφρασης της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826

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

Ακολουθεί μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από την O/N καλλιέργεια (περίπου 5ml) σε 500ml φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με αμπικιλίνη. Στη

συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm ( $OD_{600}$ ). Η νέα καλλιέργεια πρέπει να ξεκινάει από  $OD_{600} \sim 0,05-0,07$ . Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση στις 225 rpm, έως ότου η  $OD_{600}$  φτάσει περίπου 0,4. Η συνέχεια της επώασης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^{\circ}\text{C}$ ) υπό ανάδευση έως ότου  $OD_{600} \sim 0,6$ .

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

### 3.2.1.2. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826

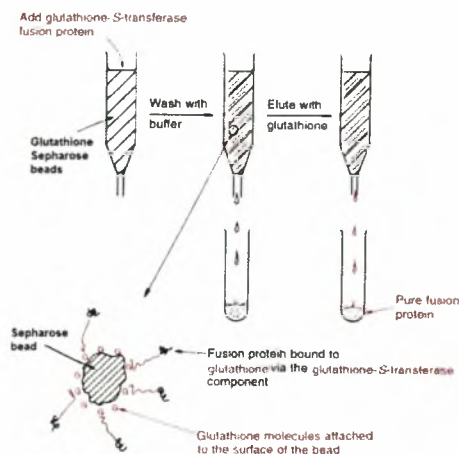
#### ❖ Λύση κυττάρων με υπερήχους

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

#### ❖ Καθαρισμός πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 με επίτοπο GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης)

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη) (εικόνα 17). Η συγγένεια των σφαιριδίων γλουταθειόνης με το τμήμα της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης που βρίσκεται στη πρωτεΐνη επιτρέπει την πρόσδεσή της στα σφαιρίδια. Έτσι, γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με τη προσθήκη διαλύματος ελεύθερης ανηγμένης γλουταθειόνης σε περίσσεια, η οποία δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με την προσδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνη, αποδεσμεύοντας την πρωτεΐνη από αυτά. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης

από τη στήλη και έχει το πλεονέκτημα ότι πραγματοποιείται σε πολύ ήπιες συνθήκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλαγών στη δομή και τη δράση της πρωτεΐνης σύντηξης.



Εικόνα 17. Στήλη συγγένειας σφαιριδίων γλουταθειόνης.

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

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

Τέλος, στα σφαιρίδια GSH προστίθεται διάλυμα γλουταθειόνης σε περίσσεια (διάλυμα 3, πίνακας 3) για την έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Με την προσθήκη της γλουταθειόνης το διάλυμα γίνεται αρκετά όξινο για αυτό το λόγο προστίθενται μερικές σταγόνες NaOH 1M, έως ότου το pH γίνει 8. Στη στήλη πραγματοποιούνται συνεχόμενες εκλούσεις των 500ml με το διάλυμα 3. Σε κάθε



έκλυση πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 1000- 3000 rpm και στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέγεται.

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

**Πίνακας 3.** Σύσταση διαλυμάτων για καθαρισμό πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826

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

#### ❖ Καθαρισμός πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται για την κλασμάτωση των μορίων με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, αφού μόρια που παρουσιάζουν έστω και μικρές διαφορές στο φορτίο τους μπορούν εύκολα να διαχωριστούν. Οι χρησιμοποιούμενοι για τον καθαρισμό πρωτεϊνών ιονικοί ανταλλάκτες αποτελούνται από αδιάλυτο στο νερό υλικό, πάνω στο οποίο βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες οι φορτισμένες ομάδες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν αμφίδρομα από το περιβάλλον τους, με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ιόντα και πρωτεΐνες αντίθετου φορτίου. Ανάλογα με το είδος του φορτίου που οι ανταλλάκτες μπορούν να δεσμεύσουν διακρίνονται σε ανιονικούς και κατιονικούς. Η αποδέσμευση των πρωτεϊνών από έναν ανταλλάκτη, επιτυγχάνεται συνήθως με διαβίβαση από τη στήλη, ρυθμιστικού διαλύματος με διαβαθμισμένη συγκέντρωση άλατος, ώστε με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος έκλυσης οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ ανταλλάκτη- πρωτεϊνών να εξασθενούν,

επιτρέποντας την απόσπασή τους από τον ανταλλάκτη και τον εκλεκτικό διαχωρισμό.

Ο ιονικός ανταλλάκτης που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία είναι ο προσροφητής MonoQ (HiTrap Sepharose Column) (εικόνα 18). Η στήλη αυτή είναι θετικά φορτισμένη, οπότε δεσμεύει τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη GST- HIF1α 348-826 έχει ισοηλεκτρικό σημείο 4,75, οπότε στο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρίσκεται με pH ίσο με 8 (διάλυμα 3, πίνακας 3), είναι αρνητικά φορτισμένη και θα δεσμεύεται από τη στήλη MonoQ.



Εικόνα 18. Στήλη MonoQ (HiTrap Sepharose Column).

Αρχικά, η στήλη εξισορροπείται με τη διαβίβαση, 10 φορές του όγκου της στήλης, ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (20mM Tris-HCl pH 8,0 , 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) σε θερμοκρασία 4°C. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη GST- HIF1α 348-826 διαβιβάζεται στη στήλη χρωματογραφίας, μετά από αραιώσή της με διάλυμα εξισορρόπησης για την αποτελεσματικότερη δέσμευση των πρωτεϊνών στη στήλη. Έπειτα, αφού ο κλασματοσυλλέκτης ρυθμιστεί ώστε να συλλέγονται κλάσματα των 5ml, ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με 15ml από το διάλυμα εξισορρόπησης, ώστε να αποδεσμευτούν από τη στήλη οι πρωτεΐνες που μπορεί να δεσμεύτηκαν χαλαρά σε αυτή. Η έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη διαβίβαση 20ml αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl (gradient, 0 - 1M) κατά 5% κάθε φορά. Ο κλασματοσυλλέκτης (εικόνα 19) σε αυτή τη περίπτωση ρυθμίζεται ώστε να συλλέγονται κλάσματα του 1ml. Τέλος, για να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τη στήλη, διαβιβάζονται άλλα 5ml διαλύματος 100% NaCl. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η οπτική απορρόφηση των εκλουσμάτων καταγράφεται από έναν ειδικό καταγραφέα (εικόνα 19).



Εικόνα 19. Κλασματοσυλλέκτης και καταγραφέας χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.

Όλα τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826 ελέγχονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% ή 12%. Τέλος, τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20°C, ύστερα από διαπίδυση O/N στους 4°C σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM DTT).

### 3.2.2. Καθαρισμός πρωτεάσης TEV

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

#### 3.2.2.1. Διαδικασία υπερέκφρασης της πρωτεάσης TEV

Σε 5ml LB Broth (πίνακας 2) με χλωραμφαινικόλη (100μg/ml) και καναμυκίνη (30μg/ml), ενοφθαλμίζονται κύτταρα BL 21 που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και επωάζονται για 12-14h (O/N) στους 37°C υπό ανάδευση στις 210 rpm.

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

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την υπερέκφραση της πρωτεάσης TEV από κύτταρα Rosetta που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο, παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνη (30μg/ml).

#### 3.2.2.2. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεάσης TEV

##### ❖ Λύση κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων BL 21 και Rosetta, στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση της TEV, επαναιωρείται σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl

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

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

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

Συγκεκριμένα, αφού το υπερκείμενο χρησιμοποιηθεί στη στήλη νικελίου, συλλέγονται κλάσματα (wash) με τη προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες διαφορετικές της TEV, οι οποίες κατακρατούνται ασθενώς στη στήλη. Στη συνέχεια, για την ανάκτηση της TEV από την στήλη χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (από 80mM έως 400mM) για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών έκλυσης της TEV από την στήλη. Τα κλάσματα που συλλέγονται (flow through, wash και elution) ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% για τον καθορισμό του βαθμού καθαρότητας της TEV μετά τη στήλη νικελίου. Στη συνέχεια, απαραίτητη είναι η απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από τη πρωτεάση TEV, για αυτό τα κλάσματα με την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται και υφίστανται διαπίδυση O/N στους 4°C σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol). Τέλος, η πρωτεΐνη φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

#### 3.2.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της ετικέτας σήμανσης GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) από αυτήν. Η GST είναι μια 26kDa πρωτεΐνη που βρίσκεται προσδεσμένη στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης HIF1α. Μεταξύ της GST και της πρωτεΐνης HIF1α

348-826 μεσολαβεί το επταπεπτίδιο ENLYFQG, το οποίο αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση TEV που το πρωτεολύει στη θέση Q\*G (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly). Έτσι, με τη χρήση της TEV πρωτεάσης διαχωρίζεται η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 από την ετικέτα σήμανσης GST. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές για τον καθορισμό των βέλτιστων αναλογιών TEV πρωτεάσης με πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826 καθώς και των συνθηκών θερμοκρασίας και χρόνου επώασης. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι αναλογίες 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 (mg TEV πρωτεάσης: mg GST- HIF1α 348-826) και επώαση στους 4°C και 25°C για 4, 8 και 14 ώρες.

### **3.2.3.1. Διαδικασία καθαρισμού πρωτεΐνης HIF1α 348-826**

#### **❖ Απομάκρυνση TEV πρωτεάσης από τη πρωτεΐνη HIF1α 348-826 - Στήλη συγγένειας Ni<sup>2+</sup> TED**

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

#### **❖ Απομάκρυνση ετικέτας σήμανσης GST από τη πρωτεΐνη HIF1α 348-826**

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

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

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE) σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970).

#### • Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δυο επιμέρους μέρη. Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), όπου τα δείγματα των πρωτεϊνών πακετάρονται με σταθερή τάση 120V. Η πηκτή αυτή έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%), ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών (πίνακας 4).

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

Πίνακας 4. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης συγκέντρωσης 5%.

Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel, running gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (πίνακας 5).

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

Πίνακας 5. Σύσταση πηκτής διαχωρισμού ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμίδης.

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

- **Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων**

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά (loading buffer, 3x) (πίνακας 6) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 5 λεπτά.

<i><b>Αντιδραστήριο</b></i>	<i><b>Περιεκτικότητα/ Συγκέντρωση</b></i>
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	62,5mM
SDS 10%	2%
Γλυκερόλη	10%
β- Μερκαπτοαιθανόλη	2%
Bromophenol blue	0,02%

**Πίνακας 6.** Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer, 3x).

- **Διαδικασία ηλεκτροφόρησης**

Αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στις ειδικές αύλακες της πηκτής. Τέλος, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (πίνακας 7) , έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 120V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοιβάξης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

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

**Πίνακας 7.** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

- **Χρώση με κυανό του Coomasie**

Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα χρωματισμού (staining solution: 40% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 0,1gr Coomasie Brilliant Blue για 100ml διαλύματος) για 45 λεπτά υπό ανάδευση, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution: 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomasie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους της BioRad (πίνακας 8).

<i>Μάρτυρας μοριακού βάρους 1</i>		<i>Μάρτυρας μοριακού βάρους 2</i>	
<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>MB</i>	<i>Χρώμα</i>	<i>MB</i>
Myosin	211,806	Blue	196,143
β- galactosidase	121,020	Magenta	131,064
Bovine Serum Albumin	100,216	Green	90,555
Ovalbumin	54,395	Violet	42,076
Carbonic anhydrase	38,708	Orange	31,931
Soybean trypsin inhibitor	29,806	Red	17,218
Lysozyme	20,040	Blue	6,890
Aprotinin	7,331	-	-

Πίνακας 8. Μάρτυρες μοριακού βάρους της BIORAD.

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

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



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

### 3.2.6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατα Western (western blotting)

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης Western είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές ανίχνευσης και πιστοποίησης των πρωτεϊνών. Στη διαδικασία αυτή, τα προς εξέταση δείγματα των πρωτεϊνών ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης και αποτυπώνονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (εικόνα 20). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από τη πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, βασίζεται στη κίνηση των πρωτεϊνών κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και στον εγκλωβισμό τους στο πλέγμα της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες κατά τη μεταφορά τους αυτή διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι μπορούν να αναγνωριστούν από τα αντισώματα. Στη πράξη, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα που περιέχει το ειδικό αντίσωμα και αυτό δεσμεύεται σε αυτή. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης και επώαση με δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί.

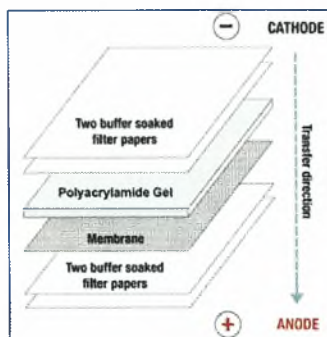


Εικόνα 20. Ανοσοαποτύπωση Western. Α) Ηλεκτρομεταφορά. Β) Ανίχνευση με αντίσωμα. Γ) Εμφάνιση αντίδρασης.

#### ▪ Διαδικασία ανοσοαποτύπωσης Western

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer:

4,5gr Trizma, 2,3gr Boric Acid, 6ml SDS 10%, 294ml ddH<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, η μεμβράνη και η πηκτή τοποθετούνται ανάμεσα σε τέσσερα διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm, αφού έχουν και αυτά εμποτιστεί στο ίδιο διάλυμα. Η τοποθέτησή τους στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (εικόνα 21). Η επαφή μεταξύ τους πρέπει να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά γίνεται για 1,30 ώρα κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 72mA.



Εικόνα 21. Στήσιμο συσκευής ηλεκτρομεταφοράς.

Μετά τη μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, η μεμβράνη επώαζεται σε 10ml διάλυμα γάλακτος 5% w/v σε PBS 1x (πίνακες 9 και 10) για 1 ώρα υπό ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Με το διάλυμα γάλακτος επέρχεται κορεσμός της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, με αποτέλεσμα να καλύπτονται τα κενά και το αντίσωμα που εισέρχεται μετά να δεσμεύεται μόνο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη για την οποία προστίθεται. Ακολουθούν δύο πλύσεις της μεμβράνης των 10 λεπτών η κάθε μία με 10ml διαλύματος PBS με tween (πίνακας 10).

<i><b>Αντιδραστήρια</b></i>	<i><b>Ποσότητα/ όγκος</b></i>
NaCl	24gr
KCl	0,6gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6,51gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6gr
ddH <sub>2</sub> O	Up to 300ml
pH= 7,4, Αποστείρωση	

Πίνακας 9. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10x

<i>PBS- Tween</i>		<i>Γάλα σε PBS</i>	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος (ml)</i>	<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα/ όγκος</i>
PBS 1x	100	PBS 1x	100ml
Tween 20	0,5	Γάλα σε σκόνη	5gr

Πίνακας 10. Σύσταση διαλυμάτων PBS- Tween και γάλακτος σε PBS.

Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 5ml διαλύματος που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα (πίνακας 11) σε κατάλληλη αραιώση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και έπειτα τοποθετείται για επώαση Ο/Ν στους 4°C. Το πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύει μόνο την συγκεκριμένη πρωτεΐνη την οποία αναγνωρίζει. Έπειτα, η μεμβράνη εκπλένεται δυο φορές με 10ml διαλύματος PBS με tween για 10 λεπτά, ώστε να αφαιρεθεί όλο το επιπλέον πρωτογενές αντίσωμα που δεν προσδέθηκε πάνω στις μεμβράνες. Ακολούθως, η μεμβράνη επώαζεται με το δευτερογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφρά ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα (πίνακας 11) αναγνωρίζει και προσδέεται στο πρωτογενές και είναι υπεύθυνο για το σήμα που λαμβάνουμε στο τέλος της διαδικασίας, που δείχνει το σημείο στο οποίο βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται 2-3 φορές με 10ml διαλύματος PBS χωρίς tween για 10 λεπτά και ακολουθεί εμφάνιση του σήματος με το κατάλληλο υπόστρωμα για το δευτερογενές αντίσωμα. Η ανοσοανίχνευση των επαχθισών πρωτεϊνών στα συγκεκριμένα πειράματα έγινε με τα αντισώματα που παρουσιάζονται στο πίνακα 11.

<i>Στόχος αντισώματος</i>		<i>Αντίσωμα</i>	<i>Αραιώση</i>	<i>Διάλυμα αραιώσης</i>
Για μεταφορά της S-γλουταθειόνης	Πρωτογενές αντίσωμα	Anti-GST Goat	1:3000	Διάλυμα γάλακτος
	Δευτερογενές αντίσωμα	Anti-Goat	1: 5000	Διάλυμα γάλακτος
Για HIF1α 348-826	Πρωτογενές αντίσωμα	Anti-HIF1α Monoclonal	1: 1000	PBS με tween
	Δευτερογενές αντίσωμα	Anti-Mouse	1: 3000	Διάλυμα γάλακτος
Για HIF1α 348-826	Πρωτογενές αντίσωμα	Polyclonal Anti-HIF1α	1: 3000	Διάλυμα γάλακτος
	Δευτερογενές αντίσωμα	Anti-Rabbit HRP	1: 3000	Διάλυμα γάλακτος

Πίνακας 11. Αντισώματα για τη μεταφορά της S-γλουταθειόνης και για τον HIF1α 348-826.

#### ▪ Εμφάνιση σήματος

Για την εμφάνιση της επιθυμητής ζώνης, η μεμβράνη επωάζεται με το υπόστρωμα του δεύτερου αντισώματος. Σε αυτή τη περίπτωση, το δεύτερο αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP, Horseradish peroxidase) και σαν υπόστρωμα χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο χλωροναφθόλη. Η χλωροναφθόλη διαλυμένη σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0,5gr/ml προστίθεται σε διάλυμα  $H_2O_2$  30% και εισάγεται στη μεμβράνη. Η χλωροναφθόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία  $H_2O_2$ , δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Η αντίδραση σταματάει ξεπλένοντας τη μεμβράνη με νερό.

### 3.2.7. Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού

#### 3.2.7.1. Γενικές αρχές φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού

Η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (Circular Dichroism Spectroscopy, CD) είναι μια τυπική φασματοσκοπία απορρόφησης, η οποία δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων για τα δομικά χαρακτηριστικά μιας πρωτεΐνης ( $\alpha$ - έλικα,  $\beta$ - φύλλο,  $\beta$ - στροφή και τυχαίο σπείραμα). Η μέθοδος στηρίζεται σε μεταπτώσεις ηλεκτρονίων, οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από τη δομή ενός οπτικού ενεργού μορίου. Αποτελεί σημαντική μέθοδο για γρήγορο και ποιοτικό προσδιορισμό της δευτεροτεγούς δομής των πρωτεϊνών. Εφαρμόζεται στην υπεριώδη περιοχή, συνήθως σε μήκη κύματος μεταξύ 180-260nm. Τα φάσματα των πρωτεϊνών στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας συνήθως χαρακτηρίζονται στην εγγύς και στην άπω υπεριώδη περιοχή. Η εγγύς περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος 250-300nm και ονομάζεται αρωματική επειδή σε αυτήν την περιοχή απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των αρωματικών αμινοξέων. Η άπω υπεριώδης περιοχή είναι η περιοχή με μήκη κύματος <250nm και σε αυτήν απορροφά κυρίως ο πεπτιδικός κορμός μιας πρωτεΐνης αλλά και ορισμένες πλευρικές αλυσίδες.

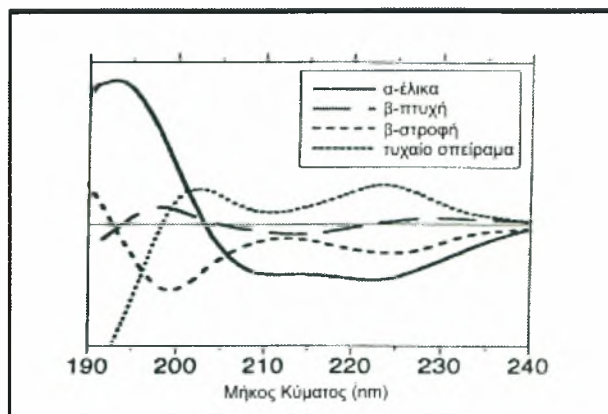
Κατά τη διαδικασία του κυκλικού διχρωϊσμού, η ακτινοβολία χωρίζεται σε δυο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες (δεξιόστροφη και αριστερόστροφη), οι οποίες περνούν μέσα από ένα διαμορφωτή που υπόκειται σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαμορφωτής εκπέμπει διαδοχικά το αριστερό και δεξιά πολωμένο φως, το οποίο μετά τη δίοδό του από το δείγμα καταλήγει στον ανιχνευτή και ακολουθεί η συλλογή και καταγραφή του σήματος. Το σήμα στον ανιχνευτή μετά την απορρόφηση του δείγματος εξαρτάται από το σχετικό προσανατολισμό των διαφορετικών ομάδων στο χώρο. Ο διχρωϊσμός για κάθε μήκος κύματος εκφράζεται

είτε ως διαφορά απορρόφησης των δυο συστατικών ( $\Delta A$ ), είτε ως ελλειπτικότητα (ellipticity) σε τιμές  $\theta$  (millidegrees).

$$CD = \Delta A = A_l - A_r \quad \theta(\text{ellipticity}) = 32,98 \cdot \Delta A$$

Κάθε είδος δευτεροταγούς διαμόρφωσης ( $\alpha$ - έλικα,  $\beta$ - φύλλο,  $\beta$ - στροφή και τυχαίο σπείραμα) προσδίδει στο φάσμα ταινίες απορρόφησης σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος (**εικόνα 22**).

- **$\alpha$ - έλικα:** Η  $\alpha$ - έλικα είναι η κύρια δευτεροταγής δομή που απαντάται σε παρα πολλές πρωτεΐνες, για αυτό το λόγο το δομικό μοτίβο της έχει μελετηθεί εκτενώς. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της  $\alpha$ - έλικας χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας ευρείας και μεγάλης σε ένταση αρνητικής περιοχής με δυο ελάχιστες τιμές ίδιας έντασης, σε μήκος κύματος 222nm και 208nm. Ακόμη παρατηρείται ένα θετικό σήμα σε μήκος κύματος 190nm για μια μετάπτωση της οποίας η πόλωση είναι κάθετη στον άξονα της  $\alpha$ - έλικας. Άλλα δομικά μοτίβα δεν δείχνουν τέτοιο διαχωρισμό αυτής της μετάπτωσης. Σαν μοντέλο  $\alpha$ - έλικας χρησιμοποιείται διάλυμα πεπτιδίου πολυ- L- λυσίνης σε υδατικό διάλυμα.
- **$\beta$ -φύλλο:** Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του  $\beta$ -φύλλου είναι πιο δύσκολο να διερευνηθούν διότι τα δομικά του χαρακτηριστικά είναι λιγότερο καθορισμένα (μπορεί να είναι παράλληλα ή αντιπαράλληλα). Επιπλέον, η δομή του  $\beta$ - φύλλου σχεδόν ποτέ δεν εμφανίζεται μόνη της αλλά συνήθως ακολουθείται από μια  $\beta$ -στροφή. Τα γενικά χαρακτηριστικά του φάσματός του είναι η εμφάνιση μιας αρνητικής τιμής σε μήκος κύματος περίπου 216nm, μικρής έντασης και μιας θετικής σε μήκος κύματος περίπου 195nm. Ωστόσο, αυτά τα χαρακτηριστικά είναι δύσκολο να διακριθούν, διότι τα φάσματα του τυχαίου σπειράματος παρουσιάζουν απορροφήσεις σε ανάλογα μήκη κύματος.
- **$\beta$ -στροφή:** Στη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού σαν  $\beta$ - στροφή ορίζεται οποιαδήποτε στροφή μπορεί να κάνει η πολυπεπτιδική αλυσίδα και όχι μόνο η στροφή που αντιστοιχεί στην δημιουργία ενός αντιπαράλληλου  $\beta$ -φύλλου. Το φάσμα μιας  $\beta$ -στροφής εμφανίζει μια ασθενή αρνητική μετάπτωση σε μήκος κύματος περίπου 225nm, μια ισχυρή θετική τιμή σε μήκος κύματος 200-205nm και μια ισχυρή αρνητική απορρόφηση στα 180-190nm.
- **Τυχαίο σπείραμα:** Στην φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού ως τυχαίο σπείραμα ορίζονται τα τμήματα της πρωτεΐνης τα οποία δεν μπορούν να καταταχθούν σε καμία από τις προηγούμενες διαμορφώσεις. Το φάσμα αυτών των τμημάτων παρουσιάζει μια αρνητική απορρόφηση σε μήκος κύματος περίπου 200nm και μια θετική στα 218nm. Σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζεται μια αδύναμη αρνητική απορρόφηση στα 235nm.



Εικόνα 22. Χαρακτηριστικές δομές φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού πρωτεϊνών. Οι καμπύλες αυτές χρησιμοποιούνται ως πρότυπα στα διάφορα λογισμικά υπολογισμού δομής των πρωτεϊνών.

### 3.2.7.2. Διαδικασία κυκλικού διχρωϊσμού

- **Προετοιμασία δειγμάτων**

Το καρβοξυτελικό τμήμα HIF-1α 348-826, του οποίου τη δευτεροταγή δομή θέλουμε να μελετήσουμε βρίσκεται σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και με DTT. Το DTT κατά τη μέθοδο του κυκλικού διχρωϊσμού, είναι γνωστό ότι εμφανίζει υψηλή τιμή απορρόφησης στην περιοχή 180-200nm, για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή του από την πρωτεΐνη. Συνεπώς, ο HIF-1α 348-826 υφίσταται διαπίδυση O/N στους 4°C σε ειδικό διάλυμα διαπίδυσης (50mM NaCl και 0,1M Potassium Phosphate Buffer pH7,6)

- **Διαδικασία κυκλικού διχρωϊσμού**

Στη συνέχεια, η μελέτη της δευτεροταγούς δομής του HIF-1α 348-826 με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωϊσμού, πραγματοποιήθηκε εξ'ολοκλήρου στο ίδρυμα 'ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος'. Η μελέτη της δομής του HIF-1α 348-826 πραγματοποιήθηκε υπό την επίδραση του διαλυτικού μέσου 1,1,1- τριφθοροαιθανόλης (σύστημα TFE/H<sub>2</sub>O) σε συγκεντρώσεις 0%, 10%, 20%, 30% και 50%, ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης παρέμεινε σταθερή. Η 1,1,1- τριφθοροαιθανόλη έχει την ικανότητα να επάγει το σχηματισμό του δομικού μοτίβου α- έλικας, εφόσον βέβαια η πρωτεΐνη αυτή έχει τη προδιάθεση. Η κλίμακα για τα μήκη κύματος στα οποία ελήφθησαν οι απορροφήσεις του δείγματος κυμάνθηκε από 200nm έως 260nm. Κάθε είδος δευτεροταγούς διαμόρφωσης προσδίδει στο φάσμα ταινίες απορρόφησης σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος.

- **Επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Από τις τιμές των απορροφήσεων όλων των φασμάτων, με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων αφαιρέθηκαν αυτόματα οι απορροφήσεις των

αντίστοιχων τυφλών δειγμάτων. Τα προκύπτοντα φάσματα αναλύθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση του προγράμματος CDNN. Το πρόγραμμα αυτό δύναται να υπολογίσει το ποσοστό επί τις εκατό των διαμορφωτικών χαρακτηριστικών των πεπτιδίων. Το λογισμικό αυτό στηρίζεται σε πειραματικές τιμές γνωστού ποσοστού έλικας διαφόρων πρωτεϊνών και εξάγει θεωρητικά αποτελέσματα από τα φάσματα τα οποία εισάγονται, λαμβάνοντας υπόψιν συγκεκριμένες παραμέτρους των πρωτεϊνών καθώς και των πειραματικών συνθηκών (αριθμού αμινοξέων, μοριακού βάρους, συγκέντρωσης δείγματος, μήκος κυψελίδας κ.α.).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Καθαρισμός πρωτεΐνης GST- HIF1α 348-826

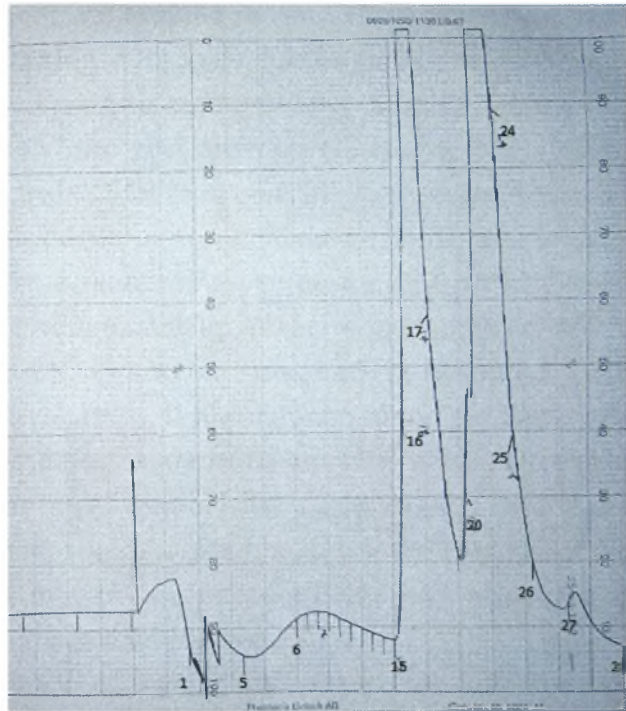
Για την έκφραση της πρωτεΐνης σε βακτήρια χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί το τμήμα του γονιδίου της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που θα προκύψει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή.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

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

Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός της πρωτεΐνης με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη), και μετέπειτα με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αρχικά, το διαλυτό κλάσμα του εκχυλίσματος κυττάρων στα οποία εκφράστηκε ο GST- HIF1α 348-826, διαβιβάστηκε σε στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη (GSH- beads, Amersham). Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 30ml διαλύματος (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM DTT, 0,1% Tween 20, 1mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin) για να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που δεν μας ενδιαφέρουν και μπορεί να έχουν κατακρατηθεί ασθενώς στη στήλη και τέλος πραγματοποιήθηκε έκλυση της GST- HIF1α 348-826 με τη προσθήκη γλουταθειόνης. Έπειτα, το έκλουσμα αυτό διαβιβάστηκε από στήλη ιοντοανταλλαγής (MonoQ, HiTrap Sepharose Column), ώστε η επιθυμητή πρωτεΐνη να διαχωριστεί με βάση το ηλεκτρικό της φορτίο. Η έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη διαβίβαση 20ml αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl (gradient, 0 - 1M) κατά 5% κάθε φορά.

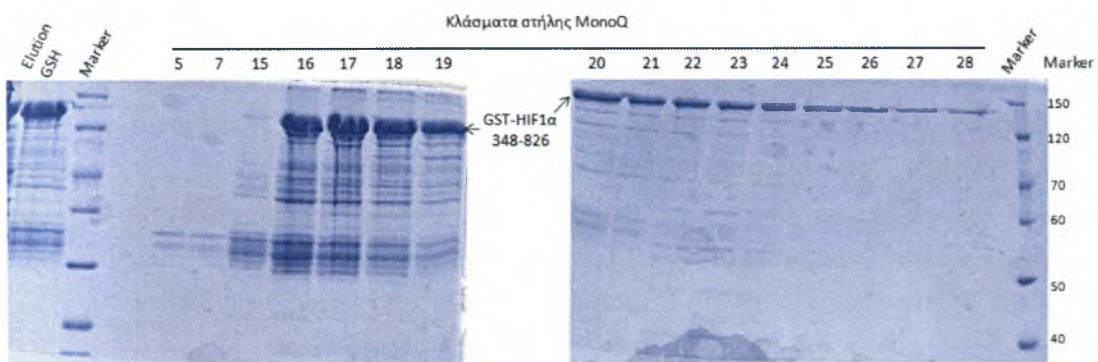
Κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας, η οπτική απορρόφηση των εκλουσμάτων καταγράφεται από έναν ειδικό καταγραφέα. Το αποτέλεσμα εμφανίστηκε με τη μορφή μιας διπλής κορυφής στο χρωματογράφημα (εικόνα 23).





Εικόνα 23. Χρωματογράφημα στήλης ιοντοανταλλαγής MonoQ.

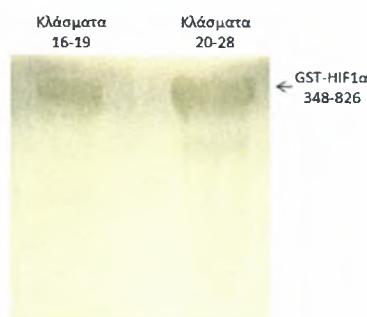
Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 και ο βαθμός καθαρότητάς της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 24).



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Ηλεκτροφόρηση κλάσματος έκλουσης της στήλης GSH (elution GSH) και των κλασμάτων έκλουσης (5, 7, 15-28) της στήλης ιοντοανταλλαγής MonoQ.

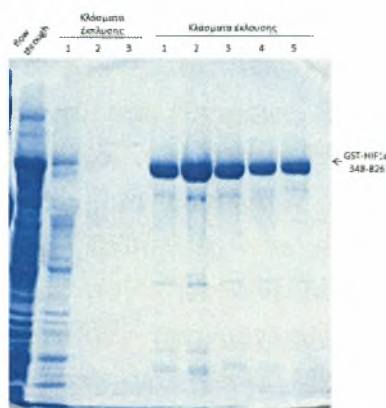
Η πρωτεΐνη σύντηξης GST-HIF1α 348-826 εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~120 και τα κλάσματα που την περιέχουν είναι τα κλάσματα 16-28. Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται μετά τα 650mM NaCl, ενώ παρατηρείται ότι

συνεχίζεται και μετά τη διαβίβαση του 100% NaCl (κλάσματα 23-28). Επίσης, διαπιστώθηκε η ύπαρξη διαφόρων ζωνών εκτός της επιθυμητής πρωτεΐνης, που αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης της GST-HIF1α 348-826 καθώς και διάφορες προσμίξεις από την κυτταροκαλλιέργεια. Με σύγκριση του κλάσματος έκλουσης από την στήλη GSH (elution GSH) με τα κλάσματα που προήλθαν από την μετέπειτα χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (16-28) διαπιστώθηκε ότι δεν επήλθε καμία βελτίωση στο βαθμό καθαρότητας της GST-HIF1α 348-826 έπειτα από την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα κλάσματα 20-28 έχουν μεγαλύτερο βαθμό καθαρότητας από τα κλάσματα 16-19 και για το λόγο αυτό ενώθηκαν ξεχωριστά. Η διαπίστωση ύπαρξης της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση του πρώτου αντισώματος Anti-HIF1α Monoclonal (1:1000) και του δεύτερου Anti-Mouse (1:3000). Η εμφάνιση του σήματος πραγματοποιήθηκε παρουσία χλωροναφθόλης, η οποία οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία  $H_2O_2$ , δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα (**εικόνα 25**).



**Εικόνα 25.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση των ειδικών για τον HIF1α 348-826 αντισωμάτων Anti-HIF1α Monoclonal και Anti-Mouse.

Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση έδειξε ότι πράγματι οι ζώνες που εμφανίστηκαν στην ηλεκτροφόρηση αντιστοιχούσαν στη πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826. Στη συνέχεια των πειραμάτων, έγιναν προσπάθειες για βελτίωση του βαθμού καθαρότητας της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης και στη συνέχεια λύση των κυττάρων παρουσία περισσότερων αναστολέων πρωτεασών. Συγκεκριμένα, η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα (20mM Tris-HCl pH 7,6, 137mM NaCl, 5mM  $MgCl_2$ , 5% Glycerol, 5mM DTT, 0,1% Tween 20) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (1mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin). Η απομόνωση της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 πραγματοποιήθηκε μόνο με στήλη GSH και τα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% (**εικόνα 26**).



**Εικόνα 26.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν το flow through και αντιπροσωπευτικά κλάσματα που προέκυψαν κατά την έκπλυση της στήλης GSH (1-3) και την έκλυση της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 (1-5).

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι ο βαθμός καθαρότητας της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 βελτιώθηκε σημαντικά έπειτα από τη χρήση περισσότερων αναστολέων πρωτεασών. Τα κλάσματα έκλυσης ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν στο 1ml με τελική συγκέντρωση 0,8μg/μl, ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>). Η καθαρότητα αυτή θεωρείται ικανοποιητική, ώστε ο HIF1α 348-826 να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για μελέτη των δομικών του χαρακτηριστικών.

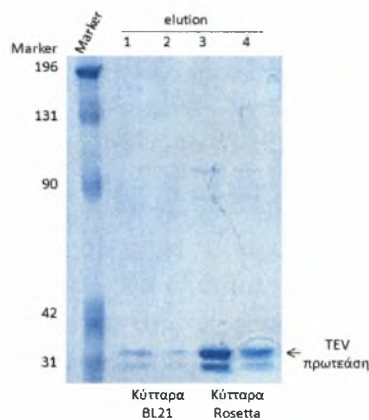
## 4.2. Καθαρισμός πρωτεάσης TEV

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων BL21 και Rosetta με τον πλασμιδιακό φορέα pET-24d, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την TEV πρωτεάση και η επίστρωση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε από την Χαχάμη Γεωργία στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό θρεπτικού υλικού σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.1. Δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές θερμοκρασίας καλλιέργειας, οπτικής πυκνότητας, συγκέντρωσης IPTG και χρόνου επαγωγής της έκφρασης, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης όσον αφορά την απόδοση σε πρωτεΐνη (πίνακας 12).

Κύτταρα	OD <sub>600</sub>	IPTG (mM)	Συνθήκες επαγωγής
BL 21 pET-24d(+)-HisTEV	0,4	1	5h στους 30 °C
	0,6	0,5	O/N σε RT
Rosetta pET-24d(+)- HisTEV	0,4	1	5h στους 30 °C
	0,6	0,5	O/N σε RT

**Πίνακας 12.** Συνθήκες υπερέκφρασης της πρωτεάσης TEV.

Μετά την επαγωγή έκφρασης της TEV πρωτεάσης, το παραχθέν πλέον πρωτεϊνικό τμήμα βρίσκεται εντός των κυττάρων. Τα κύτταρα από τις καλλιέργειες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε λύση αυτών με χρήση υπερήχων και διαχωρισμός των διαλυτών και αδιάλυτων συστατικών με φυγοκέντρηση. Ακολούθησε απομόνωση της πρωτεΐνης, για κάθε μια από τις παραπάνω καλλιέργειες (πίνακας 12), με στήλη συγγένειας  $Ni^{2+}$ -TED. Η έκλουση της TEV πρωτεάσης από τη στήλη νικελίου πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM  $MgCl_2$ , 10% Glycerol, 1mM DTT) παρουσία ιμιδαζολίου 400mM. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 27).

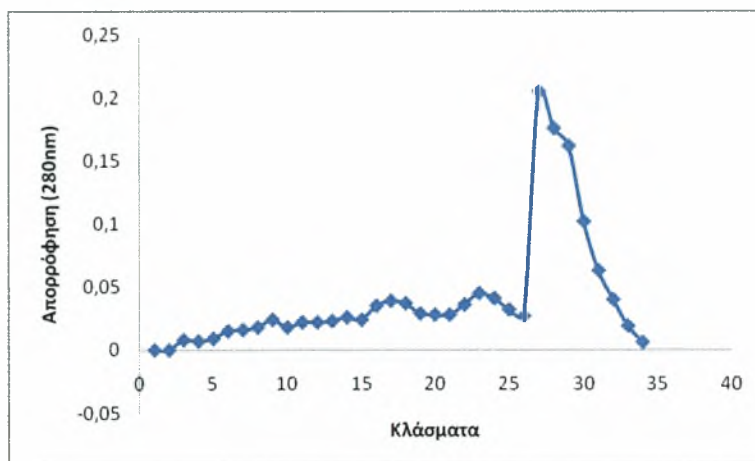


**Εικόνα 27.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα έκλουσης από τη στήλη  $Ni^{2+}$ -TED που προήλθαν ύστερα από επαγωγή έκφρασης της TEV πρωτεάσης σε διαφορετικές συνθήκες και σε διαφορετικές καλλιέργειες κυττάρων. Στα κλάσματα 1 και 3 έχουμε την επαγωγή έκφρασης με 0,5mM IPTG και επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στα κλάσματα 2 και 4 έχουμε την επαγωγή έκφρασης με 1mM IPTG και επώαση για 5h στους 30°C. (κλάσματα 1 και 2: προήλθαν από κύτταρα BL21, κλάσματα 3 και 4: προήλθαν από κύτταρα Rosetta).

Η TEV πρωτεάση εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~30. Η εικόνα που ελήφθη από την ηλεκτροφόρηση ήταν η ίδια για όλες τις συνθήκες επαγωγής, με μόνη διαφορά στην ποσότητα της πρωτεάσης TEV που είχε εκφραστεί. Συγκεκριμένα, στη περίπτωση επαγωγής της έκφρασης της TEV πρωτεάσης από κύτταρα Rosetta παρουσία 0,5mM IPTG και επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου (elution 3), παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη απόδοση σε TEV.

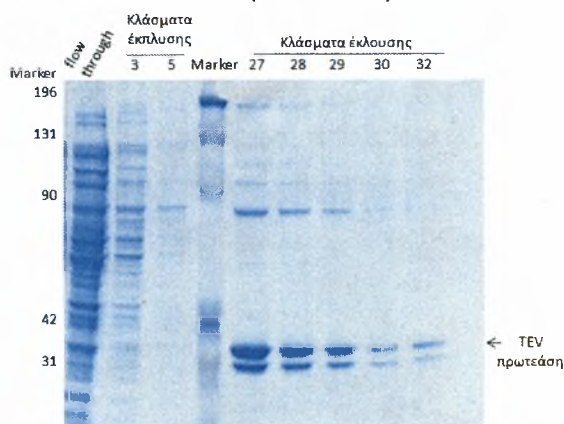
Στη συνέχεια, πέρα από την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επαγωγής της TEV κρίθηκε απαραίτητη η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών έκλουσης της TEV πρωτεάσης από την στήλη νικελίου. Για το σκοπό αυτό, ύστερα από καλλιέργεια κυττάρων Rosetta και επαγωγή της πρωτεΐνης σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες, ακολούθησε απομόνωση της TEV πρωτεάσης με στήλη  $Ni^{2+}$  TED. Για την έκλουση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM

MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (80mM έως 400mM) (εικόνα 28).



Εικόνα 28. Χρωματογράφημα έκλυσης TEV πρωτεάσης με διαβάθμιση ιμιδαζολίου. Συγκέντρωση ιμιδαζολίου ανά κλάσμα έκλυσης: Κλάσματα 1-4→ 80mM, κλάσματα 5-10→ 100mM, κλάσματα 11-15→ 150mM, κλάσματα 16-20→ 200mM, κλάσματα 21-25→ 300mM, κλάσματα 26- 34→ 400mM.

Η έκλυση της TEV πρωτεάσης πραγματοποιείται μετά τη διαβίβαση ιμιδαζολίου συγκέντρωσης 400mM. Τα κλάσματα που φαίνεται ότι περιέχουν την πρωτεάση (27-32), ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%. Η επιτυχής έκφραση της πρωτεΐνης ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 29).



Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν το flow through καθώς και τα αντιπροσωπευτικά κλάσματα έκλυσης (wash 3 και 5) και κλάσματα έκλυσης (elution 27-32) της TEV πρωτεάσης από τη στήλη Ni<sup>2+</sup>TED.

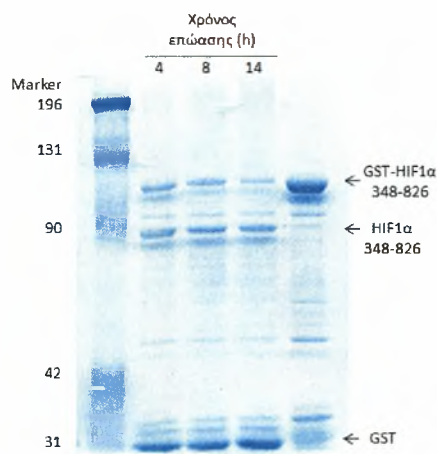
Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα έκλυσης περιέχουν την TEV πρωτεάση σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν στο 0,5ml με τελική συγκέντρωση 0,95μg/μl, ύστερα από διαπίδυση O/N σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM

MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol). Η καθαρότητα αυτή θεωρείται ικανοποιητική, ώστε η TEV πρωτεάση να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω .

### 4.3. Καθαρισμός πρωτεΐνης HIF1α 348-826

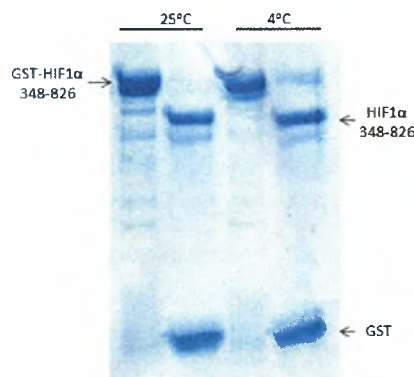
#### 4.3.1. Καθορισμός βέλτιστων συνθηκών επώασης GST-HIF1α 348-826 με TEV πρωτεάση

Το επόμενο βήμα στα πειράματα ήταν η απομόνωση της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 από την ετικέττα σήμανσης GST με την οποία βρίσκεται σε σύντηξη. Για την απομάκρυνση της GST (τρανσφεράσης της γλουταθειόνης) από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 απαιτείται η επώαση της πρωτεΐνης με την TEV πρωτεάση. Η TEV πρωτεάση αναγνωρίζει ειδικά ένα επταπεπτίδιο, το οποίο μεσολαβεί μεταξύ της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 και της ετικέττας σήμανσης GST. Ωστόσο, για να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση της GST από την επιθυμητή πρωτεΐνη, πρέπει πρώτα να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές θερμοκρασίας, διαφορετικοί χρόνοι επώασης καθώς και διαφορετικές αναλογίες TEV πρωτεάσης με πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τον καθορισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 με την TEV πρωτεάση, ώστε να γίνει η πλήρης αποκοπή του τμήματος GST. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα ύστερα από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, της TEV πρωτεάσης με την GST-HIF1α 348-826 σε αναλογία 1:30, ύστερα από 4, 8 και 14 ώρες. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 8%. Η επιτυχής αποκοπή της ετικέττας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 ταυτοποιείται μετά από βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 30).



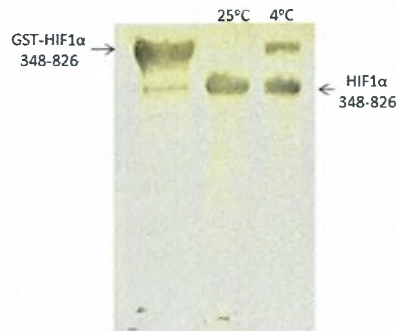
Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα, ύστερα από επώαση σε διαφορετικούς χρόνους (4, 8 και 14 ώρες) σταθερής αναλογίας TEV πρωτεάσης με GST-HIF1α 348-826 καθώς και ανέπαφη πρωτεΐνη.

Η πρωτεΐνη σύντηξης GST-HIF1α 348-826 εμφανίζεται με μοριακό βάρος ~120, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 με μοριακό βάρος ~92, ενώ το τμήμα GST με ~26. Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι η επώαση για 14 ώρες ήταν αποτελεσματικότερη ως προς την αποκοπή της ετικέτας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826. Εν συνεχεία, με δεδομένο πλέον το χρόνο επώασης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας για την πλήρη αποκοπή του τμήματος GST από την πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα, ύστερα από επώαση για 14 ώρες της TEV πρωτεάσης με την GST-HIF1α 348-826 σε αναλογία 1:20, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και στους 4°C. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% και τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής (εικόνα 31).



**Εικόνα 31.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν ανέπαφα δείγματα GST-HIF1α 348-826 φυλαγμένα στους 25°C και στους 4°C και έπειτα από επώαση με TEV πρωτεάση σε αναλογία 20:1.

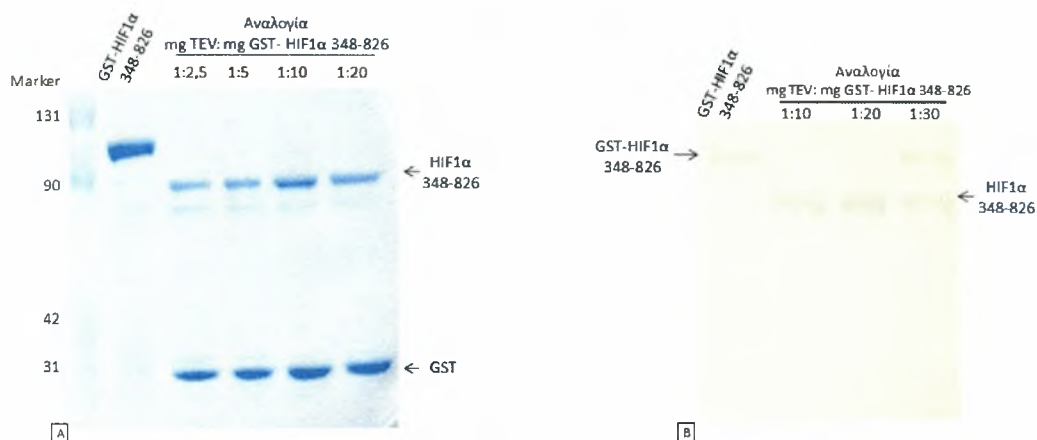
Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) η αποκοπή του τμήματος GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 είναι αποδοτικότερη σε σύγκριση με αυτήν στους 4°C, ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, η ταυτοποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση του πρώτου αντισώματος Anti-HIF1α Monoclonal (1:1000) και του δεύτερου Anti-Mouse (1:3000). Η εμφάνιση του σήματος πραγματοποιήθηκε παρουσία χλωροναφθόλης, η οποία οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα (εικόνα 32).



**Εικόνα 32.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση των ειδικών για τον HIF1α 348-826 αντισωμάτων Anti-HIF1α Monoclonal και Anti-Mouse. Χρησιμοποιήθηκε ανέπαφο δείγμα GST-HIF1α 348-826 καθώς και δείγμα πρωτεΐνης ύστερα από επώαση, στους 25°C και στους 4°C, με TEV πρωτεάση σε αναλογία 20:1.

Η ανάλυση με Western απέδωσε τα ίδια αποτελέσματα με την ηλεκτροφόρηση. Συνεπώς, με δεδομένη πλέον τη θερμοκρασία (25°C) καθώς και το χρόνο επώασης (14h), πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για τον καθορισμό της βέλτιστης αναλογίας TEV πρωτεάσης προς την πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826 για την πλήρη αποκοπή του τμήματος GST. Η ποσότητα της πρωτεάσης που απαιτείται για την πλήρη πρωτεόλυση του υποστρώματος ποικίλλει και εξαρτάται από το πόσο η δομή της πρωτεΐνης αφήνει εκτεθειμένη την αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν οι αναλογίες 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 (mg TEV πρωτεάσης: mg GST- HIF1α 348-826). Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 παρέμεινε σταθερή και ίση με 0,3mg/ml για όλες τις δοκιμές και ανάλογα με τις αναλογίες mg TEV πρωτεάσης: mg GST- HIF1α 348-826, προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα TEV πρωτεάσης. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής (**εικόνα 33A**). Στη συνέχεια, η ταυτοποίηση αυτή πραγματοποιήθηκε και με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση των αντισωμάτων Anti-HIF1α Monoclonal (1:1000) και Anti-Mouse (1:3000) (**εικόνα 33B**).



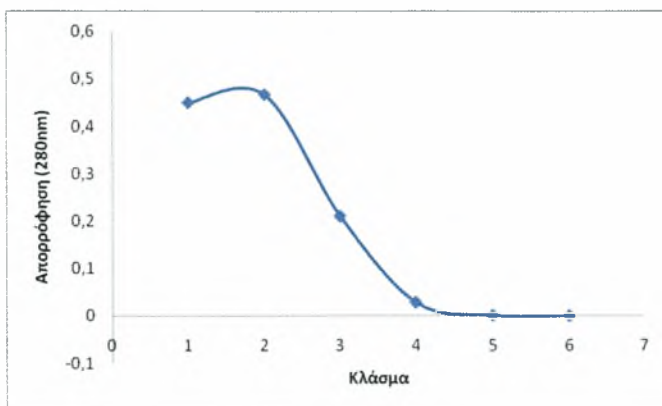


**Εικόνα 33.** Α) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Ηλεκτροφορήθηκε ανέπαφο GST-HIF1α 348-826 καθώς και ύστερα από επώασή του στους 25°C για 14h με διαφορετικές αναλογίες TEV πρωτεάσης (mg TEV πρωτεάσης: mg GST- HIF1α 348-826, 1:2,5, 1:5, 1:10 και 1:20). Β) Ανοσοαποτύπωση με τη χρήση των ειδικών για τον HIF1α αντισωμάτων Anti-HIF1α Monoclonal και Anti-Mouse. Χρησιμοποιήθηκε ανέπαφο δείγμα GST-HIF1α 348-826 καθώς και ύστερα από επώασή του με διαφορετικές αναλογίες TEV πρωτεάσης (1:10, 1:20 και 1:30).

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι στις αναλογίες 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, πραγματοποιείται πλήρης αποκοπή της ετικέτας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826. Επίσης, από την ανοσοαποτύπωση επαληθεύτηκαν οι αναλογίες 1:10 και 1:20, ενώ διαπιστώθηκε ότι σε αναλογία 1:30 πραγματοποιείται μερική αποκοπή της GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826. Συνεπώς, σε αναλογία 1:20, η TEV πρωτεάση χρησιμοποιείται εξ' ολοκλήρου για την πλήρη αποκοπή του τμήματος GST, για αυτό το λόγο θεωρήθηκε ως βέλτιστη αναλογία και είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια των πειραμάτων.

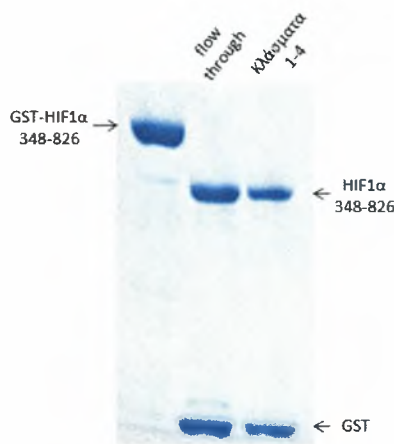
#### 4.3.2. Αποτελέσματα καθαρισμού πρωτεΐνης HIF1α 348-826

Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιήθηκε αποκοπή των ετικετών σήμανσης GST στις βέλτιστες συνθήκες επώασης, η πρωτεΐνη διαβιβάστηκε από στήλη νικελίου Ni<sup>2+</sup>TED ώστε να απομακρυνθεί η TEV πρωτεάση από αυτήν. Η στήλη δεσμεύει την TEV πρωτεάση, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 και οι GST δεν δεσμεύονται (flow through). Έπειτα, ακολούθησε έκπλυση της στήλης (κλάσματα 1-6) με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 1mM DTT) και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση (εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Χρωματογράφημα έκπλυσης στήλης νικελίου Ni<sup>2+</sup>TED.

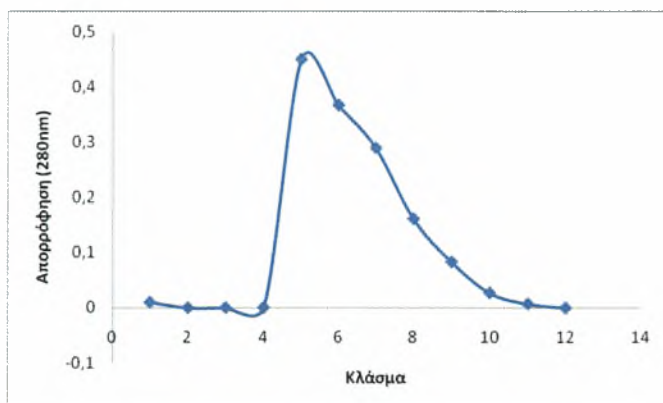
Τα κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και το αποτέλεσμα ταυτοποιήθηκε μετά από βαφή της πηκτής με χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (εικόνα 35).



**Εικόνα 35.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν η πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826 καθώς και το flow through και τα κλάσματα εκπλύσεως 1-4 της στήλης Ni<sup>2+</sup>TED, που περιέχουν την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 και τα τμήματα GST.

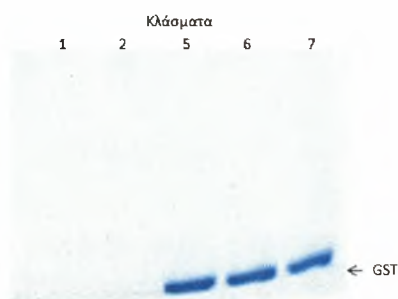
Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε η ύπαρξη της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 στα κλάσματα 1-4, για αυτό το λόγο ενώθηκαν με το flow through. Για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 χρησιμοποιήθηκε στήλη αγκιστείας GSH. Η στήλη δεσμεύει την GST, ενώ η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 δεν δεσμεύεται (flow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

πορεία απομάκρυνσης των GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 παρακολουθήθηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (εικόνα 36).



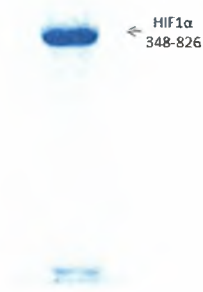
**Εικόνα 36.** Χρωματογράφημα στήλης GSH. Μέτρηση απορρόφησης των κλασμάτων έκπλυσης (1-4) και των κλασμάτων έκλουσης (5-12).

Τα κλάσματα έκπλυσης και έκλουσης από τη στήλη GSH ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής (εικόνα 37).



**Εικόνα 37.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Ηλεκτροφορήθηκαν τα κλάσματα εκπλύσεως 1 και 2 καθώς και τα κλάσματα εκλούσεως 5-7 της στήλης GSH.

Από την ηλεκτροφόρηση διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα έκπλυσης (1-2) δεν περιείχαν την επιθυμητή πρωτεΐνη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα κλάσματα έκλουσης (5-12) περιέχουν μόνο τα τμήματα GST και καθόλου GST-HIF1α 348-826, γεγονός που αποδεικνύει ότι από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 αποκόπηκαν όλα τα τμήματα GST. Τέλος, το κλάσμα με την πρωτεΐνη HIF1α 348-826 (flow through), ύστερα από διαπίδυση Ο/Ν σε διάλυμα (50mM NaCl και 0,1M Potassium Phosphate Buffer pH7,6) συμπυκνώθηκε στο 1ml και δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν μετά από βαφή της πηκτής (εικόνα 38).

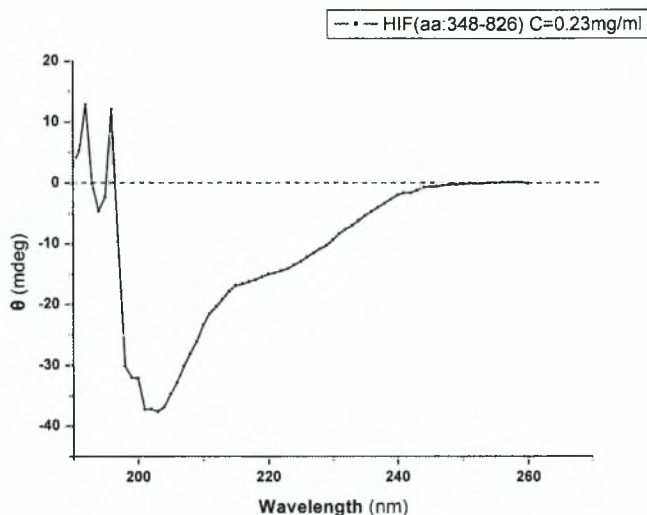


**Εικόνα 38.** Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%.

Σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση, η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 είναι σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρή και καθίσταται δυνατή η χρήση της για μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της. Η απόδοση αυτού του βήματος είναι 0,23mg/ml HIF1α 348-826.

#### **4.4. Δομική μελέτη της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 με τη χρήση Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωϊσμού**

Εφόσον λοιπόν επιτεύχθει η έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης HIF1α 348-826, το επόμενο στάδιο μελέτης αφορά τον καθορισμό των δομικών χαρακτηριστικών της. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD) και έγινε εξ'ολοκλήρου στο ίδρυμα 'ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος'. Η μέθοδος αυτή μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή της δομή και κατα πόσο αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η φύση του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις 1,1,1- τριφθοροαιθανόλης, οι 10%, 20%, 30% και 50%, ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 παρέμεινε σταθερή και ίση με 0,23mg/ml. Ελήφθησαν φάσματα στη περιοχή του υπεριώδους φωτός, 205-260nm (εικόνα 39). Το φασματοπολωσίμετρο παρόλο που μετράει την διαφορά απορρόφησης (ΔΑ), του δεξιόστροφου με του αριστερόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός, καταγράφει το φάσμα του κυκλικού διχρωϊσμού σε μονάδες μοριακής ελλειπτικότητας (θ, millidegrees) έναντι του μήκους κύματος, λ.



Εικόνα 39. Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του HIF1α 348-826.

Στη συνέχεια, επεξεργασία των ληφθέντων φασμάτων με κατάλληλο λογισμικό (CDNN) έχει ως αποτέλεσμα τον ακριβή υπολογισμό των ποσοστών α-έλικας (πίνακας 13).

Δομικό μοτίβο	Συγκέντρωση 1,1,1- τριφθοροαιθανόλης (TFE)				
	0%	10%	20%	30%	50%
α- έλικα	31,6	38,5	58,6	73,8	98,5
β- πτυχή παράλληλη	8,4	6,9	4,1	3,1	
β- πτυχή αντιπαράλληλη	9,5	7,6	4,2	3,1	
β- στροφή	17,2	16	13,3	12,4	
Τυχαίο σπείραμα	34,1	29,4	18,9	13,3	

Πίνακας 13. Αποτελέσματα επεξεργασίας των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του HIF1α 348-826. Εμφανίζονται τα ποσοστά των δομικών μοτίβων που αποκτά ο HIF1α 348-826 σε κάθε συγκέντρωση TFE.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 λαμβάνει κατά 31,6% δομή α-έλικας, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό, 34,1%, λαμβάνει δομή τυχαίου σπειράματος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι με αυξανόμενη την συγκέντρωση της 1,1,1-τριφθοροαιθανόλης σε νερό, αυξάνεται και το ποσοστό α-έλικας της πρωτεΐνης HIF1α 348-826. Σε συγκεντρώσεις άνω του 10% TFE

παρατηρούνται δραματικές αυξήσεις στο ποσοστό της δομής α-έλικας. Στη μέγιστη συγκέντρωση TFE που δοκιμάστηκε, το ποσοστό α-έλικας έφτασε το 98,5%. Συνεπώς, η παρουσία της TFE διευκολύνει την υπό μελέτη πρωτεΐνη να αποκτήσει δευτεροταγή δομή α-έλικας. Η δευτεροταγής δομή α-έλικας πιθανόν να μην ευνοείται στην πρωτεΐνη HIF1α 348-826 εντός υδατικού διαλύματος, σε αντίθεση με το διάλυμα της TFE, όπου τέτοιες διαμορφώσεις σταθεροποιούνται. Η ενίσχυση της διαμόρφωσης έλικας με την επίδραση της TFE, δείχνει ότι η TFE εξασθενίζει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και ενισχύει τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 είναι ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής και ο παράγοντας κλειδί της απόκρισης των κυττάρων στη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η ρύθμιση του HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή απόκριση του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας και συμβαίνει σε πολλαπλά επίπεδα. Το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α φαίνεται να είναι αυτό που διαδραματίζει το καθοριστικό ρόλο στη ρύθμισή του. Σε αυτό εδράζονται οι περιοχές ODD που οδηγούν τον HIF-1α σε αποικοδόμηση υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι περιοχές C-NLS οι οποίες φαίνεται να κατευθύνουν τον HIF-1α στον πυρήνα καθώς και οι περιοχές C-TAD και N-TAD οι οποίες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η υπερέκφραση σε βακτηριακά κύτταρα του καρβοξυτελικού τμήματος 348-826 του HIF-1α με σκοπό την δομική μελέτη του. Τα γονίδια της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1, ο οποίος φέρει κατάλληλους προαγωγείς που επιτρέπουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καθώς και το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), ώστε η πρωτεΐνη που προκύπτει να αποτελεί το προϊόν σύντηξης με αυτή. Επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων. Αρχικώς, επιχειρήθηκε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 με στήλη αγχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Ωστόσο, έπειτα από παρατήρηση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη GST-HIF1α 348-826 ελήφθη με πολύ μικρό βαθμό καθαρότητας. Με περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση στο βαθμό καθαρότητας. Διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε πρωτεόλυση. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση περισσότερων αναστολέων πρωτεασών κατά τη διαδικασία καθαρισμού και παρατηρήθηκε ότι ο βαθμός πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 μειώθηκε δραματικά.

Στη συνέχεια, στόχος της εργασίας ήταν η απομάκρυνση της ετικέτας σήμανσης GST από την πρωτεΐνη HIF1α 348-826. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεάση TEV, η οποία αναγνωρίζει ειδικά ένα τμήμα που μεσολαβεί μεταξύ της ετικέτας σήμανσης GST και της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 και προκαλεί την αποκοπή της GST. Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της TEV πρωτεάσης σε βακτηριακά κύτταρα BL21 και Rosetta, μετασηματισμένα με τον ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα, pET-24d, για το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση TEV. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>-TED και ελήφθη TEV πρωτεάση σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Στη συνέχεια, έπειτα από καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών επώασης της

πρωτεΐνης GST-HIF1α 348-826 με την TEV πρωτεάση ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 με στήλη GSH και Ni<sup>2+</sup> TED. Η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 ελήφθη σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό καθαρή και καθίσταται δυνατή η χρήση της για μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της.

Τελικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HIF1α 348-826 (α- έλικα, β- φύλλο, β- στροφή) με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης μετρήθηκε η διαφορά απορρόφησης του δεξιόστροφου από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως στην περιοχή 205-260nm. Ελέγχθησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις 1,1,1-τριφθοροαιθανόλης, 0-50% ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης παρέμεινε σταθερή. Για την ανάλυση και την επεξεργασία των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN. Μέσω του προγράμματος υπολογίσθηκε το ποσοστό έλικας από κάθε φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού. Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη HIF1α 348-826 λαμβάνει κατά 31,6% δομή α-έλικας, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό, 34,1%, λαμβάνει δομή τυχαίου σπειράματος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι με αυξανόμενη την συγκέντρωση της 1,1,1-τριφθοροαιθανόλης σε νερό, αυξάνεται και το ποσοστό α-έλικας της πρωτεΐνης HIF1α 348-826. Σε συγκεντρώσεις άνω του 10% TFE παρατηρούνται δραματικές αυξήσεις στο ποσοστό της δομής α-έλικας. Στη μέγιστη συγκέντρωση TFE που δοκιμάστηκε, το ποσοστό α-έλικας έφτασε το 98,5%. Συνεπώς, η παρουσία της TFE διευκολύνει την υπό μελέτη πρωτεΐνη να αποκτήσει δευτεροταγή δομή α-έλικας. Η ενίσχυση της διαμόρφωσης έλικας με την επίδραση της TFE, δείχνει ότι η TFE εξασθενίζει τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και ενισχύει τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου.

Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα μιας συνολικότερης έρευνας που ως απώτερο στόχο έχει το καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης με ακτίνες Χ καθώς και τη διερεύνηση της συνολικής δομής του επαγώμενου από την υποξία παράγοντα-1. Η διευκρίνηση της δομής του HIF-1 είναι θεμελιώδους σημασίας όχι μόνο για την παραγωγή νέας γνώσης για βασικές κυτταρικές λειτουργίες αλλά και για την κατανόηση και αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων και ανθρωπίνων ασθενειών. Ο HIF-1α ως μεταγραφικός παράγοντας φαίνεται να εμπλέκεται σε μια πληθώρα ασθενειών. Σηματοδοτικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή του HIF-1α και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη δράση του μπορούν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους, ιδιαίτερα σε ασθένειες όπως ο καρκίνος.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bardos J.I., Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1755 (2): p.107-120.
- Becker C.M., Rohwer N., Funakoshi T., Cramer T., Bernhardt W., Birsner A., Folkman J., D'Amato R.J. 2-Methoxyestradiol Inhibits Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Suppresses Growth of Lesions in a Mouse Model of Endometriosis. *Amer J Pathology*. 2008, 172: p.534-544.
- Berra E., Benizri E., Ginouvès A., Volmat V., Roux D., Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J*. 2003, 22(16): p.4082–4090.
- Bonicalzi M.E., Groulx I., de Paulsen N., Lee S. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 2001, 276(2): p.1407-1416.
- Brahimi-Horn C., Mazure N., Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal*. 2005, 17(1): p.1-9.
- Bruick R.K., McKnight S.L. A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science*. 2001, 294 (5545): p.1337-1340.
- Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *G Denelop*. 2003, 17: p.2614-2623.
- Brüne B., Zhou J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Curr Med Chem*. 2003, 10(10): p.845-55.
- Bunn H.F., Poyton R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*. 1996, 76(3): p.839-85.
- Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia. *J. Biol. Chem*. 2000, 275 (33), p. 25130–25138.
- D'Angio C.T., Finkelstein J.N. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab*. 2000, 71(1-2): p.371-80.
- Fandrey J., Gorr T.A., Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res*. 2006, 71(4): p.642-51.
- Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999, 59(16): p.3915-8.
- Fisher T.S., Etages S.D., Hayes L., Crimin K., Li B. Analysis of ARD1 Function in Hypoxia Response Using Retroviral RNA Interference. *J. Biol. Chem*. 2005, 280(18): p.17749-17757.

- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 1992, 3(2): p.65-71.
- Freedman S.J., Sun Z.Y., Kung A.L., France D.S., Wagner G., Eck M.J. Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by CITED2. *Nat Struct Biol.* 2003, 10: p. 504 – 512.
- Goldberg M.A., Dunning S.P., Bunn H.F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 1988, 242 (4884): p. 1412-1415.
- Groulx I., Lee S. Oxygen-Dependent Ubiquitination and Degradation of Hypoxia-Inducible Factor Requires Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol.* 2002, 22 (15): p.5319-5336.
- Haddad J.J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res.* 2002, 3(1): p.26.
- Hellwig-Bürgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999, 94(5): p.1561-7.
- Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1998, 95(14): p.7987-7992.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara JM., Lane WS., Kaelin WG Jr. HIF $\alpha$  Targeted for VHL-mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> Sensing. *Science.* 2001, 292: p.464 -468.
- Jeong J.W., Bae M.K., Ahn M.Y., Kim S.H., Sohn T.K., Bae M.H., Yoo M.A., Song E.J., Lee K.J., Kim K.W. Regulation and Destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell.* 2002, 111: p.709-720.
- Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S., Carrero P., Makino Y., Tanaka H., Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J.* 1998, 17(22): p.6573-86.
- Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999, 274(10): p. 6519-6525.
- Kietzmann T., Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol.* 2005, 16(4-5): p.474-86.
- Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch. *Science.* 2002, 295 (5556): p. 858-861.

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

- Sang N., Stiehl D.P., Bohensky J., Leshchinsky I., Srinivas V., Caro J. MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(16): p. 14013-14019.
- Schofield C.J., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5(5): p.343-54.
- Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res.* 2001 May, 49(5): p.614-7.
- Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3(10): p.721-32.
- Semenza G.L, Jiang BH, Leung SW. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A genes contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996, 271: p.32529-32537.
- Semenza G.L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002, 8(4): p.62-7.
- Srinivas V., Leshchinsky I., Sang N., King MP., Minchenko A., Caro J. Oxygen Sensing and HIF-1 Activation Does Not Require an Active Mitochondrial Respiratory Chain Electron-transfer Pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (25): p.21995-21998.
- Wang G.L., Jiang B., Rue EA., Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O<sub>2</sub> Tension. *Proc Natl Acad Sci.* 1995a, 92: p. 5510-5514.
- Yasinska I.M., Sumbayev V.V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 $\alpha$  protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003, 549 (3): p. 105-9.
- Zhu H., Bunn H.F. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes. *Respir Physiol.* 1999, 115(2): p.239-47.

