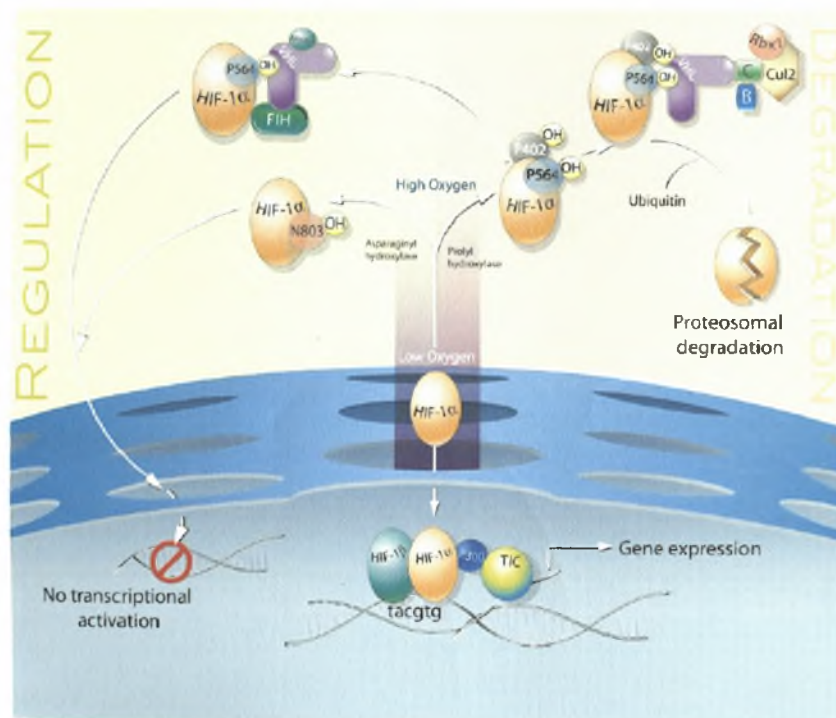


**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ
ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ 1 (HIF-1) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ
Saccharomyces cerevisiae:
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΙΑΣ ΑΠΛΗΣ IN VIVO ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ HIF-1**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΛΚΜΗΝΗ ΚΑΛΟΥΣΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



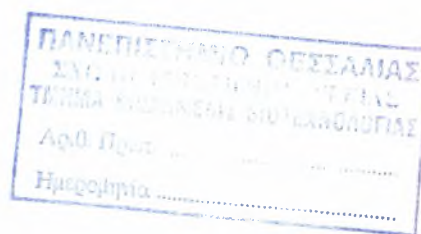
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
• ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4429/1
Ημερ. Εισ.: 16/03/2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΚΑΛ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087827



**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ 1 (HIF-1) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ *Saccharomyces
cerevisiae*:
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΙΑΣ ΑΠΛΗΣ IN VIVO ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ HIF-1**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΙΚΜΗΝΗ ΚΑΛΟΥΣΗ

Υπεύθυνος καθηγητής:

- ❖ Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας
- ❖ Μπράλιου Γεωργία, Διδάσκουσα σύμφωνα με το Π.Δ. 407/80 , του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας

ΛΑΡΙΣΑ 2005

Ευχαριστίες:

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο ερευνητικό εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής Λάρισας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο που μου έδωσε την ευκαιρία να κάνω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας της Ιατρικής σχολής Λάρισας κ. Γιώργο Σίμο που με δέχτηκε στο εργαστήριο για την εκπόνηση της διπλωματικής μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερος την κ. Γεωργία Μπράλιου που με επέβλεψε στο εργαστήριο για την πολύτιμη βοήθειά της και την επιστημονική υποστήριξή της και τέλος όλους όσους δουλεύουν στο χώρο του εργαστηρίου και συγκεκριμένα τους: Βενιέρη Μάνο, Καρανάσιο Λευτέρη, Λυμπεροπούλου Αγγελική, Τριανταφύλλου Νατάσα, Τσιάνου Θεοδώρα και Χαχάμη Γεωργία. Ειδικές ευχαριστίες χρωστώ στο συμφοιτητή μου και επίσης διπλωματικό φοιτητή στο εργαστήριο Βιοχημείας, Καββαδά Πάνο για την έμπρακτη και ηθική υποστήριξη.

Περιεχόμενα

<u>Περίληψη</u>	<u>3</u>
<u>Abstract</u>	<u>4</u>
<u>Εισαγωγή</u>	<u>5</u>
• Δομή του HIF-1	7
• Ισομορφές του HIF-1α	8
• Ρύθμιση του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου	8
• Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφικής ενεργότητας	11
• Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης	11
• HIF-1 και καρκίνος	12
• Στόχευση του HIF-1 και προοπτικές αντικαρκινικής θεραπείας	15
• Σκοπός της εργασίας	16
<u>Υλικά & Μέθοδοι</u>	<u>17</u>
• Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός σε <i>Escherichia coli</i> Top10	17
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	18
• Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουλεάσες	18
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας	19
• Μετασχηματισμός σε <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
• Επαγωγή της έκφρασης και δράσης του HIF-1 από τη γαλακτόζη	22
• Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	23
• Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	24
• Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης	25
• Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-1α με PCR	26
• Καθαρισμός Προϊόντων PCR με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη	28
• Πέψη των τμημάτων της αλληλουχίας του γονιδίου του HIF-1α και του πλασμιδίου pBS-SK(+) με ένζυμο περιορισμού <i>Bam</i> HI και ανάκτησή τους από παρασκευαστική πηκτή (preparative gel)	29
• Ποσοτικοποίηση και αντίδραση λιγάσης	30
• Μετασχηματισμός <i>E.coli</i> Top10 με προϊόντα αντίδρασης λιγάσης	30
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με ένζυμα περιορισμού	31
<u>Αποτελέσματα</u>	<u>32</u>
• Πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x	32
• Πολλαπλασιασμός και απομόνωση των πλασμιδίων pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x	33
• Επαγωγή της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 έπειτα από εισαγωγή του σε <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
> Εποπτική μέθοδος διάκρισης στελεχών ζύμης που εκφράζουν λειτουργικό HIF-1 από στελέχη στα οποία δεν είναι λειτουργικός	34
> Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT σε <i>S.cerevisiae</i> έπειτα από ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (Western blot)	36

➤ Έλεγχος της λειτουργικότητας του HIF-1 σε <i>S. cerevisiae</i> έπειτα από ανάλυση με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-galactosidase assay)	38
• Ενίσχυση αλληλουχιών διαφόρων μεγεθών του HIF-1α με PCR	40
• Ο πλασμιδιακός φορέας pBS-SK(+)	42
• Αντίδραση λιγάσης-Μετασχηματισμός σε <i>E. coli</i> Top10-Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας-Πέψη με <i>BamHI</i>	43
<u>Συζήτηση</u>	<u>45</u>
<u>Βιβλιογραφία</u>	<u>49</u>

Περίληψη

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1 παράγεται σε υψηλά επίπεδα όταν τα κύτταρα βρίσκονται κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, το μεταβολισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο HIF-1 αυξάνει κατά την ογκογένεση παίζοντας σημαντικό ρόλο σε αυτήν και γι' αυτό αποτελεί ένα πιθανό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας. Τέλος, ο HIF-1 ρυθμίζεται από διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια κάτι που κάνει τη μελέτη της έκφρασής του σε κύτταρα θηλαστικών αρκετά δύσκολη.

Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε η εφαρμογή ενός απλού in vivo συστήματος για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του HIF-1. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία έγινε έκφραση του HIF-1 στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, από τον οποίο φυσιολογικά απουσιάζει, με χρήση πλασμιδίων που περιείχαν τα cDNA των υπομονάδων του HIF-1. Ο έλεγχος της έκφρασης του HIF-1 έγινε με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Ο έλεγχος της λειτουργικότητας έγινε με τη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης η έκφραση της οποίας ελέγχεται από αλληλουχίες απόκρισης σε υποξία (HRE)s.

Επιπλέον έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης πλασμιδίων με τμήματα της αλληλουχίας του γονιδίου του ανθρώπινου HIF-1α, αφού πρώτα είχαν ενισχυθεί με PCR, με σκοπό την ανάλυσή τους με το σύστημα που περιγράφηκε παραπάνω.

Abstract

Hypoxia inducible factor HIF-1 is produced in high levels when cells grow under conditions of low oxygen concentrations and activates the transcription of genes related with erythropoiesis, angiogenesis, metabolism and cell proliferation. HIF-1 is increased in human tumours, playing a crucial role in oncogenesis and therefore HIF-1 can be a possible target for anticancer therapy. Finally, HIF-1 is implicated in several cellular pathways, thus making it difficult to study its function in mammalian cells.

For this, an application of a simple in vivo system was used in order to study the mechanism of function of HIF-1. In the present work HIF-1 was expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where it is normally absent, using plasmid vectors containing the cDNA sequences of the subunits of HIF-1. The expression of HIF-1 was observed by SDS-PAGE and Western blotting. The function of HIF-1 was studied by β -galactosidase assay, the expression of which is under the control of the hypoxia response elements (HREs).

In addition, parts of the sequence of human gene of HIF-1 α were amplified by PCR and then cloned into plasmid vectors in order to be introduced in the system which is described above.

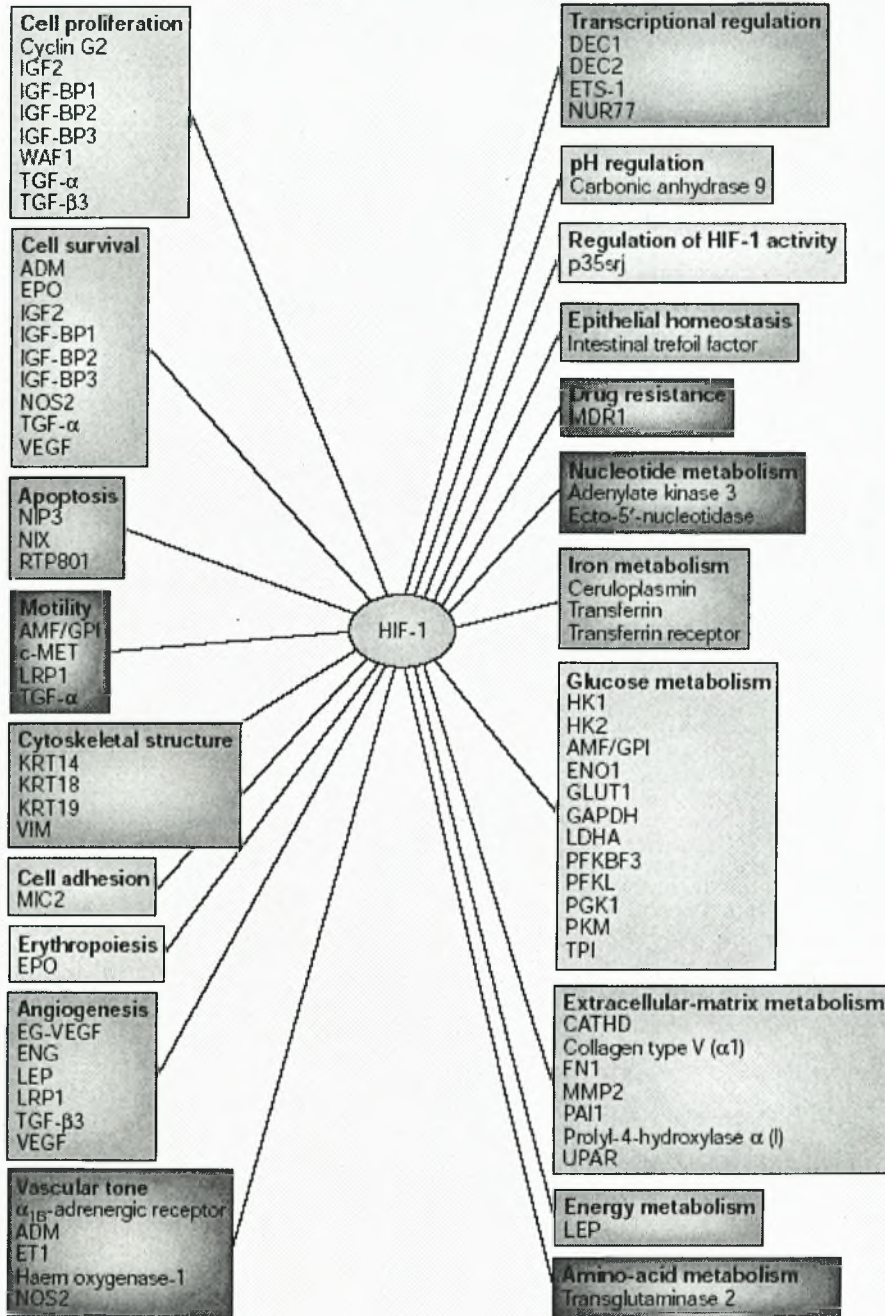
Εισαγωγή

Το οξυγόνο είναι ένα από τα πιο σημαντικά χημικά στοιχεία καθώς απαιτείται για την επιβίωση των περισσότερων οργανισμών. Όταν η παροχή του οξυγόνου παρεμποδίζεται λόγω καρδιαγγειακών, πνευμονικών και αιματολογικών ασθενειών, τότε ο ενεργειακός μεταβολισμός βλάπτεται σοβαρά. Γι' αυτόν το λόγο οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολλούς προσαρμοστικούς μηχανισμούς για να καταφέρουν να επιβιώσουν σε συνθήκες υποξίας, δηλαδή σε συνθήκες με μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου. Η προσαρμογή των οργανισμών σε συνθήκες υποξίας περιλαμβάνει αντανακλαστικό υπεραερισμό, αυξημένη παραγωγή ερυθροκυττάρων και σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) σε επίπεδο συστήματος (Czyzyk-Kreska *et al.*, 1997). Σε κυτταρικό επίπεδο η προσαρμογή στην υποξία περιλαμβάνει την αλλαγή του ενεργειακού μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε αναερόβια γλυκόλυση, καθώς επίσης την αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης αλλά και την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση ή την απόπτωση (Bunn *et al.*, 1996). Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την προσαρμογή στην υποξία λαμβάνει χώρα σε γονιδιακό επίπεδο και περιλαμβάνει την επαγωγή της μεταγραφής μέσω της πρόσδεσης του *επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1)* στην αλληλουχία *HRE (Hypoxia Response Element)* που βρίσκεται στα γονίδια απόκρισης (Semenza *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995).

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εξαρτάται από το οξυγόνο και μπορεί να επάγει την έκφραση περισσότερων από 60 πρωτεϊνών ανάμεσα στις οποίες είναι ο *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)* και η *ερυθροποιητίνη (EPO)*. Αυτές οι πρωτεΐνες αυξάνουν τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου προωθώντας την αγγειογένεση και την ερυθροποίηση αντίστοιχα. Στην εικόνα 1 παρατίθενται μερικές από τις πρωτεΐνες των οποίων την έκφραση επάγει ο HIF-1 (Semenza *et al.*, 2002; Semenza *et al.*, 2003).

Η ανακάλυψη του HIF-1 ως ρυθμιστή της ομοιοστασίας του οξυγόνου αρχικά προήλθε από την ανάλυση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους ενεργοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε απόκριση στην υποξία. Η ανακάλυψη της υπερευαίσθητης σε DNase I 3' πλευρικής περιοχής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης στον άνθρωπο από τον Semenza και τους συνεργάτες του το 1991, οδήγησε στο χαρακτηρισμό μιας αλληλουχίας περίπου 50bp ως στοιχείο απόκρισης

στην υποξία (Hypoxia Response Element HRE). Όταν αυτή η αλληλουχία εισήχθη σε ένα γονίδιο αναφοράς και έγινε επιμόλυνση σε κυτταροκαλλιέργεια, τότε παρατηρήθηκε δραματική αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς όταν τα κύτταρα επώαστηκαν σε 1% O₂ σε σχέση με την έκφραση σε 20% O₂.

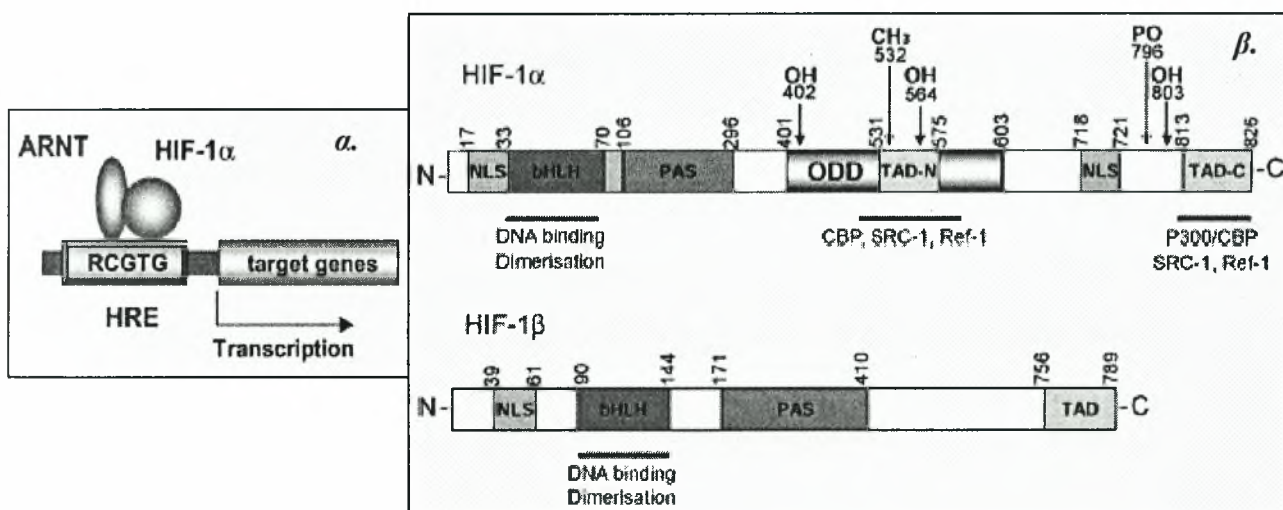


Εικόνα 1: Γονίδια των οποίων την έκφραση επάγει ο HIF-1:ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG VEGF, endocrine/endothelial-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF-α, transforming growth factor-α; TGF-β, transforming growth factor-β; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

(Από Semenza G., Targeting HIF-1 for cancer therapy, Nature reviews, 3:721-732, 2003)

Δομή του HIF-1

Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από δύο υπομονάδες τον **HIF-1α** και τον **HIF-1β** που έχουν τη χαρακτηριστική δομή bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix – Per/Arnt/Sim) (Wang *et al.*, 1995). Το ανθρώπινο HIF-1α γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 (14q21-q24) ενώ το HIF-1β γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1q21). Και οι δύο υπομονάδες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία και είναι αρκετά συντηρημένες έχοντας περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Ο HIF-1α και ο HIF-1β είναι σχετικά μεγάλες πρωτεΐνες σε μέγεθος, και αποτελούνται από 826 και 789 αμινοξέα, αντίστοιχα. Η έκφραση του HIF-1α είναι αρκετά υψηλή κατά την υποξία, ενώ διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα κατά τη νορμοξία. Αντίθετα ο HIF-1β εκφράζεται συνεχώς μέσα στα κύτταρα και η ενεργότητά του ρυθμίζεται ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνου που επικρατούν (Li *et al.*, 1996). Ο HIF-1β είναι επίσης γνωστός και ως **ARNT** (**Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator**). Ο HIF-1α πρέπει να διμεριστεί με τον ARNT για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Η κάθε υπομονάδα έχει δύο PAS περιοχές τις PAS-A και PAS-B. Οι περιοχές bHLH και PAS είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του ετεροδιμερούς καθώς και για την πρόσδεσή του στο DNA και συγκεκριμένα στις αλληλουχίες HREs (G/ACGTG) που μπορεί να βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων που αποκρίνονται στην υποξία (Jiang *et al.*, 1996).



Εικόνα 2: α. Ο HIF-1α διμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στην ειδική αλληλουχία του DNA (HRE) και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. β. Στοιχεία για τη δομή των HIF-1α και HIF-1β και περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλους παράγοντες (α) Από Yeo *et al.*, 2004 β) Από Dery *et al.*, 2004)

Ο HIF-1α αποτελείται και από άλλες δύο περιοχές τις TAD-N και TAD-C (N- και C- terminal trans-activation domain). Η TAD-N περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODD περιοχή (Oxygen Dependent Degradation) και παίζει ρόλο στη σταθερότητα της πρωτεΐνης (Εικόνα 2). Η TAD-C περιοχή αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές όπως ο p300/CBP και είναι σημαντική για την ενεργότητα του HIF-1 ως μεταγραφικού παράγοντα (*Lando et al., 2002*). Επίσης τόσο ο HIF-1α, όσο και ο HIF-1β περιέχουν αλληλουχίες NLS (Nuclear Localization Signals) που παίζουν ρόλο στη μεταφορά των υπομονάδων στον πυρήνα.

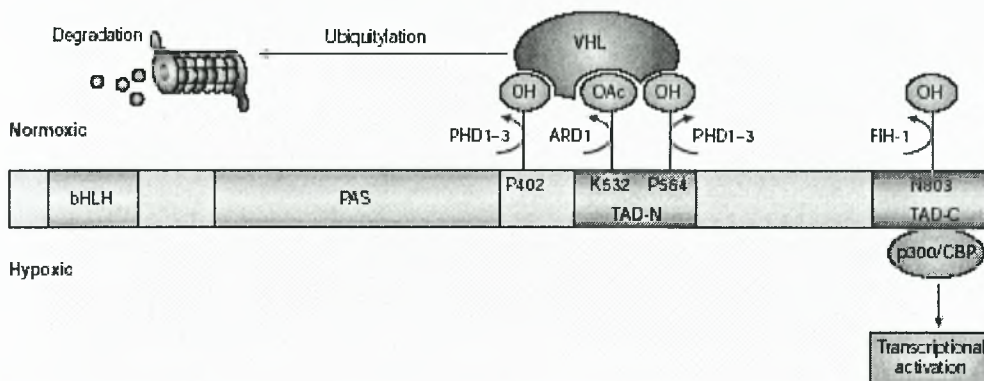
Ισομορφές του HIF-1α

Εκτός του HIF-1α είναι γνωστά και άλλα δύο μέλη της οικογένειας bHLH-PAS: ο ***HIF-2α*** που συναντάται και ως EPAS (Endothelial PAS domain protein 1) και ο ***HIF-3α*** (*Tian et al., 1997*). Ο HIF-2α παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον HIF-1α στην πρωτεϊνική τους δομή αλλά επιδεικνύει περιορισμένη και ιστο-ειδική έκφραση. Ο HIF-2α ρυθμίζεται ομοίως από τα επίπεδα του οξυγόνου και το σύμπλοκό του με τον ARNT φαίνεται πως εμπλέκεται στην γονιδιακή ρύθμιση της υποξίας όπως γίνεται και με τον HIF-1α. Ωστόσο, αν και ο HIF-3α παρουσιάζει ομολογία με τον HIF-1α δεν έχει TAD περιοχή και ο φυσιολογικός του ρόλος είναι ασαφής. Πιθανολογείται ότι λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από την υποξία έκφρασης γονιδίων. Αυτός ο αρνητικός ρυθμιστής ονομάζεται IPAS (Inhibitory PAS domain protein) και αναγνωρίστηκε σαν ένα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α. Ο IPAS παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT επειδή προσδέεται στον HIF-1α και τον εμποδίζει να προσδεθεί στα HREs (*Makino et al., 2002*).

Ρύθμιση του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου

Κατά τη νορμοξία, ο HIF-1α υπόκειται σε ταχύτατη αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού της ουβικουιτινίωσης ενώ κατά την υποξία αναστέλλεται η αποικοδόμηση αυτή οδηγώντας σε συσσώρευση της πρωτεΐνης (*Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997*). Η διαδικασία της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης HIF-1α αρχίζει με την πρόσδεση της πρωτεΐνης pVHL (Von Hippel Lindau) σε περιοχές όπου έχουν υδροξυλιωθεί προλίνες σε μετα-μεταγραφικό στάδιο από ***υδροξυλάσες προλίνης (Prolyl Hydroxylase PHD)*** ή ***υδροξυλάσες προλίνης του HIF (HIF Prolyl Hydroxylase HPH)***. Ο HIF-1α περιέχει δύο περιοχές υδροξυλίωσης μέσα στην ODD

περιοχή και αυτές είναι η προλίνη 402 και η προλίνη 564. (Masson *et al.*, 2001) Εκεί προσδένεται η pVHL που είναι ο αναγνωριστικός παράγοντας του συμπλέγματος της λιγάσης της ουβικουιτίνης (pVHL-elonginB-elonginC-Cul2-Rbx) και στοχεύει στην πρωτεόλυση του HIF-1α μέσω του μονοπατιού ουβικουιτίνης-πρωτεοσώματος (Hon *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2002). Η υδροξυλίωση του HIF-1α αυξάνει τη συγγένεια για το σύμπλοκο pVHL-elonginB-elonginC κατά τουλάχιστον τρεις φορές.



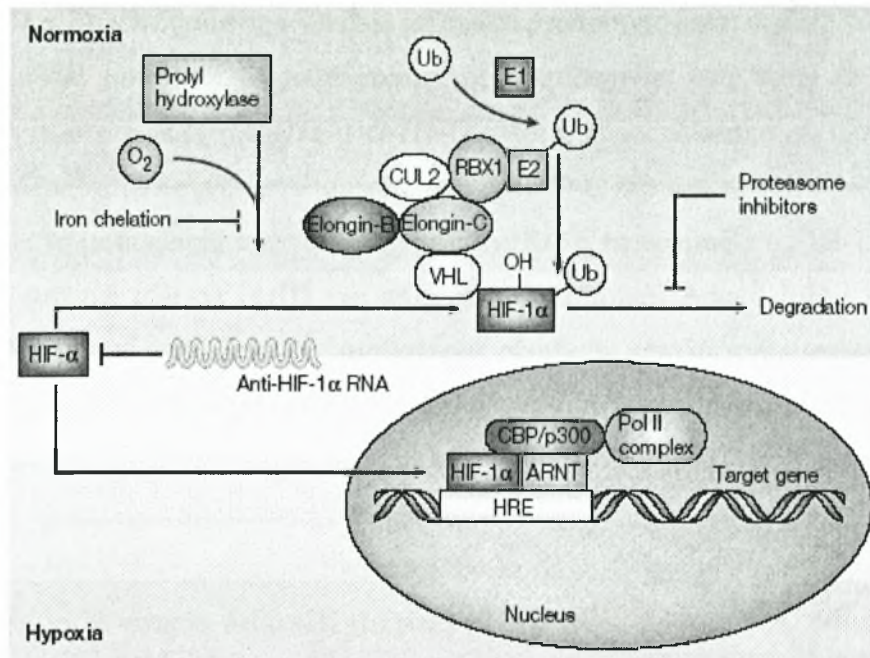
Εικόνα 3: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1. Το οξυγόνο ρυθμίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF-1α. Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες 402 και 564 του HIF-1α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη VHL που αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης. Η πρόσδεση της pVHL υποβοηθάται και από την ακετυλίωση της λυσίνης 532 από την ARD1 ακετυλοτρανσφεράση. Η ουβικουιτινίωση του HIF-1α οδηγεί την πρωτεΐνη για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεόσωμα. Το οξυγόνο ακόμη ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 803 του HIF-1α από το ένζυμο FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) εμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών p300 και CBP στον HIF-1α και έτσι αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

(Από Semenza G., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*, Nature reviews, 3:721-732, 2003)

Οι υδροξυλάσες της προλίνης είναι οξυγενάσες που απαιτούν οξυγόνο και 2-κετογλουταρικό ως υπόστρωμα και επίσης εξαρτώνται από το σίδηρο χωρίς να περιέχεται κάποια δομή αίμης μέσα στο ένζυμο. Αυτό το ένζυμο μεταφέρει ένα άτομο υδρογόνου στα κατάλοιπα προλίνης και το δεύτερο άτομο οξυγόνου αντιδρά με το 2-κετογλουταρικό παράγοντας ηλεκτρικό οξύ. Η δραστηριότητα της υδροξυλάσης της προλίνης στον HIF-1α είναι προφανές ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου ενδοκυτταρικά. Έτσι η υδροξυλίωση της προλίνης προτείνεται ότι δρα ως ένας αισθητήρας οξυγόνου (Epstein *et al.*, 2001; Jewel *et al.*, 2001).

Έχουν βρεθεί 3 παρόμοιες οξυγενάσες-εξαρτώμενες από 2-κετογλουταρικό με ικανότητα να υδροξυλιώνουν τον HIF-1α και είναι γνωστές ως prolyl hydroxylase domain (PHD)1, PHD2 και PHD3. Και οι τρεις εξαρτώνται από μοριακό οξυγόνο σαν

συν-υπόστρωμα και έτσι παρέχουν ένα άμεσο σύνδεσμο μεταξύ της διαθεσιμότητας του οξυγόνου και της ρύθμισης του HIF-1 (Epstein et al., 2001; Bruick et al., 2001).



Εικόνα 4: Τα μονοπάτια ρύθμισης του HIF-1: Παρουσία οξυγόνου οι υδροξυλάσες προλίνης υδροξυλιώνουν τον HIF-1α προκαλώντας την πρόσδεση της pVHL σ' αυτόν και κατ' επέκταση την πρόσδεση του συμπλέγματος που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες elongin-B, elongin-C, CUL2, RBX-1 και την E2 λιγάση της ουβικουιτίνης. Αυτό το σύμπλεγμα πρωτεϊνών μαζί με το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικουιτίνης οδηγούν στην ουβικουιτινίωση του HIF-1α και τη μετέπειτα αποικοδόμησή του. Απουσία οξυγόνου ο HIF-1α σταθεροποιείται, διμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στα HREs και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. (Από Harris A.L., 2001)

Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε βήμα στη φυσιολογική ρύθμιση του HIF-1 είναι σημαντικό. Στον *Caenorhabditis elegans* και στη *Drosophila melanogaster* υπάρχει μία και μοναδική υδροξυλάση προλίνης και η απενεργοποίησή της έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Σε κύτταρα θηλαστικών πειράματα με siRNA χρησιμοποιήθηκαν για να απενεργοποιήσουν κάθε μία από τις τρεις PHD σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Σε πολλές κυτταρικές σειρές αποδείχτηκε ότι η απενεργοποίηση της PHD2 είναι αρκετή ώστε να αυξήσει τα επίπεδα του HIF-1α και άρα και την μεταγραφή γονιδίων στόχων και έτσι προτάθηκε η PHD2 ως το πιο σημαντικό ένζυμο που ρυθμίζει το HIF-1α κατά τη νορμοξία (Berra et al., 2003).

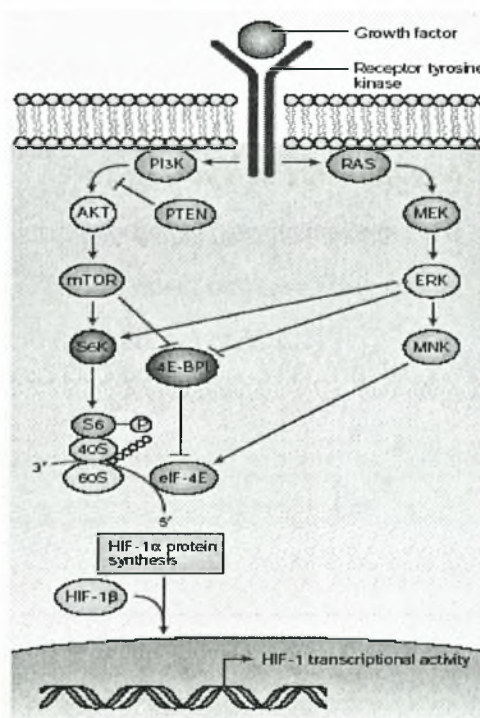
Εκτός από την υδροξυλίωση των καταλοίπων προλίνης, σημαντικό ρόλο παίζει και η ακετυλίωση της λυσίνης στη θέση 532 από την ARD-1 ακετυλοτρανσφεράση και έχει ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική πρόσδεση της pVHL (Jeong et al., 2002).

Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφικής ενεργότητας

Η αλληλεπίδραση του TAD-C με συνενεργοποιητές όπως οι CBP/p300 μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της υδροξυλίωσης της ασπαραγίνης στη θέση 803 από τον παράγοντα αναστολής του HIF-1 (FIH-1). Έτσι η υδροξυλίωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση των συνενεργοποιητών με την TAD-C περιοχή του HIF-1α και τελικά εμποδίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Κατά τη νορμοξία ο FIH-1 εξαρτάται από το δισθενή σίδηρο Fe(II) και το 2-κετογλουταρικό. Άρα ο FIH-1 μπορεί να λειτουργήσει σαν ένας δεύτερος αισθητήρας οξυγόνου επειδή χρησιμοποιεί οξυγόνο ως υπόστρωμα (Lando et al., 2000; Sang et al., 2002; Hewitson et al., 2002).

Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Εκτός από τη ρύθμιση από τα επίπεδα οξυγόνου, είναι γνωστό ότι ο HIF-1α μπορεί να σταθεροποιηθεί κατά τη νορμοξία από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες όπως η ινσουλίνη, ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας (IGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και η ιντερλευκίνη-β. Αν και δεν είναι γνωστό πως αυτοί οι παράγοντες σταθεροποιούν το HIF-1α γίνονται υποθέσεις για τη μεσολάβηση μονοπατιών κινασών όπως αυτό της PI3K/Akt και των MAPK (Zhong et al., 2000; Zundel et al., 2000; Laughner et al., 2001, Fukuda et al., 2002, Hellwig-Buregel et al., 2003).



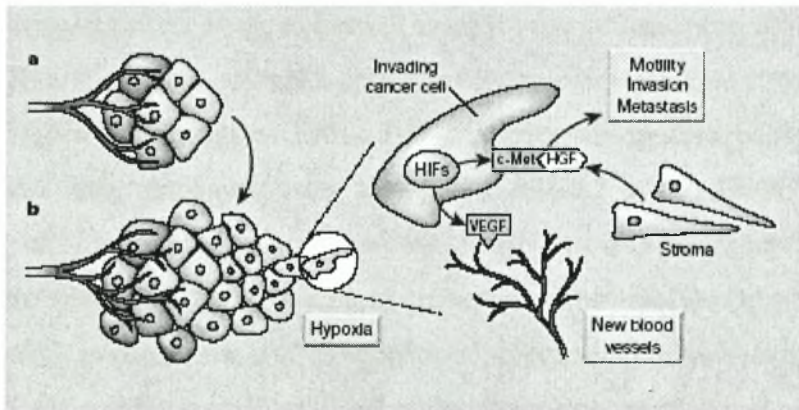
Εικόνα 5: Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α : Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε ένα γειτονικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί μονοπάτια της κινάσης 3 της φωσφατιδυλοϊνositόλης (PI3K) και των mitogen-activated protein (MAP) κινασών. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B PKB) και την mTOR(mammalian target of rapamycin). Στο μονοπάτι των MAP κινασών ή ERK (extracellular signal-regulated kinase) ενεργοποιείται από την MEK. Η ERK ενεργοποιεί την MNK κινάση. Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την p70 S6 κινάση που φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική S6 πρωτεΐνη και την 4E-BP1 πρωτεΐνη πρόσδεσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης μετάφρασης 4E (eIF-4E) και έτσι επάγεται η μετάφραση των mRNA συμπεριλαμβανομένου και του mRNA του HIF-1α. (Από Semenza G., Targeting HIF-1 for cancer therapy, Nature reviews, 3:721-732, 2003)

HIF-1 και καρκίνος

Η υποξία που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί τη μείωση των φυσιολογικών επιπέδων της πίεσης οξυγόνου σε ένα ιστό μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια οξείας και χρόνιας αγγειακής νόσου, πνευμονικής νόσου αλλά και του καρκίνου. Η παρατεταμένη υποξία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Κατά την ογκογένεση, τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση υποξίας επειδή ο πολλαπλασιασμός τους είναι πολύ γρήγορος και τα αιμοφόρα αγγεία είναι ελλιπή, με αποτέλεσμα η ροή του αίματος και κατά συνέπεια η οξυγόνωση να είναι ελαττωμένη. Αν και η υποξία είναι τοξική τόσο για τα καρκινικά κύτταρα όσο και για τα υγιή, τα καρκινικά υποβάλλονται σε γενετικές και προσαρμοστικές αλλαγές που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν και ακόμη να πολλαπλασιάζονται σε υποξικό περιβάλλον. Αυτές οι διαδικασίες συμβάλλουν στην εμφάνιση κακοήθους φαινοτύπου και σε διεισδυτική συμπεριφορά των κυττάρων του όγκου.

Τα επαγόμενα από την υποξία γονίδια ρυθμίζουν μερικές βιολογικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός, η απόπτωση, η αθανασία (immortalization) και η διεισδυτικότητα των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα επωφελούνται από πολλές από τις αποκρίσεις στην υποξία για την επιβίωσή τους. Παρακάτω περιγράφονται μερικά από αυτά τα μονοπάτια.



Εικόνα 6: Πώς οι όγκοι αντιμετωπίζουν και μπορούν να ωφεληθούν από την έλλειψη οξυγόνου.

A. Σε αυτή τη φάση, ο όγκος ο αναπτυσσόμενος όγκος τροφοδοτείται επαρκώς με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά από τη δική του παροχή αίματος. B. Ο όγκος έχει αναπτυχθεί υπερβολικά και τα κύτταρα της μπροστινής σειράς είναι υποξικά. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι σε αυτά τα κύτταρα θα επέλθει κυτταρικός θάνατος, καθώς ο HIF-1 επάγει την έκφραση του VEGF και άρα τη δημιουργία νέων αγγείων στην περιοχή. Ο HIF-1 επίσης οδηγεί και σε αύξηση της πρωτεΐνης c-Met. Αυτή προσδένεται στον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor HGF) που παράγεται από τα γειτονικά στρωματικά κύτταρα και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων, διείσδυση (invasion) και τελικά σε μετάσταση. (Από Bottaro A., 2003)

- Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Η υποξία επάγει την έκφραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων που είναι γνωστό ότι προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο HIF-1α επάγει την παραγωγή αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β και ο PDGF (*Danko et al., 2000; Koong et al., 2000; Wykoff et al., 2000; Lai et al., 2001*).

Οι MAPK p42/p44, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε απόκριση σε εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α και ενεργοποιείται η έκφραση γονιδίων σε απόκριση στον HIF-1 (*Berra et al., 2000*).

Η ενεργότητα της PI3K αυξάνει σε μερικούς κυτταρικούς τύπους κάτω από υποξικές συνθήκες. (*Chen et al., 2001*) Η PI3K είναι γνωστή ως downstream effector των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης και εμπλέκεται σε μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καταστολή της απόπτωσης. Το μονοπάτι της PI3K αναστέλλεται από τη φωσφοϊνσιτιδική φωσφατάση (PTEN) και μεταλλάξεις στην PTEN ενισχύουν τις αποκρίσεις από HIF-1 (*Zundel et al., 2000*). Το γονίδιο της PTEN έχει απαλειφθεί ή μεταλλαχθεί σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους όπως το γλιοβλάστωμα, όγκος στο ενδομήτριο και καρκίνο του προστάτη. Έτσι οι μεταλλάξεις στην PTEN μπορεί να προωθούν την ογκογένεση δρώντας συνεργιστικά με τον HIF-1.

Ο πιο καλά μελετημένος αυξητικός παράγοντας που επάγεται από την υποξία είναι ο VEGF που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Έτσι ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του VEGF και ενός από τους υποδοχείς του, τον VEGFR1/FLT-1. Ο VEGF είναι ένας παράγοντας κλειδί για την αγγειογένεση και εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες σε απόκριση στην υποξία. Οι υποδοχείς του VEGFR1 και 2 εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αγγειογένεση που έχει επαχθεί από την υποξία εμποδίζεται από αναστολές μονοπατιών των ογκογονιδίων όπως από παράγοντες που αναστέλλουν τις RAS, τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ERBB2. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα crosstalk ανάμεσα στα μονοπάτια της ογκογένεσης και της υποξίας.

Η πρωτεΐνη VHL όπως προαναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-1α και έμμεσα στην έκφραση του VEGF. Η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VHL έχει

συσχετισθεί με αυξημένη ενεργότητα του HIF-1 και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη καρκίνων όπως το νεφρικό καρκίνωμα (clear-cell renal carcinoma RCC) και το παρεγκεφαλιδικό αιμαγγείωμα που συνιστούν το λεγόμενο σύνδρομο VHL (Maxwell, P. H. et al., 1999; Zhong, H. et al., 1999, Jennens R.R. et al., 2004).

- Γλυκόλυση

Κάτω από συνθήκες υποξίας τα κύτταρα αλλάζουν τον τρόπο μεταβολισμού της γλυκόζης από οξυγονο-εξαρτώμενη σε μη οξυγονο-εξαρτώμενη. Δηλαδή αντί να παράγεται ενέργεια μέσω του κύκλου του Krebs τώρα έχουμε μόνο γλυκόλυση. Τα υποξικά καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση σαν ένα πρωταρχικό μηχανισμό της παραγωγής ATP (Dang et al., 1999; Seagroves et al., 2001). Έχει δειχθεί ότι ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση όλων των ενζύμων του γλυκολυτικού μονοπατιού καθώς επίσης και την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT1 και GLUT3 που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη της γλυκόζης (Mazurek et al., 1997). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η αυξημένη γλυκόλυση λαμβάνει χώρα σαν μια φυσιολογική απόκριση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ότι τα μεταναστευτικά κύτταρα επίσης χρησιμοποιούν αυτό το μονοπάτι σαν πηγή ενέργειας. Ακόμη, οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του γλυκολυτικού μονοπατιού παρέχουν πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση γλυκίνης, σερίνης, πουρινών, πυριμιδινών και φωσφολιπιδίων που είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και συντήρηση των κυττάρων κάτω από συνθήκες stress.

Οι μεταβολικές δραστηριότητες των καρκινικών κυττάρων επηρεάζουν και το pH του όγκου. Έχει δειχτεί ότι οι όγκοι προσαρμόζονται στις αλλαγές του pH και αναπτύσσονται σε χαμηλότερες τιμές pH από ότι στους φυσιολογικούς ιστούς, δίνοντας έτσι στον όγκο ένα πλεονέκτημα επιβίωσης. Πολλές πρωτεάσες μπορούν να ενεργοποιηθούν κάτω από όξινες συνθήκες, προωθώντας έτσι τη διείσδυση του όγκου σε παρακείμενους ιστούς. Η γλυκόλυση είναι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο οι όγκοι χαμηλώνουν το pH μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος.

- Αθανασία (Immortalization) και γενετική αστάθεια

Η υποξία μπορεί να επηρεάζει το κυτταρικό DNA και τα χρωμοσώματα με τρόπους που μπορούν να προωθήσουν τη μεταμόρφωση των κυττάρων. Η ενεργότητα της τελομεράσης αυξάνει όταν τα καρκινικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα

τοποθετούνται κάτω από υποξικές συνθήκες προωθώντας την αθανασία τους (Seimiya et al., 1999). Ακόμη έχει δειχθεί ότι η υποξία επάγει την ενίσχυση γονιδίων αλλά και το σπάσιμο του DNA σε εύθραυστες περιοχές και ότι παρεμποδίζει την επιδιόρθωση της βλάβης που έχει προκληθεί (Coquelle et al 1998).

Στόχευση του HIF-1 και προοπτικές αντικαρκινικής θεραπείας

Έχοντας ως δεδομένο τον ρόλο που παίζει ο HIF-1 στην αντιστάθμιση της απώλειας οξυγόνου, είναι φανερό ότι η ρύθμιση της δραστηριότητάς του μπορεί να αποτελέσει ένα πιθανό μηχανισμό για την αντιμετώπιση μιας ποικιλίας παθολογικών νοσημάτων σχετιζόμενων με την υποξία. Έτσι η αύξηση στα επίπεδα του HIF-1 μπορεί να αυξήσει την επιβίωση των κυττάρων κατά την υποξία και να αυξήσει την αγγειογένεση σε περιοχές όπου υπάρχει δυσλειτουργία ή απόφραξη αιμοφόρων αγγείων. Αντίθετα, μείωση των επιπέδων του HIF-1 μπορεί να εμποδίσει την αγγειογενετική δραστηριότητα σε παθολογικούς ιστούς με υποξικές περιοχές, κάτι που συμβαίνει κατά την ογκογένεση.

Πολλές προσεγγίσεις έχουν γίνει για την αναστολή του HIF-1 και αυτές μπορεί να είναι είτε γενετικές, είτε φαρμακολογικές. Σύμφωνα με τις γενετικές προσεγγίσεις στόχος είναι η αναστολή της έκφρασης ή η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Πάνω σε αυτήν την προσέγγιση έχουν γίνει έρευνες χρησιμοποιώντας κυρίως αντινοσηματικές (antisense) αλληλουχίες του HIF-1α (Sun et al., 2003) είτε ισομορφές του HIF-1α όπως το IPAS που παρουσιάζουν ανασταλτική δράση για τον HIF-1 (Makino et al., 2001,2002). Όσον αφορά τις φαρμακολογικές προσεγγίσεις γίνονται έρευνες για την ανακάλυψη ουσιών οι οποίες θα στοχεύουν τα κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην επαγωγή του HIF-1 και έτσι να ρυθμίσουν έμμεσα τη δραστηριότητά του.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η εφαρμογή μίας βιοαναλυτικής μεθόδου για την μελέτη του HIF-1 σε κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Όπως είναι γνωστό ο *S. cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός και δεν παρουσιάζεται σε αυτόν η έκφραση του συστήματος του HIF-1. Ακριβώς επειδή αυτός ο οργανισμός είναι απλούστερος των ανώτερων ευκαρυωτικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα απλό in vivo σύστημα για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του HIF-1 με άλλους παράγοντες όπως πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτόν και μπορεί να τον ενεργοποιούν, είτε να τον αναστέλλουν.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου αυτής χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *S. Cerevisiae* RS453 το οποίο μετασχηματίστηκε με πλασμίδια για την έκφραση των δύο υπομονάδων του HIF-1 καθώς και ενός γονιδίου δείκτη (β-γαλακτοσιδάση) με την αλληλουχία απόκρισης στην υποξία (HRE) σε 6 αντίγραφα πριν τον υποκινητή του γονιδίου δείκτη. Με την επαγωγή της λειτουργίας του συστήματος μέσω της γαλακτόζης θα αποδειχθεί ότι το σύστημα του HIF-1 εκφράζεται σε κύτταρα σακχαρομήκτα (Western blot) και είναι λειτουργικό εφόσον επάγει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (β-galactosidase assay).

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας έγινε η προσπάθεια της ενίσχυσης με PCR κομματιών διαφόρων μηκών του γονιδίου του HIF-1α και η εισαγωγή τους σε πλασμίδια pBS (Bluescript) για τη μετέπειτα εισαγωγή και ανάλυσή τους με το σύστημα του HIF-1 που αναφέρθηκε παραπάνω.

Υλικά & Μέθοδοι

Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent) και μετασχηματισμός *Escherichia coli* Top10

- Σε στελέχη Top10 *Escherichia coli* έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x. Πρώτα παρασκευάστηκαν κύτταρα *E.coli* Top10 δεκτικά για μετασχηματισμό (competent).
- Εμβολιάστηκε καλλιέργεια 3ml θρεπτικού TYM με αποικία από πιάτο με stock καλλιέργεια Top10 και έγινε επώαση O/N (overnight) στους 37°C.
- Την επόμενη μέρα έγινε αραιώση της καλλιέργειας 1:200 και επώασή της στους 37°C μέχρι $OD_{600nm}=0.350-0.400$. Τότε η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 1811 g για 5 min στους 4°C.
- Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25ml διαλύματος TFB-I και επώαστηκε για 10 min στον πάγο.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3220 g για 5 min στους 4°C
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml διαλύματος TFB-II.
- Έγινε επώαση στον πάγο για 60 min και τέλος μοιράστηκαν σε σωληνάκια από 100μl διαλύματος από την προηγούμενη επαναιώρηση.
- Για το μετασχηματισμό προστέθηκαν από 0.5μl των πλασμιδίων pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x (0,5~1μg/μl) σε διαφορετικά σωληνάκια με κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό και επώαστηκαν στον πάγο για 30 min.
- Έπειτα έγινε θερμικό σοκ στους 42°C για 3 min και αμέσως μετά τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον πάγο για άλλα 5 min.
- Μετά προστέθηκαν 900μl θρεπτικού LB χωρίς αντιβιοτικά και επώαστηκαν στους 37°C για 1 ώρα.
- Τέλος επιστρώθηκαν 100 μl κυττάρων σε πιάτα LB_{amp}

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

TYM :2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0.1M NaCl, 10mM MgSO₄

TFB-I: 30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% Glycerol, pH 7.0

TFB-II :10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 20% Glycerol, pH 7.0

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

τροβλία LB_{amp} :1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

- Σε δύο αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες 3 ml θρεπτικού υλικού LB_{amp} εμβολιάστηκαν αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10 με τα πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x αντίστοιχα και επώαστηκαν O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση.
- Την άλλη μέρα συλλέχθηκε η καλλιέργεια και φυγοκεντρήθηκε στα 20.800 g για 12 sec.
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 300μl διαλύματος TENS και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex).
- Κατόπιν έγινε προσθήκη 150μl CH₃COONa 3M pH 5.2 και ανάδευση στον αναδευτήρα(vortex).
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min στα 20.800 g και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι.
- Έπειτα προστέθηκε 1ml αιθανόλης 100%, ανάδευση και τοποθέτηση στους -20°C για 30 min.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.800 g για 10 min και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Έγινε ξέπλυμα με 1ml 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στα 20.800 g για 5 min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 20μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

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

Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουλεάσες

Το πλασμίδιο pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Sall* (Fermentas) και *SmaI* (New England Biolabs). Το μείγμα της πέψης περιείχε 2μl pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α (από miniprep), 5u *Sall*, 10x buffer O⁺ και H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl και αντίστοιχα για το *SmaI* 5u και buffer NEB4. Η επώαση έγινε για το *Sall* στους 37°C και για το *SmaI* σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.

Το πλασμίδιο pRW95-3-HRE-6x υπέστη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII* (Fermentas) και *SmaI* (New England Biolabs). Το μείγμα της πέψης περιείχε 2μl pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α (από miniprep), 5u *HindIII*, 10x buffer R⁺ και H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl και αντίστοιχα για το *SmaI* 5u και buffer NEB4. Η επώαση έγινε για το *HindIII* στους 37°C και για το *SmaI* σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Έπειτα από 2 ώρες προστέθηκε διάλυμα φορτώματος (loading buffer) με χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x.

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

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)

- Από O/N καλλιέργειες *E.coli* Top10 σε 100ml θρεπτικού LB_{amp} στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση με τα πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στα 3220 g για 15 min στους 4°C.
- Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το midi kit της Qiagen.
- Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν 4ml Buffer P₁ (Resuspension Buffer + RNase) από το kit της Qiagen και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex).
- Κατόπιν προστέθηκαν 4ml Buffer P₂ (Lysis Buffer) από το kit της Qiagen και έμειναν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου αφού έγινε καλή ανάμιξη.
- Προστέθηκαν 4 ml Buffer P₃ (Neutralization Buffer), έγινε ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min.
- Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στα 3220 g για 30 min, το υπερκείμενο αποχύθηκε σε νέο Falcon αφού διηθήθηκε μέσα από γάζα.
- Χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες της Qiagen (μια για κάθε πλασμίδιο). Πρώτα η στήλη ξεπλύθηκε με λίγα ml Buffer QBT.
- Έπειτα το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποχύθηκε στη στήλη, ακολούθησε ξέπλυμα 2 φορές από 10ml Buffer QC, έκλουση του DNA με 2 ml Buffer QF που μοιράστηκαν από 1ml σε σωληνάκια των 2ml.
- Προστέθηκαν 700μl ισοπροπανόλης αναμίχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 20.800 g για 30 min στους 4°C,
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν άλλα 700μl από αιθανόλη 70%, φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 20.800 g στους 4°C

- Τέλος το ίζημα ξηράνθηκε και αναδιαλύθηκε σε 50μl ddH₂O

Μετασχηματισμός *Saccharomyces cerevisiae*

Για το μετασχηματισμό σακχαρομήκυτα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* RS453 αυξότροφο σε λευκίνη (leu⁻), τρυπτοφάνη(trp⁻), αδενίνη(ade⁻), ουρακίλη(ura⁻), ιστιδίνη (his⁻) και λυσίνη (lys⁻).

- Από O/N καλλιέργεια του στελέχους RS453 του *Saccharomyces cerevisiae* σε 50ml θρεπτικού υλικού YPD στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση αραιώθηκαν ως OD_{600nm}=0.200 A και επώαστηκαν στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση μέχρι OD_{600nm}=0.5-1.0 A.

- Τότε φυγοκεντρήθηκαν τα κύτταρα στα 1811 g για 5 min στους 20°C

- Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος Tris-HCl 10mM pH 7.4, φυγοκεντρήθηκε στα 1.811 g για 5 min στους 20°C

- Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml διαλύματος LiT/10mM DTT, ανακινήθηκε στην περιστρεφόμενη ρόδα για 40 min σε θερμοκρασία δωματίου

- Έγινε φυγοκέντρωση στα 1.811 g για 5 min στους 20°C και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 800μl διαλύματος LiT.

- Σε 4 σωληνάκια προστέθηκαν από 100 μl αιωρήματος κυττάρων, 150μl LiT, 15μl Salmon Sperm DNA 10mg/ml (αφού είχε υποστεί αποδιάταξη στους 95°C για 5 min και επώαση στον πάγο) και 1μl πλασμιδιακού DNA ως εξής:

1. pBEVY-GL
2. pBEVY-GL-ARNT
3. pBEVY-GL-HIF-1α
4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α

- Έγινε καλή ανάμιξη με χρήση της πιπέτας και τοποθέτηση στη ρόδα για ανακίνηση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Κατόπιν προστέθηκαν 300μl διαλύματος PEG και έγινε προσεκτική ανάμιξη με πιπετάρισμα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη ρόδα για ανακίνηση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου

- Έγινε προσθήκη 15μl DMSO και επώαση στους 42°C για 3 min.

- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 500μl YPD και έγινε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Ακολούθησε φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, ξέπλυμα του ιζήματος με 1ml διαλύματος Tris-HCl 10mM, φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα και επαναιώρηση σε 100μl Tris-HCl 10mM.

➤ Τέλος έγινε επίστρωση σε πιάτα SDC leu⁻. Τα επιστρωμένα SDC leu⁻ πιάτα επωάστηκαν στους 30°C για 2 ημέρες.

Για την εισαγωγή του δεύτερου πλασμιδίου στα προηγούμενα ήδη μετασχηματισμένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία μετασχηματισμού για 4 καλλιέργειες αυτή τη φορά που η κάθε μία περιέχει ένα πλασμίδιο όπως φαίνεται παρακάτω:

1. pBEVY-GL
2. pBEVY-GL-ARNT
3. pBEVY-GL-HIF-1α
4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α

Κατά τη διαδικασία αυτού του δεύτερου μετασχηματισμού προστέθηκαν τα πλασμίδια pRW95-3 και pRW95-3-HRE-6x και η κατανομή τους στα σωληνάκια έγινε ως εξής:

1. pBEVY-GL + pRW95-3
2. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3
3. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3
4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3
5. pBEVY-GL + pRW95-3-HRE-6x
6. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3-HRE-6x
7. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x
8. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x

Η διαδικασία του μετασχηματισμού έγινε όπως και παραπάνω με τη διαφορά ότι το θρεπτικό υλικό στο οποίο επωάστηκαν τα κύτταρα πριν την επίστρωσή τους σε πιάτα ήταν SDC leu⁻. Στο τέλος η επίστρωση γίνεται σε τρυβλία SDC leu⁻/trp⁻ (η παρασκευή τους γίνεται με την ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι δεν προστίθεται διάλυμα τρυπτοφάνης)

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

YPD :1% bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose

LiT: 100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl pH 7.4

PEG :20g PEG σε 20ml LiT

Τρυβλία SDC leu⁻ :0.17% Yeast Nitrogen Base-AA/AS, 0.05% CSM-AA, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% glucose, pH 5.5 (με προσθήκη NaOH 5N), 2% agar, και προσθήκη διαλυμάτων Ade (166x), Ura (100x), Tryp (100x), His (330x), Lys(100x) σε τελικές συγκεντρώσεις 1x

Επαγωγή της έκφρασης και δράσης του HIF-1 από τη γαλακτόζη

➤ Από τα SDC leu⁻trp⁻ τρυβλία με τα μετασηματισμένα στελέχη εμβολιάστηκαν 5 καλλιέργειες των 25ml με θρεπτικό υλικό SDC leu⁻trp⁻ με 5 αποικίες που περιείχαν τα εξής πλασμίδια:

4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3
5. pBEVY-GL + pRW95-3-HRE-6x
6. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3-HRE-6x
7. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x
8. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x

και επωάστηκαν στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση

➤ Μετά από 8 ώρες έφτασαν σε λογαριθμική φάση γι' αυτό και αραιώθηκαν ως OD_{600nm}=0.050 A με φρέσκο θρεπτικό υλικό (100ml SDC leu⁻trp⁻).

➤ 8 ώρες αργότερα όταν οι καλλιέργειες έφτασαν ξανά σε λογαριθμική φάση έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού από SDC leu⁻trp⁻ σε SGC leu⁻trp⁻.

➤ Για την αλλαγή του θρεπτικού οι SDC leu⁻trp⁻ καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 1811 g για 3 min, επαναιωρήθηκαν σε 10ml SGC leu⁻trp⁻, φυγοκεντρήθηκαν στις 1811 g για 3 min και τέλος επαναιωρήθηκαν σε 200ml θρεπτικού SGC leu⁻trp⁻ και επωάστηκαν στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση.

Η στιγμή της μεταφοράς σε θρεπτικό υλικό με γαλακτόζη ορίστηκε ως σημείο 0h και έγινε λήψη δειγμάτων για μετέπειτα ανάλυσή τους με ανοσοαποτύπωση και δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης. Για ανοσοαποτύπωση λήφθηκε ποσότητα ίση με 10 OD καλλιέργειας και για δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης 2 φορές από 200μl και 400μl καλλιέργειας.

➤ Τα δείγματα που προορίζονταν για ανάλυση με ανοσοαποτύπωση φυγοκεντρήθηκαν στα 3220 g για λίγα λεπτά, το ίζημα ξεπλύθηκε με 1ml διαλύματος PBS, έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το ίζημα φυλάχθηκε στους -80°C.

➤ Τα δείγματα για τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης φυγοκεντρήθηκαν για 2 min στα 15.300 g, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και κρατήθηκαν τα τελευταία 20 μl (επειδή το ίζημα δεν ήταν ορατό) από κάθε δείγμα και φυλάχθηκαν στους -80°C.

Η λήψη δειγμάτων έγινε στα σημεία 0h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h και 24h όπως περιγράφεται παραπάνω. Κατά τη διάρκεια της συλλογής δειγμάτων η OD_{600nm} δεν έπρεπε να υπερβεί το 1,000 A για να μένουν πάντα οι καλλιέργειες σε λογαριθμική φάση και γι' αυτό όπου χρειάστηκε έγινε αραίωση με SGC *leu⁻trp⁻*.

Η διαδικασία της επαγωγής της έκφρασης και δράσης του HIF-1 επαναλήφθηκε αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο θρεπτικό υλικό SRC *leu⁻trp⁻* (θρεπτικό με ραφινόζη) αντί για SDC *leu⁻trp⁻*. Αυτό έγινε για να επιταχυνθεί η προσαρμογή των κυττάρων από θρεπτικό υλικό με ραφινόζη (SRC *leu⁻trp⁻*) σε θρεπτικό υλικό με γαλακτόζη (SGC *leu⁻trp⁻*). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την συλλογή των δειγμάτων είναι ακριβώς η ίδια όπως και στο πρώτο πείραμα. Τα σημεία λήψης δειγμάτων ήταν 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h και 24h.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

SGC *leu⁻trp⁻* :0.17% Yeast Nitrogen Base-AA/AS, 0.05% CSM-AA, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% galactose, pH 5.5 (με προσθήκη NaOH 5N), και προσθήκη διαλυμάτων Ade (166x), Ura (100x), His (330x), Lys (100x) σε τελικές συγκεντρώσεις 1x

SRC *leu⁻trp⁻* :0.17% Yeast Nitrogen Base-AA/AS, 0.05% CSM-AA, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% raffinose, pH 5.5 (με προσθήκη NaOH 5N), και προσθήκη διαλυμάτων Ade (166x), Ura (100x), His (330x), Lys (100x) σε τελικές συγκεντρώσεις 1x

Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Πρώτα παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* με την εξής διαδικασία:

➤ Στα ιζήματα των δειγμάτων που είχαν συλλεχθεί για ανοσοαποτύπωση προστέθηκαν 200 μl 2x Διαλύματος κατεργασίας δείγματος (Sample Buffer) και ποσότητα από γυάλινα σφαιρίδια τόση, όση και τα ¾ του όγκου που περιέχει το σωληνάκι.

➤ Ακολούθησε ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) για περίπου 10 sec και βράσιμο στους 95°C. Η ανάδευση και το βράσιμο επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.

➤ Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για λίγα δευτερόλεπτα και το υγρό περιεχόμενο μεταφέρθηκε με πιπέτα Hamilton σε νέα σωληνάκια. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι να φορτωθούν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε συσκευή της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8% πηκτής διαχωρισμού (separating gel) (2.7 ml 30% acrylamide, 2.5 ml 4x Separating Buffer, 4.8 ml ddH₂O, 40μl 10% APS και 20μl TEMED) αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) (1.2 ml 30% acrylamide, 2.0 ml 4x stacking buffer, 4.7 ml ddH₂O, 50μl 10% APS, 50μl TEMED). Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα με τη βοήθεια της πιπέτας Hamilton και το gel ηλεκτροφορήθηκε στα 150V.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

2x Διάλυμα κατεργασίας δείγματος (από αραιώση του stock 4x Sample Buffer): 250mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2% SDS, 40% glycerol, 0.2% Bromophenol Blue, 100mM DTT (προστίθεται λίγο πριν τη χρήση)

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

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

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

Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Η ανάλυση του HIF-1α με ανοσοαποτύπωση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο από Chachami et al., 2004.

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

➤ Η μεταφορά έγινε στα 400mA για 1 ώρα και 30 λεπτά. Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα και δούμε ότι όντως έγινε μεταφορά πρωτεϊνών.

➤ Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer) (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-Tween 20) για 1 ώρα, ξέπλυμα 3 φορές με PBS-Tween (15 min, 5 min, 5 min)

Έπειτα έγινε επώαση με το πρώτο αντίσωμα anti-HIF-1α και anti-HIF-1β Transduction laboratories από BT Biosciences) σε αραιώση 1:500 σε PBS-Tween 20 για τουλάχιστον 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min)

➤ Ακολούθως έγινε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα goat anti-mouse (ορός κατσίκας ενάντια των IgG ποντικού) σε αραιώση 1:3000, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS-Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min).

➤ Έπειτα η μεμβράνη προετοιμάστηκε για εμφάνιση σε φωτογραφικό φιλμ. Αρχικά τοποθετήθηκε σε διάλυμα 10 ml luminol, 100μl coumaric και 30μl 3% H₂O₂ για περίπου 5 min.

➤ Κατόπιν μέσα στο θάλαμο εμφάνισης η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα και προστέθηκε το φωτογραφικό φιλμ. Κλείνουμε την κασέτα και ανάλογα με το χρόνο έκθεσης ανοίγεται η κασέτα και το φιλμ εμβαπτίζεται σε ειδικά διαλύματα εμφάνισης (developer και fixer) μέχρι να εμφανιστεί το αποτύπωμα στο φιλμ.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

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

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

PBS Phosphate Buffer Saline: 80mM Na₂HPO₄, 20mM NaH₂PO₄, 100mM NaCl

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

Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

- Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την επαγωγή με γαλακτόζη προστέθηκαν 700μl διαλύματος Z buffer, 20μl SDS 0,1% και 20μl χλωροφόρμιο. Έγινε έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) για να σπάσουν τα κύτταρα.
- Σημειώθηκε ο χρόνος έναρξης της αντίδρασης και προστέθηκαν 200μl ο-nitrophenol-β-D-galactopyranoside (ONPG) 4mg/ml σε Z buffer.
- Παρατηρήθηκε η ανάπτυξη κίτρινου χρώματος στα δείγματα όπου δρα η β-γαλακτοσιδάση και όταν παρατηρήθηκε η ανάπτυξη χρώματος που να δίνει OD_{420nm} περίπου 0,8 A σε ένα από τα δείγματα, σημειώθηκε ο χρόνος αντίδρασης και προστέθηκαν αμέσως 400μl Na₂CO₃ 1M για να σταματήσει η αντίδραση.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.800 g για 2 min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέα σωληνάκια
- Έπειτα έγινε φωτομέτρηση στα 420nm όπου απορροφά το προϊόν της αντίδρασης (νιτροφαινόλη) και τα 550nm όπου η οπτική απορρόφηση μετρά τα θραύσματα κυττάρων και τέλος υπολογίστηκαν οι μονάδες της β-γαλακτοσιδάσης (Miller units) από τον τύπο :

$$U = \frac{1000 [(OD_{420}) - (1,75 OD_{550})]}{(t) (v) (OD_{600})}$$

όπου t ο χρόνος αντίδρασης (σε min) και v ο όγκος (σε ml) της καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε. Η οπτική απορρόφηση στα 600nm είναι μέτρο της ποσότητας των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού και οι μετρήσεις έγιναν κατά τη διάρκεια του πειράματος της επαγωγής του συστήματος με γαλακτόζη.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Z buffer :60mM Na₂HPO₄·2H₂O, 40mM Na₂H₂PO₄·2H₂O, 1mM MgCl₂, 10mM KCl, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, pH 7.0

Ενίσχυση γονιδιακών αλληλουχιών του HIF-1α με PCR

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση κομματιών του HIF-1α σε διαφορετικά μεγέθη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την αρχή και το τέλος του γονιδίου είναι οι ακόλουθες:

HIF-N-B : 5'-TTT TTG GAT CCC GAT TCA CCA TGG AGG GC- 3'

HIF-C-B : 5'- TTT TTG GAT CCT CAG TTA ACT TGA TCC AAA GC – 3'

Οι αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

H251R : 5'-TTT TTG GAT CCT CAT TTC ATA TCC AGG CTG TGT CG- 3'

H347R : 5'-TTT TTG GAT CCT CAC TGA ATA ATA CCA CTC ACA ACG- 3'

H530R : 5'- TTT TTG GAT CCT CAT TCA TTG ACC ATA TCA CTA TCC-3'

H652R : 5'- TTT TTG GAT CCT CAA GTA GTT TCT TTA TGT ATG AGG G-3'

H781R : 5'- TTT TTG GAT CCT CAT CTA CAT GCT AAA TCA GAG GG- 3'

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

Πρώτα ενισχύθηκαν τα reverse κομμάτια του HIF-1α με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράσης για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της PCR. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

Δείγμα	1	2	3	4	5
pBS HIF-1α (μl)	1	1	1	1	1
Buffer 10x (μl)	5	5	5	5	5
dNTPs 2mM each (μl)	5	5	5	5	5
Taq 5u/μl (μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
HIF1α-N-B (μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H251R (50pmoles/μl) (μl)	0.5				
H347R (μl)		0.5			
H530R (μl)			0.5		
H652R (μl)				0.5	
H781R (μl)					0.5
H ₂ O (μl)	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
Σύνολο (μl)	50	50	50	50	50

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν

- 30 sec →94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec →50°C στάδιο υβριδοποίησης
- 2 min30 sec →72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min →94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min →72°C

Για το στάδιο υβριδοποίησης η θερμοκρασία υπολογίστηκε από το μέσο όρο της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (T_m) : $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 3^\circ\text{C} \times (G+C)$

Επειδή για τα δείγματα 3, 4, 5 η PCR δεν ήταν επιτυχής, η διαδικασία επαναλήφθηκε με μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού στους 48°C και με προσθήκη 2μl DMSO (4%).

Μετά από τον καθορισμό των συνθηκών έγινε η ενίσχυση των ίδιων κομματιών με Vent πολυμεράση που είναι πιο ακριβής από την Taq και παρουσιάζει επιδιωρθωτική δράση. Το μείγμα αντίδρασης περιείχε:

Δείγμα	1	2	3	4	5
pBS HIF-1α (μl)	2	2	7	7	7
Buffer 10x (μl)	10	10	10	10	10
dNTPs 2mM each (μl)	10	10	10	10	10
Vent 2u/μl (μl)	2	2	2	2	2
HIF1α-N-B (μl)	1	1	1	1	1
H251R (μl)	1				
H347R (μl)		1			
H530R (μl)			1		
H652R (μl)				1	
H781R (μl)					1
DMSO (μl)			4	4	4
H ₂ O (μl)	74	74	65	65	65
Σύνολο (μl)	100	100	100	100	100

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν

- 30 sec →94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec →50°C στάδιο υβριδοποίησης για τα δείγματα 1 και 2
- 30 sec →48°C στάδιο υβριδοποίησης για τα δείγματα 3, 4 και 5
- 2 min 30 sec →72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min →94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min →72°C

Καθαρισμός Προϊόντων PCR με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη

➤ Στα προϊόντα της PCR προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1), έγινε ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει ομοιογενές, φυγοκέντρηση στα 15.300 g για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι.

- Έπειτα προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15.300 g για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έγινε μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι και ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.
- Στα δείγματα προστέθηκαν 2,5 όγκοι 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου διάλυμα CH₃COONa 3M, pH 5,2 .
- Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων στους -80°C για 1 ώρα, φυγοκέντρηση στα 15.300 g για 15 min στους 4°C, ξέπλυμα του ίζηματος σε 500μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 min.
- Τέλος το ίζημα ξηράνθηκε και αναδιαλύθηκε σε 40μl H₂O.

Πέψη των τμημάτων της αλληλουχίας του γονιδίου του HIF-1α και του πλασμιδίου pBluescript-SK(+) με ένζυμο περιορισμού *Bam*HI και ανάκτησή τους από παρασκευαστική πηκτή (preparative gel)

Τα κομμάτια του HIF-1α που καθαρίστηκαν στο προηγούμενο στάδιο καθώς και το πλασμίδιο pBS-SK(+) όπου πρόκειται να εισαχθούν υφίστανται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI. Το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 40μl DNA από κάθε κομμάτι του HIF-1α
- 5μl Buffer *Bam*HI 10x
- 1μl *Bam*HI 5u/μl
- 4μl H₂O

Για το πλασμίδιο pBS-SK(+) το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 10 μg pBS-SK(+)
- 5 μl Buffer *Bam*HI 10x
- 2 μl *Bam*HI 5u/μl
- H₂O σε τελικό όγκο 100μl

Στο τέλος της πέψης έγινε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του pBS-SK(+) για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι προστέθηκαν 2 μl ενζύμου CIP για 30 min στους 37°C και προσθήκη άλλου 1μl CIP για άλλα 30 min στους 37°C. Τέλος το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75°C για 10 min.

Όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστική πηκτή (1% αгарόζης σε 1x TAE, 1:20.000 βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml) με πηγαδάκια των 50 και 100μl.

Ηλεκτροφορήθηκε όλη την ποσότητα των δειγμάτων στα 90V και με το τέλος της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκαν οι ζώνες από την πηκτή με τη βοήθεια λυχνίας UV(364nm) και ακολούθησε ανάκτηση από την πηκτή με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction:

- Τα τμήματα της πηκτής με το DNA τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια και ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 3 όγκοι διαλύματος QG σε ένα όγκο της πηκτής (100 mg~100 μ l) και επωάστηκαν για 10 min στους 50°C έτσι ώστε να λιώσει η πηκτή.
- Κατόπιν προστέθηκε ένας όγκος ισοπροπανόλης και έγινε ανάδευση.
- Το περιεχόμενο από το σωληνάκι τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα σωληνάκι συλλογής.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.800 g για 1 min, απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE
- Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα στα 20.800 g για 1 min, απορρίφθηκε το αδέσμευτο κλάσμα και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες
- Τέλος κάτω από τη στήλη τοποθετήθηκε καθαρό σωληνάκι και το DNA εκλούστηκε με προσθήκη 30 μ l H₂O και φυγοκέντρηση στα 20.800 g για 1 min.

Ποσοτικοποίηση και αντίδραση λιγάσης

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

	Ligation 1	Ligation 2	Ligation 3	Ligation 4	Ligation 5	Control 6
1. H251R (μ l)	4					
2. H347R (μ l)		12				
3. H530R (μ l)			15			
4. H652R (μ l)				12		
5. H781R (μ l)					16	
pBS-SK(+) (μ l)	4	1.5	2	1.5	1	2
Buffer 10x (μ l)	2	2	2	2	2	2
T4 DNA ligase (μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H ₂ O (μ l)	9.5	4	0.5	4	0.5	15.5
Σύνολο (μ l)	20	20	20	20	20	20

Μετασχηματισμός των *E.coli* Top10 με προϊόντα αντίδρασης λιγάσης

Σε κύτταρα Top 10 που είναι δεκτικά για μετασχηματισμό προστέθηκαν 10 μl από αντίδραση λιγάσης. Η διαδικασία του μετασχηματισμού σε βακτήρια που ακολουθήθηκε αναγράφεται στη σελίδα 17. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB_{amp} +x-gal (20mg/ml x-gal διάλυση σε dimethylformamide 40μl από διάλυμα x-gal επιστρώθηκαν σε τρυβλίο LB_{amp} πριν την επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων)

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψη με ένζυμα περιορισμού

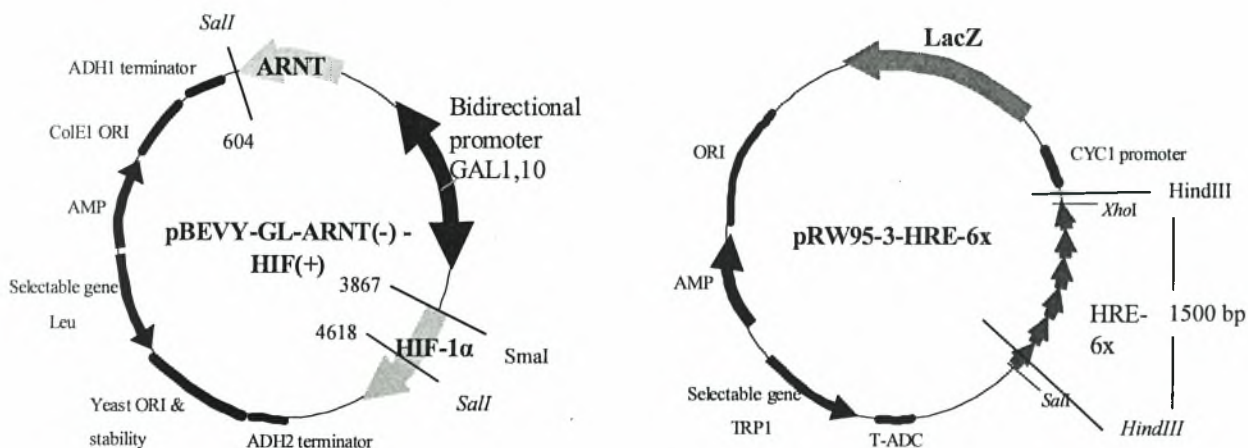
Από τις αποικίες που σχηματίστηκαν επιλέχθηκαν αυτές με το άσπρο χρώμα και εμβολιάστηκαν καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό 5ml LB_{amp}. (Η θέση κοπής του *Bam*HI βρίσκεται μέσα στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση (*lacZ*) και έτσι με την είσοδο της ένθεσης το γονίδιο απενεργοποιείται). Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας αναγράφεται στη σελίδα 18.

Η πέψη των προϊόντων από την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας έγινε με χρήση του ενζύμου *Bam*HI.

Αποτελέσματα

Πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x

Το πλασμίδιο pBEVY (bi-directional expression vectors for yeast) δίνει τη δυνατότητα της ταυτόχρονης έκφρασης δύο πρωτεϊνών κάτω από τον έλεγχο του διπλής κατεύθυνσης υποκινητή Gal1,10 που επάγεται από τη γαλακτόζη. Έτσι στο πλασμίδιο pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α (Braliou et al., 2004) τα γονίδια των HIF-1α και ARNT έχουν τοποθετηθεί εκατέρωθεν του υποκινητή αυτού. Η ταυτόχρονη έκφραση των δύο πρωτεϊνών μας δίνει στοιχειομετρία 1:1 για την αλληλεπίδραση τους κάτι που είναι πολύ σημαντικό για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Το πλασμίδιο pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α περιέχει γονίδιο επιλογής για τη σύνθεση του αμινοξέος της λευκίνης έτσι ώστε να επιλεγεί από στελέχη του *S. Cerevisiae* που είναι αυξότροφα σε λευκίνη. Επίσης περιέχει το γονίδιο AMP που δίνει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη καθώς και αλληλουχίες έναρξης της αντιγραφής τόσο για βακτήρια όσο και για yeast.



Εικόνα 7: Αριστερά φαίνεται η δομή του πλασμιδίου έκφρασης pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α ενώ δεξιά φαίνεται η δομή του πλασμιδίου αναφοράς pRW95-3-HRE-6x (Από Braliou et al., 2004)

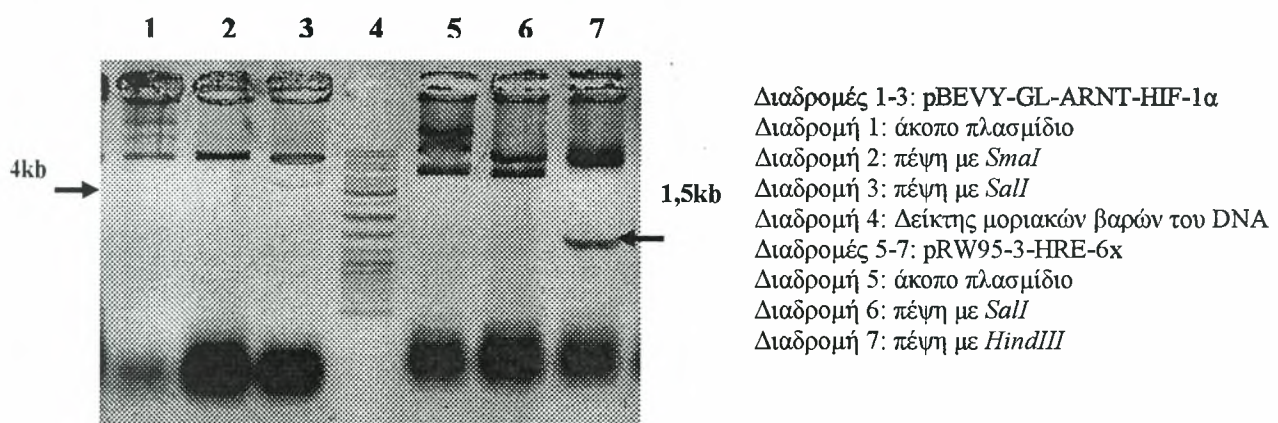
Το πλασμίδιο pRW95-3-HRE-6x (Braliou et al., 2004) περιέχει 6 αντίγραφα της αλληλουχίας του HRE του γονιδίου της ερυθροποιητίνης στην περιοχή πριν τον υποκινητή CYC1 και το γονίδιο LacZ που εκφράζει το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης. Ακόμη το πλασμίδιο αυτό περιέχει το γονίδιο επιλογής TRP1 που δίνει τη δυνατότητα παραγωγής του αμινοξέος τρυπτοφάνη σε στελέχη του *S. Cerevisiae* που είναι αυξότροφα της.

Πολλαπλασιασμός και απομόνωση των πλασμιδίων *pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α* και *pRW95-3-HRE-6x*

Ο πολλαπλασιασμός των δύο πλασμιδίων έγινε με εισαγωγή τους σε στελέχη Top10 *E.coli* και με καλλιέργεια των μετασηματισμένων αποικιών σε θρεπτικό υλικό LB_{amp}. Για να επαληθεύσουμε την εισαγωγή των πλασμιδίων στα κύτταρα του *E.coli* πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας και έπειτα έγινε πέψη με ένζυμο περιορισμού έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν το πλασμίδιο που έχει εισαχθεί είναι όντως το σωστό και ταυτόχρονα αν περιέχει τις αλληλουχίες που θα χρησιμεύσουν στη συνέχεια του πειράματός μας.

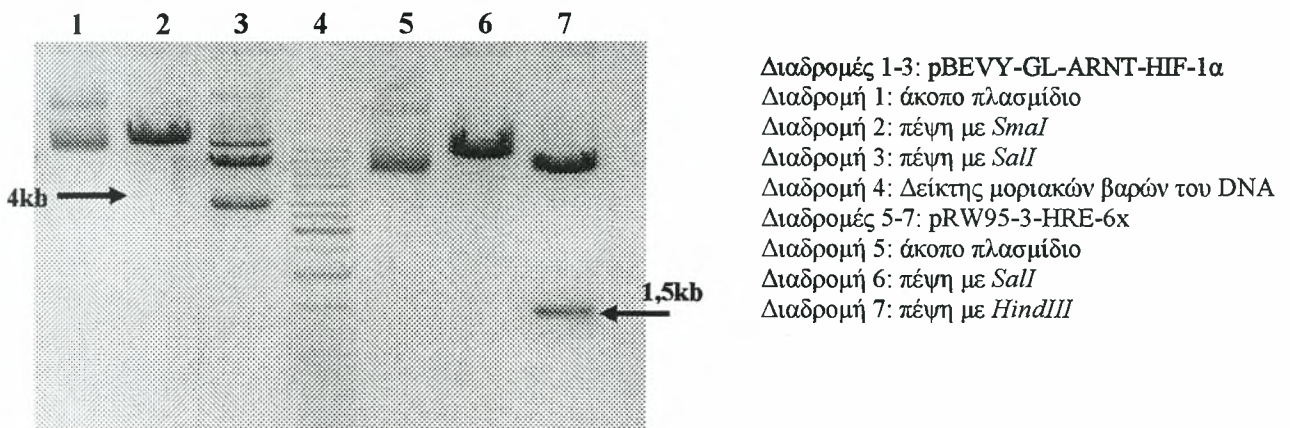
Όσον αφορά το πλασμίδιο *pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α* έγινε πέψη με το ένζυμο *SmaI* που κόβει μόνο μία φορά το συγκεκριμένο πλασμίδιο καθώς η αλληλουχία που αναγνωρίζει βρίσκεται σε ένα μόνο αντίγραφο. Επίσης έγινε πέψη με το ένζυμο *Sall*, το οποίο κόβει το πλασμίδιο σε δύο σημεία και συγκεκριμένα στις θέσεις 604 και 4618, ανάμεσα στις οποίες βρίσκονται οι αλληλουχίες του ARNT, του HIF-1α και του διπλής κατεύθυνσης υποκινητή GAL1,10 όπως φαίνεται και στην εικόνα 7. Άρα περιμέναμε ένα κομμάτι 4 kb περίπου, που πράγματι φαίνεται στην εικόνα 8.

Όσον αφορά το πλασμίδιο *pRW95-3-HRE-6x* έγινε πέψη με το ένζυμο *Sall*, το οποίο το κόβει σε ένα μόνο σημείο. Ακόμη έγινε πέψη με το ένζυμο *HindIII*, το οποίο κόβει το πλασμίδιο σε δύο σημεία μέσα και έξω από την ένθεση, δίνοντας ένα κομμάτι περίπου 1,5 kb που όντως φαίνεται και στην εικόνα 8.



Εικόνα 8: Με mini preparation παρασκευάστηκαν τα σωστά πλασμίδια *pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α* και *pRW95-3-HRE-6x*. Στις διαδρομή 2 φαίνεται η ζώνη του πλασμιδιακού DNA που έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο *SmaI* και αφού κόβει μία μόνο φορά δίνει μία ζώνη γύρω στις 10kb που είναι συνολικά το πλασμίδιο. Στη διαδρομή 3 παρατηρείται έστω και εξασθενημένη η ζώνη των 4 kb που δίνει η πέψη με το ένζυμο *Sall*. Στη διαδρομή 6 το πλασμίδιο *pRW95-3-HRE-6x* έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο *Sall* που κόβει μία φορά και δίνει μία ζώνη γύρω στις 8 kb αλλά και μια ζώνη άκοπου πλασμιδίου. Στη διαδρομή 7 και έπειτα από πέψη με *HindIII* παρατηρείται μια ζώνη στις 1,5 kb κάτι που ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με το χάρτη του πλασμιδίου.

Μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας ακολούθησε απομόνωση DNA μεσαίας κλίμακας (midi preparation) με σκοπό την απομόνωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA και με υψηλό βαθμό καθαρότητας. Για να ελεγχθεί και πάλι αν έχουμε απομονώσει τα σωστά πλασμίδια έγινε πέψη με περιοριστικά ένζυμα όπως και παραπάνω. Στην εικόνα 9 απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης έπειτα από την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας.



Εικόνα 9: Με *mid preparation* παρασκευάστηκαν τα σωστά πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x. Τα αποτελέσματα από την πέψη του *mini preparation* επιβεβαιώνονται με την εμφάνιση της ζώνης των 4 kb έπειτα από πέψη του pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α με *SalI* στη διαδρομή 3 και την εμφάνιση της ζώνης των 1,5 kb έπειτα από πέψη του pRW95-3-HRE-6x με *HindIII* στη διαδρομή 7.

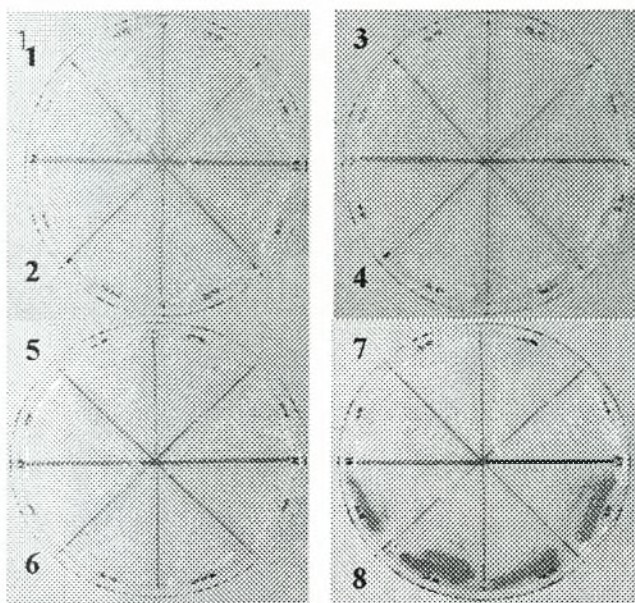
Επαγωγή της έκφρασης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 έπειτα από εισαγωγή του σε *Saccharomyces cerevisiae*

➤ Εποπτική μέθοδος διάκρισης στελεχών ζύμης που εκφράζουν λειτουργικό HIF-1 από στελέχη στα οποία δεν είναι λειτουργικός

Τα απομονωμένα πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x εισήχθησαν σε στελέχη RS453 του *Saccharomyces cerevisiae* με μετασχηματισμό με χρήση διαλυμάτων LiOAc/PEG και τελικά επιστρώθηκαν σε SDC leu⁻trp⁻ τρυβλία που περιέχουν ως πηγή ενέργειας γλυκόζη. Παράλληλα έγινε μετασχηματισμός στα ίδια στελέχη με πλασμίδια που περιείχαν μόνο τον ARNT ή μόνο τον HIF-1α ή κανένα από τα δύο παρουσία και απουσία του HRE-6x. Πιο συγκεκριμένα κατά το μετασχηματισμό σε κύτταρα *S. cerevisiae* RS453 εισήχθησαν πλασμίδια με τους εξής συνδυασμούς:

1. pBEVY-GL + pRW95-3
2. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3
3. pBEVY-GL-HIF-1 α + pRW95-3
4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1 α + pRW95-3
5. pBEVY-GL + pRW95-3-HRE-6x
6. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3-HRE-6x
7. pBEVY-GL-HIF-1 α + pRW95-3-HRE-6x
8. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1 α + pRW95-3-HRE-6x

Όπως φαίνεται ο συνδυασμός στον οποίο αναμένουμε λειτουργικό HIF-1 είναι αυτός στο #8 όπου παρουσιάζονται ταυτόχρονα ο HIF-1 α , ο ARNT αλλά και οι 6 επαναλήψεις του HRE στον υποκινητή του γονιδίου lacZ. Οι συνδυασμοί 1-7 αποτελούν τα στελέχη ελέγχου και έπειτα από επαγωγή του συστήματος από γαλακτόζη θα αποδεχθεί ότι ο HIF-1 εκφράζεται και είναι λειτουργικός μόνο στο στέλεχος 8 που περιέχονται όλα τα «συστατικά» του συστήματος και σε καμία άλλη περίπτωση. Γι' αυτό το λόγο από κάθε ένα από τα 8 παραπάνω στελέχη πήραμε 4 μετασηματισμένες αποικίες και τις επιστρώσαμε σε τρυβλία SGC leu-trp- που περιέχουν το υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης x-gal. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι μόνο στα τρυβλία που επιστρώθηκαν αποικίες του στελέχους 8 παρατηρήθηκε η εμφάνιση μπλε χρώματος λόγω της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης σε αυτά (Εικόνα 10). Δηλαδή μόνο σε αυτά τα στελέχη επάγεται η έκφραση των υπομονάδων του HIF-1 και ταυτόχρονα είναι λειτουργικές αφού προσδένονται στις ειδικές αλληλουχίες HREs έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης που είναι προσκείμενη στα HREs και την εμφάνιση του μπλε χρώματος έπειτα από τη διάσπαση του x-gal. Επιπλέον είναι σημαντικό το γεγονός ότι στο στέλεχος #4 όπου υπάρχει και ο HIF-1 α και ο ARNT αλλά όχι η αλληλουχία HRE-6x δεν παρατηρήθηκε η εμφάνιση μπλε χρώματος στο τρυβλίο. Αυτό υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (β-γαλακτοσιδάση) είναι πάντα εξαρτώμενη από τα HREs. Ακόμη το γεγονός ότι στα στελέχη #6 και #7 που παράγεται μόνο ο ARNT και μόνο ο HIF-1 α αντίστοιχα δεν παρατηρείται ανάπτυξη μπλε χρώματος υποδεικνύει ότι μόνο ο ένας από τους δύο παράγοντες δεν είναι αρκετός για να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.



Εικόνα 10: Μόνο όπου εκφράζονται ταυτόχρονα ο HIF-1α και ο ARNT παρατηρείται μπλε χρώμα, ένδειξη λειτουργικότητας του HIF-1.

Αποικίες μετασηματισμένων στελεχών σακχαρομύκητα επιστρωμένες σε τρυβλία SGCl_{eu}-trp- x-gal

1. pBEVY-GL + pRW95-3
2. pBEVY-GL-ARNT+ pRW95-3
3. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3
4. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3
5. pBEVY-GL + pRW95-3-HRE-6x
6. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3-HRE-6x
7. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x
8. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α+pRW95-3-HRE-6x

Εμφανίζεται μπλε χρώμα μόνο στο τρυβλίο με τις αποικίες του στελέχους #8

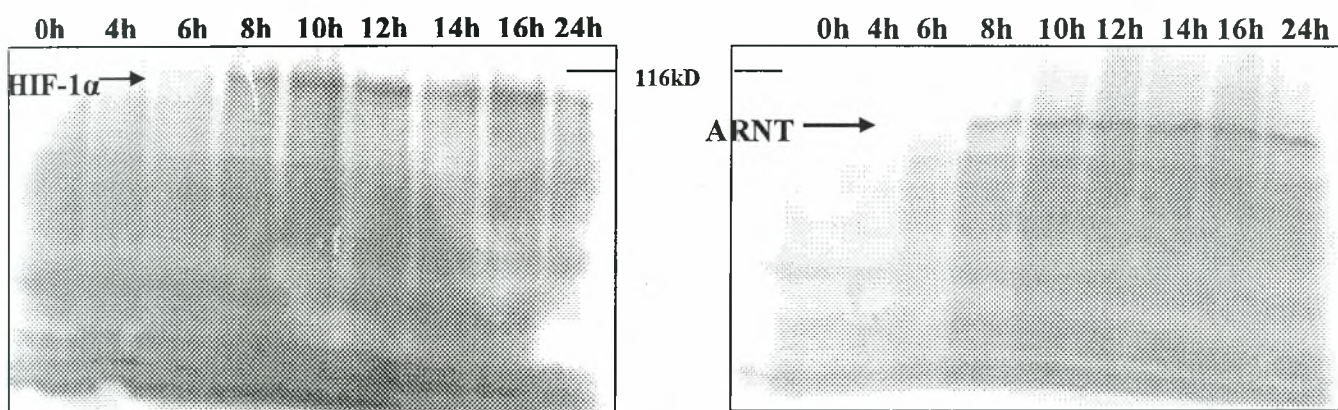
➤ Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT σε *S. cerevisiae*

έπειτα από ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση (Western blot)

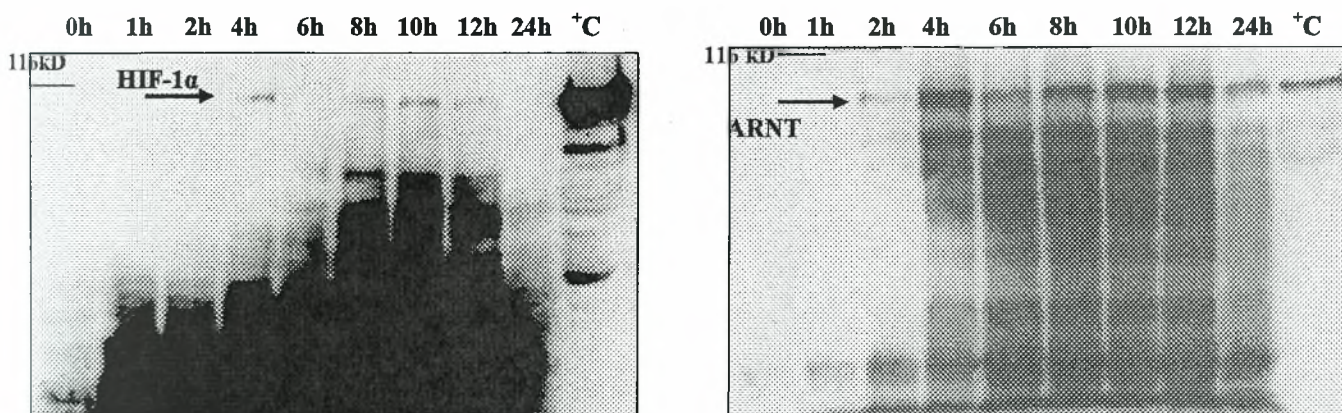
Για να διαπιστωθεί ότι ο HIF-1α και ο ARNT όντως εκφράζονται σε κύτταρα σακχαρομύκητα εφόσον τα γονιδια τους έχουν εισαχθεί μέσω του πλασμιδίου pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και έχει γίνει επαγωγή με επώαση σε θρεπτικό υλικό με γαλακτόζη (SGC leu-trp-), έγινε ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε νιτροκυτταρίνη και κατόπιν με χρήση αντισωμάτων ειδικών για την κάθε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-HIF-1α και anti-HIF-1β (Transduction laboratories από BT Biosciences)

Η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT επάγεται από τη γαλακτόζη λόγω του διπλής κατευθύνσεως υποκινητή GAL1,10 που εξαρτάται από αυτή. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με την μεταφορά των στελεχών ζύμης που περιέχουν τα πλασμίδια pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α και pRW95-3-HRE-6x από θρεπτικό υλικό με γλυκόζη σε θρεπτικό με γαλακτόζη και απομονώθηκαν δείγματα κυττάρων σε διάφορα χρονικά διαστήματα για 24 ώρες. Το πείραμα της επαγωγής της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών που συνιστούν τον HIF-1 επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι πριν γίνει η μετάβαση σε γαλακτόζη, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ραφινόζη. Αυτό έγινε με την προοπτική της ταχύτερης

προσαρμογής των κυττάρων της ζύμης στη χρήση της γαλακτόζης ως πηγή ενέργειας, καθώς είναι γνωστό ότι η παρουσία γλυκόζης αλλά όχι ραφινόζης καταστέλλει το μεταβολισμό της γαλακτόζης. Κατά αυτόν τον τρόπο θέλαμε να διαπιστώσουμε αν επιτυγχάνεται ταχύτερη έκφραση και λειτουργικότητα του HIF-1. Όσον αφορά την έκφραση των πρωτεϊνών HIF-1α και ARNT έπειτα από επαγωγή με γαλακτόζη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 11, ο μεν HIF-1α αρχίζει ήδη να φαίνεται από την 6^η ώρα έως και την 24^η, ο δε ARNT εμφανίζεται καθαρά από την 8^η ώρα έως και την 24^η. Όσον αφορά την έκφραση των δύο πρωτεϊνών με επαγωγή από γαλακτόζη και αφού έχει προηγηθεί χρήση ραφινόζης ο HIF-1α εμφανίζεται την 4^η, 8^η, 10^η και 12^η ώρα ενώ ο ARNT εμφανίζεται από τη 2^η έως και την 24^η ώρα. Είναι λοιπόν φανερό η ταχύτερη έκφραση των πρωτεϊνών όταν πριν την επαγωγή από γαλακτόζη χρησιμοποιείται ραφινόζη, έστω και αν το κέρδος χρόνου όσον αφορά τον HIF-1α είναι μόνο 2 ώρες.



Εικόνα 11: Έκφραση του HIF-1α και του ARNT έπειτα από επαγωγή με γαλακτόζη. Ο HIF-1α έχει αρχίσει να φαίνεται κατά την 6^η ώρα σε μικρό βαθμό και συνεχίζει να εμφανίζεται από την 8^η έως και τη 16^η ώρα. Ο ARNT αρχίζει να εμφανίζεται κατά την 8^η ώρα και συνεχίζει να εκφράζεται έως και την 24^η ώρα.



Εικόνα 12: Έκφραση του HIF-1α και του ARNT έπειτα από επαγωγή με γαλακτόζη και χρήση ραφινόζης. Ο HIF-1α εκφράζεται κατά την 4^η, 8^η, 10^η και 12^η ώρα. Ο ARNT αρχίζει να εκφράζεται από τη 2^η ώρα σε μικρή ποσότητα ενώ συνεχίζει να εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα κατά την 4^η, 6^η, 8^η, 10^η, 12^η, και 24^η ώρα. Το δείγμα θετικού ελέγχου (C⁺) προέρχεται από λεία μυϊκά κύτταρα που έχουν επωαστεί με κοβάλτιο.

Ωστόσο αυτό που παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις είναι η παρουσία πολλών ζωνών που πιθανόν υποδηλώνει πρωτεόλυση και των δύο πρωτεϊνών. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε ενδογενή πρωτεόλυση στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, είτε στη δράση πρωτεασών κατά την παρασκευή των εκχυλισμάτων.

➤ **Ποσοτικός έλεγχος της λειτουργικότητας του HIF-1 σε *S.cerevisiae* έπειτα με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-galactosidase assay)**

Εφόσον με την ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση διαπιστώθηκε ότι όντως εκφράζονται ο HIF-1α και ο ARNT σε κύτταρα *S.cerevisiae* αυτό που έμενε ήταν να ελεγχθεί αν οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι λειτουργικές. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 στους χάρτες των πλασμιδίων, το pRW95-3-HRE-6x πλασμίδιο περιέχει έξι επαναλήψεις της αλληλουχίας HRE από το γονίδιο της ερυθροποιητίνης σε μια περιοχή που βρίσκεται ακριβώς πριν από το γονίδιο lacZ. Έτσι το σκεπτικό ήταν ότι δεδομένου ότι ο HIF-1 εκφράζεται στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, τότε για να είναι αυτός λειτουργικός πρέπει οι υπομονάδες του να μπορούν να διμεριστούν, να προσδεθούν στα HREs και τελικά να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Ωστόσο για να εξασφαλιστεί το γεγονός ότι η μεταγραφή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης γίνεται μόνο παρουσία του HIF-1α, του ARNT και των HREs χρησιμοποιήθηκε και μια σειρά από δείγματα ελέγχου που καθένα στερούνταν έναν ή δύο παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα δείγματα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων:

1. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3
2. pBEVY-GL + pRW95-3-HRE-6x
3. pBEVY-GL-ARNT + pRW95-3-HRE-6x
4. pBEVY-GL-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x
5. pBEVY-GL-ARNT-HIF-1α + pRW95-3-HRE-6x

Η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α και του ARNT έγινε όπως και για το προηγούμενο πείραμα της ανάλυσης των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση πρώτα με χρήση μόνο γαλακτόζης και έπειτα με χρήση ραφινόζης και γαλακτόζης με δειγματοληψία ανά καθορισμένα χρονικά σημεία. Με την εφαρμογή της δοκιμασίας της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία είναι χρωματομετρική

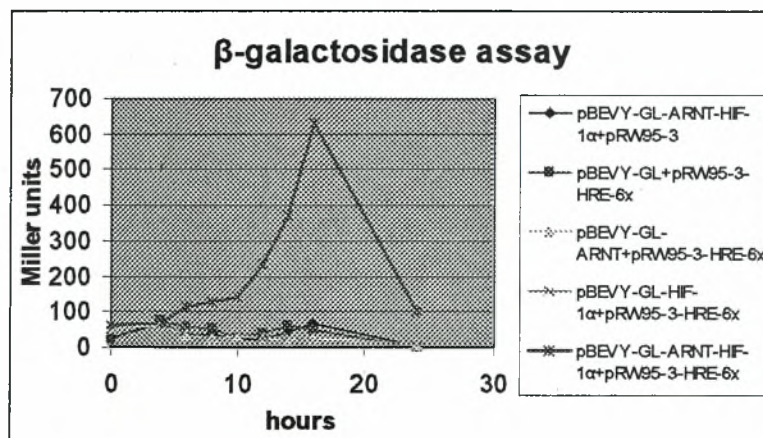
μέθοδος και βασίζεται στην παραγωγή χρωμοφόρου ενώσεως από τη διάσπαση του υποστρώματος ONPG από τη β-γαλακτοσιδάση, υπολογίστηκαν οι μονάδες του ενζύμου (Miller units) από τον εξής τύπο:

$$U = \frac{1000 \times [(OD_{420}) - (1,75 \times OD_{550})]}{(t) \times (v) \times (OD_{600})}$$

όπου t ο χρόνος αντίδρασης (σε min) και v ο όγκος της καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε (σε ml). Στα 420nm απορροφά το προϊόν της αντίδρασης (νιτροφαινόλη), στα 550nm η οπτική απορρόφηση μετρά τα θραύσματα κυττάρων και η μέτρηση στα 600nm είναι μέτρο της ποσότητας των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού. Η OD_{600nm} μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος της επαγωγής του συστήματος με γαλακτόζη.

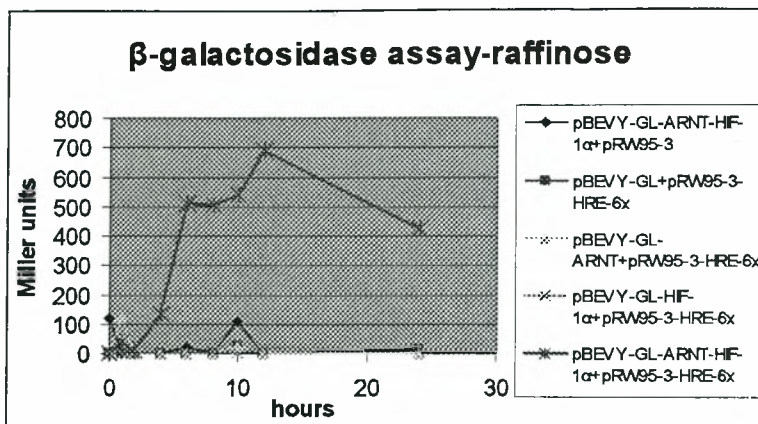
Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της β-γαλακτοσιδάσης φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα 1&2. Στο γράφημα 1 όπου για την επαγωγή του συστήματος έχει χρησιμοποιηθεί γαλακτόζη μετά από γλυκόζη παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση των μονάδων του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης που ξεκινά από τη 10^η ώρα και φτάνει στο μέγιστο κατά τη 16^η ώρα για να καταλήξει σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά την 24^η ώρα. Όσον αφορά το γράφημα 2, όπου πριν την επαγωγή του συστήματος από γαλακτόζη έγινε χρήση ραφινόζης η αύξηση των μονάδων του ενζύμου ξεκινά ήδη από την 4^η ώρα και συνεχίζει μέχρι να φτάσει το μέγιστο κατά την 12^η ώρα. Όπως παρατηρήθηκε και στο πρώτο γράφημα οι μονάδες του ενζύμου μειώνονται κατά την 24^η ώρα.

Γράφημα 1



	Miller Units								
	0h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	24h
1	27.1	67.8	37.3	36.4	25.1	21.6	44	64.1	5.2
2	23.4	72.7	58.4	51.8	25.1	38.6	63.3	47.2	1.6
3	53.3	59.7	36.5	26	30.7	25	18.8	25.1	9.3
4	49.5	124	55	19.6	43.1	25	32.5	12.5	12.6
5	62.2	64.6	115.5	125.9	19.1	231.4	370.2	12.6	101.7

Γράφημα 2



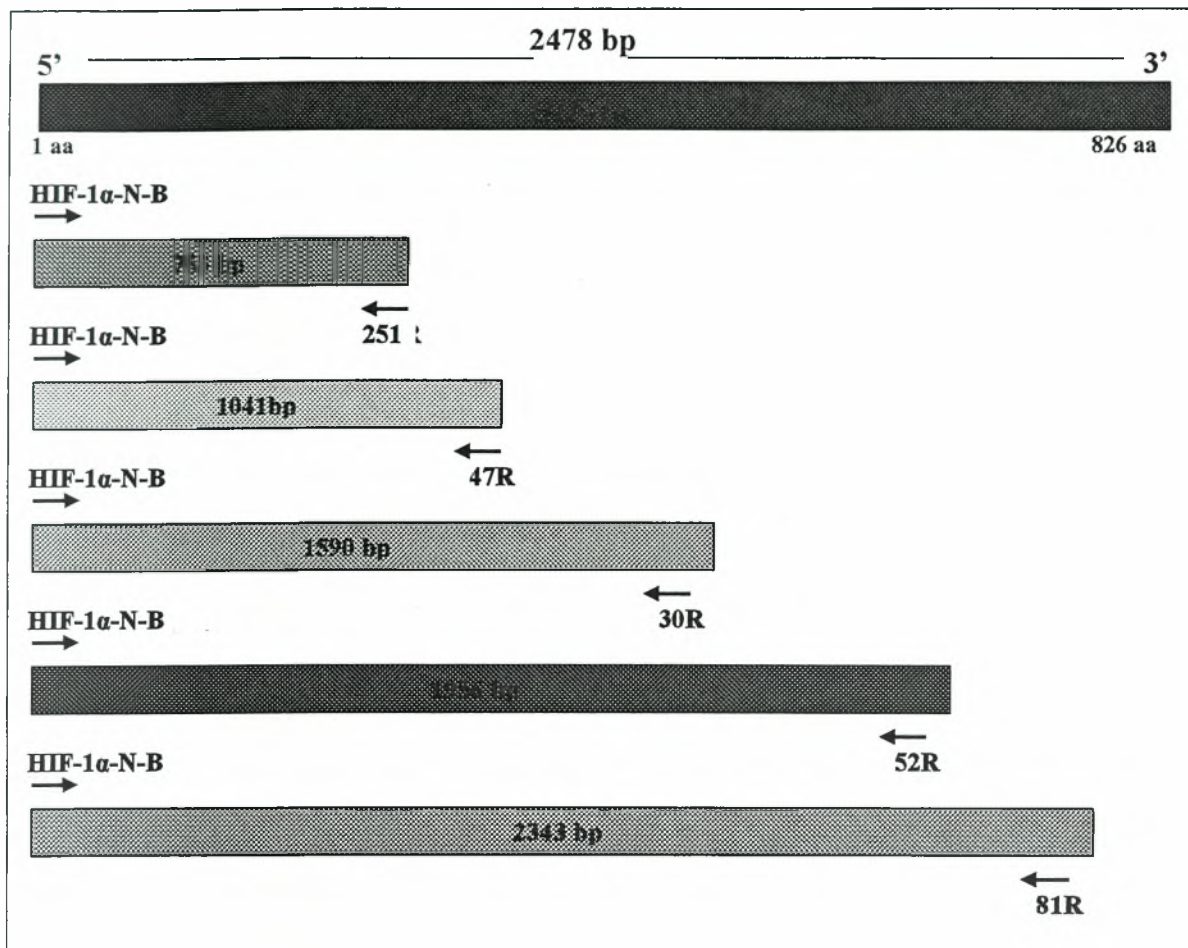
Miller Units-raffinose									
	0h	1h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h
1	119.1	0	0	0	20.5	0	111.1	0	11.3
2	0	0	0	0	0	0	24.8	0	13.2
3	0	125	0	0	0	0	24.5	2.2	0
4	0	0	0	0	0	4.5	0	23.3	25
5	0	34	8.9	133.7	509.5	503.7	540	689.2	425.1

Ενίσχυση αλληλουχιών διαφόρων μεγεθών του HIF-1α με PCR

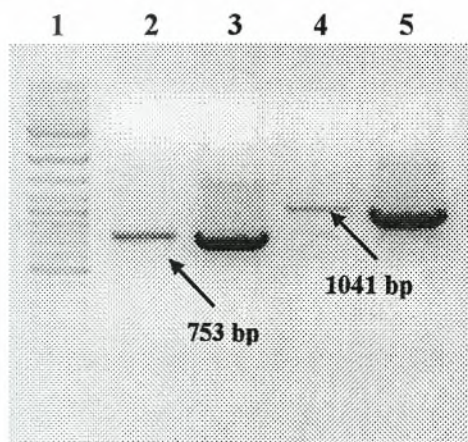
Σε αυτό το μέρος της εργασίας έγινε προσπάθεια για την ενίσχυση κομματιών διαφορετικών μεγεθών του γονιδίου του HIF-1α με σκοπό τη μετέπειτα εισαγωγή τους στο πλασμίδιο pBS-SK(+) και το μετασχηματισμό σε κύτταρα *E.coli* Top10.

Οι εκκινητές (primers) σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να περιέχουν μια αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI και μια αλληλουχία για κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης (για τον εκκινητή HIF-1α-N-B) ή κωδικόνιο λήξης (για τους εκκινητές H251R, H347R, H530R, H652R, H781R). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στη σελίδα 26 ενώ τα μεγέθη των αλληλουχιών του HIF-1α που επρόκειτο να ενισχυθούν φαίνονται στην εικόνα 13.

Οι διάφορες αλληλουχίες του HIF-1α ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με χρήση των θερμοανθεκτικών πολυμερασών Taq και Vent. Πρώτα χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση για τον καθορισμό των συνθηκών της αντίδρασης και έπειτα χρησιμοποιήθηκε η Vent πολυμεράση η οποία αντιγράφει το DNA με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με την Taq. Στις εικόνες 14 και 15 φαίνονται οι ενισχυμένες αλληλουχίες του HIF-1α έπειτα από ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης. Τα μεγέθη των αλληλουχιών του HIF-1α που ενισχύθηκαν είναι 753 bp, 1041 bp, 1590 bp, 1956 bp και 2343 bp.



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών του HIF-1α που ενισχύθηκαν με χρήση των εκκινητών HIF-1α-N-B, H251R, H347R, H530R, H652R, H781R



Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA

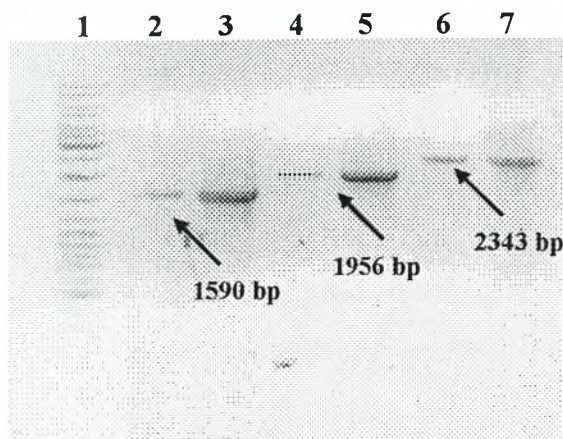
Διαδρομή 2: Ενίσχυση με Vent του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H251R

Διαδρομή 3: Ενίσχυση με Taq του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H251R

Διαδρομή 4: Ενίσχυση με Vent του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H347R

Διαδρομή 5: Ενίσχυση με Taq του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H347R

Εικόνα 14: Με PCR παρήχθησαν τα αναμενόμενα τμήματα της αλληλουχίας του HIF-1α. Στις διαδρομές 2 και 4 φαίνονται τα ενισχυμένα τμήματα του HIF-1α μήκους 753 και 1041 bp αντίστοιχα χρησιμοποιώντας τους ανάστροφους εκκινητές H251R και H347R. Τα ίδια τμήματα ενισχύθηκαν και με Taq πολυμεράση όπως φαίνεται στις διαδρομές 3 και 5.



Διαδρομή 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA
Διαδρομή 2: Ενίσχυση με VentI του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H530R
Διαδρομή 3: Ενίσχυση με Taq του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H530R
Διαδρομή 4: Ενίσχυση με VentI του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H652R
Διαδρομή 5: Ενίσχυση με Taq του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H652R
Διαδρομή 6: Ενίσχυση με VentI του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H781R
Διαδρομή 7: Ενίσχυση με Taq του τμήματος του HIF-1α με εκκινητή H781R

Εικόνα 15: Με PCR παράχθησαν τα αναμενόμενα τμήματα της αλληλουχίας του HIF-1α. Στις διαδρομές 2 και 4 και 6 φαίνονται τα ενισχυμένα τμήματα του HIF-1α μήκους 1590, 1956 και 2343 bp αντίστοιχα χρησιμοποιώντας τους αναστροφους εκκινητές H530R, H652R και H781R. Τα ίδια τμήματα ενισχύθηκαν και με Taq πολυμεράση όπως φαίνεται στις διαδρομές 3, 5 και 7.

Οι αλληλουχίες του HIF-1α που ενισχύθηκαν στο προηγούμενο πείραμα υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και κατόπιν υπέστησαν πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BamHI*.

Για λόγους ευκολίας τα τμήματα του HIF-1α που ενισχύθηκαν ονομάζονται ως εξής:

- Τμήμα 753 bp → #1
- Τμήμα 1041 bp → #2
- Τμήμα 1590 bp → #3
- Τμήμα 1956 bp → #4
- Τμήμα 2343 bp → #5

Ο πλασμιδιακός φορέας pBS-SK(+)

Ακολούθως επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBS-SK(+) για την εισαγωγή των αλληλουχιών του HIF-1α (ενθέσεις). Το πλασμίδιο pBS-SK(+) έχει μέγεθος 3 kb και περιέχει το γονίδιο *lacZ* που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση. Μέσα στην περιοχή του *lacZ* υπάρχουν πολλές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ένζυμο περιορισμού (multiple cloning site) και οι ενθέσεις εισάγονται σε αυτό το σημείο εμποδίζοντας την έκφραση λειτουργικής β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι όταν γίνεται μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* με pBS-SK(+) που προέρχεται από αντίδραση λιγάσης και τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με x-gal, τότε μπορεί να παρατηρηθεί ανάπτυξη μπλε και άσπρων αποικιών. Οι αποικίες που μας ενδιαφέρουν είναι αυτές με το άσπρο χρώμα καθώς υποδεικνύουν ότι η ένθεση έχει εισαχθεί

ανάμεσα στο γονίδιο *lacZ* παρεμποδίζοντας την έκφραση λειτουργικής β-γαλακτοσιδάσης.

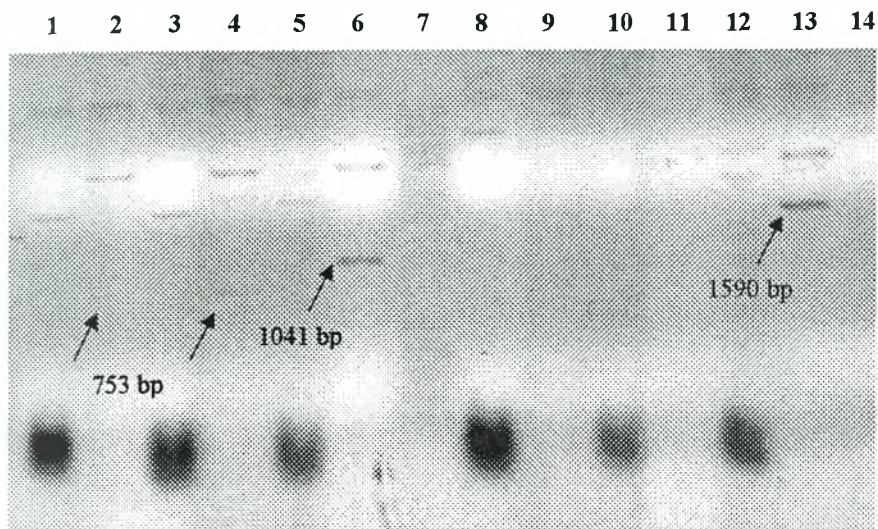
Το πλασμίδιο *pBS-SK(+)* πριν υποβληθεί σε αντίδραση λιγάσης με τις ενισχυμένες αλληλουχίες του *HIF-1α*, υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BamHI* (ο *pBS-SK(+)* διαθέτει μόνο μία αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου) και κατόπιν υποβλήθηκε σε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) για την αφαίρεση των 5' φωσφορικών ομάδων έτσι ώστε τα κολλώδη άκρα που δημιουργούνται με *BamHI* να μην επανασυνδεθούν.

Αντίδραση λιγάσης-Μετασχηματισμός σε *E.coli* Top10-Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας-Πέψη με *BamHI*

Πριν γίνει αντίδραση λιγάσης για τα κομμάτια του *HIF-1α* και το πλασμίδιο *pBS-SK(+)* έγινε ηλεκτροφόρηση γνωστών όγκων και των δύο για να γίνει ποσοτικοποίηση με εκτίμηση της φωτεινότητας που επιδεικνύουν οι ζώνες των διαφόρων κομματιών. Με την διαδικασία της ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν κατά προσέγγιση οι ποσότητες των ενθέσεων αλλά και του φορέα που θα λάμβαναν μέρος στην αντίδραση λιγάσης. Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης. Τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης εισήχθησαν σε κύτταρα *E.coli* Top10 με μετασχηματισμό και έγινε επίστρωση σε τρυβλία *LB_{amp}-x-gal*. Την άλλη μέρα μετρήθηκαν οι αποικίες:

	Στέλεχος #1	Στέλεχος #2	Στέλεχος #3	Στέλεχος #4	Στέλεχος #5	Control
Μπλε αποικίες	25	7	12	3	16	2
Άσπρες αποικίες	19	9	1	4	7	-

Από τις άσπρες αποικίες μεταφέρθηκαν 2 από το στέλεχος #1 (1α και 1β), 3 από το στέλεχος #2 (2α, 2β και 2γ), 1 από το στέλεχος #3 (3α), 3 από το στέλεχος #4 (4α, 4β και 4γ) και 3 από το στέλεχος #5 (5α, 5β και 5γ) για εμβολιασμό καλλιέργειών με θρεπτικό υλικό *LB_{amp}* με σκοπό την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού *BamHI* για να ελεγχθεί αν όντως υπάρχει η ένθεση στον πλασμιδιακό φορέα. Τα αποτελέσματα της πέψης με *BamHI* φαίνονται στις εικόνες 16 και 17.



Διαδρομές 1,3,5,8,10,12: Άκοπο πλασμίδιο από κλώνους #1α, 1β, 2α, 2β, 2γ και 3α σε αντίστοιχες διαδρομές

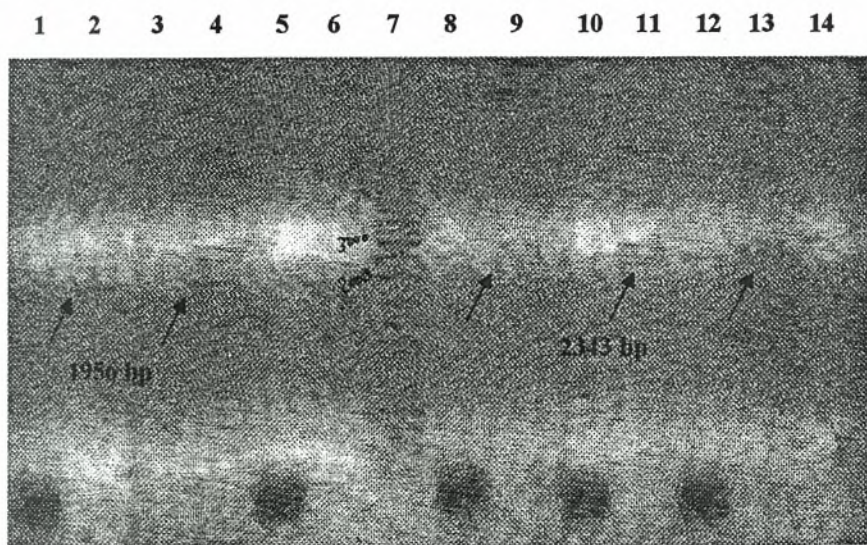
Διαδρομές 2,4,6,9,11,13: Πέψη των πλασμιδίων με *Bam*HI από κλώνους κλώνους #1α, 1β, 2α, 2β, 2γ και 3α σε αντίστοιχες διαδρομές

Διαδρομή 7: Δείκτης μοριακών βαρών DNA

Διαδρομή 8: Άκοπο pBS-SK(+)

Εικόνα 16: Παραγωγή πλασμιδίων pBS που φέρουν τμήματα αλληλουχίας HIF-1α. Έπειτα από πέψη πλασμιδιακού DNA από mini preparation με *Bam*HI στις διαδρομές 2 και 4 είναι ορατές δύο αδύναμες ζώνες γύρω στις 753 bp πράγμα που σημαίνει ότι η ένθεση #1 έχει εισαχθεί στους κλώνους 1α και 1β. Στη διαδρομή 6 φαίνεται η ζώνη στις 1041 bp και επομένως η ένθεση #2 έχει εισαχθεί στον κλώνο 2α. Στη διαδρομή 13 είναι ορατή η ζώνη στις 1590 bp υποδεικνύοντας ότι η ένθεση #3 έχει εισαχθεί στον κλώνο 3α.

Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 16 και 17 η εισαγωγή της ένθεσης στο φορέα ήταν επιτυχής για τους κλώνους 1α, 1β, 2α, 3α, 4α, 4β, 5α, 5β και 5γ καθώς στα προϊόντα της πέψης με *Bam*HI εμφανίζονται οι ενθέσεις στα αναμενόμενα μεγέθη όπως αυτά φάνηκαν μετά την PCR αντίδραση. Αυτό που θα πρέπει να γίνει στη συνέχεια είναι η εύρεση του προσανατολισμού με τον οποίο εισήχθη η ένθεση (θετικού ή αρνητικού).



Διαδρομές 1,3,5,8,10,12: Άκοπο πλασμίδιο από κλώνους #4α, 4β, 4γ, 5α, 5β και 5γ σε αντίστοιχες διαδρομές

Διαδρομές 2,4,6,9,11,13: Πέψη των πλασμιδίων με *Bam*HI από κλώνους κλώνους #4α, 4β, 4γ, 5α, 5β και 5γ σε αντίστοιχες διαδρομές

Διαδρομή 7: Δείκτης μοριακών βαρών DNA

Διαδρομή 8: pBS-SK(+) κομμένος με *Bam*HI

Εικόνα 17: Παραγωγή πλασμιδίων pBS που φέρουν τμήματα αλληλουχίας HIF-1α. Έπειτα από πέψη πλασμιδιακού DNA από mini preparation με *Bam*HI στις διαδρομές 2 και 4 είναι ορατές δύο ζώνες στις 1950 bp πράγμα που σημαίνει ότι η ένθεση #4 έχει εισαχθεί στους κλώνους 4α και 4β. Στη διαδρομές 9, 11 και 13 φαίνονται οι ζώνες στις 2343 bp και επομένως οι ενθέσεις #5 έχουν εισαχθεί στους κλώνους 5α, 5β και 5γ.

Συζήτηση

Ο HIF-1 είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν ανακαλυφθεί τα τελευταία 15 χρόνια και οι συνεχείς έρευνες γύρω από αυτόν έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αντιλαμβάνονται την παρουσία ή απουσία του οξυγόνου και αντιμετωπίζουν την έλλειψή του. Ο HIF-1 παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της κυτταρικής έλλειψης οξυγόνου ενεργοποιώντας μια σειρά γονιδίων -μέχρι στιγμής ο HIF-1 εμπλέκεται άμεσα στην επαγωγή της έκφρασης 60 περίπου γνωστών γονιδίων- που εμπλέκονται άμεσα σε διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση και η γλυκόλυση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή της έκφρασης αυτών των γονιδίων είναι ο διμερισμός των δύο υπομονάδων του HIF-1, HIF-1α και ARNT, η είσοδός τους στον πυρήνα και η πρόσδεσή του διμερούς σε ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στην υποξία τα HREs (*Semenza et al., 1997; Wang et al., 1995*). Οι αλληλουχίες αυτές ανιχνεύονται στις προσκείμενες περιοχές των γονιδίων που επάγονται από τον HIF-1. Όσον αφορά τη ρύθμιση του HIF-1, αυτή γίνεται σε τρία επίπεδα που αφορούν τον HIF-1α (ο ARNT εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα): πρωτεόλυσης του HIF-1α μέσω του μονοπατιού ουβικουιτινώσεως, απώλειας της μεταγραφικής του ενεργότητας και τέλος σε επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης του HIF-1α.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή του HIF-1 στην ογκογένεση. Σε πολλές καρκινικές σειρές κυττάρων έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα του HIF-1 και έχουν να κάνουν με την προσπάθεια της επιβίωσης των ταχύτατα πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων καθώς η αιμάτωση και η οξυγόνωση σε αυτές τις περιοχές είναι ελλιπής. Ακόμη έχει δειχθεί ότι ο HIF-1 μπορεί να προάγει την διεισδυτικότητα και την αθανασία των καρκινικών κυττάρων (*Semenza G., 2003*).

Όλα τα παραπάνω κάνουν φανερή την προοπτική της χρησιμοποίησης του HIF-1 ως στόχο αντικαρκινικής θεραπείας με την αναστολή του από διάφορες ουσίες είτε χημικές, είτε βιολογικές.

Ωστόσο, ο τρόπος που ελέγχεται η έκφραση του HIF-1 είναι πολύπλοκος και ενέχει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Σε αυτή την εργασία επιχειρήθηκε με επιτυχία η εισαγωγή του ανθρώπινου HIF-1 στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* από τον οποίο φυσιολογικά απουσιάζει. Έτσι εισάγοντας στο *S.cerevisiae* με τη

βοήθεια πλασμιδιακών φορέων τις δύο υπομονάδες του HIF-1 αλλά και μερικές επαναλήψεις των αλληλουχιών HREs σε ένα γονίδιο αναφοράς (lacZ) ελέγχθηκε η έκφραση του HIF-1 αλλά και η λειτουργικότητα του συστήματος.

Πρώτα έγινε μια προσπάθεια ελέγχου λειτουργικότητας του συστήματος χρησιμοποιώντας μια εποπτική μέθοδο διάκρισης στελεχών ζύμης που εκφράζουν λειτουργικό HIF-1 από στελέχη που δεν είναι λειτουργικός. Αυτή η μέθοδος βασίστηκε στην επίστρωση στελεχών του *S.cerevisiae* που περιέχουν διάφορους συνδυασμούς πλασμιδίων (σελίδα 35) σε τρυβλία που περιέχουν x-gal. Όπως παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μπλε χρώματος είναι ορατή μόνο για το στέλεχος που περιέχει τον HIF-1α, τον ARNT και το HRE-6x. Αυτό σημαίνει πως η παρουσία των τριών αυτών παραγόντων είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη της λειτουργικότητας του συστήματος. Επομένως η ενεργοποίηση της λειτουργίας του συστήματος του HIF-1 είναι πάντα εξαρτώμενη των HREs και επιπλέον ούτε ο HIF-1α μόνος του, ούτε ο ARNT δεν είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν την έκφραση του γονιδίου αναφοράς μέσω της πρόσδεσής στους στα HREs. Κατά αυτόν τον τρόπο αποκλείεται και η πιθανότητα να σχηματίζονται λειτουργικά ομοδιμερή είτε του HIF-1α, είτε του ARNT, κάτι που έχει δειχθεί και σε πρόσφατη βιβλιογραφία (*Chachami et al., 2005*).

Κατόπιν για να δειχθεί με εξειδικευμένο τρόπο η έκφραση των δύο υπομονάδων του HIF-1 έγινε ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Πράγματι παρατηρήθηκε η εμφάνιση και των δύο πρωτεϊνών (εικόνες 11 και 12) στα περισσότερα χρονικά σημεία που έγινε επαγωγή της έκφρασης του συστήματος με γαλακτόζη αλλά και με χρήση θρεπτικού υλικού με ραφινόζη πριν την επαγωγή με γαλακτόζη. Μάλιστα η εμφάνιση του HIF-1α γίνεται δύο ώρες νωρίτερα με χρήση ραφινόζης (4^η ώρα) σε σύγκριση με τη μη χρήση της (εμφάνιση κατά την 6^η ώρα σε χαμηλά επίπεδα). Ωστόσο είναι περίεργο το γεγονός ότι στην εικόνα 12 ο HIF-1α εξαφανίζεται κατά την 6^η ώρα και ίσως οφείλεται σε κάποιο πειραματικό σφάλμα. Όσον αφορά τον ARNT αυτός εμφανίζεται από την 8^η έως και την 24^η ώρα χωρίς τη χρήση ραφινόζης, ενώ με χρήση της εμφανίζεται ήδη από τη 2^η ώρα και διατηρείται η έκφραση και ως την 24^η. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η χρήση της ραφινόζης επιταχύνει την έκφραση των δύο υπομονάδων όταν χρησιμοποιείται αντί της γλυκόζης πριν την επαγωγή με γαλακτόζη.

Όσον αφορά τον έλεγχο της λειτουργικότητας του συστήματος διενεργήθηκε η δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση κωδικοποιείται από

το γονίδιο *lacZ* (στο πείραμά μας αποτελεί το γονίδιο αναφοράς) και του οποίου ενεργοποιείται η έκφραση όταν ο HIF-1 προσδένεται στα HREs που βρίσκονται πριν από αυτό. Έτσι εκμεταλλευόμενοι τη χρωματική αντίδραση που δίνει η β-γαλακτοσιδάση όταν διασπά το υπόστρωμα ONPG υπολογίστηκαν οι μονάδες του ενζύμου. Σύμφωνα με αυτές και όπως φαίνεται από τα γραφήματα 1 και 2, παρατηρείται αύξηση των μονάδων του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης κατά τη διάρκεια του χρόνου επαγωγής από γαλακτόζη. Επίσης παρατηρείται ότι οι μονάδες φτάνουν στο μέγιστο κατά την 16^η και τη 12^η ώρα στα γραφήματα 1 και 2 αντίστοιχα και παρατηρείται σημαντική μείωση κατά την 24^η ώρα. Το τελευταίο δεδομένο είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι καλλιέργειες επαγωγής από τη 16^η και τη 12^η ώρα αντίστοιχα και μέχρι την 24^η έφτασαν σε στατική φάση και τα κύτταρα προτίμησαν να μειώσουν τη λειτουργία του συστήματος καθώς είναι προφανές ότι θα σπαταλά πολύτιμη ενέργεια. Επιπλέον μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η χρήση της ραφινόζης πριν την επαγωγή με γαλακτόζη επιταχύνει τη λειτουργικότητα του συστήματος σε σχέση με τη μη χρήση ραφινόζης. Συγκεκριμένα με χρήση ραφινόζης η αύξηση των μονάδων του ενζύμου αρχίζει κατά τη 4^η ώρα, ενώ χωρίς ραφινόζη η αύξηση αρχίζει μετά την 8^η ώρα. Ακόμη επαληθεύονται και τα συμπεράσματα που αναφέρθηκαν από τη χρήση της εοπτικής μεθόδου με τα τρυβλία που περιείχαν x-gal καθώς κατά τη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης συμπεριλήφθηκαν και στελέχη ελέγχου (όπως αυτά αναφέρονται στη σελίδα 38). Έτσι είναι φανερό από τα γραφήματα 1 και 2 ότι τα επίπεδα της λειτουργικότητας στα στελέχη ελέγχου είναι αμελητέα έως και μηδαμινά σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται για το στέλεχος που περιέχει το πλήρες σύστημα.

Εφόσον λοιπόν διαπιστώθηκε η επιτυχημένη λειτουργία του συστήματος του HIF-1 σε *S.cerevisiae* το επόμενο βήμα θα ήταν η εισαγωγή στο σύστημα αυτό ενός τρίτου πλασμιδίου που να περιέχει την γονιδιακή αλληλουχία κάποιου πρωτεϊνικού παράγοντα ώστε να μελετηθεί το πώς επιδρά πάνω στη λειτουργία του HIF-1α. Για το λόγο αυτό και δεδομένου ότι υπάρχουν πληροφορίες στη βιβλιογραφία για την αναστολή του HIF-1α από ισομορφές του (IPAS) (Makino *et al.*, 2002), έγινε η ενίσχυση αλληλουχιών διαφόρων τμημάτων του γονιδίου του HIF-1α και η εισαγωγή τους σε πλασμιδιακούς φορείς pBS-SK(+). Η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής καθώς ανιχνεύθηκαν όλες οι ενθέσεις έπειτα από πέψη του κλωνοποιημένου φορέα με περιοριστικά ένζυμα. Αυτό που μένει να γίνει είναι ο καθορισμός του προσανατολισμού με τον οποίο έχει εισαχθεί η ένθεση και τελικός στόχος είναι η

εισαγωγή των ενθέσεων σε πλασμιδια pBEVY-GU, που αποτελούν φορείς έκφρασης σε κύτταρα σακχαρομύκητα .

Η είσοδος των πλασμιδίων αυτών στο σύστημα του σακχαρομύκητα που ήδη περιέχει τον HIF-1 και τα HREs θα δώσει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση τμημάτων αλληλουχιών του HIF-1α πάνω στο HIF-1 και πιο συγκεκριμένα θα μελετηθεί ποια από τα τμήματα αυτά επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τόσο την έκφραση όσο και τη λειτουργικότητα του HIF-1.

Βιβλιογραφία

- Berra, E. *et al.*, (2003), HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082–4090 This paper provides genetic evidence for the crucial importance of PHD2 in setting the oxygenated levels of HIF1 α .
- Berra, E. *et al.*, (2000), Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1171–1178
- Bottaro D., Liotta L., (2003), Out of air is not out of action, *Nature*, 423:593-595
- Braliou G.G., E. Venieris and G. Simos, 2004, The Human hypoxia Inducible factor (hif-1) Heterodimer is active in yeast: The Basis of a Bioassay for Identification of Anticancer Agents. Proceedings of the 56th Meeting, Newsletter 51.
- Bruick, R. K. & McKnight, S. L., (2001), A conserved family of prolyl-4hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337–1340
- Bunn HF, Poyton RO., (1996), Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 76:839–85.
- Chachami G, Paraskeva E., Georgatsou E., Bonanou S., Simos G., (2005), Bacterially produced human HIF-1 α is competent for heterodimerization and specific DNA-binding, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331 464–470
- Chachami G., Simos G., Hatziefthimiou A., Bonanou S., Molyvdas P., Paraskeva E., (2004), Cobalt induces HIF-1 α expression in ASM cells by a ROS and PI3K dependent mechanism, *Am J Respir Cell Mol Biol.*, Nov;31(5):544-51
- Chen, C. H., Pore, N., Behrooz, A., Ismail, B.-F. & Maity, A., (2001), Regulation of GLUT1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525
- Chen, E. Y., Mazure, N. M., Cooper, J. A. & Giaccia, A. J. (2001), Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* 61, 2429–2433
- Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A. & Debatisse, M., (1998), A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol. Cell*, 2, 259–265
- Czyzyk-Krzeska MF., (1997), Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Respir Physiol*, 110: 99–111.
- Dang, C. V. & Semenza, G. L., (1999), Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24, 68–72
- Denko, N. *et al.* Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 6, 480–487 (2000).
- Dery Marc-Andre C., Maude D. Michaud, Darren E. Richard, (2005), Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37 535–540
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ., (2001), C. elegans EGL-9 and mammalian

homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107:43-54

- Fukuda R. (2002), Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 277:38205-11
- Harris A.L., (2001), Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth, *Nature Reviews*, 2:38-47
- Hellwig-Bürigel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W., (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 94:1561-7
- Hewitson KS, Mcneil LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM., (2002), Hypoxia inducible factor asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, 277:26351-5
- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY., (2002), Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature*, 417:975-8
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM. Bunn HF., (1996), Activation of HIF depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, 271:32253-9
- Jennens R.R., Rosenthal M.A., Lindeman G.J., Michael M., (2004) Complete radiological and metabolic response of metastatic renal cell carcinoma to SU5416 in a patient with probable von Hippel-Lindau syndrome, *Urologic Oncology*, 22:193-196
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW., (2002), Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111:709-20
- Jewell UR, Kveitikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. , (2001), Induction of Hif-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*, 15:1312-4
- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, Mcguire J, Poellinger L., (1997), Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5667-72
- Koong, A. C. *et al.*, (2000), Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 60, 883–887
- Lal, A. *et al.*, (2001), Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J. Natl Cancer Inst.* 93, 1337–1343
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML., (2002), Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain. *Science*, 295:858-61
- Laughner E., (2001), HRE2 signaling increases the rate of HIF-1 α synthesis: novel mechanism for HIF-1 mediated VEGF expression. *Mol Cell Biol*, 21:3995-4004
- Li H, Ko HP, Whitlock JP., (1996), Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1alpha. *J Biol Chem* , 271:21262-7
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L., (2001), Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414:550-4

- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L., (2002), Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem*, 277:32405–8.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ., (2001), Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, 20:5197-206
- Maxwell, P. H. *et al.*, (1999), The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275
- Mazurek, S., Boschek, C. B. & Eigenbrodt, E., (1997), The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 315–330
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP., (2002), Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signalling. *Science* 296:1886-9
- Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J., (2002), Carboxylterminal transactivation activity of hypoxia inducible factor 1 is governed by a VHL protein independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol*, 22: 2984-92
- Seagroves, T. N. *et al.*, (2001), Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3436–3444
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al., (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1., *Kidney Int* 51:553–5
- Seimiya, H. *et al.*, (1999), Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 365–370
- Semenza GL., (2002), HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics., *Trends Mol Med*, 8:S62-7
- Semenza GL., (2003), Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:721-32
- Semenza G., (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nature reviews*, 3:721-732
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. (1991). Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5680-84
- Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW., (2001), Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy, *Gene Ther* , 8:638–45.
- Tian H, Mcknight SL, Russel DW. (1997) , Endothelial PAS domain protein 1, a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes Dev* 11:72-82
- Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L. & Ratcliffe, P. J., (2000), Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel–Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling, *Oncogene* 19, 6297–6305
- Yeo Eun-Jin, Yang-Sook Chun, Jong-Wan Park, (2004) New anticancer strategies targeting HIF-1, *Biochemical Pharmacology*, 68:1061–1069

- Zhong, H. *et al.*, (1999), Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59, 5830–5835
- Zhong H., (2000) , Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res* 260:1541-5
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ., (2000), Loss of PTEN facilitates HIF-1- mediated gene expression, *Genes Dev* 14:391-6