

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-
1α ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ Myo ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΟΥ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ Rho GTPασες, MgcRacGAP**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΑΠΑΧΡΗΣΤΟΣ

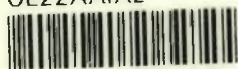
ΛΑΡΙΣΑ 2009



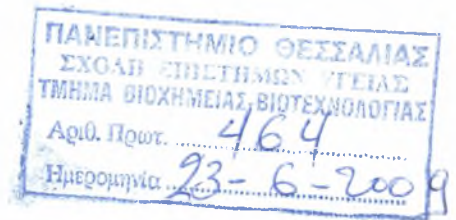
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7374/1
Ημερ. Εισ.: 21-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087208



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ
ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1 α ΜΕ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ Myo ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ Rho
GTPασες, MgcRacGAP**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΑΠΑΧΡΗΣΤΟΣ

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Γεωργάτσου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια
Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή: Γεωργάτσου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια
Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος
Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας του
τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ε. Γεωργιάδου

Ευχαριστώ θερμά:

Την κα. Ελένη Γεωργιάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας για όλα όσα μου διδάξε και για τη συμπαράσταση σε κάθε στάδιο της διπλωματικής εργασίας.

Την κα. Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, για τη δυνατότητα διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.

Την κα. Μαρία Κοντού, Λέκτορα Κλινικής Χημείας, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.

Τον κ. Γεώργιο Σίμο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, για την παραχώρηση της άδειας χρησιμοποίησης του συστήματος YASH.

Τον κ. Ηλία Μυλωνή, Διδάσκων 407 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Την κα. Αγγελική Λυμπεροπούλου, Διδάσκουσα 407 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Την κα. Γεωργία Μπράλιου, Μεταδιδακτορική Υπότροφο, για τα υλικά και τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεργασία και την φιλική τους διάθεση.

Περιεχόμενα

	Σελ.
▪ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
▪ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5-13
➢ Η πρωτεΐνη HIF-1.....	5
➢ Η δομή του HIF-1α.....	5
➢ Η δομή του HIF-1β.....	6
➢ Ρύθμιση του HIF-1α.....	6
• Από φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία).....	6
• Από μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία).....	7
• Από χημικές ουσίες.....	7
• Από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια.....	8
➢ HIF-1α και καρκίνος.....	9
➢ Ο HIF-1α ως στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων.....	9
➢ Μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α.....	10
➢ Δομή και λειτουργία της MgcRacGAP.....	10
▪ ΣΚΟΠΟΣ.....	14
▪ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15-26
➢ Υλικά	
• Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης.....	15
• Θρεπτικά υλικά.....	16
• Μάρτυρες μοριακών βαρών.....	17
➢ Μέθοδοι	
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	17
• Απομόνωση και καθαρισμός DNA από την πηκτική αγαρόζης με τη μέθοδο "GEL EXTRACTION" της QIAGEN.....	18
• Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.....	19
• Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	19
• Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (<i>E.coli</i>) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA.....	19
• Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase).....	20
• Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης).....	20
• Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (<i>E.coli</i> transformation).....	21
• Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (mini preparation).....	21
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit.....	21
• Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T ή HeLa.....	22
• Μέτρηση δράσης της λουσιφεράσης.....	23
• Φθορισμός.....	23
• Ανοσοφθορισμός.....	23
• Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	23
• Μετασχηματισμός <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
• Επαγωγή της έκφρασης και δράσης του HIF-1 από τη γαλακτόζη.....	25
• Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης.....	25
▪ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27-44
➢ Απομόνωση του cDNA της περιοχής 1-138 της MgcRacGAP με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	27
• Καθαρισμός της περιοχής IMyo και πέψη με BamHI.....	27
➢ Κλωνοποίηση της περιοχής IMyo στο πλασμιδιακό φορέα pEGFP.....	28
• Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pEGFP για την αντίδραση σύνδεσης.....	28
• Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pEGFP/BamHI/CIP με την περιοχή IMyo/BamHI.....	29
• Μετασχηματισμός των κυττάρων <i>E.coli</i> με τα προϊόντα της σύνδεσης.....	29
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation).....	29
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midi preparation).....	30

➤ Έλεγχος της δράσης της pEGFP-IMyo στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 σε κύτταρα HEK 293T.....	31
• Επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T για 48 h και επαγωγή του HIF-1 με DMOG.....	31
• Επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T για 24 h και επαγωγή του HIF-1 με DMOG.....	32
➤ Παρατήρηση της έκφρασης της GFP-Myo σε κύτταρα HEK 293T με μικροσκόπιο φθορισμού..	33
➤ Κλωνοποίηση της περιοχής IMyo στο πλασμιδιακό φορέα pCMV-FLAG.....	34
• Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pCMV-FLAG για την αντίδραση σύνδεσης	34
• Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pCMV-FLAG/BamHI/CIP, με την περιοχή IMyo/BamHI.....	35
• Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης.....	35
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας.....	35
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας.....	36
➤ Παρατήρηση της FLAG-IMyo σε κύτταρα HeLa με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.....	36
➤ Ανίχνευση της FLAG-IMyo σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa με ανοσοαποτύπωση.....	37
➤ Κλωνοποίηση της περιοχής IMyo στους πλασμιδιακούς φορείς pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST.....	38
• Προετοιμασία των πλασμιδιακών φορέων pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST για την αντίδραση σύνδεσης.....	38
• Αντίδραση σύνδεσης των φορέων pBEVY-GU-GFP/BamHI/CIP και pBEVY-GU-GST/BamHI/CIP, με την περιοχή IMyo/BamHI.....	39
• Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης.....	39
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας για τον pBEVY-GU-GFP.....	39
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας.....	40
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας για τον pBEVY-GU-GST.....	40
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας.....	41
➤ Μετασχηματισμός των κυττάρων σακχαρομύκητα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	41
➤ Επίδραση της GFP-IMyo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης	42
➤ Επίδραση της GST-IMyo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης	43
▪ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	45-47
▪ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48-49
▪ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50-53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 αποτελεί έναν ετεροδιμερή παράγοντα που αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β) εκ των οποίων η μία (α) ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου. Ρυθμίζει την έκφραση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων σαν απόκριση στην υποξία, που σχετίζονται με την ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, το μεταβολισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αποτελεί πιθανό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας, καθώς συχνά αυξάνεται σημαντικά κατά την ογκογένεση και σχετίζεται με κακή πρόγνωση σε διάφορα είδη καρκίνων.

Ο HIF-1 αλληλεπιδρά με πληθώρα μορίων, ένα εκ των οποίων είναι και η πρωτεΐνη MgcRacGAP. Ο HIF-1α συνδέεται άμεσα με την περιοχή Myo της MgcRacGAP. Η MgcRacGAP είναι μια GAP πρωτεΐνη η οποία παίζει ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών RhoA, Rac1 και cdc42, συμμετέχοντας έτσι στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της κυτοκίνησης κατά τη μίτωση. Όταν η MgcRacGAP υπερεκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών, καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 έως και 80%. Για την καταστολή είναι απαραίτητη η περιοχή Myo, διότι όταν αυτή απαλειφθεί από το μόριο της MgcRacGAP, η καταστολή δεν παρατηρείται πλέον (Lyberopoulou *et al.* 2007).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετασθεί κατά πόσον η περιοχή Myo της MgcRacGAP, αποκομμένη από το υπόλοιπο μόριο, είναι ικανή να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Γι' αυτό το σκοπό το cDNA που κωδικοποιεί για την περιοχή Myo κλωνοποιήθηκε σε φορείς έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών προκειμένου να παραχθούν οι πρωτεΐνες GFP-Myo και FLAG-Myo και να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa και HEK293T με τα πλασμίδια που παράγουν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Αποδείχθηκε, με μικροσκοπία φθορισμού για την GFP-Myo και με ανοσοφθορισμό και την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης για την FLAG-Myo, ότι οι δύο χιμαιρικές πρωτεΐνες δεν είναι δυνατόν να εκφραστούν σε αυτά τα κύτταρα.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένα ετερόλογο σύστημα όπου ο HIF-1 εκφράζεται, είναι ενεργός και η ενεργότητά του είναι μετρήσιμη σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.) (σύστημα YASH) (Braliou *et al.* 2006). Για το σκοπό αυτό το cDNA της περιοχής Myo κλωνοποιήθηκε σε φορείς έκφρασης σε κύτταρα S.c. προκειμένου να παραχθούν οι πρωτεΐνες GFP-Myo και GST-Myo και να ελεγχθεί η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα S.c. μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια που τις εκφράζουν. Πράγματι, τα αποτελέσματα της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP-Myo αλλά και της πρωτεΐνης GST-Myo ανεξάρτητα, δείχνουν ότι η περιοχή Myo είναι ικανή να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 κατά τουλάχιστον 50%. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι η άμεση αλληλεπίδραση της περιοχής Myo της MgcRacGAP με την υπομονάδα HIF-1α είναι υπεύθυνη για την μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E. (2007). "MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity." *Cell Physiol Biochem* **20**(6):995-1006

Braliou GG, Venieris E, Kalousi A, Simos G. (2006). "Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1 α effectors." *Biochem Biophys Res Commun*. **346**(4): 1289-96.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη HIF-1

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ανακαλύφθηκε με την αναγνώριση μιας ειδικής αλληλουχίας DNA (5'-RCGTG-3'), η οποία ονομάζεται στοιχείο απόκρισης στην υποξία HRE (Hypoxia Response Element) και βρέθηκε στον 3' ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, μιας ορμόνης που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ερυθροκυττάρων και υφίσταται μεταγραφή επαγόμενη από την υποξία (Goldberg *et al.* 1988, Semenza *et al.* 1991).

Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από την υπομονάδα β (HIF-1β) που εκφράζεται συνέχεια και την υπομονάδα α (HIF-1α) που υπόκειται συνεχώς σε αποικοδόμηση κατά τη νορμοξία (21% O₂), ενώ σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών basic helix-loop-helix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) (Wang *et al.* 1995). Έχουν αναγνωρισθεί τρεις ισομορφές της υπομονάδας α του HIF: ο HIF-1α, ο HIF-2α (επίσης γνωστός σαν EPAS-1, MOP2, HLF και HRF) και ο HIF-3α.

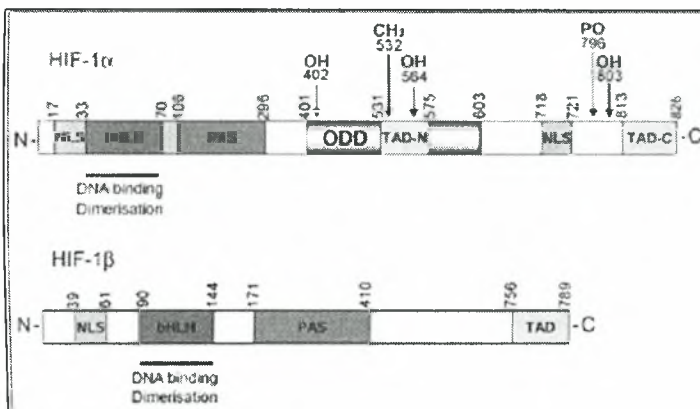
Η δομή του HIF-1α

Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και σχηματίζει ετεροδιμερές με τον HIF-1β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator) (Εικ. 1). Κατά την υποξία ο HIF-1α εμφανίζεται στον πυρήνα, μέσω ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη και ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού NLS (Nuclear Localization Signal). Ο HIF-1α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού τα N-NLS (17-74 αα) και C-NLS (718-721 αα) (Kallio *et al.* 1998). Επίσης, ο HIF-1α επανεξάγεται αποτελεσματικά στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρώντας με την εξπορτίνη CRM1 μέσω ενός σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα-NES (631-639 αα) που περιέχει. Παράλληλα, με ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση του NES, την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον διμερισμό του με τον ARNT και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της υποξίας (Mylonis *et al.* 2006, Mylonis *et al.* 2008). Ο HIF-1α διαθέτει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), την αποκαλούμενη αμινο-τελική N-TAD (αμινοξέα 531-575) και την καρβοξυ-τελική C-TAD (αμινοξέα 831-826), που εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό τμήμα του συνόλου του HIF-1α. Η περιοχή N-TAD αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή ODD (Oxygen Dependent Degradation) (αμινοξέα 401-603), από την οποία εξαρτάται η σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η περιοχή C-TAD αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων περιλαμβάνει διμερισμό των δύο υπομονάδων (α και β) και την πρόσδεση στα HREs που βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών (Semenza *et al.* 1997) (Εικ. 2). Τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που βρίσκονται στην αμινο-τελική περιοχή του

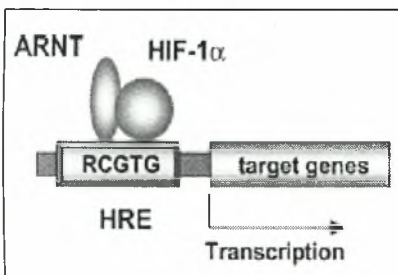
HIF-1α απαιτούνται για το διμερισμό με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs (Jiang et al. 1996). Πιο αναλυτικά, η περιοχή 17-30 αα αποτελεί αλληλουχία βασικών αμινοξέων, τα αμινοξέα 31-71 την περιοχή HLH και τα αμινοξέα 99-343 την περιοχή PAS, η οποία διακρίνεται στις υποπεριοχές PASA (99-209) και PASB (242-343) (Taylor & Zhoulin 1999).

Η δομή του HIF-1β

Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές 774 και 789 αμινοξέων. Κατά αντιστοιχία με τον HIF-1α στο αμινοτελικό άκρο υπάρχει η περιοχή διμερισμού και σύνδεσης με το DNA bHLH (90-144), PAS (171-410), ενώ στο καρβοξυτελικό υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD (756-789) η οποία όμως δεν χρειάζεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του HIF-1 (Εικ. 1) (Dery et al. 2005).



Εικ. 1 Στοιχεία για τη δομή των HIF-1α και HIF-1β.



Εικ. 2 Ο HIF-1α διμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στην ειδική αλληλουχία του DNA (HRE) και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων

Ρύθμιση του HIF-1α

▪ Από φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία)

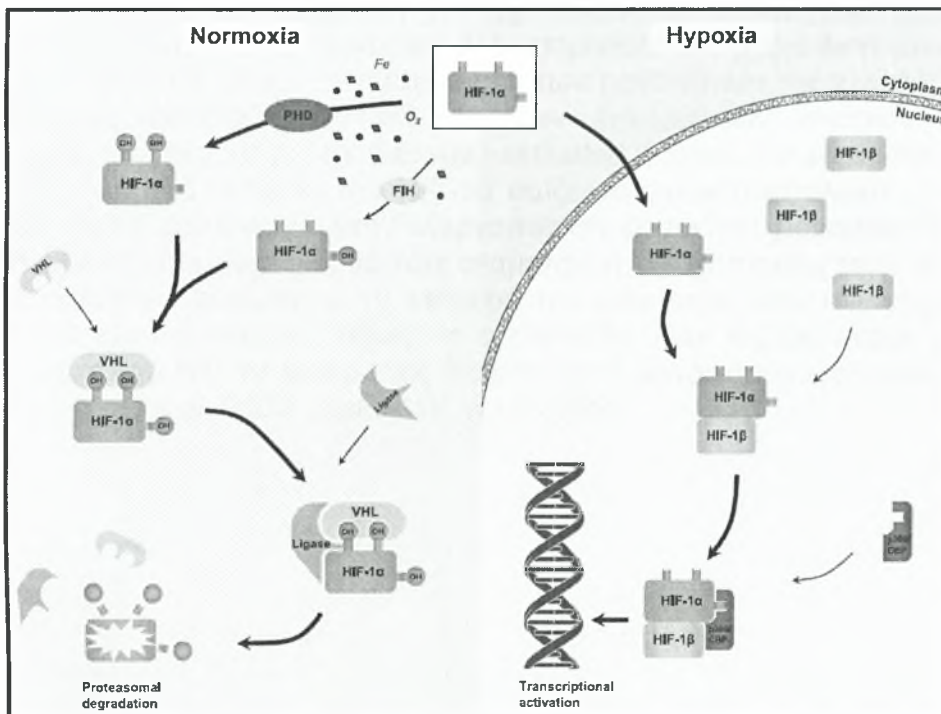
Παρουσία οξυγόνου ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων, ουβικουίτινιλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα. Η υδροξυλίωση αυτή συμβαίνει στις προλίνες 402 και 564 και πραγματοποιείται από τρία οξυγονο-εξαρτόμενα ένζυμα της οικογένειας των

πρόλυτο-υδροξυλασών (PHD 1-3) (Ivan 2001, Masson 2001). Απαραίτητη προϋπόθεση για την πλήρη υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs είναι η ύπαρξη σιδήρου, οξυγόνου και 2-οξογλουταρικού (Schofield & Ratcliffe 2004).

Ο υδροξυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (pVHL) που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου λιγάσης E3 της ουβικουΐτινης (Maxwell 1999, Ohh 2000). Έτσι ο HIF-1α αρχικά ουβικουΐτινιλιώνεται και στη συνέχεια πρωτεολύεται στο πρωτεάσωμα (Εικ. 3).

- **Από μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία)**

Σε αυτή την περίπτωση αναιρείται η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs λόγω έλλειψης οξυγόνου και αυτό οδηγεί στη σταθεροποίησή του καθώς η μη υδροξυλιωμένη του μορφή δεν αναγνωρίζεται από τον pVHL (Εικ. 3). Ο HIF-1α μπορεί να συνδεθεί με τον HIF-1β και να σχηματιστεί το σύμπλοκο HIF-1. Ο HIF-1 στην συνέχεια αναγνωρίζει και συνδέεται στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που περιέχουν τις αλληλουχίες HRE ενεργοποιώντας έτσι την έκφρασή τους. Σημαντικό ρόλο στη δράση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας έχει η ακετυλο-τρανσφεράση p300/CBP που είναι συνενεργοποιητής της μεταγραφής και αλληλεπιδρά με τον HIF-1α με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του (Hirota 2005).



Εικ. 3 Ρύθμιση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας

- **Από χημικές ουσίες**

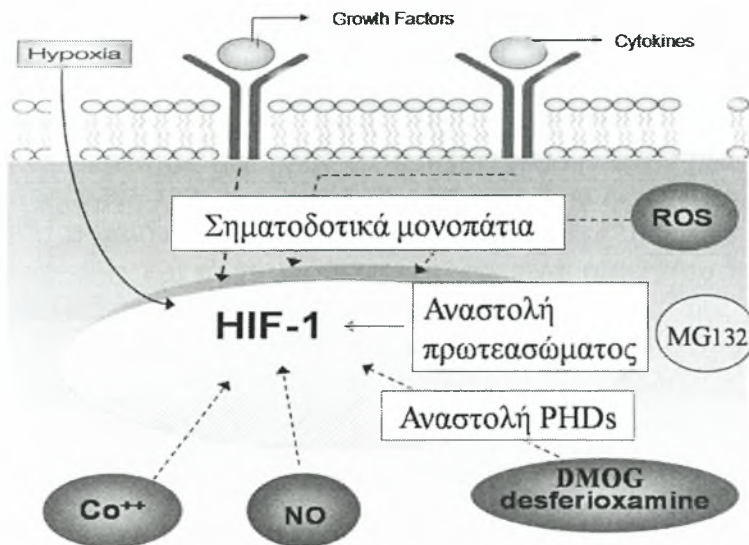
Εκτός από την υποξία ο HIF-1α επάγεται και σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου υπό την επίδραση διαφόρων ουσιών (Εικ. 4). Συγκεκριμένα ενώσεις οι οποίες προκαλούν αναστολή των πρόλυλο-υδροξυλασών (π.χ. DMOG: διμεθυλοξαλική γλυκίνη) οδηγούν στη σταθεροποίηση του HIF-1α εξαιτίας της μη υδροξυλίωσης και άρα της μη πρωτεόλυσής του από το πρωτεόσωμα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και διάφοροι χημικοί παράγοντες όπως η δεσφεριοξαμίνη (DFO) οι οποίοι δεσμεύουν τον Fe^{+2} που απαιτούν οι υδροξυλάσες του HIF-1α, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές.

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως διασθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο προκαλούν επαγωγή του HIF-1α (Wang *et al.* 1995). Είναι πολύ πιθανό το κοβάλτιο να δεσμεύει το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δράση των πρόλυλο-υδροξυλασών (Wang *et al.* 1995). Ενδέχεται ακόμη να αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α και να εμποδίζει την πρόσδεση του pVHL (Yuan *et al.* 2003) ή να δρα μέσω ενός τρίτου μηχανισμού που περιλαμβάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αύξηση της σύνθεσης του HIF-1α μέσω του μονοπατιού της PI3K και των MAPK (Chachami *et al.* 2004, Triantafyllou *et al.* 2006).

Τέλος, η χημική ουσία MG132 επάγει τον HIF-1α καθώς προκαλεί την αναστολή του πρωτεασώματος στο οποίο οδηγείται για να αποικοδομηθεί.

▪ **Από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια**

Σε αντίθεση με την υποξία, η διέγερση του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες επάγει την έκφρασή του με ιστοειδικό τρόπο. Επιπλέον οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια διεγείρουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK). Σημαντικό ρόλο στα επίπεδα του HIF-1α παίζει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN, το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση μέσω του μονοπατιού της PI3K. Όταν το PTEN είναι ενεργό τότε σταματάει η ενεργοποίηση του HIF-1α, με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδά του ενώ όταν είναι ανενεργό τα επίπεδα του είναι αυξημένα. Τέλος, το ογκογονίδιο Ras παίρνει μέρος στην ενεργοποίηση του HIF-1α μέσω ενός διαφορετικού μονοπατιού από αυτό της PI3K. (Zhong H. *et al.* 2000, Zundel W. *et al.* 2000)



Εικ. 4 Ρύθμιση του HIF-1 από υποξία, αυξητικούς παράγοντες και χημικές ουσίες

HIF-1α και καρκίνος

Η υπερέκφραση του HIF-1α βρέθηκε σε πλήθος διαφορετικών ανθρώπινων καρκίνων πιθανόν σαν αποτέλεσμα της υποξίας στο εσωτερικό των όγκων ή λόγω γενετικής εξαλλαγής (*Talks et al. 2000, Zhong et al. 1999*). Το εσωτερικό της μάζας του νεοσύστατου όγκου, το οποίο αυξάνει συνεχώς σε μέγεθος, γίνεται σταδιακά υποξικό μέχρις ότου να αποκτήσει επαρκή αιμοφόρα αγγεία και να αποκατασταθεί η αιμάτωση. Οι υποξικές συνθήκες στο εσωτερικό των όγκων μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη σταθερότητα και ενεργότητα του HIF-1. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι υπάρχουν ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε καλοήθεις όγκους, αυξημένα επίπεδα σε πρόωρα κακοήθεις όγκους και ένα ενδεικτικό ποσοστό σε μεταστάσεις όγκων σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς (*Harris 2002, Zhong et al., 1999*). Η έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF γενικά φαίνεται να συμβαδίζει με τα επίπεδα του HIF-1α.

Τα καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α όπως βρέθηκε στον καρκίνο του δέρματος, του προστάτη, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και των νεφρών (*Zhong H 1999*). Γενικά η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα σε πρώιμα στάδια καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σε ορισμένους τύπους καρκίνου του στήθους.

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυτό γίνεται όταν τα κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο και αρχίζουν να αποπίπτουν. (*Semenza GL 2002, Harris AL 2002, Semenza GL 2003*).

Ο HIF-1α ως στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων

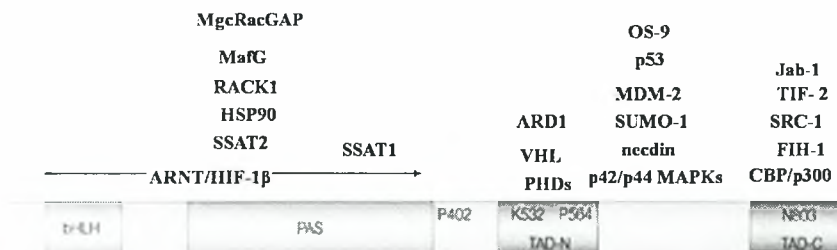
Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν τον HIF-1α στην αντιμετώπιση του καρκίνου στηρίζονται κυρίως στην αναστολή της επαγωγής ή της δράσης του ή στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του.

Φάρμακα που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αγγειογένεση χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές για την αντικαρκινική τους δράση (Semenza 2003). Ο λόγος είναι ότι η αναστολή της αγγειογένεσης επιλέγει τα καρκινικά κύτταρα που έχουν προσαρμοστεί σε συνθήκες υποξίας, καθώς αυτά τα κύτταρα μπορούν να ανταπεξέλθουν στην μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Από τις κλινικές δοκιμές έχει δειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που μπορούν και επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας είναι ανθεκτικά στην ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία και είναι αυτά που προκαλούν μεταστάσεις και τελικά τον θάνατο (Hockel M 2001). Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι ο HIF-1 προωθεί την ανθεκτικότητα των κυττάρων στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία (Unruh A 2003). Επομένως αναστολή της δράσης του HIF-1 θα μπορούσε να είναι ένας καλός συνδυασμός μαζί με κάποια αντι-αγγειογενετική θεραπεία.

Μια πληθώρα αναστολέων της λειτουργίας του HIF-1 χρησιμοποιούνται ήδη σαν αντικαρκινικά φάρμακα, ενώ οι έρευνες συνεχίζονται για την εύρεση ειδικών αναστολέων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλους αναστολείς που αντιμετωπίζουν συγκεκριμένα είδη καρκίνων και ασθενών.

Μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α

Η διαδικασία ενεργοποίησης του HIF-1α προϋποθέτει την μοριακή αλληλεπίδρασή του με διάφορες πρωτεΐνες. Μερικές από τις αλληλεπιδράσεις αυτές αναφέρθηκαν ήδη (βλ. HIF-1β, pVHL και CBP/p300). Ωστόσο ο HIF-1α αλληλεπιδρά άμεσα και με πολλές άλλες πρωτεΐνες (Εικ. 5), οι οποίες επηρεάζουν τη μεταγραφική του ενεργότητα, τον υποκυτταρικό του εντοπισμό, τη σταθερότητά του, ενώ κάποιες από αυτές έχουν λειτουργίες που ακόμα δεν γνωρίζουμε.



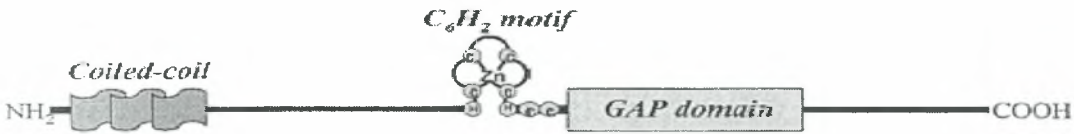
Εικ. 5 Πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα ο HIF-1α

Μία από αυτές είναι η MgcRacGAP, η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή 244-532 χωρίς όμως η βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης να είναι γνωστή.

Δομή και λειτουργία της MgcRacGAP

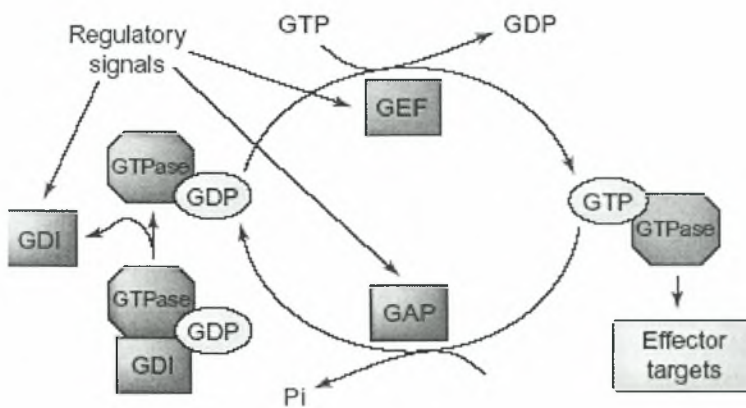
Η MgcRacGAP (Male Germ Cell Rac Gap) χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1998 και βρέθηκε ότι έχει ομολογία με το προϊόν rotundRacGAP της *Drosophila Melanogaster* (Gacon 1998). Αποτελείται από 632 αμινοξέα και η δομή της περιλαμβάνει μια περιοχή σπειρωμένου σπειράματος στο

αμινοτελικό της άκρο (41-124 αα), που παρουσιάζει ομοιότητα με τις μυοσίνες και γι' αυτό το λόγο αποκαλείται περιοχή Myo. Ακολουθεί μια περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (περιοχή Cys) (278-348 αα) που συνοδεύεται από την καταλυτική GAP περιοχή (362-617 αα) (Εικ. 6).



Εικ. 6 Η δομή της πρωτεΐνης MgcRacGAP. Στο αμινοτελικό άκρο φαίνεται η περιοχή σπειρωμένου σπειράματος Myo, ακολουθεί η περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου και η καταλυτική περιοχή GAP.

Η MgcRacGAP είναι μια GAP (GTPase Activating Protein) της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών. Οι GAPs είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με την GTP-συνδεόμενη μορφή των μικρών G πρωτεϊνών της οικογένειας Rho και ενεργοποιούν τη δράση τους. Έτσι ρυθμίζουν αρνητικά τη λειτουργία των Rho πρωτεϊνών προωθώντας τις στην ανενεργή GDP-συνδεόμενη μορφή τους (Εικ. 7). Η MgcRacGAP είναι GAP ειδική κυρίως για την G πρωτεΐνη Rac1 και σε μικρότερο βαθμό για την cdc42 (Gacon 1998). Οι πρωτεΐνες αυτές ευθύνονται κυρίως για το σχηματισμό λαμελιποδίων και φιλοποδίων αντίστοιχα, στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα μέλη της Rho οικογένειας έχει δείχθει ότι συμμετέχουν στην οργάνωση των συστατικών του κυτταροσκελετού, στη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και στις διακυτταρικές συνδέσεις (K.Kaibuchi 1999). Οι GAPs έχει δείχθει ότι λειτουργούν σαν μεταφορείς μηνυμάτων σε σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά κι ότι επηρεάζονται από διάφορα ενδοκυτταρικά μηνύματα (Mc Cormick 1989, Hall 1994).



Εικ. 7 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου των GTPασών. Η δράση των GTPασών ρυθμίζεται κυκλικά μεταξύ μιας ανενεργής GDP-συνδεόμενης μορφής και μιας ενεργής GTP-συνδεόμενης μορφής. Για την κυκλική αυτή δράση είναι απαραίτητη η συμμετοχή των GAPs (GTP Activating Proteins), των GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) και των GDIs (Guanine nucleotide dissociation Inhibitors). Οι απενεργοποιητές των GTPασών απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ενεργοποιητές με πράσινο.

Η MgcRacGAP δεν εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα αλλά με βάση πειράματα που έγιναν φαίνεται να εντοπίζεται και στον πυρήνα. Κατά

την ανάφαση διανέμεται στη μιτωτική άτρακτο, ενώ στο τέλος της τελόφασης βρίσκεται στο μεσόσωμα (midbody). Η κατανομή αυτή της MgcRacGAP οφείλεται στη σύνδεση της περιοχής Myo με τις α-, β- και γ-τουμπουλίνες (Hirose 2001).

Εκτός από τη δράση της στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η MgcRacGAP φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και για την ολοκλήρωση της κυτοκίνησης. Κατά την κυτοκίνηση η MgcRacGAP συνδέεται μέσω της περιοχής Myo με την κινεσίνη MKLP1 δημιουργώντας το σύμπλοκο της ατράκτου (centralspindlin complex), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτοκίνηση καθώς συσπειρώνει αντιπαράλληλες τουμπουλίνες, ρυθμίζει το σχηματισμό της αύλακας και προωθεί την αποκοπή της. Η περιοχή της MgcRacGAP στην οποία φαίνεται να συνδέεται η MKLP1 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-36. Έτσι σχηματίζεται το ετεροδιμερές MgcRacGAP-MKLP1 το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη δημιουργία όσο και στη σταθεροποίηση του συμπλόκου αυτού (Pavicic 2007).

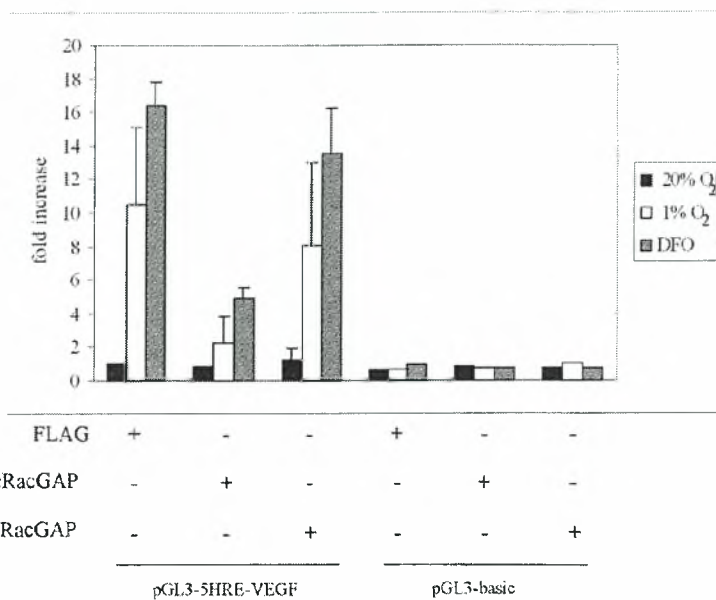
Κατά τη φάση M του κυτταρικού κύκλου η MgcRacGAP φωσφορυλιώνεται από την Aurora B στην σερίνη 387. Η τροποποίηση αυτή μεταβάλλει την δράση της σαν GAP, έτσι ώστε να αναγνωρίζει ως υπόστρωμα τη RhoA και όχι τη Rac1 και τη cdc42, γεγονός το οποίο φαίνεται να παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της κυτοκίνησης (Minoshima 2003).

Κατά συνέπεια, ποντίκια από τα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την MgcRacGAP πεθαίνουν πολύ νωρίς κατά την εμβρυακή ανάπτυξη (8η κυτταρική διαίρεση), λόγω ανώμαλων κυτταρικών διαιρέσεων. (Van de Putte 2001).

Τέλος, η MgcRacGAP παίζει το ρόλο της συνοδού-πρωτεΐνης για την εισαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων STAT3 και STAT5 στον πυρήνα μέσω του μονοπατιού των ιμφορτινών α/β. Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3, η MgcRacGAP και οι πρωτεΐνες Rac δημιουργούν ένα σύμπλοκο, το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στη μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 μέσα στον πυρήνα. Για το ρόλο συνοδού πρωτεΐνης της MgcRacGAP παίζει σημαντικό ρόλο το NLS της που βρίσκεται στην περιοχή 180-200 αα (Tonozuka 2004, Kawashima 2006, Kawashima 2009).

Η MgcRacGAP βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α τόσο σε κύτταρα θηλαστικών όσο και σε κύτταρα σακχαρομύκητα (Lyberopoulou et al 2007). Βρέθηκε συγκεκριμένα ότι η περιοχή της MgcRacGAP που είναι υπεύθυνη γι' αυτή την αλληλεπίδραση, είναι η περιοχή Myo. Σε πειράματα που έγιναν σε συνθήκες υποξίας αλλά και σε συνθήκες χημικής υποξίας (επαγωγή του HIF-1 με DFO) φάνηκε ότι η υπερέκφραση της MgcRacGAP αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α έως και 80%.

Αντίθετα, στην περίπτωση που λείπει η περιοχή Myo από την MgcRacGAP η αναστολή αυτή ουσιαστικά δεν παρατηρείται (Εικ. 8), υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας οφείλεται στην αλληλεπίδραση της MgcRacGAP με τον HIF-1α (Lyberopoulou et al. 2007).



Εικ. 8 Επίδραση των πρωτεϊνών MgcRacGAP και ΔMyo-MgcRacGAP στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α στις αναγραφόμενες συνθήκες (Lyberopoulou et al 2007)

ΣΚΟΠΟΣ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β) και παράγεται σε υψηλά επίπεδα όταν τα κύτταρα βρίσκονται κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή μιας πληθώρας γονιδίων, ενώ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο κατά την ογκογένεση και υψηλά επίπεδά του συσχετίζονται με κακή πρόγνωση σε διάφορα είδη καρκίνων.

Η MgcRacGAP είναι μια πρωτεΐνη με δύο τουλάχιστον γνωστές λειτουργίες. Εκτός από το ρόλο της στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών RhoA, Rac1 και cdc42 που παίζουν ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και στην ολοκλήρωση της κυτοκίνησης κατά τη μίτωση.

Από προηγούμενα πειράματα ήταν ήδη γνωστό ότι η MgcRacGAP αλληλεπιδρά με τον HIF-1α. Η αλληλεπίδραση αυτή οφείλεται στην περιοχή Myo της MgcRacGAP. Επιπλέον, ήταν γνωστό ότι η υπερέκφραση της MgcRacGAP είναι ικανή να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, ενώ στην περίπτωση που αφαιρεθεί η περιοχή της Myo κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρείται.

Καθώς τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η καταστολή από την MgcRacGAP οφείλεται στην άμεση σύνδεσή της με τον HIF-1α, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον εάν υπερεκφραστεί μόνο η περιοχή Myo, μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα θηλαστικών. Τελικά η μελέτη επεκτάθηκε και σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* που εκφράζουν εξωγενώς μεταγραφικά ενεργό HIF-1.

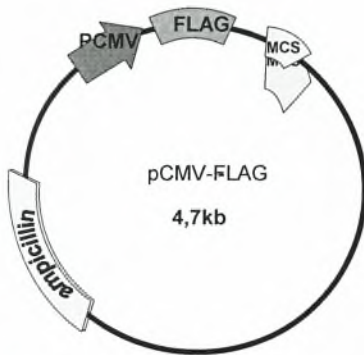
Πειραματικά, η περιοχή Myo κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών pEGFP και pCMV-FLAG και στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST με σκοπό να παραχθεί υπό τη μορφή πρωτεϊνών σύντηξης GFP-Myo, FLAG-Myo, GST-Myo και GFP-Myo στα κατάλληλα κύτταρα αντίστοιχα. Η επίδραση της περιοχής Myo στην ενεργότητα του HIF-1 ελέγχθηκε στα κύτταρα θηλαστικών μέσω του συστήματος μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 με γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση, ενώ στα κύτταρα σακχαρομύκητα μέσω του συστήματος YASH (βλ. παράρτημα σελ. 48). Παράλληλα στα κύτταρα θηλαστικών παρατηρήθηκε η έκφραση της περιοχής Myo στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη μέθοδο του φθορισμού ή του ανοσοφθορισμού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

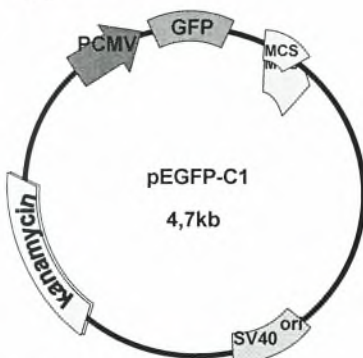
ΥΛΙΚΑ

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης

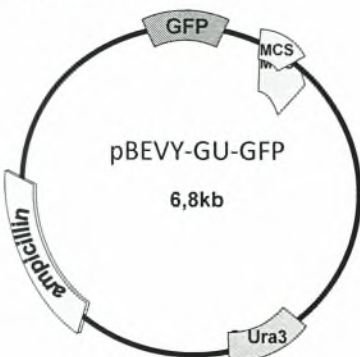
A) pCMV-FLAG



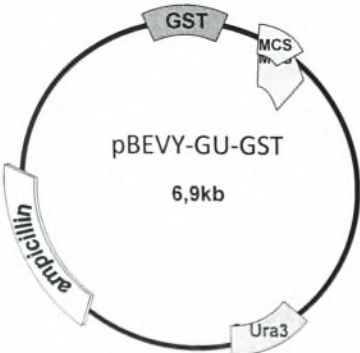
B) pEGFP



Γ) pBEVY-GU-GFP



Δ) pBEVY-GU-GST



Θρεπτικά υλικά

- LB (για 1000 ml):
- 10 gr bacto tryptone
- 5 gr bacto yeast extract
- 10 gr NaCl
- για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- YPD (για 1000 ml):
- 20 gr glucose
- 10 gr bacto yeast extract
- 20 gr bacto peptone
- για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- SC (για 1000 ml):
- 20 gr glucose
- 1,7 gr yeast nitrogen base
- 5 gr NH₄SO₄
- 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: υδροξυ-προλίνη, κυστίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη)
- 350 μl NaOH 5 M (pH: 5.6)
- για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- SR (για 1000 ml):
- 20 gr raffinose
- 1,7 gr yeast nitrogen base
- 5 gr NH₄SO₄
- 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: υδροξυ-προλίνη, κυστίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη)
- 350 μl NaOH 5 M (pH: 5.6)
- για τριβλία: +20 gr agar

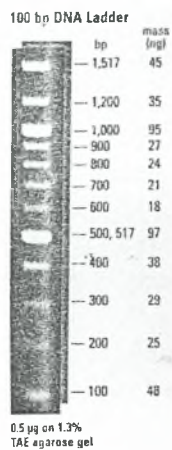
Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- SG (για 1000 ml):
- 20 gr galactose
- 1,7 gr yeast nitrogen base
- 5 gr NH₄SO₄
- 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: υδροξυ-προλίνη, κυστίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη)
- 350 μl NaOH 5 M (pH: 5.6)
- για τριβλία: +20 gr agar

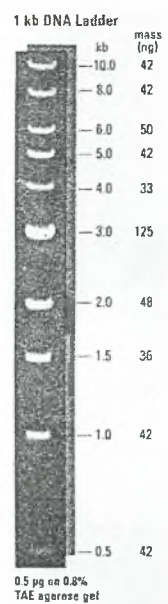
Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

Μάρτυρες μοριακών βαρών

A) Μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp (M1)



B) Μάρτυρας μοριακού βάρους 1 kb (M2)



ΜΕΘΟΔΟΙ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* μέθοδος η οποία επιτρέπει τη γρήγορη ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με χρήση κατάλληλων εκκινητών από μικρά ποσά ενός αρχικού δίκλωνου DNA εκμαγείου.

Συγκεκριμένα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελείται από τρία καθορισμένα στάδια:

- 1) Την αποδιάταξη των κλώνων του DNA εκμαγείου σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 90 °C (30 δευτερόλεπτα-5λεπτά).
- 2) Την υβριδοποίηση των δύο εκκινητών σε θερμοκρασία που επιλέγεται συνήθως μεταξύ 40°-65°C (20-60 δευτερόλεπτα) ανάλογα με τις ιδιότητες των εκκινητών.
- 3) Την σύνθεση και επιμήκυνση της νέας αλυσίδας του DNA από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Τα τρία παραπάνω στάδια αποτελούν ένα κύκλο όπου το DNA διπλασιάζεται. Η επανάληψη της διαδικασίας 30-40 φορές (κύκλοι) είναι αρκετή για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA. Μετά τον πρώτο κύκλο χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία όχι μόνο οι αρχικές αλυσίδες αλλά και οι νεοσυντεθείσες, οι οποίες έχουν προκαθορισμένο μήκος από τα άκρα των περιοχών που είναι συμπληρωματικά με τους εκκινητές.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για μια αντίδραση PCR σε τελικό όγκο 50 µl είναι τα παρακάτω (αναφέρονται οι τελικές συγκεντρώσεις) :

- 5-20 ng πλασμιδιακού DNA-εκμαγείου
- 200 ng από κάθε εκκινητή
- 200 ng DNTP'S
- 5 µl ρυθμιστικού διαλύματος 10x
- 1 Unit Vent πολυμεράσης
- x µl ddH₂O

Προτού ξεκινήσει το στάδιο των επαναλαμβανόμενων κύκλων όπου οι συνθήκες επιλέγονται ανάλογα με το μήκος του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, υπεισέρχεται ένα στάδιο αποδιάταξης για 4' στους 94 °C. Επίσης, μετά την ολοκλήρωσή τους, προστίθεται ένα στάδιο επιμήκυνσης του πολυμερισμού για 1' στους 72 °C.

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από την πηκτή αγαρόζης με τη μέθοδο "GEL EXTRACTION" της QIAGEN

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό DNA από 70 bp έως 10 kb.

- Αφαιρείται από την πηκτή αγαρόζης το κομμάτι που περιέχει το DNA με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Ζυγίζεται η ποσότητα που ανακτήθηκε και προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG.
- Επωάζονται στους 50 °C για 10 λεπτά.
- Προστίθεται ίσος όγκος, με την ποσότητα που ζυγίστηκε, ισοπροπανόλης.
- Το διάλυμα διέρχεται από την ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Προστίθεται στη στήλη 0,5 ml διαλύματος QG και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Προστίθεται 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Ξαναφυγοκεντρείται η στήλη για 1 λεπτό.
- Για την έκλυση του DNA προστίθενται 50µl ρυθμιστικού διαλύματος EB ή δις απεσταγμένο H₂O στο κέντρο της στήλης. Αφήνεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ανακτάται το DNA με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης

- Διαλύεται τόση ποσότητα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (βλ. στο τέλος της μεθόδου), ώστε η συγκέντρωσή της στον τελικό όγκο να είναι η επιθυμητή.
- Ανακινείται και θερμαίνεται στους 100 °C.
- Όταν πέσει η θερμ/σία του διαλύματος στους 60 °C, προστίθεται τόσος όγκος 10 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου ώστε στο διάλυμα η συγκέντρωσή του να είναι 0,5 µg/ml.
- Το διάλυμα αποχύνεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές έως ότου πήξει.
- Προστίθεται TAE ώστε να καλυφθεί η πηκτική.
- Προστίθεται στο διάλυμα με το DNA η χρωστική μπλε βρωμοφαινόλη (0,25%), και γλυκερόλη (30%), η οποία είναι 7x σε σχέση με τον συνολικό όγκο.
- Φορτώνεται το DNA στις εγκοπές της πηκτής.
- Συνδέονται τα ηλεκτρόδια στη συσκευή και ηλεκτροφορείται στα 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον.
- Τοποθετείται η πηκτική πάνω από λάμπα που να εκπέμπει στο υπεριώδες και φωτογραφίζεται.

Διάλυμα 1x TAE:

- 4 mM Tris-acetate
- 1 mM EDTA

Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η ποσότητα κάθε ενζύμου που χρησιμοποιείται σε αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητά του (Unit/µl). Η σχέση DNA προς ενζύμου που χρησιμοποιείται είναι 1:1 (µg:Units).

- Η αντίδραση γίνεται συνήθως στα 30 µl.
 - 10 µg πλασμιδιακό DNA (1µg/µl)
 - x µl ενζύμου
 - 3 µl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου
 - 30-x µl ddH₂O

Όπου κριθεί αναγκαίο προστίθεται 0,5 µl RNase

- Επώαση στους 37 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.

Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (*E.coli*) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Με τον όρο δεκτικό κύτταρο (competent cell), εννοούνται τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν εύκολα ξένο και συγκεκριμένα πλασμιδιακό DNA.

- Υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων αναπτύσσεται σε 5ml θρεπτικό μέσο TYM με αντιβιοτικό επιλογής στους 37 °C όλη νύχτα.
- Την επόμενη ημέρα γίνεται αραίωση 1:100 της καλλιέργειας σε τελικό όγκο 3 ml TYM με αντιβιοτικό επιλογής.
- Επώαζεται στους 37 °C για 2-3 ώρες.

- Γίνεται αραίωση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό.
- Η καλλιέργεια μεγαλώνει έως ότου η απορρόφηση (OD) στα 590nm γίνει 0,35-0,4.
- Φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 5 λεπτά.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1/2 του αρχικού όγκου διαλύματος TFBI.
- Αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 5 λεπτά.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1/25 του αρχικού όγκου διαλύματος TFBII.
- Αφήνεται για 60 λεπτά στον πάγο.
- Μοιράζονται από 200μl του τελικού όγκου των κυττάρων σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου και αποθηκεύονται στους -80 °C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται:

TYM	TFBI	TFBII
-2% tryptone	-30 mM KOAc	- 10 mM MOPS
-0,5% yeast extract	-50 mM MnCl	-75 mM CaCl ₂
-0,1 M NaCl	-100 mM KCl	-10 mM KCl
-10 mM MgSO ₄	-10 mM CaCl ₂	-20% γλυκερόλη
	-15% γλυκερόλη	(pH: 7.0)
	(pH: 7.0)	

Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase)

Για την αφαίρεση της 5'φωσφορικής ομάδας από μονόκλιωνα ή δίκλιωνα τμήματα DNA εμποδίζοντας την επανασύνδεσή τους.

- 1Unit ενζύμου καταλύει την αντίδραση 1pmole 5'φωσφορικών άκρων DNA.
- Στα 100 μl της αντίδρασης:
 - 20 μl DNA (10 μg)
 - 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα NEB 3 (10x)
 - 3 μl CIP (10.000 Unit/ml)
 - 64 μl ddH₂O
- Επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά.
- Προστίθενται 5mM EDTA (pH: 8.0).
- Θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 75 °C.
- Γίνονται εκχυλίσεις με φαινόλη : χλωροφόρμιο (1:1)
- Τέλος, το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων.

- Στο 20μl της αντίδρασης έχουμε:
 - Τις επιλεγμένες ποσότητες πλασμιδιακού φορέα και ξένου τμήματος DNA ανάλογα με το μέγεθός του.
 - 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10 x)

- 0,8 μl λιγάσης
- ddH₂O
- Επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επωάζεται όλη νύχτα στους 16 °C.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E.coli* transformation)

- 200 μl δεκτικών κυττάρων TOP10 επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο με το προς μετασχηματισμό DNA (στην περίπτωση μας την αντίδραση σύνδεσης).
- Τοποθετούνται για 2 λεπτά στους 42 °C.
- Μεταφέρονται αμέσως στον πάγο για 3 λεπτά.
- Προστίθεται 500μl υγρό LB.
- Επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα.
- Φυγοκεντρώνονται για 30 δευτερόλεπτα.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο έως ότου περισσέψουν 50μl και το ίζημα επαναδιαλύεται σε αυτόν τον όγκο.
- Απλώνονται σε τριβλία LB με αντιβιοτικό επιλογής και επωάζονται στους 37 °C όλη νύχτα.

Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (mini preparation)

- Επωάζεται ολονύχτια καλλιέργεια 3 ml κυττάρων *E.coli* σε θρεπτικό μέσο LB.
- Αποχύνεται σε σωληνάκι φυγοκέντρου 1,5 ml καλλιέργειας.
- Φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 12 δευτερόλεπτα.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται 300 μl TENS και αναδεύονται σε κυκλοτερή αναδευτήρα.
- Προστίθενται 150 μl 3M οξικού νατρίου και αναδεύονται σε κυκλοτερή αναδευτήρα.
- Φυγοκεντρώνονται στις 13000 στροφές για 2 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι φυγοκέντρου.
- Προστίθεται 1 ml 100% αιθανόλη, αναδεύεται και ψύχεται στους -20 °C για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά.
- Προστίθεται 1 ml 70% αιθανόλη και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά, στεγνώνεται το ίζημα και επαναδιαλύεται σε 20 μl ddH₂O.

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

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

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit

- Επωάζεται ολονύχτια καλλιέργεια 50 ml κυττάρων *E.coli* με το ανασυνδρασμένο πλασμίδιο σε θρεπτικό μέσο LB.

- Αποχύνονται σε Falcon 15 ml καλλιέργειας.
- Φυγοκεντείται στις 4000 στροφές για 5 λεπτά.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο, προστίθενται 4ml Buffer P₁ (Resuspension Buffer + RNase) και αναδεύονται στον αναδευτήρα (vortex).
- Προστίθενται 4ml Buffer P₂ (Lysis Buffer) και μένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται 4 ml Buffer P₃ (Neutralization Buffer), αναμιγνύονται και επωάζονται στον πάγο για 15 min.
- Φυγοκεντρώνονται στις 4000 στροφές για 30 min, το υπερκείμενο αποχύνεται σε νέο Falcon αφού πρώτα διηθηθεί μέσα από γάζα.
- Χρησιμοποιείται στήλη της Qiagen αφού πρώτα ξεπλυθεί με λίγα ml Buffer QBT.
- Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποχύνεται στη στήλη και ακολουθεί ξέπλυμα 2 φορές από 10ml Buffer QC, έκλουση του DNA με 2 ml Buffer QF που μοιράζονται από 1ml σε σωληνάκια των 2ml.
- Προστίθενται 700μl ισοπροπανόλης, αναμιγνύονται και φυγοκεντρώνονται στις 10000 στροφές για 30 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται άλλα 700μl από αιθανόλη 70%.
- Φυγοκεντρώνονται για 10 min στα 10000 στροφές στους 4 °C.
- Τέλος το ίζημα ξηραίνεται και επαναδιαλύεται σε 50μl ddH₂O.

Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T ή HeLa

- Σε τριβλίο με κύτταρα HEK 293T ή HeLa αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και ξεπλένονται με 1,5 ml PBS 1x.
- Προστίθεται 1,5 ml τρυψίνη, ανακινούνται προσεκτικά, επωάζονται για 5' στους 37 °C και προστίθενται 5 ml πλήρες DMEM προκειμένου να ανασταλεί η δράση της τρυψίνης.
- Σε άδειο τριβλίο προστίθενται 8 ml πλήρες DMEM, στο οποίο προστίθενται 1 ml από τα αιωρημένα κύτταρα.
- Εφ' όσον πρόκειται για πειράματα λουσιφεράσης, σε τριβλίο 12 θέσεων προστίθενται 80 μl κυττάρων σε 1 ml DMEM, ενώ στην περίπτωση του φθορισμού ή του ανοσοφθορισμού προστίθενται αντίστοιχα 160 μl σε 2 ml DMEM σε τριβλίο 6 θέσεων και στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται ολονύχτια στους 37 °C ούτως ώστε την επόμενη μέρα η επικάλυψη του τριβλίου να είναι της τάξης του 60-70%.
- Τα κύτταρα HEK 293T ή HeLa επιμολύνονται με 1,5 μg DNA ανά θέση, σε τριβλία 12 θέσεων (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο:HRE:renilla, 0,9:0,5:0,1).
- Σε άδειο erpendorf προστίθεται 1,5 μl transpass (λιπόφιλη ουσία η οποία χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση) σε 500 μl DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό.
- Το μίγμα επιμόλυνσης αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για το σχηματισμό των συμπλόκων επιμόλυνσης.
- Αφαιρείται το πλήρες DMEM, ξεπλένονται μία φορά με DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό και στη συνέχεια προστίθεται το μίγμα επιμόλυνσης σε κάθε erpendorf και επωάζονται στους 37 °C για 3 ώρες.
- Αντικαθιστάται το μίγμα με πλήρες DMEM και επωάζονται στους 37 °C για 24 ή 48 ώρες ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος.

Μέτρηση δράσης της λουσιφεράσης

- Τα κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με PBS 1x και προστίθενται 100 µl lysis buffer 1x της εταιρίας PROMEGA σε κάθε θέση στο τριβλίο με σκοπό να λυθούν τα κύτταρα.
- Τα κύτταρα ανακινούνται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, το εκχύλισμα μεταφέρεται σε erpendorf και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές.
- Σε erpendorf που περιέχει 20 µl LARII (υπόστρωμα για firefly λουσιφεράση) προστίθενται 40 µl εκχυλίσματος και μετράται στο λουμινόμετρο.
- Στο ίδιο erpendorf προστίθενται 25 µl stop & glo (υπόστρωμα και ρυθμιστικό διάλυμα για τη renilla-λουσιφεράση) της εταιρίας PROMEGA και μετράται για δεύτερη φορά στο λουμινόμετρο.

Φθορισμός

- Τα επιμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με PBS 1x.
- Τα κύτταρα σταθεροποιούνται με PBS-3% φορμαλδεΐδη για 3 λεπτά.
- Τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με PBS 1x από 5 λεπτά.
- Οι καλυπτρίδες στεγνώνονται.
- Προστίθεται μία σταγόνα vectracil (+ DAPI) το οποίο ενισχύει και διατηρεί το σήμα του φθορισμού.
- Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

Ανοσοφθορισμός

- Τα επιμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με PBS 1x.
- Τα κύτταρα σταθεροποιούνται με PBS-3% φορμαλδεΐδη για 3 λεπτά.
- Ξεπλένονται με PBS 1x για 5 λεπτά.
- Προστίθεται PBS-1% Triton X-100 για 15 λεπτά τους 4 °C για τη δημιουργία διαπερατής μεμβράνης.
- Ξεπλένονται με PBS 1x για 5 λεπτά.
- Μπλοκάρονται με PBS-0,1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 4 °C.
- Οι καλυπτρίδες στεγνώνονται.
- Επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα (mouse anti-FLAG) σε PBS-Tween/1% BSA, όλη νύχτα στους 4 °C (ή για μία ώρα).
- Ξεπλένονται 3 φορές με 1x PBS Tween/1% BSA.
- Επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse FITC) για 30 λεπτά.
- Οι καλυπτρίδες στεγνώνονται.
- Προστίθεται μία σταγόνα vectracil(+DAPI).
- Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

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

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται και τοποθετείται μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer).
- Η μεταφορά γίνεται στα 400mA για 1 ώρα και 30 λεπτά.
- Η νιτροκυτταρίνη αφαιρείται και τοποθετείται για 2 λεπτά σε διάλυμα Ponceau.
- Η νιτροκυτταρίνη ξεπλένεται με PBS-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρις ότου αφαιρεθεί το Ponceau.
- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος (5% γάλα σε σκόνη, και PBS-Tween 20) για 1 ώρα και ξεπλένεται 3 φορές με PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min).
- Επωάζεται 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.
- Ξεπλένεται 3 φορές με PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min).
- Επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα goat anti-mouse (ορός κασίκας ενάντια των IgG ποντικίου) σε αραιώση 1:3000, με 5% γάλα σε σκόνη και PBS-Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξεπλένεται 3 φορές σε PBS-Tween 20 (15 min, 5 min, 5 min).
- Τέλος η μεμβράνη εμφανίζεται σε φωτογραφικό φιλμ. Αρχικά τοποθετείται σε διάλυμα 10 ml luminol, 100μl coumaric και 30μl 3% H₂O₂ για περίπου 5 min.

Διαλύματα που χρησιμοποιούνται :

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

Μετασχηματισμός *Saccharomyces cerevisiae*

- 2 ml καλλιέργειας επωάζονται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) στους 30 °C όλη νύχτα.
- Η καλλιέργεια φωτομετρείται στα 600 nm και ποσότητα αυτής μεταφέρεται σε 10 ml θρεπτικού SC ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι 5x10⁶ κύτταρα /ml.
- Επωάζεται στους 30 °C έως ότου ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 2x10⁷ κύτταρα/ml.
- Φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 5 ml ddH₂O και ξαναφυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 1 ml οξικού λιθίου (CH₃COOLi) 0.1M.
- Φυγοκεντρούνται για 15 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια με την εξής σειρά :

- 240 μl 50% (w/v) πολυαιθυλενγλυκόλη 3350MW (PEG)
 - 36 μl 1M CH₃COOLi
 - 50μl ssDNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα θερμαίνεται στους 100 °C για 30 λεπτά)
 - x μl πλασμιδιακού DNA (από 0,1-10 μg)
 - 34-x μl ddH₂O.
- Γίνεται ανάδευση του μίγματος έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά και επωάζεται για 30 λεπτά στους 30 °C.
 - Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 42 °C.
 - Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 12.000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200-400 μl ddH₂O.
 - Τέλος τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επωάζονται για 2-4 ημέρες στους 30 °C.

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

- Από τα τρυβλία SC leu⁻trp⁻ura⁻ με τα μετασχηματισμένα στελέχη εμβολιάζονται καλλιέργειες των 10ml με θρεπτικό υλικό SC leu⁻trp⁻ura⁻ με αποικίες που περιέχουν τα επιθυμητά πλασμίδια και επωάζονται στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση.
- Μετά από 3,5 ώρες αφού φτάσουν σε λογαριθμική φάση, αραιώνονται ως OD_{600nm}=0.050 με φρέσκο θρεπτικό υλικό (10ml SR leu⁻trp⁻ura⁻).
- Έπειτα από ολονύχτια επώαση όταν οι καλλιέργειες φτάνουν ξανά σε λογαριθμική φάση και αραιώνονται ως OD_{600nm}=0.200 με φρέσκο θρεπτικό υλικό SG leu⁻trp⁻ura⁻ σε καλλιέργειες των 4 ml.

Η στιγμή της μεταφοράς σε θρεπτικό υλικό με γαλακτόζη ορίζεται ως σημείο 0h και γίνεται λήψη δειγμάτων ανά καθορισμένα χρονικά σημεία, για μετέπειτα ανάλυσή τους με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Για τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης λαμβάνεται ποσότητα από 200 μl καλλιέργειας και αφού γίνει φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο ούτως ώστε να μείνουν 25 ή 100 μl και φυλάσσονται στους -80 °C .

Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

- Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την επαγωγή με γαλακτόζη προστίθενται 700μl διαλύματος Z buffer, 20μl SDS 0,1% και 20μl χλωροφόρμιο. Γίνεται έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) για να σπάσουν τα κύτταρα.
- Σημειώνεται ο χρόνος έναρξης της αντίδρασης και προστίθενται 200μl o-nitrophenol-β-D-galactopyranoside (ONPG) 4mg/ml σε Z buffer.
- Όταν παρατηρείται η ανάπτυξη χρώματος που να δίνει OD_{420nm} περίπου 0,8 σε ένα από τα δείγματα, σημειώνεται ο χρόνος αντίδρασης και προστίθενται αμέσως 400μl Na₂CO₃ 1M για να σταματήσει η αντίδραση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 2 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέα σωληνάκια.
- Γίνεται φωτομέτρηση στα 420 nm όπου απορροφά το προϊόν της αντίδρασης (νιτροφαινόλη) και τα 600 nm.

- Τέλος υπολογίζονται οι μονάδες της β-γαλακτοσιδάσης (Miller units) από τον 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 (σε ml) της καλλιέργειας που χρησιμοποιείται. Η οπτική απορρόφηση στα 600nm είναι μέτρο της ποσότητας των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού και οι μετρήσεις γίνονται κατά τη διάρκεια του πειράματος της επαγωγής του συστήματος με γαλακτόζη.

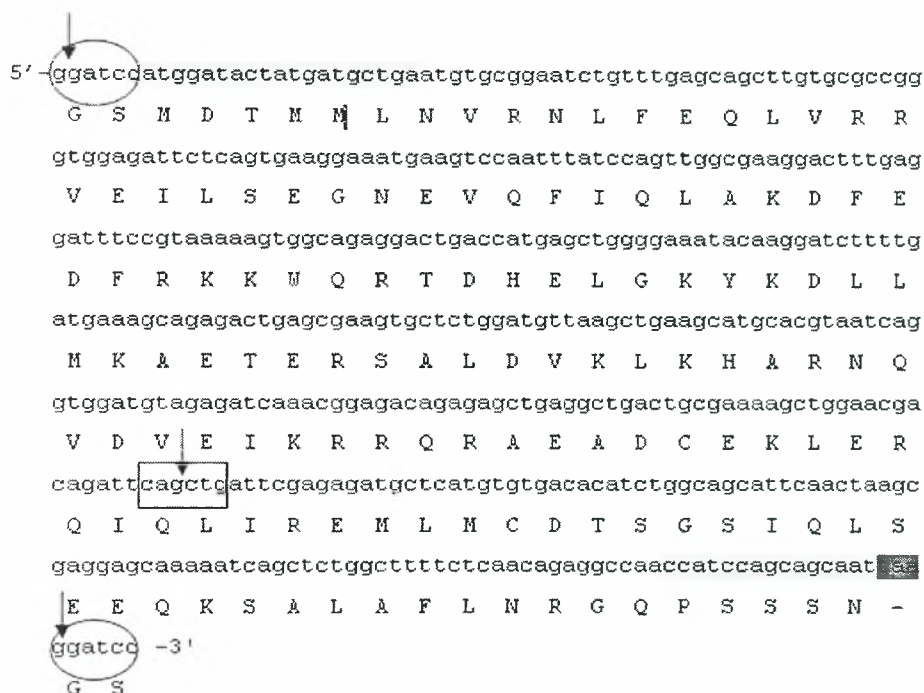
Διαλύματα που χρησιμοποιούνται:

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομόνωση του cDNA της περιοχής 1-138 της MgcRacGAP με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Το cDNA που κωδικοποιεί για την περιοχή 1-138 της MgcRacGAP (Εικ. 9) και που βρισκόταν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pVP16 απομονώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (βλ. μέθοδοι σελ. 17), με απώτερο σκοπό να κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης, προκειμένου να εκφραστεί σε κύτταρα θηλαστικών και *S.cerevisiae*. Στο εξής η περιοχή 1-138 της MgcRacGAP θα καλείται **Myo** και το αντίστοιχο cDNA, **IMyo**.



Εικ. 9 Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της περιοχής Myo. Με κίτρινο χρώμα υποδεικνύονται οι εκκινητές, με κόκκινο υποδεικνύεται το κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης, με τετράγωνο συμβολίζεται η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII, ενώ με κύκλο συμβολίζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI. Τα βέλη υποδεικνύουν τα νουκλεοτίδια στα οποία κόβουν οι ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Καθαρισμός της περιοχής IMyo και πέψη με BamHI

Η περιοχή IMyo (Εικ. 9) απομονώθηκε με PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν 20 ng πλασμιδίου στο οποίο βρισκόταν το cDNA της MgcRacGAP και πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι με τις παρακάτω συνθήκες:

- 1' στους 94 °C

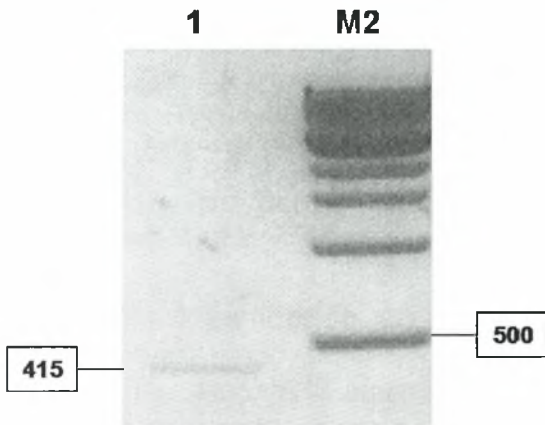
- 1' στους 50 °C
- 1' στους 72 °C

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τις εξής αλληλουχίες:

5' Myo : TTTTGGATCCATGGATACTATGATGCTGA

3' Myo : TTTTGGATCCCTTAATTGCTGCTGGATGG

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 10).



Εικ. 10: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,3%
 Διαδρομή 1: 5 μl προϊόντος PCR, διαδρομή M2 :5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb

Όπως παρατηρείται από την εικόνα, το μέγεθος του θραύσματος είναι το αναμενόμενο (415 bp).

Το θραύσμα απομονώθηκε και έγινε καθαρισμός του (βλ. μέθοδοι σελ. 18).

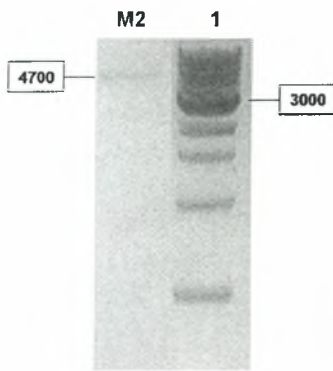
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη του IMyo με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI για τη δημιουργία των κατάλληλων άκρων (βλ. Μέθοδοι σελ. 19).

Κλωνοποίηση της περιοχής IMyo στο πλασμιδιακό φορέα pEGFP

Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pEGFP για την αντίδραση σύνδεσης

Δέκα μg πλασμιδιακού φορέα pEGFP επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI ούτως ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης (βλ. μέθοδοι σελ. 19).

Στη συνέχεια, ο φορέας pEGFP/BamHI επεξεργάστηκε με την αλκαλική φωσφατάση (CIP) που αφαιρεί τις 5' φωσφορικές ομάδες, για να αποφευχθεί η συνένωση των άκρων του (βλ. μεθόδους σελ. 20). Η αντίδραση αυτή έγινε στο διάλυμα πέψης. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικ. 11).



Εικ. 11: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%
 Διαδρομή 1: 3 μl pEGFP/BamHI/CIP, διαδρομή M2: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb

Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pEGFP/BamHI/CIP με το DNA IMyo/BamHI

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση, το οποίο καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων. Για την αντίδραση επώαστηκαν 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pEGFP/BamHI/CIP με 50 ng της περιοχής IMyo (βλ. μεθόδους σελ. 20).

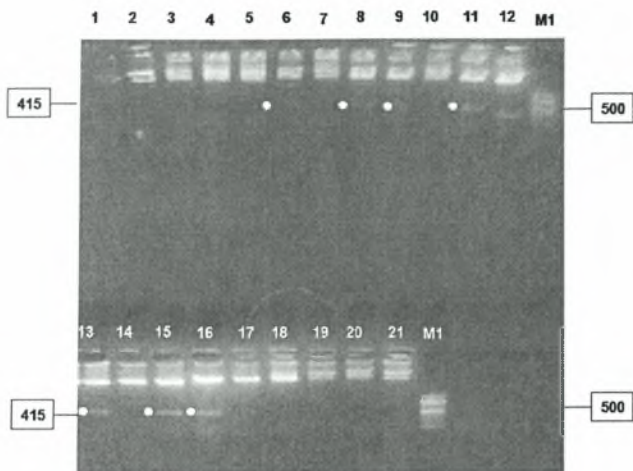
Μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* με τα προϊόντα της σύνδεσης

Δεκτικά κύτταρα *E.coli* Top 10 (competent cells) μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα σύνδεσης (βλ. μεθόδους σελ. 21). Η επώαση των κυττάρων έγινε σε τριβλία LB που περιείχαν το αντιβιοτικό καναμυκίνη ως μέσο επιλογής των κυττάρων που φέρουν τον φορέα pEGFP.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation)

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στην καναμυκίνη επιλέχθηκαν 21 και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας) (βλ. μέθοδοι σελ. 21), έτσι ώστε να εξετασθεί η ύπαρξη ή μη ενθέματος 415 bp στον φορέα pEGFP.

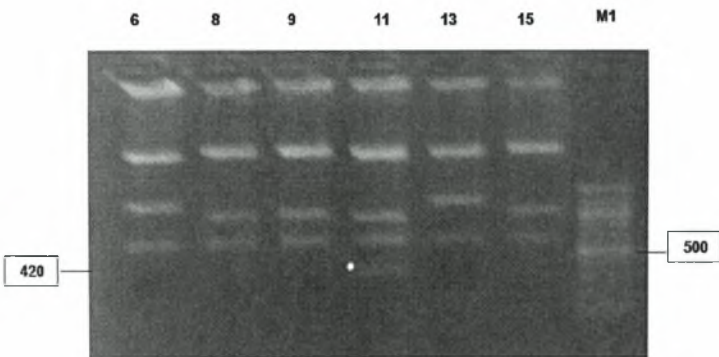
Για τον λόγο αυτό τα πλασμιδιακά DNA επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 12). Όπως ήδη αναφέρθηκε εφ' όσον το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στον πλασμιδιακό φορέα, θα παρατηρηθεί ένα θραύσμα στις 415 bp.



Εικ. 12: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,3%
 Διαδρομές 1-21: 3 μl pEGFP, διαδρομή M1: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp

Όπως παρατηρείται, το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στα πλασμίδια τα οποία βρίσκονται στις εγκοπές 6,8,9,11,13,15 και 16.

Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να επιλεγθούν τα ενθέματα τα οποία βρίσκονται στο σωστό προσανατολισμό σε σχέση με το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος της GFP. Έτσι, τα πλασμίδια επωάστηκαν με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού PvuII και EcoRI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 13). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζουν τα ένζυμα PvuII και EcoRI τον φορέα pEGFP, εφ' όσον το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 420 bp, ενώ αν έχει λάθος προσανατολισμό θα προκύψουν ένα θραύσμα στις 1220 bp και ένα στις 160 bp.



Εικ. 13: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,3%
 Διαδρομές 6-15: 3 μl pEGFP-IMyo, διαδρομή M1: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp

Παρατηρείται ότι το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό στο πλασμίδιο στην εγκοπή 11.

Άρα κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο **pEGFP-IMyo**. Το πλασμίδιο αυτό είναι ικανό να παράγει σε κύτταρα θηλαστικών την χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-Myo.

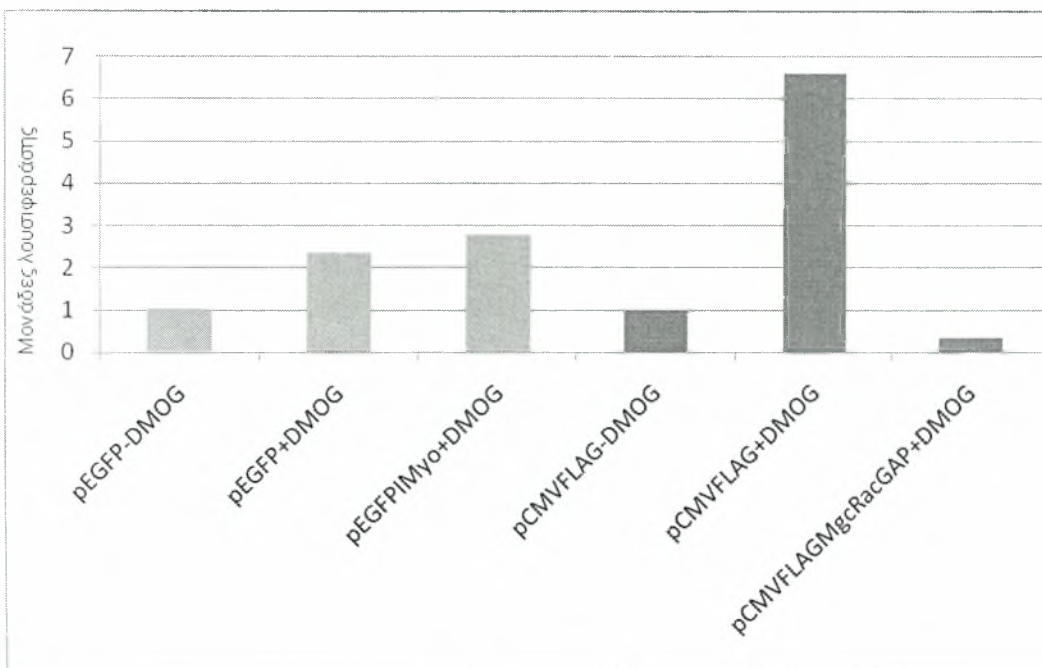
Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midi preparation)

Η αποικία η οποία περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-IMyo αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υγρό LB με καναμυκίνη στους 37 °C σε αναδευτήρα όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια έγινε παρασκευή DNA μεσαίας κλίμακας (βλ. μέθοδοι σελ. 21). Η αρτιότητα της κατασκευής επιβεβαιώθηκε με εύρεση της αλληλουχίας της από την εταιρεία CoGenics.

Έλεγχος της δράσης της pEGFP-IMyo στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 σε κύτταρα HEK 293T.

A) Επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T για 48 h και επαγωγή του HIF-1 με DMOG

Κύτταρα HEK 293T τοποθετήθηκαν σε τριβλία των 12 θέσεων έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης να βρίσκονται σε πυκνότητα 60-70% (βλ. μέθοδοι σελ. 22). Η επιμόλυνση έγινε με τα πλασμίδια pGL3-VEGF/5HRE και pCI-renilla (βλ. παράρτημα 48) για όλες τις θέσεις του τριβλίου και επιπλέον με τα πλασμίδια pEGFP ή pEGFPIMyo ή pCMVFLAG ή pCMVFLAGMgcRacGAP. Τέσσερις ώρες πριν τη λύση των κυττάρων έγινε επαγωγή του HIF-1 με τον αναστολέα των προλυουδροξυλασών DMOG (1mM). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (βλ. παράρτημα σελ. 48) και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 14:



	1	2	3	M.O.	Μονάδες Λουσιφεράσης
pEGFP-DMOG	0,12	0,176	0,172	0,156	1
pEGFP+DMOG	0,305	0,264	0,514	0,361	2,31
pEGFPIMyo+DMOG	0,357	0,607	0,314	0,426	2,73

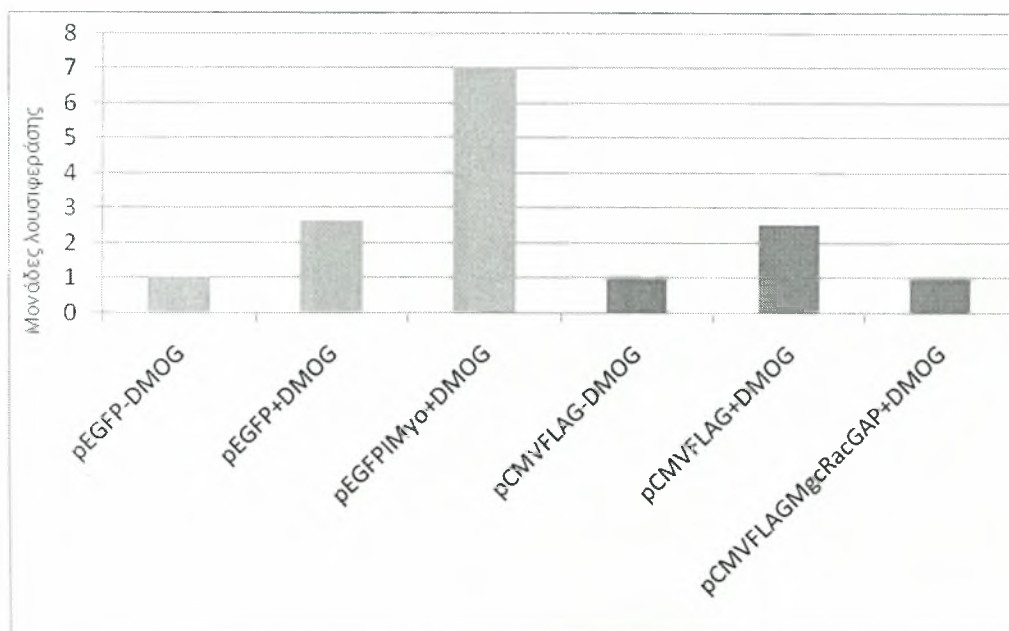
pCMVFLAG-DMOG	0,21	0,08	0,067	0,119	1
pCMVFLAG+DMOG	0,559	0,724	1,073	0,785	6,60
pCMVFLAGMgcRacGAP+DMOG	0,056	0,036	0,03	0,041	0,34

Εικ. 14 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 48 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων HEK293T με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που αναγράφονται στο γράφημα, κάτω από τις συνθήκες που αναγράφονται. Οι τιμές που απεικονίζονται στο διάγραμμα, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών τιμών, οι οποίες έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της renilla λουσιφεράσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

Παρατηρείται ότι η δράση του HIF-1 καταστέλλεται από την MgcRacGAP (πλασμίδιο pCMVFLAGMgcRacGAP) όπως ήταν αναμενόμενο, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διεξαγωγή του πειράματος ήταν επιτυχής. Παρ' όλα αυτά όσον αφορά στη δράση της περιοχής Myo δεν παρατηρείται καταστολή στην ενεργότητά του.

B) Επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T για 24 h και επαγωγή του HIF-1 με DMOG

Το προηγούμενο πείραμα επαναλήφθηκε με διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά στο χρόνο της επιμόλυνσης (24h αντί για 48h) και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 15:



	1	2	3	M.O.	Μονάδες λουσιφεράσης
pEGFP-DMOG	0,05	0,04	0,06	0,05	1
pEGFP+DMOG	0,1	0,13	0,16	0,130	2,60
pEGFP+Myo+DMOG	0,15	0,26	0,64	0,350	7,00
pCMVFLAG-DMOG	0,04	0,03	0,07	0,047	1

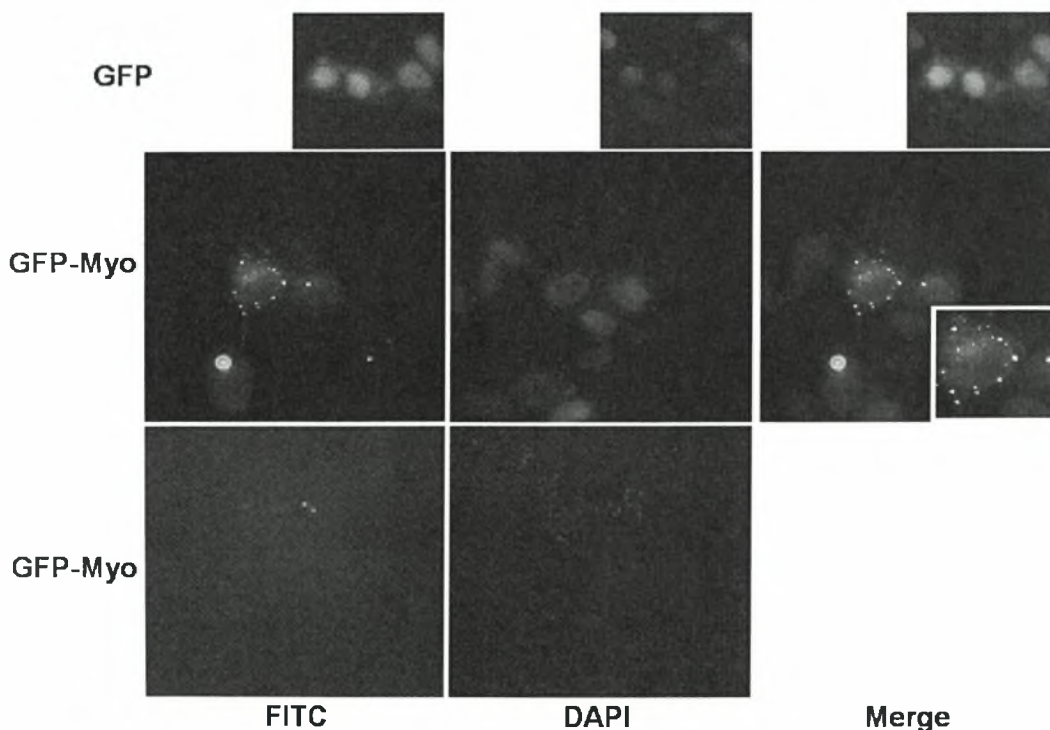
pCMVFLAG+DMOG	0,12	0,07	0,17	0,120	2,55
pCMVFLAG+MgcRacGAP+DMOG	0,02	0,1	0,02	0,047	1,00

Εικ. 15 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 24 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων HEK293T με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που αναγράφονται στο γράφημα, κάτω από τις συνθήκες που αναγράφονται. Οι τιμές που απεικονίζονται στο διάγραμμα, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών τιμών, οι οποίες έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της renilla λουσιφεράσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

Παρατηρείται ότι η διεξαγωγή του πειράματος ήταν επιτυχής, καθώς και πάλι η MgcRacGAP καταστέλλει τη δράση του HIF-1, ενώ αντίθετα δεν παρατηρείται καταστολή που μπορεί να οφείλεται στην περιοχή Myo.

Παρατήρηση της έκφρασης της GFP-Myo σε κύτταρα HEK 293T με μικροσκόπιο φθορισμού

Δεδομένου ότι η επιμόλυνση των κυττάρων HEK293T με το πλασμίδιο pEGFPIMyo δεν έδειξε να επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, ήταν απαραίτητη η επιβεβαίωση της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP-Myo σε αυτά τα κύτταρα. Για την παρατήρηση της GFP-Myo στο μικροσκόπιο φθορισμού, αρχικά έγινε επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-IMyo. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα κατεργάστηκαν με διάλυμα φορμαλδευδης 3% σε PBS και μετά τη χρώση των πυρήνων με DAPI (βλ. μέθοδοι σελ. 23) έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 16:



Εικ. 16 Κύτταρα HEK 293T στα οποία εκφράζονται οι αναγραφόμενες πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρείται αρχικά ότι η GFP εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα όπως ήταν αναμενόμενο. Αντίθετα, δεν παρατηρείται έκφραση της GFP-Myo στα περισσότερα κύτταρα, ενώ στα ελάχιστα κύτταρα όπου αυτή εκφράζεται φαίνεται να εμφανίζεται με τη μορφή συσσωματωμάτων.

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η GFP-Myo, αν και είναι δυνατόν να παραχθεί από το πλασμίδιο δεν είναι δυνατόν να εκφραστεί τελικά στα κύτταρα HEK293T υπό διαλυτή μορφή.

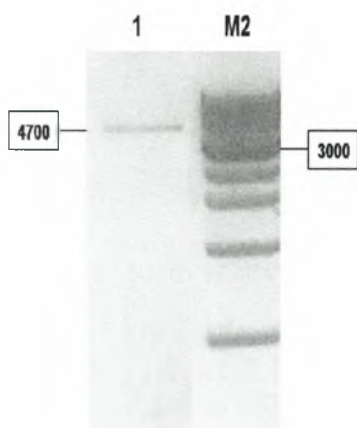
Κλωνοποίηση της περιοχής IMyo στο πλασμιδιακό φορέα pCMV-FLAG

Προκειμένου να επιτευχθεί η έκφραση της περιοχής Myo της MgcRacGAP σε κύτταρα θηλαστικών δοκιμάστηκε η σύντηξη της με τον επίτοπο FLAG και άρα η κλωνοποίηση του cDNA IMyo στον φορέα pCMV-FLAG.

Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pCMV-FLAG για την αντίδραση σύνδεσης

Δέκα μg πλασμιδιακού φορέα pCMV-FLAG επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI ούτως ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης (βλ. μέθοδοι σελ. 19).

Στη συνέχεια, ο φορέας pCMV-FLAG/BamHI επεξεργάστηκε με την αλκαλική φωσφατάση (CIP) (βλ. μέθοδοι σελ. 20). Η αντίδραση αυτή έγινε στο διάλυμα πέψης. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικ. 17).



Εικ. 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%
Διαδρομή 1: 3 μl pCMV-FLAG/BamHI/CIP, διαδρομή M2: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb

Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pCMV-FLAG/BamHI/CIP με το DNA IMyo/BamHI

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση και επωάστηκαν 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pCMV-FLAG/BamHI/CIP με 50 ng της περιοχής IMyo (βλ. μεθόδους σελ. 20).

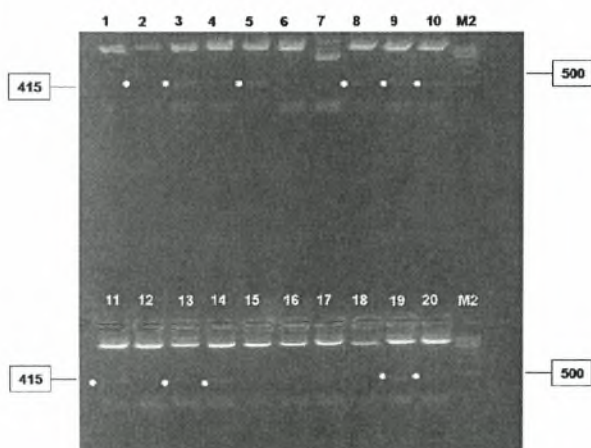
Μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* με τα προϊόντα της σύνδεσης

Δεκτικά κύτταρα *E.coli* Top 10 (competent cells) μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα σύνδεσης (βλ. μεθόδους σελ. 21). Η επώαση των κυττάρων έγινε σε τριβλία LB που περιείχαν το αντιβιοτικό αμπικικιλίνη ως μέσο επιλογής των κυττάρων που περιέχουν τον φορέα pCMV-FLAG.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στην αμπικικιλίνη επιλέχθηκαν 20 και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας) (βλ. μέθοδοι σελ. 21), έτσι ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη ή μη ενθέματος 415 bp στον φορέα pCMV-FLAG.

Για τον λόγο αυτό τα πλασμιδιακά DNA επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 18).

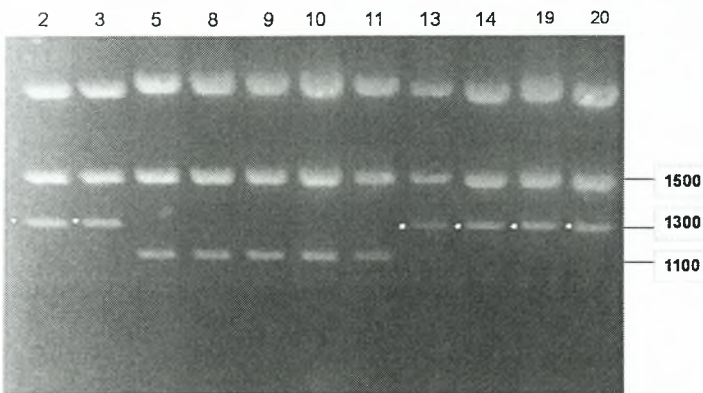


Εικ. 18: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,3%
Διαδρομές 1-20: 3 μ l pCMV-FLAG, διαδρομή M2: 5 μ l μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb

Παρατηρείται ότι το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στα πλασμίδια στις εγκοπές 2,3,5,8,9,10,11,13,14,19 και 20, ενώ τα πλασμίδια στις εγκοπές 4 και 17 έχουν διπλό ένθεμα οπότε και απορρίπτονται.

Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να επιλεχθούν τα ενθέματα τα οποία βρίσκονται στο σωστό προσανατολισμό σε σχέση με το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος του FLAG. Έτσι, τα πλασμίδια επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 19). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζει το ένζυμο PvuII τον φορέα pCMV-FLAG,

εφόσον το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 1300 bp, ενώ αν έχει λάθος προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 1100 bp.



Εικ. 19: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,3%
Διαδρομές 2-20: 3 μl pCMV-FLAG-IMyo

Παρατηρείται ότι το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό στα πλασμίδια στις εγκοπές 2,3,13,14,19 και 20.

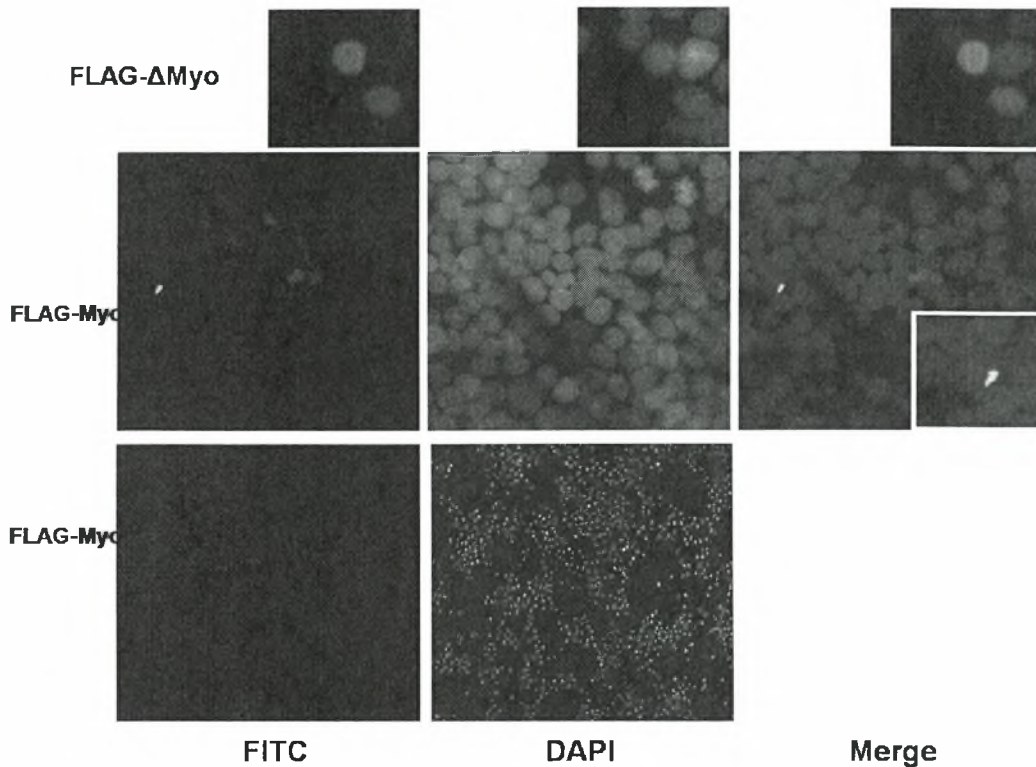
Συμπεραίνουμε ότι κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο **pCMV-FLAG-IMyo**. Το πλασμίδιο αυτό είναι ικανό να παράγει σε κύτταρα θηλαστικών τη χιμαιρική πρωτεΐνη FLAG-Myo.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

Η αποικία η οποία περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCMV-FLAG-IMyo της εγκοπής 2 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υγρό LB με αμπικιλίνη στους 37 °C σε αναδευτήρα όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια έγινε παρασκευή DNA μεσαίας κλίμακας (βλ. μέθοδοι σελ. 21). Η αρτιότητα της κατασκευής επιβεβαιώθηκε με εύρεση της αλληλουχίας της.

Παρατήρηση της FLAG-IMyo σε κύτταρα HeLa με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση της πρωτεΐνης FLAGMyo, έγινε επιμόλυνση των κυττάρων HeLa σε τριβλία 6 θέσεων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCMV-FLAG-IMyo και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από επεξεργασία με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-FLAG (βλ. μέθοδοι σελ. 23). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 20:



Εικ. 20 Κύτταρα HeLa στα οποία εκφράζονται οι αναγραφόμενες πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από επεξεργασία με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-FLAG.

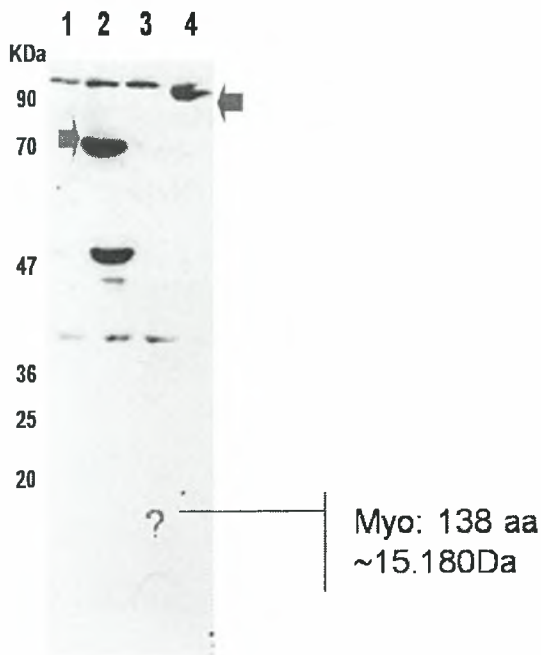
Από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού φαίνεται ότι η FLAG-Myc εκφράζεται σε αμελητέο ποσοστό κυττάρων. Στα ελάχιστα κύτταρα στα οποία παρατηρείται έκφραση η πρωτεΐνη εμφανίζεται και πάλι υπό τη μορφή συσσωματωμάτων.

Ανίχνευση της FLAG-Myc σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa με ανοσοαποτύπωση

Με σκοπό να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη Myc χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης (βλ. μέθοδοι σελ. 23) σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa.

Έτσι, κύτταρα HeLa τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε τριβλία στους 37 °C, επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες FLAG ή FLAG-MgcRacGAP ή FLAG-ΔMyo-MgcRacGAP ή FLAG-Myc.

Στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti-FLAG. Εκχύλισμα κυττάρων που εκφράζουν τον επίτοπο FLAG (διαδρομή 1), χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, ενώ εκχυλίσματα κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες FLAG-ΔMyo-MgcRacGAP (διαδρομή 2) και FLAG-MgcRacGAP (διαδρομή 4) γνωστών μοριακών βαρών, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (Εικ. 21).



Εικ. 21 Ανοσοαποτύπωση εκχυλίσματος κυτάρων HeLa που εκφράζουν τις παρακάτω πρωτεΐνες: FLAG (διαδρομή 1), FLAG-ΔMyc-MgcRacGAP (διαδρομή 2), FLAG-Myc (διαδρομή 3) και FLAG-MgcRacGAP (διαδρομή 4). Η μεμβράνη επώαστηκε με αντίσωμα anti-FLAG. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις των πρωτεϊνών FLAG-MgcRacGAP και FLAG-ΔMyc. Στα αριστερά του ανοσοαποτυπώματος σημειώνονται οι αναμενόμενες θέσεις μετατόπισης μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών.

Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης Myc(15 kDa) καθώς και των υπολοίπων πρωτεϊνών είναι γνωστά. Έτσι ήταν αναμενόμενο να εμφανιστεί ένα θραύσμα στην αντίστοιχη περιοχή για κάθε πρωτεΐνη. Όπως παρατηρείται από την εικόνα, το θραύσμα το οποίο αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Myc δεν ανιχνεύεται, σε αντίθεση με τα θραύσματα των υπολοίπων πρωτεϊνών τα οποία ανιχνεύονται κανονικά, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων του ανοσοφθορισμού που δείχνουν ότι η πρωτεΐνη FLAG-Myc δεν εκφράζεται σε κύτταρα HeLa και έτσι δεν αναμένεται να έχει κάποια επίδραση στην ενεργότητα του HIF-1.

Κλωνοποίηση της περιοχής IMyc στους πλασμιδιακούς φορείς pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST

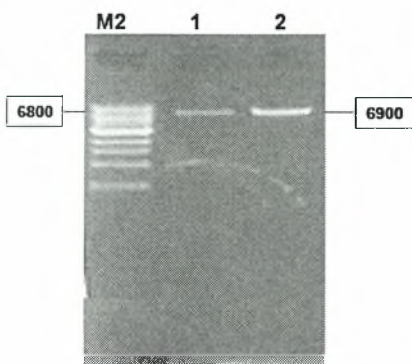
Καθώς παρατηρήθηκε ότι η περιοχή Myc δεν εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η δράση της στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα YASH (βλ. παράρτημα σελ. 48).

Προετοιμασία των πλασμιδιακών φορέων pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST για την αντίδραση σύνδεσης

Δέκα μg πλασμιδιακού φορέα pBEVY-GU-GFP και 10 μg πλασμιδιακού φορέα pBEVY-GU-GST επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού

BamHI ούτως ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης (βλ. μέθοδοι σελ. 19).

Στη συνέχεια, τόσο ο φορέας pBEVY-GU-GFP/BamHI όσο και ο pBEVY-GU-GST/BamHI επεξεργάστηκαν με την αλκαλική φωσφατάση (CIP) (βλ. μεθόδους σελ. 20). Η αντίδραση αυτή έγινε στο διάλυμα πέψης. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικ. 22).



Εικ. 22: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

Διαδρομή 1: 3 μ l pBEVY-GU-GFP/BamHI/CIP, διαδρομή 2: 3 μ l pBEVY-GU-GST/BamHI/CIP, διαδρομή M2: 5 μ l μάρτυρα μοριακού βάρους 1 kb

Αντίδραση σύνδεσης των φορέων pBEVY-GU-GFP/BamHI/CIP και pBEVY-GU-GST/BamHI/CIP με το DNA IMyo/BamHI

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση και επώαστηκαν 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pBEVY-GU-GFP/BamHI/CIP και 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pBEVY-GU-GST/BamHI/CIP, με 50 ng της περιοχής IMyo (βλ. μεθόδους σελ. 20).

Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης

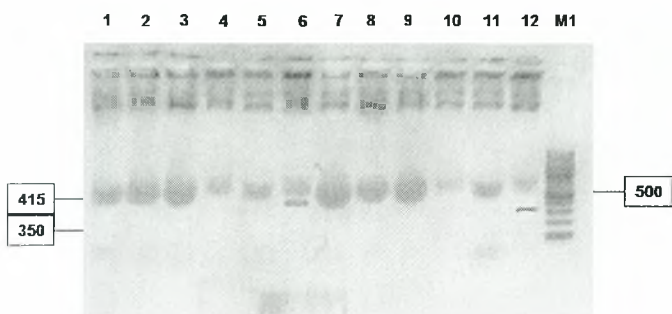
Δεκτικά κύτταρα *E.coli* Top 10 (competent cells) μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα σύνδεσης (βλ. μεθόδους σελ. 21). Η επώαση των κυττάρων έγινε σε τριβλία LB που περιείχαν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ως μέσο επιλογής των κυττάρων που φέρουν τόσο τον φορέα pBEVY-GU-GFP όσο και τον pBEVY-GU-GST.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας για τον pBEVY-GU-GFP

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στην αμπικιλίνη επιλέχθηκαν 6 και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας) (βλ. μέθοδοι σελ. 21), έτσι ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη ή μη ενθέματος 415 bp στον φορέα pBEVY-GU-GFP.

Για τον λόγο αυτό τα πλασμιδιακά DNA επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τις ενδονουκλεάσες PvuII και EcoRI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,3% (Εικ. 23). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζουν τα

ένζυμα PvuII και EcoRI τον φορέα pBEVY-GU-GFP, εφόσον το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 350 bp, ενώ αν έχει λάθος προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 160 bp.



Εικ. 23: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,3%

Διαδρομές 1-6: 3 μl pBEVY-GU-GFP ύστερα από επώαση με BamHI, διαδρομές 7-12: 3 μl pBEVY-GU-GFP ύστερα από επώαση με PvuII και EcoRI, διαδρομή M1: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp

Παρατηρείται ότι η περιοχή IMyo έχει το σωστό προσανατολισμό στο πλασμίδιο στην εγκοπή 6 (και 12).

Κατά συνέπεια κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο **pBEVY-GU-GFP-IMyo**. Το πλασμίδιο αυτό είναι ικανό να παράγει σε κύτταρα σακχαρομύκητα την χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-Myo.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

Η αποικία η οποία περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBEVY-GU-GFP-IMyo αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη στους 37 °C σε αναδευτήρα όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια έγινε παρασκευή DNA μεσαίας κλίμακας (βλ. μέθοδοι σελ. 21). Η αρτιότητα της κατασκευής επιβεβαιώθηκε με εύρεση της αλληλουχίας της.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας για τον pBEVY-GU-GST

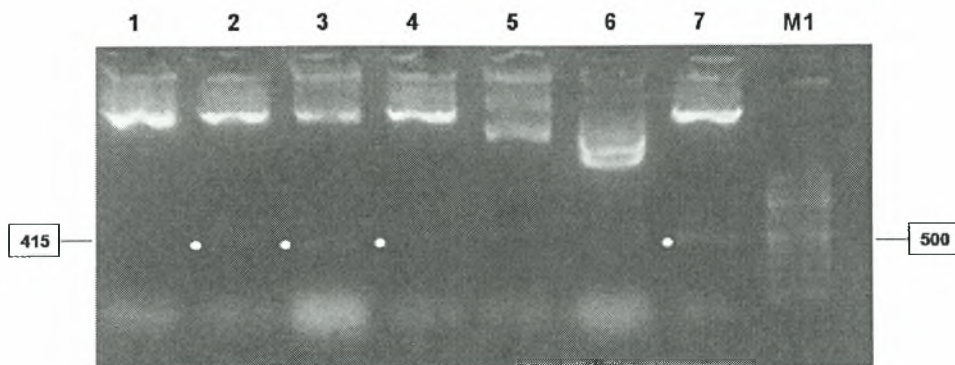
Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στην αμπικιλίνη επιλέχθηκαν 7 και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας) (βλ. μέθοδοι σελ. 21), έτσι ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη ή μη ενθέματος 415 bp στον φορέα pBEVY-GU-GST.

Για τον λόγο αυτό τα πλασμίδια επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,3% (Εικ. 24).

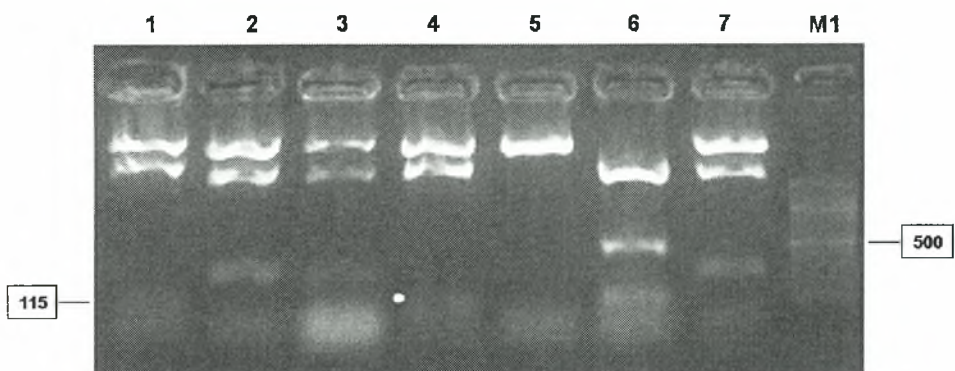
Παρατηρείται ότι το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στα πλασμίδια στις εγκοπές 2,3,4 και 7.

Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να επιλεγθούν τα ενθέματα τα οποία βρίσκονται στο σωστό προσανατολισμό σε σχέση με το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος της GST. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζουν τα ένζυμα PvuII και EcoRI τον φορέα pBEVY-GU-GST, εφόσον το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα

στις 115 bp, ενώ αν έχει λάθος προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 300 bp (Εικ. 25).



Εικ. 24: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,3%
Διαδρομές 1-7: 3 μl pBEVY-GU-GST, διαδρομή M1: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp



Εικ. 25: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,3%
Διαδρομές 1-7: 3 μl pBEVY-GU-GST-IMyo, διαδρομή M1: 5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp

Παρατηρείται ότι το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό στο πλασμίδιο που βρίσκεται στην εγκοπή 4. Άρα κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο **pBEVY-GU-GST-IMyo**. Το πλασμίδιο αυτό είναι ικανό να παράγει σε κύτταρα σακχαρομύκητα τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Myo.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

Η αποικία η οποία περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBEVY-GU-GST-IMyo της εγκοπής 4 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υγρό LB με αμπικιλίνη στους 37 °C σε αναδευτήρα όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια έγινε παρασκευή DNA μεσαίας κλίμακας (βλ. μέθοδοι σελ. 21). Η αρτιότητα της κατασκευής επιβεβαιώθηκε με εύρεση της αλληλουχίας της.

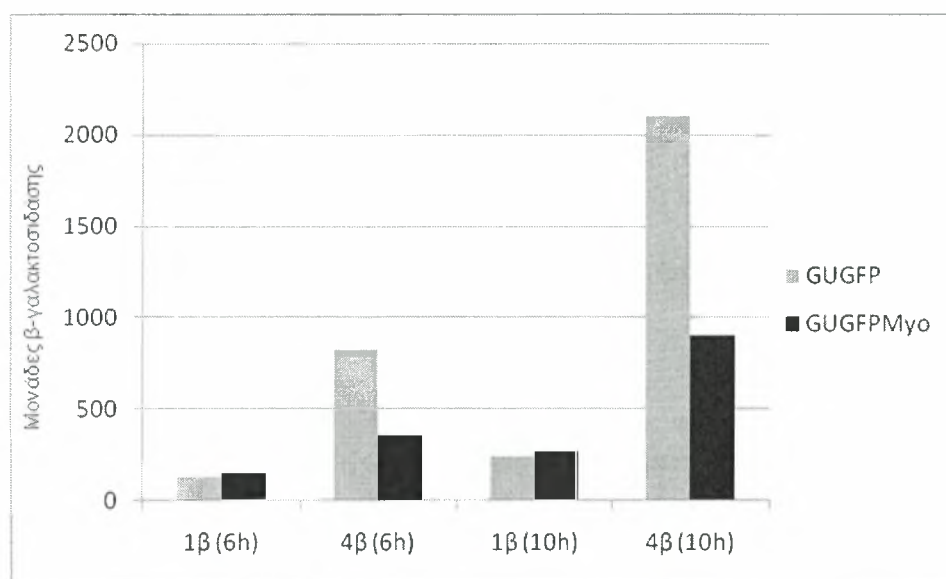
Μετασχηματισμός των κυττάρων σακχαρομύκητα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των πρωτεϊνών GFPMyo και GSTMyo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, κύτταρα σακχαρομύκητα

που εκφράζουν τον HIF-1 και τη β-γαλακτοσιδάση κάτω από τον έλεγχο των HRE (βλ. παράρτημα σελ. 48) μετασχηματίστηκαν επιπλέον με τα πλασμίδια ρBEVY-GU-GFP-IMyo ή ρBEVY-GU-GST-IMyo. Έτσι τα στελέχη 1β και 4β που δεν εκφράζουν και που εκφράζουν τον HIF-1 όταν μεγαλώνουν σε γαλακτόζη αντίστοιχα, μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια ρBEVY-GU-GFP-IMyo ή ρBEVY-GU-GFP ή ρBEVY-GU-GST-IMyo ή ρBEVY-GU-GST (βλ. παράρτημα σελ. 48 και μέθοδοι σελ. 24), τα οποία προσδίδουν στα αντίστοιχα στελέχη αυξοτροφία για την ουρακίλη.

Επίδραση της GFP-Myo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης

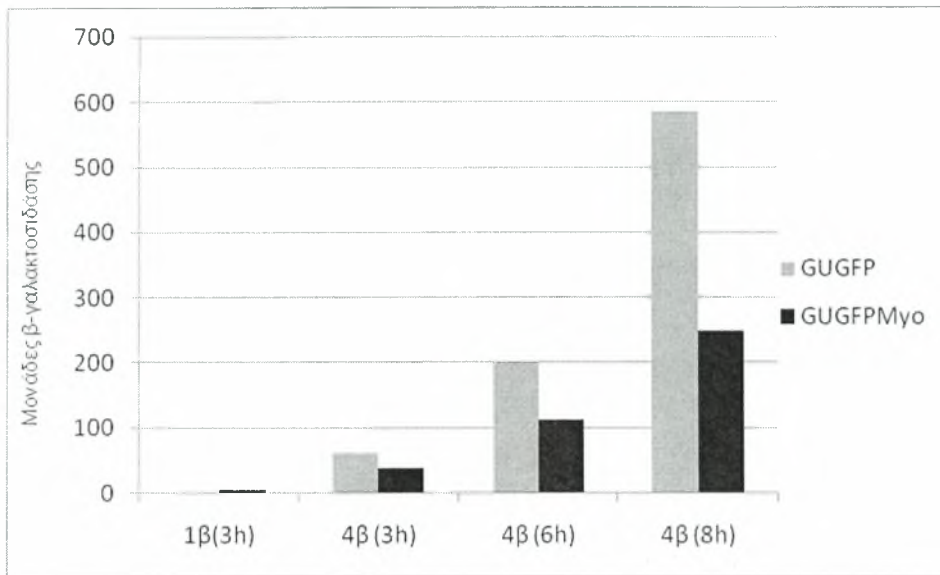
Από τις αποικίες που εμφάνισαν αυξοτροφία σε ουρακίλη απομονώθηκαν 3 για κάθε περίπτωση και μετρήθηκε η δράση της β-γαλακτοσιδάσης ύστερα από επαγωγή σε μέσο με γαλακτόζη (βλ. μέθοδοι σελ. 25). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 26:



Εικ. 26: Μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης μετά από αύξηση των αναγραφόμενων στελεχών σε γαλακτόζη για 6 και 10 ώρες

Παρατηρείται ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 επάγεται σημαντικά μετά από την πάροδο 6 ωρών παρουσία γαλακτόζης, ενώ φτάνει στο διπλάσιο μετά από 10 ώρες. Παρατηρείται ότι η σύγχρονη έκφραση της GFP-Myo τόσο μετά από 6 ώρες όσο και μετά από 10 ώρες, μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 περίπου κατά 50%.

Έγινε επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας με δειγματοληψία ανά διαφορετικά χρονικά σημεία και μετρήθηκαν οι μονάδες του ενζύμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 27:



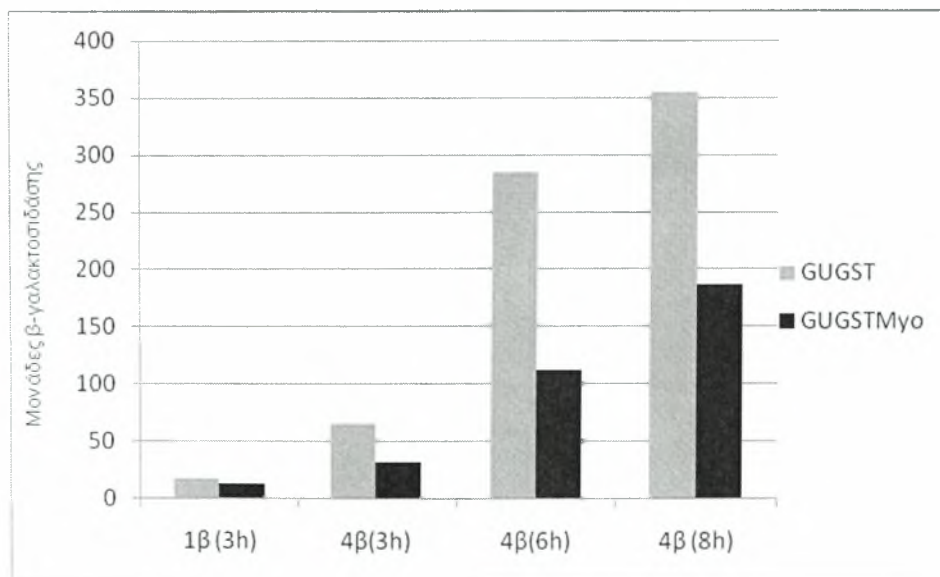
Εικ. 27: Μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης μετά από αύξηση των αναγραφόμενων στελεχών σε γαλακτόζη για 3, 6 και 8 ώρες

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, έτσι και σ'αυτό παρατηρείται ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με την πάροδο του χρόνου επάγεται σημαντικά, ενώ όταν προστίθεται το πλασμίδιο που εκφράζει GFP-Mγo η μεταγραφική του ενεργότητα μειώνεται περίπου κατά το ήμισυ.

Επίδραση της GST-Mγo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης

Από τις αποκίες που εμφάνισαν αυξοτροφία σε ουρακίλη απομονώθηκαν 3 για κάθε περίπτωση και μετρήθηκε η δράση της β-γαλακτοσιδάσης ύστερα από επαγωγή σε μέσο με γαλακτόζη (βλ. μέθοδοι σελ. 25).

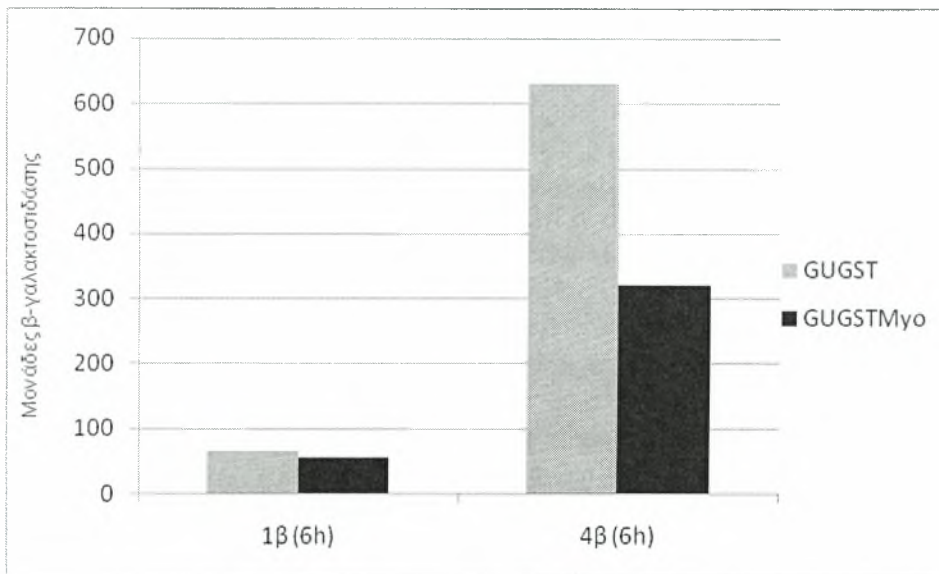
Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 28:



Εικ. 28: Μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης μετά από αύξηση των αναγραφόμενων στελεχών σε γαλακτόζη για 3, 6 και 8 ώρες

Από την εικόνα παρατηρείται ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 επάγεται με το πέρασμα του χρόνου, ενώ η επίδραση του πλασμιδίου που εκφράζει τη GST-Myo έχει σαν αποτέλεσμα η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 να μειώνεται περίπου κατά 50% τόσο μετά από 3 ώρες, όσο και μετά από 6 και 8 ώρες.

Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε με δειγματοληψία μόνο μετά από 6 ώρες και μετρήθηκαν οι μονάδες του ενζύμου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 29:



Εικ. 29: Μέτρηση β-γαλακτοσιδάσης μετά από αύξηση των αναγραφόμενων στελεχών σε γαλακτόζη για 6 ώρες

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα παρατηρείται ότι το πλασμίδιο που εκφράζει τη GST-Myo έχει σαν αποτέλεσμα η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 να μειώνεται κατά 50% περίπου.

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της περιοχής Myo της MgcRacGAP σε κύτταρα *Saccharomyces Cerevisiae* είναι ικανή να μειώσει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1 αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων σαν απόκριση στην υποξία, τα οποία σχετίζονται με διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η ερυθροποίηση, ο αναερόβιος μεταβολισμός και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β), εκ των οποίων η μία (α) είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των αποκρίσεων του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή των παραπάνω γονιδίων είναι ο διμερισμός των δύο υπομονάδων του HIF-1, η είσοδός τους στον πυρήνα και η πρόσδεσή τους στα HREs. Έχει παρατηρηθεί ότι συχνά τα επίπεδα του HIF-1 αυξάνουν σημαντικά κατά την ογκογένεση, ενώ τα αυξημένα επίπεδά του σχετίζονται και με την κακή διάγνωση σε συγκεκριμένα είδη καρκίνων. Έτσι, είναι φανερό ότι ο HIF-1 χρησιμοποιείται ως στόχος αντικαρκινικής θεραπείας με προσπάθειες αναστολής του από διάφορες χημικές και βιολογικές ουσίες.

Ο HIF-1 αλληλεπιδρά με πληθώρα μορίων, ένα εκ των οποίων είναι και η MgcRacGAP. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η περιοχή Myo της MgcRacGAP είναι αυτή που αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1. Η MgcRacGAP ρυθμίζει τη λειτουργία των πρωτεϊνών RhoA, Rac1 και cdc42 σαν GAP πρωτεΐνη διαδραματίζοντας έτσι βασικό ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, ενώ παίζει επίσης σημαντικό ρόλο και στην ολοκλήρωση της κυτοκίνησης κατά την μίτωση. Συνδέεται στην κινεσίνη MKLP1, δημιουργώντας το σύμπλοκο της ατράκτου (centralspindlin complex) το οποίο συσπειρώνει αντιπαράλληλες τουμπουλίνες, ρυθμίζει το σχηματισμό της αύλακας και προωθεί την αποκοπή της. Η περιοχή της MgcRacGAP η οποία συνδέεται με την κινεσίνη περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-36. Επίσης, βρέθηκε ότι όταν η MgcRacGAP υπερεκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών, αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 έως και 80%. Για την αναστολή αυτή είναι απαραίτητη η περιοχή Myo της MgcRacGAP, καθώς όταν αυτή απουσιάζει δεν υπάρχει αναστολή στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσον η περιοχή Myo αν υπερεκφραστεί σε κύτταρα θηλαστικών μπορεί από μόνη της να αναστείλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Για να είναι αυτό εφικτό έπρεπε η περιοχή 1-138 αα της MgcRacGAP να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Έτσι, το αντίστοιχο cDNA IMyo απομονώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και κλωνοποιήθηκε στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης θηλαστικών pEGFP και pCMV-FLAG, με σκοπό την παραγωγή των πρωτεϊνών GFP-Myo και FLAG-Myo αντίστοιχα. Αφού κατασκευάστηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμιδια ελέγχθηκε η δράση της Myo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα HEK293T και HeLa. Παρατηρήθηκε ότι η περιοχή Myo δε φαίνεται να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Αυτό ήταν φυσιολογικό από τη στιγμή που στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη μέθοδο του φθορισμού (για την GFP-Myo) και του ανοσοφθορισμού (για την FLAG-Myo), παρατηρήσαμε ότι το τμήμα Myo της MgcRacGAP δεν εκφράζεται σε κύτταρα HeLa και HEK293T. Στα μεμονωμένα κύτταρα όπου ανιχνεύθηκε

κάποια έκφραση και στις δύο περιπτώσεις φάνηκε να σχηματίζονται συσσωματώματα. Στην περίπτωση δε του pCMV-FLAG-IMyo επαληθεύτηκε η αδυναμία της Myo να εκφραστεί σε κύτταρα θηλαστικών, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Το θραύσμα που αναμενόταν στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης FLAG-Myo δεν παρατηρήθηκε.

Είναι πιθανό, λαμβανομένων υπ' όψιν και των αποτελεσμάτων του μικροσκοπίου φθορισμού, το επιλεγμένο τμήμα 1-138 της MgcRacGAP να είναι ικανό να παραχθεί, αλλά να οδηγείται προς αποικοδόμηση. Στην περίπτωση που η ποσότητά του ξεπερνά το ρυθμό αποικοδόμησής του αυτό είναι δυσδιάλυτο και δημιουργεί συσσωματώματα που καθιζάνουν μέσα στο κύτταρο. Είναι δυνατόν ακόμη, τα κύτταρα που εκφράζουν την GFP-Myo να μην επιβιώνουν.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκφραση της περιοχής Myo σε κύτταρα θηλαστικών θα μπορούσε να δοκιμασθεί: 1) Να μειωθεί το μέγεθος του επιλεγμένου τμήματος, πιθανόν με αφαίρεση του τμήματος 1-36 έτσι ώστε να αποκλειστεί η αλληλεπίδραση με την κινεσίνη. Μια τέτοια αλληλεπίδραση ανταγωνίζεται ίσως την ενδογενή αλληλεπίδραση MgcRacGAP/MKLP1 καταστρέφοντας τη διαδικασία της κυτοκίνησης και σκοτώνοντας τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την περιοχή 1-138 και 2) Να αυξηθεί το μέγεθος του επιλεγμένου τμήματος με προσθήκη της αμέσως επόμενης περιοχής της MgcRacGAP η οποία είναι υψηλή σε περιεκτικότητα βασικών αμινοξέων και άρα είναι πιθανό να καταστήσει το τμήμα πιο ευδιάλυτο.

Καθώς επαληθεύτηκε ότι η Myo δεν εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τη δράση της σε κύτταρα *Sacharomyces cerevisiae*, έναν πολύ απλό ευκαρυωτικό οργανισμό για του οποίου την κυτοκίνηση δεν χρειάζεται η MgcRacGAP και δεν περιέχει ενδογενή HIF-1, αλλά στον οποίο μπορούμε να μετρήσουμε τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 μέσω του συστήματος YASH (βλ. παράρτημα σελ. 48). Για το λόγο αυτό το cDNA της Myo κλωνοποιήθηκε στους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pBEVY-GU-GFP και pBEVY-GU-GST προκειμένου να εκφραστούν οι πρωτεΐνες GFP-Myo και GST-Myo αντίστοιχα. Αφού κατασκευάστηκαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, ελέγχθηκε η δράση τους στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με το σύστημα YASH. Το στέλεχος 4β που εκφράζει ενεργό HIF-1 όταν αναπτύχθει σε γαλακτόζη και το στέλεχος 1β (δεν εκφράζει HIF-1 -προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας-) μετασχηματίστηκαν με κάθε ένα από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και έγιναν μετρήσεις της ενεργότητας του HIF-1 μετά από μεταφορά τους σε γαλακτόζη.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και η GFP-Myo και η GST-Myo, οι οποίες εκφράζονται επίσης από υποκινητές επαγόμενους από γαλακτόζη, καταστέλλουν την ενεργότητα του HIF-1 κατά τουλάχιστον 50%. Η καταστολή αυτή ξεκινάει από τις πρώτες μετρήσεις έκφρασης του HIF-1 (3h) και παραμένει σταθερή μέχρι 10 ώρες επαγωγής του σε γαλακτόζη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η περιοχή Myo της MgcRacGAP είναι ικανή να καταστείλει την δράση του HIF-1 μέσα σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο.

Γνωρίζουμε ότι η περιοχή Myo της MgcRacGAP αλληλεπιδρά με την υπομονάδα του HIF-1α σε κύτταρα θηλαστικών και σε κύτταρα *S.c.* (βλ. εισαγωγή, Lyberopoulou et al. 2007) και μπορούμε με βεβαιότητα να

συνάγουμε ότι αυτή η αλληλεπίδραση είναι και η αιτία της καταστολής της δράσης του HIF-1 στο στέλεχος 4β.

Η περιοχή του HIF-1α με την οποία αλληλεπιδρά η περιοχή Myo εντοπίζεται στο τμήμα PASB, ενώ στις αλληλουχίες περίπου 100 αμινοξέων που ακολουθούν δεν έχει αποδοθεί κάποια ιδιαίτερη λειτουργία. Θα ήταν δυνατόν, οι πρωτεΐνες GFP-Myo και GST-Myo, εφ' όσον αλληλεπιδρούν με την περιοχή PASB να ανταγωνίζονται τη σύνδεση του HIF-1α με τον HIF-1β που συμβαίνει σε αυτή την περιοχή και να μειώνουν έτσι τη δημιουργία μεταγραφικά ενεργών συμπλόκων HIF-1. Από την άλλη μεριά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την περίπτωση η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Myo με τον HIF-1α σε οποιοδήποτε τμήμα του (PASB ή την ακόλουθη περιοχή) να επηρεάζει τη δέσμευση του στο DNA ή την αλληλεπίδρασή του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής ή και με το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο και να μειώνει με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφική του ενεργότητα.

Η εύρεση του μηχανισμού με τον οποίο συμβαίνει η καταστολή της δράσης του HIF-1 από την Myo στα κύτταρα S.c., θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο που συμβαίνει η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 από την MgcRacGAP σε κύτταρα θηλαστικών και θα διαφωτίσει την βιολογική σημασία αυτής της *in vivo* αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A) Σύστημα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1

Για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 στα κύτταρα HEK 293T χρησιμοποιείται σύστημα το οποίο βασίζεται στις διαφορετικές αντιδράσεις που καταλύουν δύο ένζυμα τα οποία παράγουν φως, η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) και η λουσιφεράση της *renilla reniformis*. Η μέτρηση του παραγόμενου φωτός από το κάθε ένζυμο είναι δυνατόν να γίνει στο ίδιο δείγμα καθώς χρησιμοποιούν διαφορετικά υποστρώματα και ρυθμιστικά διαλύματα προκειμένου να καταλύσουν την αντίστοιχη αντίδραση (βλ. μέθοδοι σελ. 22-23). Το ρυθμιστικό διάλυμα που αντιστοιχεί στη λουσιφεράση από τον οργανισμό *renilla reniformis*, έχει την ικανότητα να αδρανοποιεί τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας.

Πιο συγκεκριμένα, η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{+2} . Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Αντίθετα, η λουσιφεράση της *renilla reniformis* χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την κολεντεραζίνη την οποία μετατρέπει σε κολεντεραμίδιο. Σαν πλασμίδιο αναφοράς για την επαγωγή του HIF-1, χρησιμοποιείται το pGL3-VEGF/5HRE το οποίο περιέχει 5 HRE του γονιδίου του VEGF (γονιδίου στόχου του HIF-1) στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της επιμόλυνσης χρησιμοποιείται το pCI-*renilla* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση της *renilla reniformis* κάτω από τον έλεγχο του σταθερά εκφραζόμενου υποκινητή του CMV. Κατά την επιμόλυνση, όλα τα τριβλία επιμολύνονται και με τα δύο αυτά πλασμίδια προκειμένου να γίνει η κατάλληλη κανονικοποίηση για την απόδοση της επιμόλυνσης σε κάθε τριβλίο μέσω του πλασμιδίου pCI-*renilla* και να μετρηθεί συγχρόνως η ενεργότητα του HIF-1 μέσω του πλασμιδίου pGL3-VEGF/5HRE.

B) Σύστημα YASH

Για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα YASH το οποίο δημιουργήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Π.Θ. (Braliou et al. 2006)

Συνοπτικά, στο σύστημα αυτό κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* RS453 αυξότροφα σε λευκίνη (*leu⁻*), τρυπτοφάνη (*trp⁻*), αδενίνη (*ade⁻*), ουρακίλη (*ura⁻*), ιστιδίνη (*his⁻*) και λυσίνη (*lys⁻*) μετασχηματίζονται με πλασμίδια (βλ. μέθοδοι σελ. 24) τα οποία μπορούν και παράγουν τον ανθρώπινο HIF-1. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα σακχαρομύκητα δεν παράγουν HIF-1, εφ' όσον αυτός εκφράζεται μόνο σε κύτταρα θηλαστικών. Έτσι, το πλασμίδιο pARNT-HIF-1α παράγει τις δύο υπομονάδες του HIF-1 σε μέσο με γαλακτόζη, καθώς ο υποκινητής του είναι επαγόμενος από αυτή. Το πλασμίδιο αυτό έχει προέλθει από την κλωνοποίηση των γονιδίων του HIF-1α

και του ARNT στο πλασμίδιο pBEVY-GL, υπό τον έλεγχο υποκινητή επαγόμενου από την γαλακτόζη, το οποίο προσδίδει στο στέλεχος αυξοτροφία στην λευκίνη. Η μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 επιτυγχάνεται με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (βλ. μέθοδοι σελ. 25), καθώς ο HIF-1 στοχεύει τα HRE του πλασμιδίου pHRE(6x)-LacZ και θα παράγει β-γαλακτοσιδάση μόνο εφ' όσον εκφράζεται λειτουργικός HIF-1 μέσα στο κύτταρο. Το πλασμίδιο αυτό προσδίδει στο κύτταρο αυξοτροφία στην θρυπτοφάνη. Τα στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα YASH είναι τα εξής:

- pRS453
- pRS453+pBEVY-GL+ pHRE(6x)-LacZ (θα αναφέρεται ως 1β)
- pRS453+pARNT-HIF-1α + pHRE(6x)-LacZ (θα αναφέρεται ως 4β)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bernards, A. and J. Settleman (2004). "GAP control: regulating the regulators of small GTPases." Trends Cell Biol **14**(7): 377-85.
- Braliou GG, Venieris E, Kalousi A, Simos G. (2006). "Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1alpha effectors." Biochem Biophys Res Commun. **346**(4): 1289-96.
- Chachami G, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, Paraskeva E. (2004). "Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(5): 544-51.
- Déry MA, Michaud MD, Richard DE (2005). "Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." Int J Biochem Cell Biol **37**(3): 535-40.
- Gacon G, Touré A, Dorseuil O, Morin L, Timmons P, Jégou B, Reibel L, (1998). "MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to Drosophila rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells." J Biol Chem **273**(11): 6019-23.
- Goldberg MA, Dunning SP and Bunn HF (1988). "Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein." Science **242**(4884):1412-1415
- Hall A. and Lamarche, N. (1994). "GAPs for rho-related GTPases." Trends Genet **10**(12): 436-40.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.
- Hirose K, Kawashima T, Iwamoto I, Nosaka T, Kitamura T. (2001). "MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody." J Biol Chem **276**(8): 5821-8.
- Hirota K, Semenza GL (2005) "Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases." Biochem Biophys Res Commun. **338**(1):610-6
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-76.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing." Science **292**(5516): 464-8.
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996). "Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **271**(30): 17771-8.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." Annu Rev Biochem **68**: 459-86.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998). "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation

and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha." EMBO J **17**(22): 6573-86.

Kawashima T, Bao YC, Nomura Y, Moon Y, Tonozuka Y, Minoshima Y, Hatori T, Tsuchiya A, Kiyono M, Nosaka T, Nakajima H, Williams DA, Kitamura T. (2006). "Rac1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors." The Journal of Cell Biology **175**(6):937-46

Kawashima T, Bao YC, Minoshima Y, Nomura Y, Hatori T, Hori T, Fukagawa T, Fukada T, Takahashi N, Nosaka T, Inoue M, Sato T, Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Yokoyama S, Kitamura T. (2009). "A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors." Molecular And Cell Biology **29**(7):1796-813

Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E. (2007). "MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity." Cell Physiol Biochem **20**(6):995-1006

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**(18): 5197-206.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.

McCormick, F. (1989). "ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator." Cell **56**(1): 5-8.

Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS Jr, Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M, Kitamura T (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell **4**(4): 549-60.

Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G (2006). "Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor 1a." J Biol Chem. **281**(44):33095-106

Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. (2008). "Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK." J Biol Chem. **283**(41):27620-7

Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000). "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein." Nat. Cell Biol. **2**(7): 423-7.

Pavicic-Kaltenbrunner V, Mishima M, Glotzer M. (2007). "Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex." Molecular Biology of the Cell **18**(12):4992-5003

Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 343-54.

Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM and Antonarakis SE (1991). "Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13):5680-5684

Semenza GL, Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R. (1997). "Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension." J Biol Chem **272**(31): 19253-60.

Semenza, G. L. (2002). "HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S62-7.

Semenza, G. L. (2003). "Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders." Annu Rev Med **54**: 17-28.

Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-32.

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." Am J Pathol **157**(2): 411-21.

Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 479-506.

Tonozuka Y, Minoshima Y, Bao YC, Moon Y, Tsubono Y, Hatori T, Nakajima H, Nosaka T, Kawashima T, Kitamura T (2004). "A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line." Blood **104**(12): 3550-7.

Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S (2006). "Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism." Free Radic Res **40**(8): 847-56.

Van de Putte T, Zwijsen A, Lonnoy O, Rybin V, Cozijnsen M, Francis A, Baekelandt V, Kozak CA, Zerial M, Huylebroeck D (2001). "Mice with a homozygous gene trap vector insertion in mGcRacGAP die during pre-implantation development." Mech Dev **102**(1-2): 33-44.

Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH (2003). "The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy." Oncogene **22**(21): 3213-20.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**(12): 5510-4.

Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE (2003). "Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α ." J Biol Chem **278**(18): 15911-6.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases." Cancer Res **59**(22): 5830-5.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL (2000). "Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics." Cancer Res **60**(6): 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(4): 391-6.

