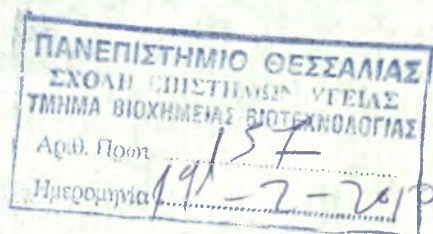


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ  
ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ HIF-1 $\alpha$  ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ  
ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1: Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ  
HAX-1**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΚΑΡΑΤΑΣΙΟΥ ΤΖΕΝΗ-ΑΓΑΠΗ**

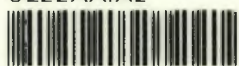
ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8169/1  
Ημερ. Εισ.: 19-04-2010  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2010  
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087100


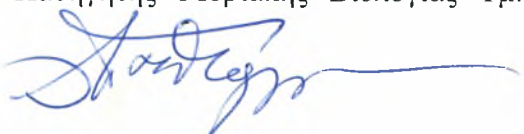



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ  
ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ HIF-1 $\alpha$  ΤΟΥ ΕΠΑΓΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ  
ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1: Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ  
HAX-1**

**Υπεύθυνος καθηγητής:**

- ❖ Γεωργάτσου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Λάρισας

**Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

- ❖ Γεωργάτσου Ελένη Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Λάρισας 
- ❖ Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας 
- ❖ Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας 

Ευχαριστώ θερμά:

Την κα. Ε. Γεωργιάτσου, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, για όλα όσα μου δίδαξε και για την συμπαράσταση σε κάθε στάδιο της διπλωματικής εργασίας.

Τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που μου πρότεινε το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής για την εκπόνηση της διπλωματικής μου και μεσολάβησε ώστε να γίνω δεκτή σε αυτό.

Τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

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

Τον κ. Μυλωνή Ηλία, διδάσκοντα 407 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

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

## Περιεγόμενα

➤ Συντμήσεις	7
Περίληψη	9
Εισαγωγή	10
➤ HIF-1	10
• Η δομή του HIF-1	11
• Η ρύθμιση του HIF-1α	14
• Ρύθμιση από φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία)	14
• Ρύθμιση από μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία)	15
• Ρύθμιση από χημικές ουσίες	16
• Ρύθμιση από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια	16
• Συσχέτιση με ασθένειες	17
• Ανάπτυξη	17
• Καρκίνος	18
• Ισχαιμικές ασθένειες	19
• Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α	19
➤ HAX-1	21
• Η δομή της HAX-1	22
• Ο εντοπισμός της HAX-1	23
• Οι αλληλεπιδράσεις της HAX-1 με άλλες πρωτεΐνες	23
• Συσχέτιση με ασθένειες	28
➤ Σκοπός της εργασίας	30
Υλικά και Μέθοδοι	31
➤ Υλικά	31
➤ Μέθοδοι	36
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit	36
• Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA	36
• Πέψη με ένζυμα περιορισμού	37
• Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	37
• Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase)	38
• Απομόνωση και καθαρισμός DNA από την πηκτή αγαρόζης με τη μέθοδο “GEL EXTRACTION” της QIAGEN	38
• Ποσοτικοποίηση	39

• Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)	39
• Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (E.coli Top10) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	39
• Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (E.coli transformation)	40
• Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (mini preparation) χρησιμοποιώντας το QIAprep Spin Miniprep Kit και μικροφυγόκεντρο.	40
• Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (BL21 RIL) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	41
• Επαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	41
• Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια	42
• Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	42
• Χρώση με Coomassie Brilliant Blue	43
• Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης	43
• Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο ιστιδινών	44
• Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	45
• Συγκρατήριση πρωτεϊνών <i>in vitro</i>	45
• Ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση	46
<b>Αποτελέσματα</b>	49
➤ Κλωνοποίηση του cDNA της HAX-1 <sup>49-246</sup> σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης πρωτεϊνών (pGEX4T1-Tev)	50
• Απομόνωση της HAX-1 <sup>49-246</sup> από τον πλασμιδιακό φορέα pVP16 και προετοιμασία του φορέα pGEX4T1-Tev για την αντίδραση σύνδεσης	50
• Αντίδραση σύνδεσης του pGEX4T1-Tev/NotI/CIP με το DNA της HAX-1 <sup>49-246</sup> /NotI	52
• Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Top10 με τα προϊόντα	52
• Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation)	53
• Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το QIAprep Spin Miniprep Kit και μικροφυγόκεντρο	56
➤ Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX1 <sup>49-246</sup> , GST/GAP <sup>138</sup> , GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α <sup>244-532</sup>	57
• Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 RIL	57

• Έπαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	59
• Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα βακτήρια	59
• Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	59
➤ Καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1 <sup>49-246</sup> , GST/GAP <sup>138</sup> , GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α <sup>244-532</sup>	61
• Καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1 <sup>49-246</sup> , GST/GAP <sup>138</sup>	61
• Καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α <sup>244-532</sup>	63
➤ In vitro ειδική σύνδεση (pull down assay) του GFP/HIF-1α και του GFP/HIF-1α <sup>244-532</sup> με την GST, GST/GAP <sup>138</sup> και την GST/HAX-1 <sup>49-246</sup> και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση	66
Συζήτηση	71
Βιβλιογραφία	73

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1

HAX-1: HS-1-συνδεόμενη πρωτεΐνη X-1

bHLH: βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας

BSA: Αλβουμίνη ορού βοδίου

CIP: Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

GAP: GTPase Activating Protein

GFP: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GST: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης

HIF-1α: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α

HRE: Στοιχείο απόκρισης στην υποξία

bHLH: basic helix-loop-helix

IPTG: Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο

LB: Luria Broth

MCS: Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης

MgcRacGAP: Male germ cell Rac GAP

PAS: Per-Arnt-Sim

PBS: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων

PMSF: φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

ROS: Ενεργές ρίζες οξυγόνου

SDS: Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο

TAE: Tris-οξικό οξύ-EDTA

TEMED: N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

Tris: Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

ATP: Αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ

DFO: δεσφερριοξαμίνη

DMOG: διμεθυλοξαλική γλυκίνη

MAPK: Κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα

PHD: πρόλυλο-υδροξυλάση

VEGF: Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων

GTP: τριφωσφορική γουανωσίνη

DNA: Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ



NLS: nuclear localization signals

PSTD: Pro-Ser-Thr rich protein stabilization domain

ODD: oxygen dependent degradation domain

PHD: Proline Hydroxylase Domain

pVHL: Von Hippel Lindau

p300/CBP: Creb Binding Protein

SRC-1: Steroid Receptor Coactivator 1

TIF-2: Transcription Intermediary factor 2

HNF4: Hepatocyte Nuclear Factor 4

HDAC7: Histone Deacetylase 7

Jab1: Jun Activation domain-binding protein 1

FIH-1: Factor Inhibiting HIF-1

ARD1: ARrest Defective-1 protein

SUMO-1: Small Ubiquitin-like Modifier 1

MDM2: Murine Double Minute 2

Hsp90: Heat Shock Protein 90

Necdin: Neurally differentiated embryonal carcinoma-cell derived factor

Bcl-2: B cell lymphoma/leukemia-2

BH1, BH2: Bcl-2 homology

PEST: proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) enriched sequence TMD: transmembrane domain

EBNA-LP: Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein

EBV: Epstein-Barr virus

Bax: συνδεόμενη με την Bcl-2 πρωτεΐνης X

IL-1: ιντερλευκίνη-1

K15: KSHV Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

Vpr: ιική πρωτεΐνη R

HIV-1: ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας τύπου 1

Omi/HtrA2: High temperature requirement protein A2 γνωστή και ως Omi

SERCA2: Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase

PLN: phospholamban

PKD2: Polycystic kidney disease 2

RRE: στοιχείο απάντηση στη ιική πρωτεΐνη Rev

SDS: sodium dodecyl sulfate

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 αποτελεί την κύρια απόκριση του κυττάρου όταν αυτό εκτεθεί σε συνθήκες μειωμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου (υποξία). Πρόκειται για ένα ετεροδιμερή παράγοντα ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες, την α και τη β. Η ρύθμιση του HIF-1 συντελείται μέσω της α υπομονάδας (HIF-1α), η έκφραση της οποίας εξαρτάται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση οξυγόνου. Η ενεργοποίηση του HIF-1 σηματοδοτεί την έκφραση γονιδίων τα προϊόντα των οποίων δρουν αντιρροπιστικά στο υποξικό στρες. Γίνεται φανερό λοιπόν, ότι ο HIF-1 εμπλέκεται σε μονοπάτια ερυθροποίησης, αγγειογένεσης, μεταβολισμού και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ωστόσο, για τη λειτουργία του HIF-1 αναγκαία κρίνεται η συσχέτισή του και με άλλα μόρια. Το σύστημα των δύο υβριδίων ήταν αυτό που επιλέχθηκε ως γρήγορο και αξιόπιστο για την ανίχνευση των μορίων αυτών με τον HIF-1α [1]. Έτσι, ανάμεσα στις διάφορες μοριακές αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύτηκαν συμπεριλαμβάνεται και αυτή με την πρωτεΐνη HAX-1<sup>49-246</sup>.

Η HAX-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη 35 kDa η οποία φυσιολογικά εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια και εμπλέκεται σε διάφορα μονοπάτια, το πιο καλά μελετημένο από τα οποία είναι αυτό των κασπασών 3 και 9 όπου και έχει αντιαποπτωτική δράση. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχτεί ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της προκαλούν ουδετεροπενία [Severe Congenital Neutropenia (SCN)], ενώ υποθέσεις έχουν γίνει για συσχέτισή της και με άλλες ασθένειες όπως η ψωρίαση, η πολυκυστική νόσος των νεφρών, ο καρκίνος κ.α.

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η έκφραση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών HAX-1<sup>49-246</sup> και HIF-1α<sup>244-532</sup> και η *in vitro* επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης τους, καθώς το σύστημα δύο υβριδίων αν και κατάλληλο για την ανίχνευση αγνώστων αλληλεπιδράσεων, παρ' όλα αυτά είναι ένα ετερόλογο σύστημα το οποίο χρειάζεται επαλήθευση.

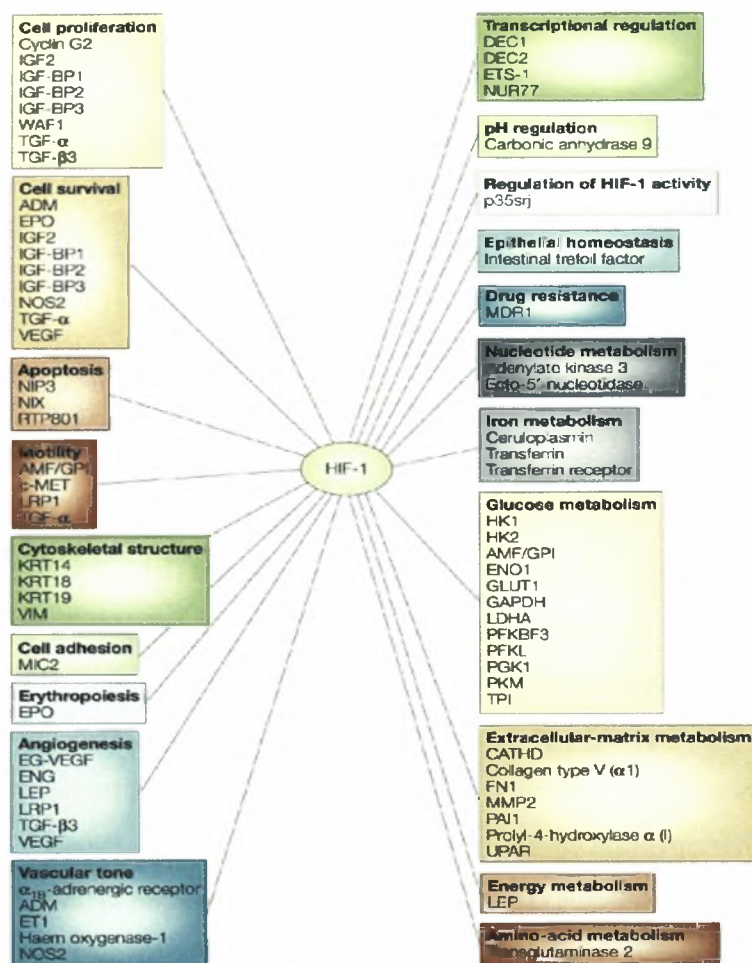
Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του cDNA της HAX-1<sup>49-246</sup> σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης πρωτεϊνών (pGEX4T1-Tev) και ακολούθησε επαγωγή και καθαρισμός της HAX-1<sup>49-246</sup> και του HIF-1α<sup>244-532</sup> (παράλληλα καθαρίστηκαν και πρωτεΐνες οι οποίες αποτέλεσαν, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες της πειραματικής διαδικασίας). Τελικά πραγματοποιήθηκε επιτυχής *in vitro* ειδική σύνδεση (pull down assay) των δύο πρωτεϊνών ενώ τα αποτελέσματα της σύνδεσης αυτής αναλύθηκαν με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Επιβεβαιώθηκε δηλαδή η *in vitro* σύνδεση της πρωτεΐνης HAX-1<sup>49-246</sup> με τον HIF-1α.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## HIF-1

Για την επιβίωση τόσο ενός οργανισμού όσο και κάθε κυττάρου του ξεχωριστά, απαραίτητη είναι η διατήρηση της ομοιοστασίας διαφόρων στοιχείων. Οποιαδήποτε διαταραχή της θα μπορούσε να επιφέρει βλάβες στο κύτταρο οι οποίες οδηγούν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο, σε περίπτωση που είναι ανεπανόρθωτες. Το οξυγόνο είναι ένα από τα στοιχεία που η διατήρηση της ομοιοστασίας του κρίνεται απαραίτητη για το κύτταρο καθώς εμπλέκεται σε ζωτικές διεργασίες. Μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του (υποξία) οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής ATP από τα κύτταρα και έτσι διακοπή του αερόβιου μεταβολισμού ενώ αύξηση στα επίπεδα του (υπεροξία) μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).

Προκειμένου τα κύτταρα να αποτρέψουν τον θάνατο που οφείλεται σε διαταραχές στη συγκέντρωση οξυγόνου και να ανταπεξέλθουν στις καταστάσεις στρές, αρχίζουν να τροποποιούν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Παρ' όλα αυτά, σε ακραίες συνθήκες ανοξίας στο κύτταρο διαδραματίζεται μια σειρά γεγονότων με σκοπό να προκαλέσουν τελικά αποπτωτικό θάνατο. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς στοχεύει στην αποφυγή συσσώρευσης μεταλλαγμένων κυττάρων. Ο παράγοντας που διαμεσολαβεί στις προαναφερόμενες διαδικασίες είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1(Hypoxia Inducible Factor-1) ο οποίος ταυτοποιήθηκε στον άνθρωπο και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1995. Ο HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες: α) την υπομονάδα HIF-1α η έκφραση της οποίας επηρεάζεται από την υποξία και β) HIF-1β ή ARNT που δεν εξαρτάται από την υποξία. Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την προσαρμογή στην υποξία λαμβάνει χώρα σε γονιδιακό επίπεδο και περιλαμβάνει την επαγωγή της μεταγραφής μέσω της πρόσδεσης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 στην αλληλουχία HRE (Hypoxia Response Element) που βρίσκεται στους υποκινητές των γονιδίων απόκρισης [2, 3] (Εικ. 1).



Εικ. 1: Γονίδια στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1[4]

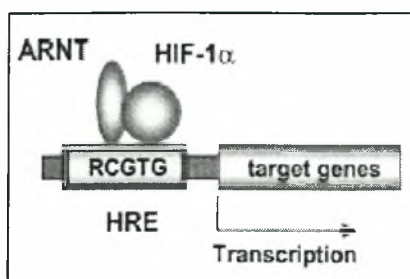
## Η δομή του HIF-1

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος πρώτη φορά εντοπίστηκε να προσδένεται στον 3' ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Η ερυθροποιητίνη είναι μια ορμόνη που επάγεται μεταγραφικά σε υποξικές καταστάσεις και ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των ερυθροκυττάρων. Στο νέο αυτό μεταγραφικό παράγοντα αναγνωρίστηκε μία ειδική αλληλουχία DNA (5'-RCGTG-3'), η οποία ονομάζεται στοιχείο απόκρισης στην υποξία HRE (Hypoxia Response Element). Αυτό το στοιχείο είναι και εκείνο που τον διακρίνει και τον κάνει αναγνωρίσιμο ως ένα παράγοντα απόκρισης στην υποξία [5, 6].

Ο HIF-1 όπως προαναφέρθηκε είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες: τον HIF-1 $\alpha$  (επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 $\alpha$ , Mr 92670 Da, 826 aa) και του HIF-1 $\beta$  ή ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator, Mr 91000-94000 Da, 774-789 aa) [7, 8] (Εικ. 2). Και οι δύο υπομονάδες διαθέτουν υψηλή ομολογία και είναι αρκετά συντηρημένες



έχοντας περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο.



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

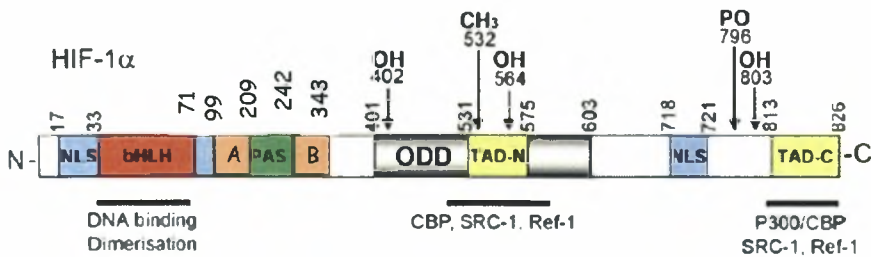
Η υπομονάδα HIF-1β εκφράζεται συνεχώς και ανεξάρτητα από συνθήκες υποξίας ή οποιουδήποτε άλλου είδους στρές. Ο HIF-1α, όμως εκφράζεται όταν η συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου είναι χαμηλότερη από 6%, που αντιστοιχεί σε μερική πίεση οξυγόνου 40 mm Hg, ενώ αποικοδομείται σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>) [9]. Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-1β είναι ότι ανήκουν στην οικογένεια bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM) [7, 8, 10], καθώς ο διμερισμός τους συμβαίνει μέσω της κοινής περιοχής bHLH-PAS που έχουν στο αμινοτελικό τους άκρο. Η περιοχή bHLH διαθέτει δομή έλικας-θηλιάς-έλικας και παρουσιάζεται συχνά ανάμεσα στους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στο DNA. [11, 12]. Ακόμα, η περιοχή διαιρείται σε δύο χαρακτηριστικές υποπεριοχές, τις PAS A και PAS B οι οποίες μαζί συμβάλλουν στον διμερισμό.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν αναγνωριστεί τρεις ισομορφές της α υπομονάδας του HIF-1: α) HIF-1α, β) HIF-2α, γ) HIF-3α. Η ύπαρξη των ισομορφών αυτών, μαρτυρεί και άλλους συνδυασμούς των υπομονάδων α με τον HIF-1β, εξασφαλίζοντας έτσι, την έκφραση HIF-1 ακόμα και σε περιπτώσεις απουσίας της υπομονάδας HIF-1α. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής διαθέτουν ξεχωριστές λειτουργίες το καθένα [13]. Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι σε όλες τις ισομορφές παρατηρήθηκε η ύπαρξη περιοχής PAS στην αλληλουχία τους. Χαρακτηριστικό είναι ακόμα ότι μετατροπές στην περιοχή PAS της ισομορφής HIF-2α έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του διμερισμού της με τον HIF-1β, κάτι που αποτελεί άλλη μία απόδειξη της σπουδαιότητας της περιοχής αυτής [14].

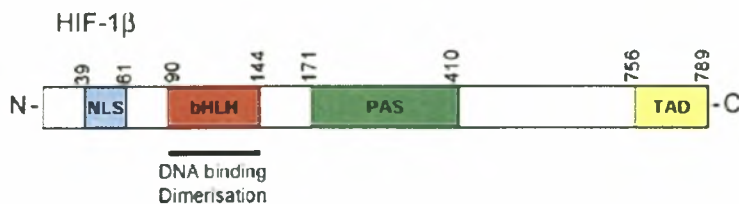
Η πρωτεΐνη του αποτελείται από 826 αμινοξέα (Εικ. 3) και κωδικοποιείται σε όλους τους ιστούς, με υψηλότερα επίπεδα στους νεφρούς και την καρδιά [15]. Η πρωτεϊνική δομή του HIF-1α περιλαμβάνει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADN και TADC, transcription activation domains) στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 531-575 και 786-826 αντίστοιχα). Αυτές οι περιοχές συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του μορίου με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως

οι: CBP/p300, SRC-1 και TIF-2 [16-18]. Χαρακτηριστική είναι ακόμα η περιοχή PSTD (Pro-Ser-Thr rich protein stabilization domain, 429-608aa), ή διαφορετικά ODDD (oxygen dependent degradation domain), που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε νορμοξία. Παράλληλα ιδιαίτερα σημαντικής σημασίας είναι και οι περιοχές bHLH και PAS (1-390 aa) [19], που είναι απαραίτητη για τη σύνδεση με το DNA και τον διμερισμό του με τον ARNT. Επιπρόσθετα, στην πρωτεϊνική δομή του HIF-1α συναντούμε ακόμα δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals), το N-NLS και το C-NLS, τα οποία τον οδηγούν στον πυρήνα και βρίσκονται ένα στο αμινοτελικό κι ένα στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 17-33 και 718-721 αντίστοιχα) [17]. Ο HIF-1α όμως μπορεί να επανεξάγεται στο κυτταρόπλασμα χάρη στην αλληλεπίδραση με την εξπορτίνη CRM1 μέσω ενός σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα-NES (631-639 aa) που διαθέτει. Παρ' όλα αυτά όμως ο HIF-1α μπορεί σε συνθήκες υποξίας να συσσωρευτεί στον πυρήνα ώστε να έχει τη δυνατότητα να διμεριστεί με τον HIF-1β και να ενεργοποιηθούν στην συνέχεια τα επιθυμητά γονίδια προστασίας στην υποξία. Αυτό γίνεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού των MAP κινασών. Πιο συγκεκριμένα ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση του NES [20, 21]. Τέλος, μια ρυθμιστική περιοχή ID (inhibitory domain, 575-786aa) η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της σταθερότητας του μορίου. Η τελευταία βρίσκεται ανάμεσα στις δύο περιοχές TADs. (Εικ. 3).

Ο HIF-1β μπορεί να εμφανιστεί σε δύο ισομορφές 774 και 789 αμινοξέων. Σε σύγκριση με τον HIF-1α ο HIF-1β περιλαμβάνει στην πρωτεϊνική του δομή τις σύνδεσης με το DNA και τις περιοχές διμερισμού bHLH (90-144) και PAS (171-410). Βέβαια, στο καρβοξυτελικό του άκρο υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD (756-789), όπως στον HIF-1α, η οποία όμως δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του [22]. Επιπλέον, ακόμα ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals) βρίσκεται στο αμινοτελικό του άκρο. (Εικ. 4).



Εικ. 3: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α. Φαίνονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα οι περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA. Οι περιοχές ενεργοποίησης φαίνονται με κίτρινο και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) με μπλέ χρώμα. Η θέση της ODD φαίνεται με γκρι χρώμα. Από Dery et al., 2004



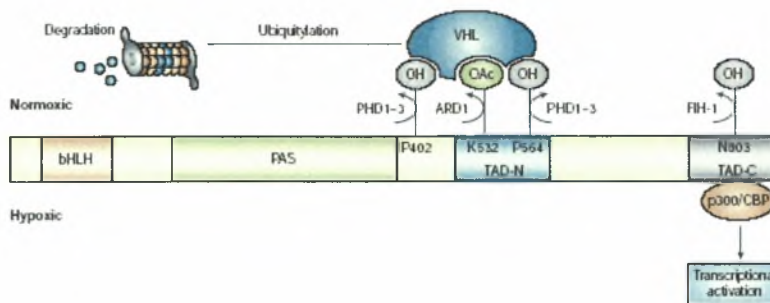
Εικ. 4: Πρωτεϊνικές περιοχές του HIF-1β). Φαίνονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα οι περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA. Οι περιοχές ενεργοποίησης φαίνονται με κίτρινο και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) με μπλέ χρώμα. Η θέση της ODD φαίνεται με γκρι χρώμα. Από Dery *et al.*, 2004

## Η Ρύθμιση του HIF-1α

### Ρύθμιση από φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία).

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται από μεγάλη αστάθεια, καθώς ουβικουτινυλιώνεται μέσω της διαδικασίας υδροξυλίωσης. Η υδροξυλίωση αυτή συμβαίνει σε κατάλοιπα προλίνης (P402 και P564) [23] στην ODD περιοχή από υδροξυλάσες προλίνης ή προλυλο-υδροξυλάσες (Proline Hydroxylase Domain, PHD) και κάνει δυνατή την πρόσδεση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης pVHL (Von Hippel Lindau) στον HIF-1α. Η pVHL αποτελεί μέρος του συμπλέγματος της E3 λιγάσης της ουβικουτίνης και μαζί με τις πρωτεΐνες elongin B, elongin C, Cul2 και Rbx-1 προσδένεται στον HIF-1α (Εικ. 5) [24]. Αυτό συμβαίνει μέσω ουβικουτινυλίωσης του HIF-1α, αναγνώρισής του από το πρωτεόσωμα και αποικοδόμησής του από αυτό. Έτσι, παρουσία οξυγόνου και μέσα σε 5 λεπτά από τη σύνθεσή του, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται, ουβικουτινυλιώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα (Εικ. 6).

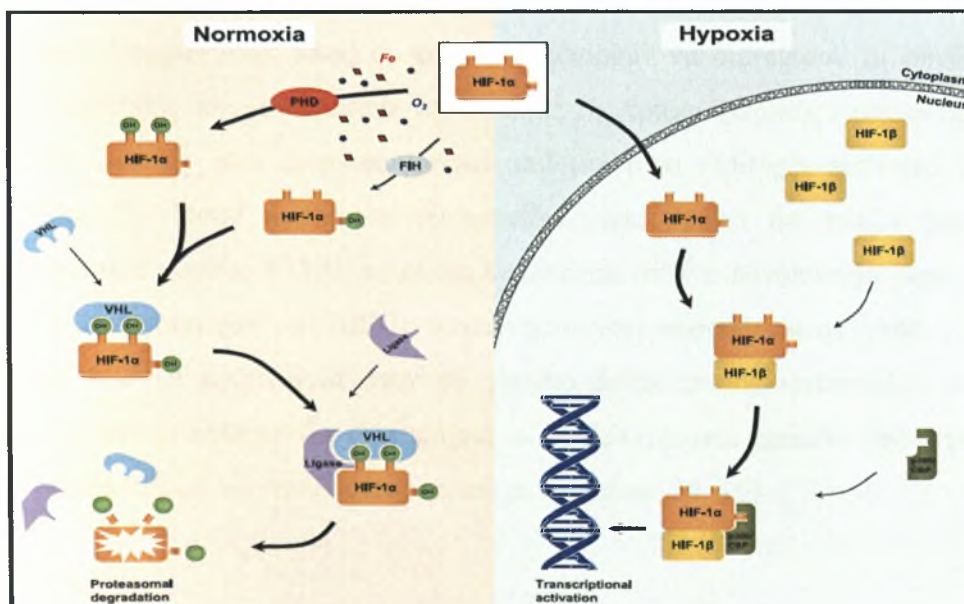
Οι PHDs συναντώνται σε τρεις ισομορφές τις PHD1, PHD2 και PHD3. Όπως έχει αποδεχθεί πειραματικά απενεργοποίηση της PHD2 είναι αρκετή ώστε να αυξηθούν τα επίπεδα του HIF-1α, κάτι που σημαίνει ότι η PHD2 είναι η πιο σημαντική από τις τρεις ισομορφές για τη ρύθμιση του HIF-1α κατά τη νορμοξία [25]. Οι υδροξυλάσες της προλίνης είναι οξυγενάσες που απαιτούν οξυγόνο και 2-κετογλουταρικό ως υπόστρωμα και επίσης εξαρτώνται από το σίδηρο χωρίς να περιέχεται κάποια δομή αίμης μέσα στο ένζυμο. Έτσι, η επάρκεια σε οξυγόνο, σίδηρο και α-κετογλουταρικό κρίνουν την σωστή λειτουργία των υδροξυλασών αυτών και συνάμα αποτελούν στόχους διάφορων ουσιών για την αναστολή τους.



Εικ. 5: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1. Το οξυγόνο ρυθμίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF-1α. Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες 402 και 564 του HIF-1α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη VHL που αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικουτίνης. Η πρόσδεση της pVHL υποβοηθάται και από την ακετυλίωση της λυσίνης 532 από την ακετυλοτρανσφεράση ARD1. Η ουβικουτινίωση του HIF-1α οδηγεί την πρωτεΐνη για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεόσωμα. Το οξυγόνο ακόμη ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Η υδροξυλίωση της ασπαργίνης 803 του HIF-1α από το ένζυμο FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) εμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών p300 και CBP στον HIF-1α και έτσι αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. (Από Semenza G., Targeting HIF-1 for cancer therapy, Nature reviews, 3:721-732, 2003)

## Από μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία)

Απουσία οξυγόνου η διαδικασία της υδροξυλίωσης του HIF-1α αναιρείται, με αποτέλεσμα η μη υδροξυλιωμένη μορφή του HIF-1α να μην αναγνωρίζεται από τον pVHL. Έτσι, τελικά ο HIF-1α σταθεροποιείται και διμερίζεται με τον HIF-1β δημιουργώντας 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 των γονιδίων (Εικ. 6).



Εικ. 6: Ρύθμιση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας



## Από χημικές ουσίες

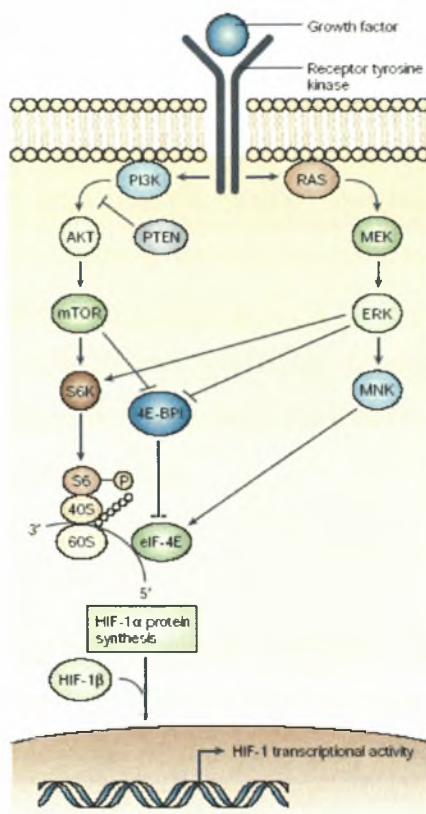
Έχουν βρεθεί διάφορες ουσίες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να σταθεροποιούν τον HIF-1α ακόμα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Αυτές οι ουσίες δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς, κυρίως όμως εμπλέκονται στη λειτουργία των πρόλυλο-υδροξυλασών. Συγκεκριμένα ενώσεις όπως το DMOG (διμεθυλοξαλική γλυκίνη), προκαλούν αναστολή των πρόλυλο-υδροξυλασών και οδηγούν στη σταθεροποίηση του HIF-1α εξαιτίας της μη υδροξυλίωσης και άρα της μη πρωτεόλυσής του από το πρωτεόσωμα. Ακόμα υπάρχουν ουσίες στην κατηγορία των οποίων ανήκουν διάφοροι χηλικοί παράγοντες όπως η δεσφεριοξαμίνη (DFO), οι οποίοι δεσμεύουν τον  $Fe^{+2}$  που απαιτούν οι υδροξυλάσες του HIF-1α, με αποτέλεσμα να τις καθιστούν ανενεργές. Είναι φανερό ότι ουσίες σαν τις προηγούμενες δρουν έμμεσα στο μονοπάτι των υδροξυλασών.

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί πως δισθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο προκαλούν επαγωγή του HIF-1α. Τα δισθενή μέταλλα μπορούν να δράσουν με τρεις τρόπους. Το κοβάλτιο, ειδικά, είτε δεσμεύει το σίδηρο που είναι απαραίτητος για τη δράση των πρόλυλο-υδροξυλασών [7], είτε αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α να εμποδίζει την πρόσδεση του pVHL [26] είτε ακόμα 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 [27, 28].

Τέλος, η χημική ουσία MG132 έχει αποδειχθεί πως δρα αναστέλλοντας το πρωτεάσωμα στο οποίο ο HIF-1α οδηγείται για να αποικοδομηθεί.

## Από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια

Αυξητικοί παράγοντες όπως οι κυτοκίνες μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) (Εικ. 7). Όσον αφορά τα ογκογονίδια, έχει βρεθεί ότι παίζει σπουδαίο ρόλο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN, το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση μέσω του μονοπατιού της PI3K. Η ενεργοποίηση του HIF-1α διακόπτεται όταν εκφράζεται το γονίδιο, ενώ αντίθετα τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται όταν το γονίδιο βρίσκεται σε καταστολή. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι και το ογκογονίδιο Ras μπορεί να εμπλέκεται στα επίπεδα ενεργοποίησης του HIF-1α, με τη βοήθεια όμως κάποιου διαφορετικού μονοπατιού [29, 30].



Εικ. 7: Επαγωγή του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες. (Semenza, G.L.03.)

## Συσχέτιση με ασθένειες

### Ανάπτυξη

Συστατικά που συμμετέχουν στο μονοπάτι του HIF-1 έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυονική ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι knockout ποντίκια τόσο για τον HIF-1α [31], όσο και για τον HIF-2α [32] [33], ή τον HIF-1β [34] κατέληξαν σε μη φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη και τελικά σε θάνατο.

Έμβρυα με απαλοιφή και στα δυο αλληλόμορφα του HIF-1α (*HIF-1α<sup>-/-</sup>*) απεβίωσαν την 11<sup>η</sup> μέρα σαν αποτέλεσμα της έλλειψης σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων, ελαττωματικό σχηματισμό νευρικού ιστού και ανωμαλιών στο σχηματισμό αγγείων της καρδιάς. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των κυττάρων σε πολλαπλασιασμό και η έκφραση γονιδίων επαγόμενων από τον HIF-1α μειώθηκαν σε *HIF-1α<sup>-/-</sup>* κύτταρα σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα. Παρόλο που τα

ετερόζυγα ποντίκια (*HIF-1α<sup>+/-</sup>*) αναπτύχθηκαν φυσιολογικά, παρουσίασαν τελικά ελαττωματικές φυσιολογικές αποκρίσεις όταν δοκιμάστηκαν σε χρόνια υποξία [35].

Η στοχευμένη απανεργοποίηση του HIF-2α (*HIF-2α<sup>-/-</sup>*) σε ποντίκια οδήγησε σε μάλλον διαφορετικό φαινότυπο. Ειδικότερα προκάλεσε ανεπαρκή συγχώνευση αγγείων και ανεπαρκή αναδιαμόρφωσή τους, ελαττωματική ωρίμανση των πνευμόνων και χαμηλή καρδιακή λειτουργία λόγω ανεπαρκούς παραγωγής κατεχολαμινών [32] [33].

Έτσι γίνεται φανερό ότι ο HIF-1α και ο HIF-2α εξυπηρετούν διαφορετικές βασικές λειτουργίες για τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά την ανάπτυξη, παρά την στενή ομοιότητά τους σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας και δομής.

## Καρκίνος

Η ανάπτυξη των συμπαγών όγκων περιορίζεται εξ' αιτίας της έλλειψης νέο-αγγειογένεσης που χρειάζεται για την μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Συνήθως η υποξία που οφείλεται στην ύπαρξη όγκων δημιουργείται σε μια απόσταση 100-200μm από αιμοφόρα αγγεία και κύτταρα που δεν καταφέρνουν να προσαρμοστούν στην έλλειψη οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, αποπίπτουν ή νεκρώνονται [36]. Από την άλλη μεριά η υποξία μπορεί να επηρεάσει θετικά την ανάπτυξη του καρκίνου οδηγώντας έτσι σε έναν κακοήγη φαινότυπο με επιθετική καρκινική συμπεριφορά, καθώς επίσης και σε αντίσταση των κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία. Τα καρκινικά κύτταρα που προσαρμόζονται στην υποξία αυξάνουν την νέο-αγγειογένεση με σκοπό την επαρκή μεταφορά οξυγόνου, παράγουν ενέργεια μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού και ρυθμίζουν διάφορους αντι-αποπτωτικούς και προ-αποπτωτικούς παράγοντες [37, 38].

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. Υπερέκφραση του HIF-1α και του HIF-2α βρέθηκε σε πλήθος διαφορετικών ανθρώπινων καρκίνων πιθανόν σαν αποτέλεσμα της υποξίας στο εσωτερικό των όγκων [39].

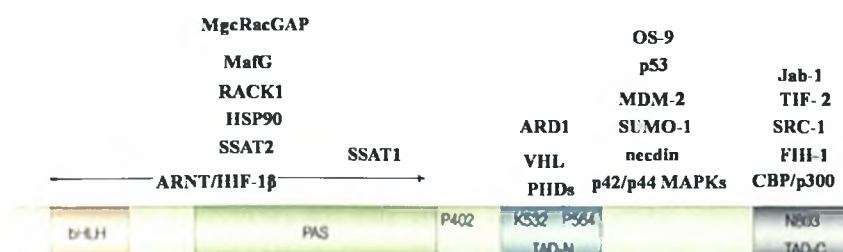
Η υπερέκφραση του HIF-1α προσφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα. Σε πολλές μελέτες έχει σημειωθεί συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του HIF-1 και της θνησιμότητας του ασθενούς, κακή πρόγνωση ή αντίσταση στη θεραπεία [4]. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις επέδειξαν ότι υπάρχουν ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά 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 [40]. Η έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF γενικά φαίνεται να συμβαδίζει με τα επίπεδα του HIF-1α.

## Ισχαιμικές ασθένειες

Η ενεργοποίηση της δράσης του HIF έχειδειχθεί σε μια ευρεία κλίμακα φυσιολογικών αποκρίσεων σε ισχαιμικές, υποξικές και φλεγμονώδεις συνθήκες, όπου παίζει θετικό ρόλο στην απόκριση στις βλάβες που υφίστανται όργανα και ιστοί. Για παράδειγμα, τα επίπεδα του HIF-1α και του VEGF αυξήθηκαν στο μυοκάρδιο όταν οι ασθενείς ανέπτυξαν οξύ αποκλεισμό της στεφανιαίας αρτηρίας [41]. Η αποτελεσματική αναδιαμόρφωση των αγγείων έπειτα από ισχαιμική βλάβη βρέθηκε ότι εξαρτάται από την επαγόμενη από τον HIF-1 έκφραση γονιδίων. Αύξηση της έκφρασης του HIF-1α και των επαγόμενων γονιδίων του παρατηρήθηκε σε μοντέλα μυοκαρδιακής και εγκεφαλικής ισχαιμίας σε ποντίκια και πρόβατα [42].

## Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α

Η εύρεση πολλών διαφορετικών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτέλεσε το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη των διάφορων λειτουργιών του. Ο HIF-1α αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες και σε διάφορες περιοχές του κατά τα στάδια ρύθμισής του προκειμένου να είναι λειτουργικός (Εικ. 8). Πολλές φορές μάλιστα, η εύρεση νέων και αγνώστων μοριακών αλληλεπιδράσεων αποκάλυψε και καινούργιες λειτουργίες του HIF-1 (π.χ. FIH, ARD1 κ.α.) Όλες αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α με διαφορετικές περιοχές σύνδεσης οι περισσότερες των οποίων είναι ταυτοποιημένες. Πολλές αλληλεπιδράσεις προκαλούν άμεσα μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο μόριο του HIF-1α και περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης, φωσφορυλίωσης, και ακετυλίωσης, άλλες επηρεάζουν τη δράση μέσω συμπλοκοποίησης τους μαζί του, ενώ άλλες δεν είναι ακόμα γνωστό πως επηρεάζουν τη λειτουργία του.



Εικ. 8 : Πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά άμεσα ο HIF-1α



Ο HIF-1α, σε όλα τα στάδια της διαδικασίας ενεργοποίησης και δράσης του, αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες προκειμένου να επιτελέσει τις λειτουργίες του. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις οι οποίες έχουν ήδη αναφερθεί (ARNT, PHDs, FIH-1, VHL κ.α.), τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί πολλές άλλες οι οποίες έχουν συμβάλει στην κατανόηση του πολυδιάστατου ρόλου του. Γνωρίζουμε ότι ο HIF-1α συνδέεται με συμπαράγοντες της μεταγραφής όπως ο SRC-1 και ο TIF2 οι οποίοι δρουν συνεργειακά με τον CBP/p300 για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του [43]. Υπάρχουν αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη OS-9 που εκφράζεται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος και συνδέεται με τον ήδη υδροξυλιωμένο από τις PHDs HIF-1α στην περιοχή ODD διευκολύνοντας την αποικοδόμησή του [44], ή η β-catenin που συνδεόμενη με τον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου επάγει τη μεταγραφική του ενεργότητα [45].

Πολλές αλληλεπιδράσεις που έχουν ανιχνευθεί είναι λιγότερο χαρακτηρισμένες, όπως αυτή με την πρωτεΐνη necdin, η οποία είναι ένας κατασταλτικός παράγοντας της ανάπτυξης των κυττάρων και μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη δράση του HIF-1α [46], ή την πρωτεΐνη MafG της οποίας η αλληλεπίδραση με τον HIF-1α έχει προταθεί ότι επηρεάζει την υποκυτταρική του κατανομή. Το 1998 έγινε γνωστό ότι το προϊόν του ογκογονιδίου p53 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και στη συνέχεια βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή προωθεί την αποικοδόμησή του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, χωρίς όμως η βιολογική σημασία του συμπλόκου HIF-1α /MDM2 /p53 να είναι πλήρως κατανοητή. Τη σύνδεση του HIF-1α με την p53 ανταγωνίζεται η πρωτεΐνη Jab1 [47] η οποία σταθεροποιεί τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας.

Στην περιοχή PASA συνδέονται ανταγωνιστικά η Hsp90 και η πρωτεΐνη RACK1. Η Hsp90 'προστατεύει' τον HIF-1α από αποικοδόμηση ανεξάρτητη του οξυγόνου [48],[49], ενώ η σύνδεση με τη RACK1 προκαλεί, αντίθετα, την ουβικιτινυλίωσή του και την αποικοδόμησή του στο προτεόσωμα [50]. Η πρωτεΐνη Hsp90 είναι μια μοριακή συνοδός που απαιτείται για την σταθερότητα μιας σειράς σηματοδοτικών πρωτεϊνών που ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [51].

Ο HIF-1α συμπεριλαμβάνεται στις πρωτεΐνες-υποστρώματα της Hsp90, και η αναστολή των συνοδευτικών ικανοτήτων της τελευταίας οδηγεί στην αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση του HIF-1α και, ως αποτέλεσμα, στην αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Σημαντικό είναι ότι η αναστολή της Hsp90 αποσταθεροποιεί και άλλες πρωτεΐνες-υποστρώματα διακόπτοντας πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που άμεσα εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου.

Πρόσφατα ενεπλάκη και μια τρίτη πρωτεΐνη στην μέσω της RACK1 αποικοδόμηση του HIF-1α, η sept9-v1, της οικογένειας των σεπτινών, πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού που είναι δεσμευμένες με GTP, η οποία δεσμευόμενη στην περιοχή bHLH του HIF-1α αποτρέπει την αποικοδόμηση που εξαρτάται από τη RACK1. Όπως έδειξε προηγούμενη εργασία της Ομάδας 1,

στην αμινο-τελική περιοχή του HIF-1α δεσμεύεται και η MgcRacGAP, μια άλλη πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού με δράση GTPάσης, ή οποία καταστέλλει τη μεταγραφική του ενεργότητα[1].

Πρέπει να ειπωθεί όμως ότι έχουν βρεθεί ακόμα κάποιες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α χωρίς η βιολογική τους λειτουργία να είναι ακόμα γνωστή. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η HAX-1 η οποία θα μας απασχολήσει και στη συνέχεια.

## **HAX-1**

Η HS-1-συνδεόμενη πρωτεΐνη X-1 (HAX-1) ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη 35 kDa η οποία αλληλεπιδρά με την HS-1 (Hematopoietic Lineage cell-specific protein-1). Η HS-1 αποτελεί υπόστρωμα κίνησης τυροσίνης, ενώ εμπλέκεται στη μετάδοση σήματος μέσω των B κυττάρων. Η HAX-1 έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά τόσο με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, όσο και με ικές πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει με σαφή τρόπο την εμπλοκή της πρωτεΐνης αυτής σε πολλά μονοπάτια σήματος καθώς και σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες. Η HAX-1 έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται σε όλους τους ιστούς στον άνθρωπο και στον ποντικό. Εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια αλλά παράλληλα εμφανίζεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη πυρηνική μεμβράνη. Ακόμα, με βάση την ομολογία που παρουσιάζει με την αντιαποπτωτική Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) έχει προταθεί και η εμπλοκή της στη ρύθμιση της απόπτωσης και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [52].

## **Η δομή της HAX-1**

## Από το γονίδιο στην πρωτεΐνη

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HAX-1 στον ποντικό βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 και στην περιοχή F2, ενώ στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1q21). Τα cDNAs ποντικού και ανθρώπου μοιράζονται ομοιότητα 86%, ενώ σε επίπεδο πρωτεΐνης μοιράζονται ομοιότητα σε ποσοστό 80% [53]. Η πρωτεΐνη της HAX-1 αποτελείται από 279 αμινοξέα (837 νουκλεοτίδια).

Βέβαια, με τη βοήθεια του εναλλακτικού ματίσματος στην περιοχή 5' προκύπτουν εφτά ξεχωριστές παραλλαγές της. Οι διαφορές εμφανίζονται στα πρώτα 2 ιντρόνια και εξόνια καθώς αυτά διαγράφονται ή διατηρούνται μερικώς σε κάθε παραλλαγή με ιδιαίτερο τρόπο ώστε τελικά να παραλαμβάνουμε την κάθε μία με ιδιαίτερο ξεκίνημα στην 5' UTR περιοχή. Είναι πιθανό κάθε παραλλαγή να εμπλέκεται και σε διαφορετική λειτουργία, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί [54].

Η διαδικασία αυτή παραγωγής διάφορων παραλλαγών της πρωτεΐνης HAX-1 έχει ως αποτέλεσμα αυτή, να εμφανίζεται σε τρεις ισομορφές: την πρώτη από την οποία έχει μοριακό βάρος 35 kDa, τη δεύτερη ισομορφή η οποία έχει μοριακό βάρος 32 kDa και την τρίτη ισομορφή η οποία έχει μοριακό βάρος 27 kDa [54].

Παρά το γεγονός ότι παρατηρούνται διαφορές στα αμινοτελικά άκρα των παραλλαγών εξαιτίας και πάλι του προαναφερθέντος εναλλακτικού ματίσματος, οι βασικές δομικές και λειτουργικές περιοχές που διαθέτει η πρωτεΐνη είναι οι: NLS (Nuclear Localisation Signal), BH1, BH2 (Bcl-2 homology), PEST [proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) enriched sequence] και TMD (transmembrane domain) [54] (Εικ. 9).



Εικ. 9: Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης HAX-1.

*BH=Bcl-2 homology, PEST=proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) enriched sequence, TMD=transmembrane domain*

Η περιοχή σήματος πυρηνικού εντοπισμού NLS βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και είναι

υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό, οι περιοχές BH1 και BH2 εμφανίζουν ομολογία με την Bcl-2 και έτσι όπως είναι αναμενόμενο σχετίζονται με την αντιαποπτωτική λειτουργία της πρωτεΐνης, η περιοχή PEST είναι πλούσια σε προλίνη, γλουταμινικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη και αποτελεί την περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή της, ενώ τέλος η TMD ευθύνεται για τον διαμεμβρανικό εντοπισμό της. Υπάρχει ακόμα μία περιοχή πριν ακριβώς από την BH1 η οποία ονομάζεται Acid Box και είναι περιοχή πλούσια σε γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή με την οποία η HAX-1 αλληλεπιδρά με διάφορες άλλες πρωτεΐνες βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της [52].

### **Ο εντοπισμός της HAX-1**

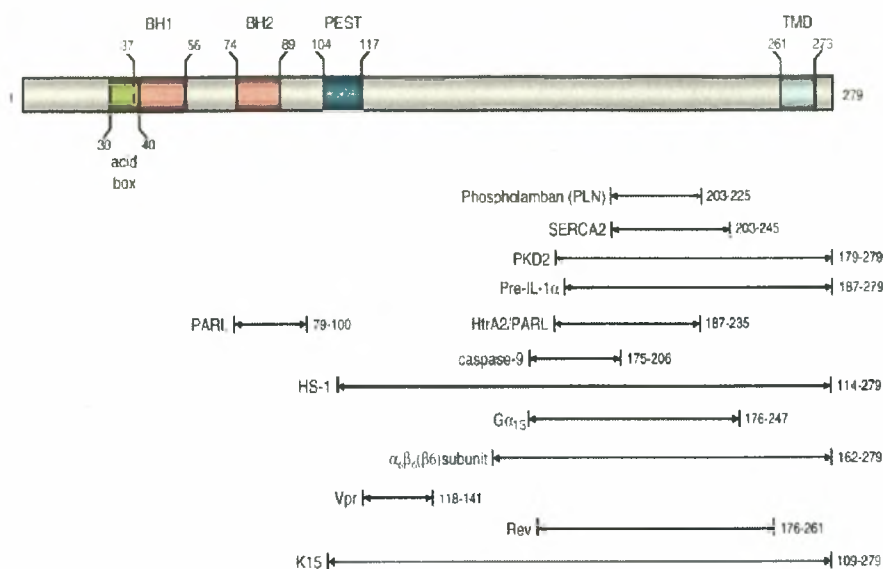
Ενδοκυτταρικά όπως έχει ήδη αναφερθεί η HAX-1 βρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και σε μικρότερο βαθμό στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρηνικό φάκελο.

Σε επίπεδο ιστών η HAX-1 φυσιολογικά εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Παρά το γεγονός όμως αυτό, τα επίπεδα του mRNA της σε διαφορετικούς ιστούς κυμαίνονται. Παράλληλα, παρατηρείται ότι τα επίπεδα mRNA πολλές φορές δεν αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα πρωτεΐνης σε κάποιο ιστό. Συνήθως το επίπεδο της πρωτεΐνης που βρίσκεται σε κάποιο ιστό είναι μικρότερο από αυτό που αναμένεται με βάση το επίπεδο της ποσότητας του mRNA. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταμεταγραφική ρύθμιση, στη αστάθεια του mRNA, τη σταθερότητα της πρωτεΐνης ή και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης [53].

### **Οι αλληλεπιδράσεις της HAX-1 με άλλες πρωτεΐνες**

Οι βασικές λειτουργίες στις οποίες κύριος διαμεσολαβητής είναι η HAX-1 δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Παρ' όλα αυτά η διερεύνηση των μοριακών τις αλληλεπιδράσεων είναι το βασικότερο βήμα προς την κατεύθυνση αυτή. Ήδη έχουν βρεθεί αρκετά μόρια με τα οποία συνδέεται η HAX-1 όπως φαίνεται και στην εικόνα 10.





Εικ. 10: Περιοχή αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης HAX- με διάφορες πρωτεΐνες [52].

### ➤ HAX-1 η HS-1-συνδεόμενη πρωτεΐνη X-1

Αρχικά με τη βοήθεια του συστήματος δύο υβριδίων αρχικά βρέθηκε ότι η HAX-1 συνδέεται με την HS-1. Η πρωτεΐνη HS-1 εκτός του ότι αποτελεί υπόστρωμα κινάσης τυροσίνης, εκφράζεται ειδικά στα κύτταρα της αιματοποιητικής γενιάς και πιστεύεται ότι κατέχει ενεργό ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα B κύτταρα. Η HAX-1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης και προωθεί την επιβίωση των B-κυττάρων μέσω της σύνδεσής της με τη HS-1. Πιο συγκεκριμένα αυτό μπορεί να επιτευχθεί, καθώς η HS-1 συμβάλλει στην απόπτωση ή τον πολλαπλασιασμό που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς των B-κυττάρων. Ακόμα η HS-1 συνδέεται στενά με την κορτακτίνη, η οποία σχετίζεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας. Έχει δειχθεί επίσης, ότι μετάγει το σήμα για κλωνική ανάπτυξη και απάλειψη στα λεμφοειδή κύτταρα. [52, 53].

### ➤ Σύνδεση της HAX-1 με ικές πρωτεΐνες

Περαιτέρω μελέτες με το σύστημα δύο υβριδίων έδειξαν ότι η HAX-1 αλληλεπιδρά με την πυρηνική αντιγονική πρωτεΐνη οδηγό του ιού Epstein-Barr (EBNA-LP Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein). Η πρωτεΐνη του Epstein-Barr virus (EBV) αλληλεπιδρά με την Bcl-2 μέσω της HAX-1, κάτι το οποίο οδήγησε στην υπόθεση ότι η HAX-1 εμπλέκεται στην απόπτωση πιθανώς βοηθώντας τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με EBV να αποφύγουν την απόπτωση μετά την επαγωγή από κυτταροτοξικά κύτταρα. Δείχθηκε, επίσης ότι η HAX-1 είναι πιθανός παρεμποδιστής της συνδεόμενης με την Bcl-2, πρωτεΐνης X (Bax) που επάγει την απόπτωση [53].

Η πρωτεΐνη K15 του σαρκώματος Kaposi που σχετίζεται με τον ερπητοϊό (KSHV Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) είναι μία επιπλέον πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με τη HAX-1 [53].

Πρόσφατα δείχθηκε ότι η ιική πρωτεΐνη R (Vpr) του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1), αλληλεπιδρά με την HAX-1 κατά τη απόπτωση που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Η Vpr απαιτείται για ιική παθογένεση του HIV, καθώς συνδέεται σε T-κύτταρα απόπτωσης και οδηγεί σε ενεργοποίηση τις κασπάσες 3 και 9. Τέλος η ίδια πρωτεΐνη συμβάλλει και στη διαταραχή της μιτοχονδριακής μεμβράνης [53].

#### ➤ Αλληλεπίδραση της HAX-1 με μόρια του αντιαποπτωτικού μονπατιού

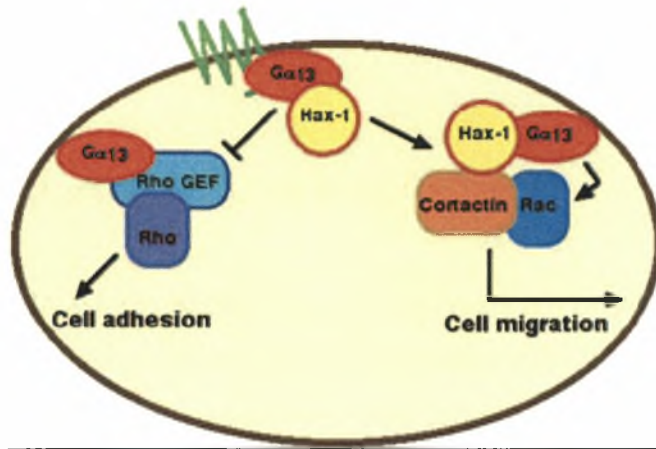
Η κύρια αντιαποπτωτική λειτουργία της HAX-1 συνδέεται με την αλληλεπίδρασή της με τις κυστεΐνο-εξαρτώμενες πρωτεάσες όταν αυτές δρουν μέσω του μονοποατιού που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Έτσι, η HAX-1 παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, η οποία είναι μέλος από το αποπτώσωμα ενώ αποικοδομείται από την κασπάση 3[52].

#### ➤ Αλληλεπίδραση της HAX-1 με μόρια που σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση

Η HAX-1 συνδέεται με την κορτακτίνη που είναι μέλος της οικογένειας HS-1. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες, εντοπίζονται μαζί στο κυτταρόπλασμα και στα λαμελιπόδια στην περιφέρεια του κυττάρου. Η κορτακτίνη εμπλέκεται στις λειτουργίες της ακτίνης στον κυτταροσκελετό που είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην κινητικότητα του κυττάρου [53].

Επιπλέον βρέθηκε ότι η HAX-1 σχηματίζει σύμπλεγμα με την  $\alpha$  υπομονάδα της ετεροτριμερούς πρωτεΐνης G13 ( $G_{\alpha_{13}}$ ), την κορτακτίνη και μια GTPase που ανήκει στην RAS υποοικογένεια των μικρών πρωτεϊνών που συνδέονται με GTP (Rac). Η  $G_{\alpha_{13}}$  σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της Rac. Η Rac σηματοδοτεί την μετατόπιση της κορτακτίνης και η κορτακτίνη με τη σειρά της οδηγεί στον πολυμερισμό της ακτίνης και στη δημιουργία λαμελιποδίων. Έτσι, η HAX-1 μαζί με την  $G_{\alpha_{13}}$  μπορεί να αποτελούν μέρος του σηματοδοτικού σύμπλοκου για τη μεταγωγή σήματος που είναι σημαντικό για την κινητικότητα του κυττάρου [53].

Έτσι, σύνδεση της HAX-1 με τη  $G_{\alpha_{13}}$  μειώνει τη διαμεσολαβούμενη από  $G_{\alpha_{13}}$  ενεργοποίηση της Rho και αυξάνει την ενεργοποίηση της Rac. Το σύμπλοκο HAX-1,  $G_{\alpha_{13}}$  και Rac σε συνδυασμό με την κορτακτίνη ωθεί το κύτταρο στη μετανάστευση. Σε αντίθετη περίπτωση, στην οποία δεν υπάρχει συμμετοχή της HAX-1, και ενεργοποιηθεί η Rho, το κύτταρο οδηγείται στην προσκόλληση [55] (Εικ.11).



Εικ. 11: Προτεινόμενο μοντέλο για τη ρύθμιση της κυτταρικής κηνητικότητας που διαμεσολαβείται από την  $G\alpha_{13}$  και τη HAX-1.

Σύνδεση της HAX-1 με την  $G\alpha_{13}$  οδηγεί σε μείωση της  $G\alpha_{13}$  μεσολαβούμενης ενεργοποίησης της Rho, σε συνδυασμό με την αύξηση της  $G\alpha_{13}$  μεσολαβούμενης ενεργοποίησης της Rac. Με τη σύνδεση τη  $G\alpha_{13}$  με την κορτακτίνη σε ένα σύμπλοκο που περιέχει τη Rac, η HZX-1 φέρνει πιο κοντά την  $G\alpha_{13}$  στην κορτακτίνη και αυτή με τη σειρά της σηματοδοτείται από την  $G\alpha_{13}$ -ενεργοποιούμενη Rac για να αρχίσει τον πολυμερισμό της ακτίνης, την κυτταρική προεκβολή και έτσι την κυτταρική μετακίνηση [55].

Μια ακόμα σύνδεση της HAX-1 είναι αυτή με την υπομονάδα  $\beta_6$  της ετεροτριμερούς ιντεγρίνης  $\alpha\beta_6$ . Η  $\alpha\beta_6$  είναι μεμβρανο-περατή και μετά τη σύνδεσή της με τη HAX-1 ενδοκυτταρώνεται με τη βοήθεια της κλαθρίνης, κάτι που διαμεσολαβεί στη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων [52].

Η HAX-1 σχετίζεται και με το προϊόν αντίστοιχου γονιδίου PKD2 (Polycystic kidney disease 2) του οποίου οι μεταλλάξεις είναι συχνές σε άτομα με πολυκυστική νόσο των νεφρών [53].

### ➤ Η σύνδεση της HAX-1 με mRNA

Τέλος, οι νεότερες έρευνες αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της HAX-1 με το mRNA. Η σύνδεση της πρωτεΐνης με το mRNA εμπλέκεται στη ρύθμισή του στη σταθεροποίησή του καθώς και στη μεταφορά του. Τα δύο mRNA που έχουν ταυτοποιηθεί σαν στόχοι της πρωτεΐνης είναι αυτά που κωδικοποιούν την DNA πολυμεράση  $\beta$  (POLB) και την βιμεντίνη. Η βιμεντίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό και συναντάται περιμετρικά του πυρήνα κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη του ότι σχετίζεται με την μεταφορά του mRNA [52].

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι μία ακόμα ιική πρωτεΐνη με την οποία σχετίζεται η HAX-1 είναι η πρωτεΐνη Rev του ανθρώπινου ιού ανοσαανεπάρκειας τύπου I (HIV-I) που διευκολύνει το ιικό mRNA, που περιέχει το στοιχείο απάντηση στη Rev (RRE), να βγει από τον πυρήνα. Η HAX-1 διαταράσσει τον εντοπισμό της Rev. Η Rev μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα,

όπου εντοπίζεται μαζί με τη HAX-1 και συνδέεται μαζί της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η Rev να μην μπορεί να συνδεθεί με το RRE και το mRNA του να είναι ασταθές και να αποικοδομείται [52].

### ➤ Άλλες μοριακές αλληλεπιδράσεις της HAX-1

Έχει δείχθηκε ότι η HAX-1 αποικοδομείται από μια πρωτεάση με υψηλές θερμοκρασιακές απαιτήσεις, την A2 (Omi/HtrA2 High temperature requirement protein A2/γνωστή και ως Omi), στα μιτοχόνδρια μετά από επαγωγή απόπτωσης και πριν η πρωτεάση μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα, συμβάλλοντας σε μια ανεξάρτητη από κασπάσες επαγωγή της απόπτωσης από την Omi/HtrA2 [53].

Επιπρόσθετα, η HAX-1 συνδέεται με την ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Η IL-1 συνδέεται στην αμινοτελική περιοχή (IL-1NTP) και προκύπτει από τη διάσπαση της πρόδρομης μορφής της ιντερλευκίνης-1α (pre-IL-1α) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής της [53].

Παράλληλα, η HAX-1 αλληλεπιδρά τόσο με την SERCA2 (Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) όσο και με τη φωσφολαμπάνη (PLN Phospholamban). Η SERCA2 είναι μια ATPase που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά  $\text{Ca}^{2+}$  στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο, και έτσι αποτελεί ρυθμιστή της ομοιόστασης  $\text{Ca}^{2+}$  και της συσταλτικότητας της καρδιάς. Η δραστηριότητα, όμως της SERCA2 ρυθμίζεται από μια διαμεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη του καρδιακού σαρκοπλασματικού δικτύου που αποτελείται από 52aa, PLN. Η PLN συνδέεται με τη SERCA2 και επηρεάζει την συγγένειά της με το  $\text{Ca}^{2+}$ . Η PLN λειτουργεί ως παρεμποδιστής της SERCA2. Η HAX-1 αλληλεπιδρά με PLN και η ενέργεια αυτή ενισχύει τα προστατευτικά αποτελέσματα της HAX-1 για την επιβίωση του κυττάρου. Η HAX-1 συνδέεται και με την SERCA2 ανεξάρτητα από τη PLN. Υπερέκφραση της HAX-1 όμως οδηγεί σε αντικατάσταση της SERCA2 και σε κατιούσα ρύθμισή της, μέσω ενός τρόπου που εξαρτάται από το πρωτεόσωμα, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα επίπεδα  $\text{Ca}^{2+}$  [56],[57].

Οι αλληλεπιδράσεις της HAX-1 με άλλες πρωτεΐνες συνοψίζονται στον πίνακα 1:

Table 1  
Summary of proteins, that were shown to interact with human HAX1

Protein	Localisation	Cellular Function	Reference
Cortactin	Ubiquitously in all except hematopoietic cells; cytoplasm	Substrate of tyrosine kinases, F-actin binding protein, stimulates actin polymerization	Gallagher et al., 2000
EFNA5	Mitochondria	Viral protein of Epstein Barr virus	Dufva et al., 2001
Ga13	Actin cytoskeleton	Involved in actin polymerization	Radhika et al., 2004
HS-1	Hematopoietic cells; cytoplasm	Substrate of tyrosine kinases; transduces signals for clonal expansion or deletion of lymphoid cells, stimulates actin polymerization	Suzuki et al., 1997
IL-1 NTP	N.D.	Capable of acting as a transforming oncogene	Yin et al., 2001
$\beta$ QILAP2	Actin cytoskeleton	Regulation of thrombin-induced platelet cytoskeletal actin reorganization	Weisbach et al., 1998
K15 protein	Cytoplasm, plasma membrane, Golgi	Viral protein of Kaposi's sarcoma associated virus	Sharp et al., 2002
Omi/HtrZA	Mitochondria	Serine protease, involved in mitochondrial homeostasis, cleaves IAPs after induction of apoptosis	Ciletti et al., 2004
Polycystin 2	Endoplasmic reticulum, plasma membrane, lamellipodia	Intracellular $Ca^{2+}$ release channel	Gallagher et al., 2000
Vpr	Nucleus and nuclear membrane	Viral protein of HIV	Yedavalli et al., 2005

Only Polycystin 2 is known to interact with mouse Hax1. If known, the intracellular localisation and cellular function is specified. For full protein names, see Section 3. N.D.: not determined.

Πίνακας 1: Σύνοψη των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η HAX-1[53].

### ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ HAX-1 ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Η HAX-1 είναι μια πρωτεΐνη που από τις μέχρι τώρα έρευνες έχει συνδεθεί με αρκετές ασθένειες.

Μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τη HAX-1 έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ουδετεροπενία (SCN Severe congenital neutropenia). Η ουδετεροπενία είναι μια κατάσταση στην οποία ο ασθενής παρουσιάζει στο περιφεριακό αίμα λιγότερα ουδετερόφιλα από 500/μλ. Για την ουδετεροπενία υπεύθυνες είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο της HAX-1 ή και σε άλλα γονιδίων όπως τα ELA1,2 (Elastase gene). Το μεταλλαγμένο γονίδιο της HAX-1 είναι υπολειπόμενο, ενώ τα μεταλλάγματα των ELA1,2 είναι επικρατή. Αλληλεπικάλυψη των γονιδίων αυτών δεν υπάρχει, δηλαδή μετάλλαξη σε ένα από αυτά είναι αρκετή να προκαλέσει την ασθένεια. Ωστόσο, επειδή η HAX-1 είναι σημαντική πρωτεΐνη για τη διατήρηση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, κάποια διαταραχή της θα οδηγούσε επίσης σε ουδετεροπενία μέσω της αύξησης της απόπτωσης των προγόνων των μυελοειδών κυττάρων [52].

Αυξημένα επίπεδα του mRNA της HAX-1 βρέθηκαν ακόμα, σε αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα με αποτέλεσμα να συσχετιστεί η HAX-1 και με ασθένειες όπως η ψωρίαση. Αυξημένα επίπεδα του mRNA της HAX-1 βρέθηκαν και σε διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές μελανώματος [58].

Η πολυκυστική νόσος των νεφρών συνδέεται με μεταλλάξεις στα γονίδια PKD1 και PKD2. Στο καρβοξυτελικό άκρο των προϊόντων των γονιδίων αυτών συνδέεται η HAX-1, κάτι που



σημαίνει πως και αυτή εμπλέκεται στην ασθένεια αυτή. Η HAX-1 και η PKD2 εντοπίζονται μαζί στο σώμα του κυττάρου και πολλές φορές και στα λαμελιπόδια. HAX-1 και PKD2 σχετίζονται επίσης και με την F-ακτίνη [59].

Μία ακόμη ασθένεια στην οποία εμπλέκεται η HAX-1 είναι η συστηματική σκλήρυνση, ένα χρόνιο αυτοάνοσο νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από ίνωση του δέρματος και εσωτερικών οργάνων όπως οι πνεύμονες, οι νεφροί, και η καρδιά. Η συστηματική σκλήρυνση σχετίζεται με ανωμαλίες στην παραγωγή της pre-IL-1α στους ινοβλάστες του δέρματος η οποία βοηθά στην παραγωγή κολλαγόνου και ίνωσης. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η HAX-1 αλληλεπιδρά με την pre-IL-1α στους ινοβλάστες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Μελέτες με τη βοήθεια RNAi (interference) έδειξαν ότι η HAX-1 συμβάλλει σημαντικά στην παραγωγή IL-6 η οποία επάγεται μέσω της pre-IL-1α, όπως και στη σύνθεση προκολλαγόνου τύπου 1 [52].

Τέλος, πρέπει ακόμα να αναφερθεί ότι η HAX-1 σχετίζεται με διάφορες δυσλειτουργίες του καρδιακού μυ που οφείλονται σε διαταραχές στα επίπεδα συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$ . Όπως προαναφέρθηκε η SERCA2 και η ρυθμιστική της πρωτεΐνη PLN ρυθμίζουν την ομοιοστάση του  $Ca^{2+}$  στον καρδιακό μυ. Επειδή η HAX-1 αλληλεπιδρά και με τις δύο, καθίσταται σαφής ο σημαντικός της ρόλος για τη διατήρηση της ομοιοστασίας αυτής [53].

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ**

Η HAX-1 είναι μια πρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία είναι αντιαποπτωτική. Η αντιαποπτωτική δράση της εμπλέκεται κυρίως στο μονοπάτι της κασπάσης-9. Επιπλέον, συνδέεται με τη μεταγωγή σήματος καθώς και με τον κυτταροσκελετό. Η πρωτεΐνη αυτή ακόμα, είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ παράλληλα προστατεύει τα μυελοειδή κύτταρα από απόπτωση. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με πολλά διαφορετικά μόρια, όμως η πλήρης λειτουργία της HAX-1 δεν είναι αποσαφηνισμένη.

## ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση την εφαρμογή του συστήματος δύο υβριδίων (σύστημα *in vivo*) το οποίο είχε ήδη πραγματοποιηθεί, ήταν γνωστές διάφορες μοριακές αλληλεπιδράσεις της  $\alpha$  υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Μία από τις αλληλεπιδράσεις αυτές ήταν και αυτή με την πρωτεΐνη HAX-1 και πιο συγκεκριμένα με την περιοχή της από το 49<sup>ο</sup> αμινοξύ ως το 246<sup>ο</sup> (HAX-1<sup>49-246</sup>). Δεδομένου όμως ότι το σύστημα των δύο υβριδίων είναι ένα τεχνητό και ετερόλογο σύστημα, όσον αφορά τις δύο πρωτεΐνες, έπρεπε να γίνει και η *in vitro* επιβεβαίωση της αλληλεπιδράσης των δύο πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες HIF-1 $\alpha$ <sup>244-532</sup> και HAX-1<sup>49-246</sup> ήταν αναγκαίο να εκφραστούν υπό τη μορφή καθαρών πρωτεϊνών ώστε να ελεγχθεί η δυνατότητά τους να συνδέονται μεταξύ τους *in vitro*.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η επιβεβαίωση της *in vitro* σύνδεσης συγκεκριμένα του HIF-1 $\alpha$  με την HAX-1<sup>49-246</sup>. Έτσι, προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός οι δύο πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε βακτήρια υπό μορφή κατάλληλη ώστε να μπορούν να συγκρατηθούν σε σφαιρίδια, να ανιχνευτούν από αντισώματα και να γίνει έλεγχος των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Με χρήση κατάλληλων μαρτύρων αποδείχθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες, HIF-1 $\alpha$  και HAX-1<sup>49-246</sup> αλληλεπιδρούν ειδικά μεταξύ τους.

## ΥΛΙΚΑ

1.

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

Εάν είναι επιθυμητό προσθέτονται τόσα μl αντιβιοτικού όσα είναι τα ml του θρεπτικού υλικού.  
Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

2.

**Διάλυμα 1x TAE:** 4 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA

3.

**TYM:** 2% tryptone, 0,5% yeast extract, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**TFBI:** 30 mM KOAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycerol, (pH: 7.0)

**TFBII:** 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 20% glycerol, (pH: 7.0)

4.

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

**Διάλυμα TE:** 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA

5.

**Διάλυμα λύσης για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο:** 1x PBS, 5mM DTT, 0,1mM PMSF, μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche).

**Διάλυμα λύσης για τις πρωτεΐνες με His-επίτοπο:** 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100, μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche)

6.

**separating gel (πήκτωμα διαχωρισμού):** 3,33ml 30% acrylamide, 2.5 ml 4x Separating Buffer, 4,15 ml ddH<sub>2</sub>O, 40μl 10% APS και 20μl TEMED

**stacking gel (πήκτωμα επιστοίβαξης):** 1.2 ml 30% acrylamide, 2.0 ml 4x stacking buffer, 4.7 ml ddH<sub>2</sub>O, 50μl 10% APS, 50μl TEMED.

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

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

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

**stock 4x Sample Buffer (διάλυμα επιφόρτωσης):** 250mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2% SDS, 40% glycerol, 0.2% Bromophenol Blue, 100mM DTT (προστίθεται λίγο πριν τη χρήση)

7.

**Διάλυμα χρώσης:** 0,25 % Coomassie Brilliant Blue, 50% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ

**Διάλυμα αποχρωματισμού:** 30 % αιθανόλη, 10 % οξικό οξύ.

8.

**GSH Elution Buffer:** 10mM GSH, 50mM Tris-HCl pH.8.0

**Διάλυμα λύσης για τις στήλες με σφαιρίδια Ni-NTA:** 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών Roche

9.

**1x PBS:** 5mM DTT 0,1mM PMSF και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche).

**Διάλυμα σύνδεσης για στήλες GST:** 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών Roche

**Διάλυμα λύσης για τις στήλες με σφαιρίδια Ni-NTA:** 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών Roche

**Διάλυμα σύνδεσης για τις στήλες με σφαιρίδια Ni-NTA:** 1x PBS, 5mM DTT 0,1mM PMSF και μίγμα αναστολέων πρωτεασών Roche.

10.

**Διάλυμα μεταφοράς:** 48mM Tris, 39mM Glycine, 1,3mM SDS, 20% μεθανόλη

11.

**Διάλυμα κορεσμού:** 5% γάλα σε σκόνη σε PBS+0,1%Tween 20

**Διάλυμα λουμινόλης:** 1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5

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

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

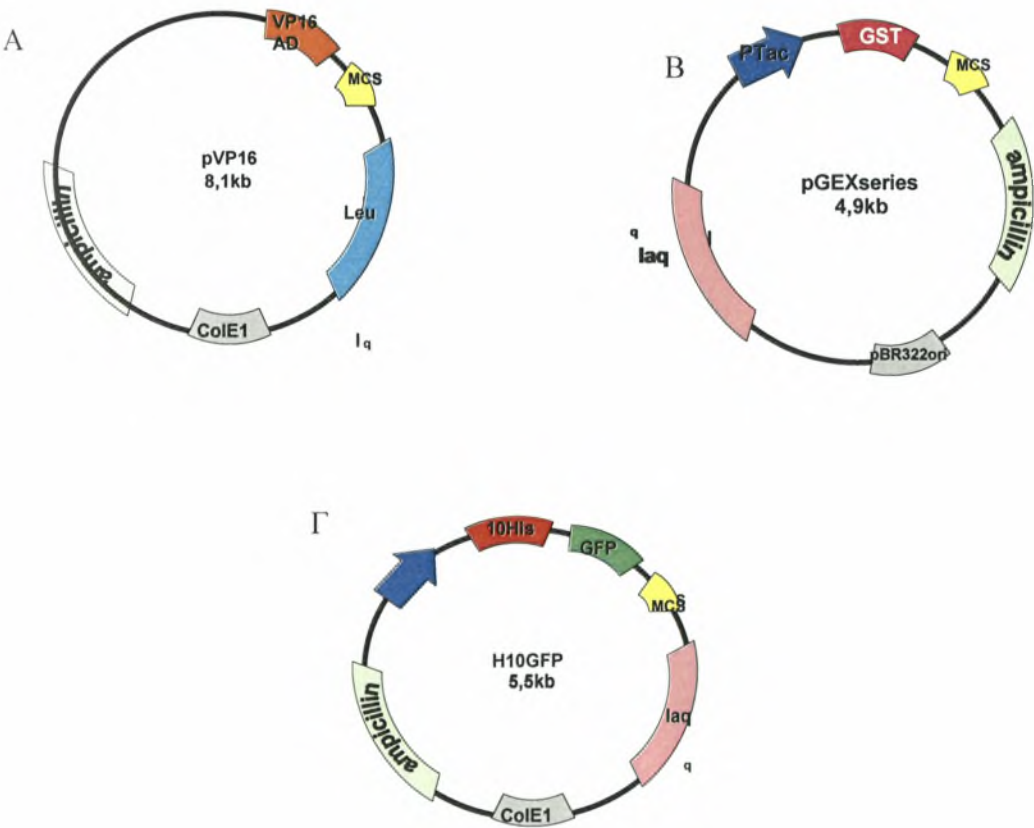
12.

**Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης χωρίς ένθεμα**

**A) pVP16:** Περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16 σε συνέχεια με την περιοχή που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS). Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη (Leu).

**B) pGEX-4T-1:** (Amersham Pharmacia). Περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) πριν το MCS.

**Γ) H10GFP:** Κωδικοποιεί για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP σε σύντηξη με επίτοπο 10 ιστιδινών (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Görlich, ZMBH, Χαϊδελβέργη).





Σχήμα 1: Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης χωρίς ένθεμα: Φαίνονται σχηματικά οι υποκινητές των πλασμιδίων, οι περιοχές έναρξης της αντιγραφής (ori), τα γονίδια ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου σε αντιβιοτικά, οι περιοχές κωδικοποίησης των ιστιδινών (His), οι περιοχές κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

13.

Κυτταρικά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

**TOP10 (InVitrogen):** Κύτταρα *E. coli* ιδανικά για κάθε σχεδόν εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

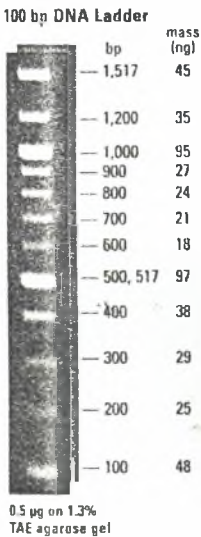
**BL21 RIL (Stratagene):** Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Από τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν οι Lon και OmpT πρωτεάσες. Επιπλέον, επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων κάποιων ανθρώπινων tRNA (αυτά των αργινίνης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του RIL πλασμιδίου.

14.

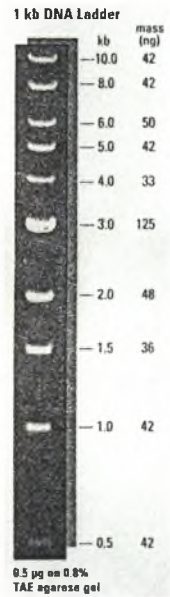
Μάρτυρες μοριακών βαρών

ΓΙΑ DNA

A) Μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp (M1)

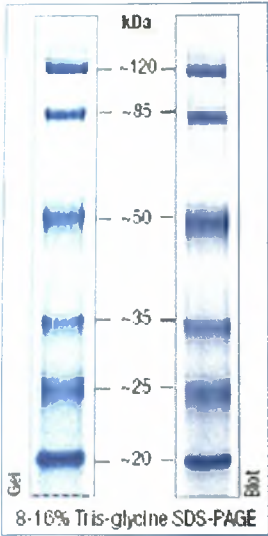


B) Μάρτυρας μοριακού βάρους 1 kb (M2)

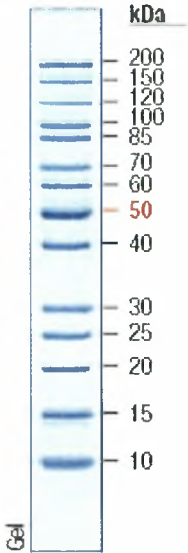


ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

A) Prestained Protein Molecular Weight Ladder (M3)



B) Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (M4)



## ΜΕΘΟΔΟΙ

### ✚ 1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit

Ολονύχτια καλλιέργεια (O/N) 50 ml κυττάρων *E.coli* επωάζεται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε θρεπτικό μέσο LB και έπειτα αποχύνονται σε Falcon 15 ml της καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 4ml Buffer P<sub>1</sub> (Resuspension Buffer + RNase) σε κάθε falcon , ενώ ακολουθεί ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Προστίθενται 4ml Buffer P<sub>2</sub> (Lysis Buffer) και μένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml παγωμένο Buffer P<sub>3</sub> (Neutralization Buffer), αναμιγνύονται και επωάζονται στον πάγο για 15 min. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 30 min και το υπερκείμενο αποχύνεται σε νέο Falcon αφού πρώτα διηθηθεί μέσα από γάζα. Χρησιμοποιείται στήλη της Qiagen αφού πρώτα ξεπλυθεί με λίγα ml (4ml) Buffer QBT. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης από κάθε falcon αποχύνεται στη στήλη και ακολουθούν 2 ξεπλύματα με 10ml Buffer QC το καθένα, έκλουση του DNA με 2 ml Buffer QF που μοιράζονται από 1ml σε σωληνάκια των 2 ml. Προστίθενται 700 ml ισοπροπανόλης, αναμιγνύονται και φυγοκεντρούνται στις 10000 στροφές για 30 min στους 4 °C. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 700 ml αιθανόλη 70%. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 10 min στις 10000 στροφές στους 4 °C. Τελικά το ίζημα ξηραίνεται στους 37° C και επαναδιαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O 50 µl.

### ✚ 2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του DNA. Απορρόφηση ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 µg/ml δίκλωνου DNA κάτι που σημαίνει ότι η συγκέντρωση του δείγματος DNA υπολογίζεται ως εξής: Συγκέντρωση DNA = 50µg/ml x A<sub>260</sub> x παράγοντας αραιώσης. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση της

απορρόφησης στα 280nm ( $A_{280}$ ) και υπολογίζεται ο λόγος  $A_{260} / A_{280}$ . Για το καθαρό από προσμίξεις DNA ο λόγος  $A_{260} / A_{280}$  είναι μεταξύ 1,8-2,0.

### ✚ 3. Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ικανότητα να πέπτουν το DNA σε μικρότερα τμήματα, κάτω από ορισμένες συνθήκες, καθώς αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του. Η ιδιότητα αυτή των περιοριστικών ενδονουκλεασών αποτελεί χρήσιμο εργαλείο τόσο για την απομόνωση συγκεκριμένων κομματιών που προορίζονται για κλωνοποίηση, όσο και για τον έλεγχο του μεγέθους των κομματιών DNA που κλωνοποιήθηκαν και τον σωστό προσανατολισμό τους.

Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται για την αντίδραση είναι ιδιαίτερα σημαντική και καθορίζεται από την ενεργότητα (Unit/μl) η οποία χαρακτηρίζει το κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Γενικά ισχύει ότι, 1 unit ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl σε μια ώρα και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. 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 ddH<sub>2</sub>O

Όπου κριθεί αναγκαίο προστίθεται 0,5 μl RNase.

Επώαση στους 37 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.

*Σημείωση:* Η BSA είναι αλβουμίνη από ορό βοοειδούς.

### ✚ 4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Ποσότητα αгарόζης διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (βλ.υλικά 2 σελ.31 ) ώστε η τελική συγκέντρωσή στον όγκο του διαλύματος όγκο να είναι 0,8-1%. Επειτα από ανακίνηση θερμαίνεται στους 100 °C. Μόλις η θερμ/σία του διαλύματος πέσει 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 αφήνεται να πήξει στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης με τις κατάλληλες εγκοπές. Αφού πήξει προστίθεται TAE ώστε να καλυφθεί η πηκτή. Στα δείγματα που είναι προς ηλεκτροφόρηση και περιέχουν το DNA προστίθεται η χρωστική μπλε βρωμοφαινόλη (0,25%), και γλυκερόλη (30%), η οποία είναι 7x σε σχέση με τον συνολικό όγκο. Τελικά τα δείγματα φορτώνονται στις εγκοπές της πηκτής και αφού συνδεθούν τα ηλεκτρόδια της συσκευής ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον. Εφόσον ολοκληρωθεί ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται πάνω από λάμπα που εκπέμπει στο υπεριώδες και φωτογραφίζεται.

#### **✚ 5. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase)**

Χρησιμοποιείται για την αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα 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 ddH<sub>2</sub>O

Η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά και προστίθενται 5mM EDTA (pH: 8.0). Ακολουθεί θέρμανση για 10 λεπτά στους 75 °C. Γίνονται εκχυλίσσεις με φαινόλη : χλωροφόρμιο (1:1) και τελικά το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

#### **✚ 6. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από την πηκτή αγαρόζης με τη μέθοδο “GEL EXTRACTION” της QIAGEN**

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται το Gel Extraction Kit της Qiagen. Από την πηκτή αγαρόζης κόβεται το επιθυμητό κομμάτι –ζώνη από την πηκτή με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου νυστεριού. Το κομμάτι αυτό ζυγίζεται, τοποθετείται σε eppendorf και προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG. Ακολουθεί επώαση στους 50 °C για 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος, αυτή τη φορά με την ποσότητα που



ζυγίστηκε, ισοπροπανόλης. Το διάλυμα διέρχεται από την ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 1 min. Χρησιμοποιείται στήλη QIAquick από την οποία περνάει το δείγμα (1 ml κάθε φορά) με τη βοήθεια φυγοκέντρωσης. Έπειτα, προστίθεται στη στήλη 0,5 ml και πάλι από το διάλυμα QG και γίνεται φυγοκέντρωση. Αφού τελειώσει και αυτή η διαδικασία, προστίθενται 0,75 ml διαλύματος PE και το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό. Γίνεται απόχυση και νέα φυγοκέντρωση για 1 min σε 13000 rpm. Τελικά για την έκλυση του DNA προστίθενται 50μl ρυθμιστικού διαλύματος EB ή δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O στο κέντρο της στήλης. Αφήνεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και γίνεται ανάκτηση του DNA με φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα.

## ✚ 7. Ποσοτικοποίηση

Για την ποσοτικοποίηση των κομματιών του DNA που θα χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση λιγάσης ηλεκτροφορούνται γνωστοί όγκοι και από την υποψήφια ένθεση καθώς και του πλασμιδιακού φορέα.

## ✚ 8. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)

Το ένζυμο το οποίο καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων είναι η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Με τη βοήθεια δηλαδή, του ενζύμου αυτού είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων δίκλωνου DNA με την προϋπόθεση ότι έχουν συμπληρωματικά ή τυφλά 3' και 5' άκρα.

- 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
- ddH<sub>2</sub>O

Η αντίδραση επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ακολουθεί νέα επώαση (O/N) για όλη τη νύχτα στους 16 °C.

## ✚ 9. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (E.coli Top10) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Το παρακάτω πρωτόκολλο πραγματοποιείται με σκοπό να μετατραπούν τα βακτηριακά κύτταρα σε δεκτικά ως προς κάποιο ξένο πλασμιδιακό DNA. Με την ακόλουθη διεργασία δηλαδή, τα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να μετασχηματίζονται ευκολότερα.

Βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια σε 5 ml θρεπτικού μέσου TYM στους 37<sup>0</sup> C όλη νύχτα, παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής (στρεπτομυκίνη). Την επόμενη ημέρα, γίνεται αραίωση 1:100 της καλλιέργειας σε τελικό όγκο 3 ml TYM παρουσία και πάλι του ίδιου αντιβιοτικού, και επώασή της στους 37<sup>0</sup> C για 2 ώρες με ανάδευση. Ακολούθως γίνεται νέα αραίωση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό αυτή τη φορά. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται έως ότου η απορρόφηση (OD) στα 590nm γίνει 0,35-0,4. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5 min και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1/2 του αρχικού όγκου διαλύματος TFBII. Μετά το πέρασμα 10 min στον πάγο έγινε και νέα φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5 min. Το ίζημα αυτή τη φορά επαναδιαλύεται σε 1/25 του αρχικού όγκου διαλύματος TFBII και το διάλυμα αυτό επωάζεται για 60 min στον πάγο. Τέλος μοιράζονται από 200μl του τελικού όγκου των κυττάρων σε σωλήνες μικροφυγόκεντρον και αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup> C..

Για τη σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται βλ. υλικά 3 σελ.31.

## ✦ 10. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E.coli* transformation)

Χρησιμοποιούνται 200 μl δεκτικών κυττάρων TOP10 (ή BL21RIL) και επωάζονται για 30 min στον πάγο με το προς μετασχηματισμό DNA. Τοποθετούνται για 2 λεπτά στους 42 °C και μεταφέρονται αμέσως στον πάγο για 3 min. Ακόμα προσθέτονται σ' αυτά 500 μl υγρό LB, ενώ στη συνέχεια επωάζονται και πάλι αλλά στους 37 °C για 1 ώρα. Μετά από αυτή την επώαση φυγοκεντρούνται για 30 sec και αφαιρείται το υπερκείμενο έως ότου περισσέψουν 50μl και το ίζημα επαναδιαλύεται σε αυτόν τον όγκο. Στο τέλος απλώνονται σε τριβλία LB με αντιβιοτικό επιλογής και επωάζονται στους 37 °C όλη νύχτα.

## ✦ 11. Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (mini preparation) χρησιμοποιώντας το QIAprep Spin Miniprep Kit και μικροφυγόκεντρο.

Ολονύχτια καλλιέργεια κυττάρων *E.coli* αναπτύσσεται σε 3 ml θρεπτικό υλικό LB (βλ. υλικά 1 σελ.31 ). 1,5 ml της καλλιέργειας αυτής τοποθετήθηκε σε ένα erpedorf. Αυτό φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 12 sec. Αφού απορρίπτεται το υπερκείμενο, προσθέτονται 300 μl διαλύματος

TENS (βλ. υλικά 4 σελ.31 ) και το δείγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex. Προστίθενται ακόμα 150 μl 3M οξικού νατρίου με ανάδευση και αυτή τη φορά. Μετά από αυτό παραλαμβάνεται το υπερκείμενο που προέκυψε από φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 2 min και μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Προστίθεται μετά, 1 ml 100% αιθανόλη, αναδεύεται και το δείγμα ψύχεται στους -20 °C για 30 min . Και πάλι φυγοκέντρείνεται στις 13000 στροφές για 10 min ενώ απομακρύνεται και το υπερκείμενο. Τέλος προστίθεται 1 ml 70% αιθανόλη και ακολουθήσε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 min. Τελευταίο βήμα της διαδικασίας αυτής είναι η συλλογή του ιζήματος και η επαναδιάλυσή του σε 20 μl ddH<sub>2</sub>O.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκεται στα υλικά (βλ. υλικά 4 σελ.31 ).

## **✚ 12. Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων (BL21 RIL) δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA**

Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που παρουσιάζεται στην μέθοδο 9 με τη μόνη διαφορά ότι το αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται είναι η χλωραμφαινικόλη αντί για τη στρεπτομυκίνη.

## **✚ 13. Επαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG**

Τα γονίδια των πρωτεϊνών που είναι επιθυμητό να επαχθούν είναι κλωνοποιημένα σε πλασμίδια με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκονται υπό τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή (π.χ. T5, T7 κ.α.). Ο υποκινητής αυτός υπόκειται σε ένα χαρακτηριστικό τρόπο ρύθμισης, όντας συνδεδεμένος με περιοχές του χειριστή (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Ο χειριστής αυτός βρίσκεται σε ενεργή μορφή, επιτρέποντας έτσι και την έκφραση των γονιδίων, μόνο όταν η περιοχή του δεν καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη καταστολέα. Η πρωτεΐνη καταστολέας εκφράζεται από το lacI γονίδιο και αποτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Την πρωτεΐνη αυτή καταστολέα έχουν την ικανότητα να απενεργοποιήσουν η λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG) δίνοντας έτσι το έναυσμα για ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Έτσι, τελικά επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG γίνεται σε καλλιέργεια LB με κατάλληλα αντιβιοτικά (αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη). Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της καλλιέργειας είναι 0.6-0.7 στα 600nm. Πριν την προσθήκη IPTG κρατείται 2 ml δείγμα από κάθε καλλιέργεια με σκοπό στη συνέχεια να ελεγχθεί (με τη βοήθεια ανάλυσης SDS-PAGE) εάν η επαγωγή έγινε με επιτυχία. Τότε προστίθεται τόσο IPTG ώστε η

τελική του συγκέντρωση στην καλλιέργεια να είναι 1 mM και επωάζεται στους 30° C. Μετά το πέρασμα 4 ωρών κρατούνται και πάλι δείγματα των 2 ml με τον ίδιο σκοπό που αναφέρθηκε. Και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στα 3000xg, ξεπλένονται με ddH<sub>2</sub>O και αποθηκεύονται στους -20°C.

#### ✚ 14. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια

Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1/20 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας σε κατάλληλο διάλυμα λύσης. Για την πλήρη λύση των κυττάρων γίνονται υπέρηχοι στο διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα και φυγοκέντρωση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10.000rpm για 30min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγγιστείας χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στους 4°C.

Η σύσταση από τα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιούνται για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο και για τις πρωτεΐνες με His-επίτοπο αναφέρεται στα υλικά 5 σελ. 31.

#### ✚ 15. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Στην ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο SDS-PAGE ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με βάση το μοριακό τους βάρος καθώς αυτές ηλεκτροφορούνται αποδιαταγμένες. Πιο συγκεκριμένα, το αποδιατακτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι το απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulfate). Το SDS δεν βοηθά μόνο στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών αλλά παράλληλα δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Έτσι, σχηματίζονται σύμπλοκα τα οποία έχουν καθορισμένη δομή, είναι επιμήκη και φέρουν αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Στην ηλεκτροφόρηση η πηκτή πολυακρυλαμίδιου αποτελείται από δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πηκτώμα επιστοιβάξης (stacking gel) που είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel) που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σ'

αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και τη σύσταση τους. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιούνται οι συσκευές της Hoeffeur και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθεται πρώτα η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) Πάνω από την πηκτή επιστοίβαξης τοποθετείται χτενάκι και όταν η πηκτή πήξει τοποθετούνται οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώνεται με 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Τέλος φορτώνονται τα δείγματα με τη βοήθεια της πιπέτας Hamilton και το gel ηλεκτροφορήθηκε στα 200V για 60 min. Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται αναφέρεται στα υλικά 6 σελ. 31.

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων αυτά αναμιγνύονται με το διάλυμα επιφόρτωσης και ακολουθεί βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95°C. Και η σύσταση του διαλύματος επιφόρτωσης αναφέρεται στα υλικά 6 σελ.31. Ακολουθεί χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

## ✦ 16. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Για την ανίχνευση των θέσεων των πρωτεϊνών μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue για 30 min. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται σε διάλυμα αποχρωματισμού για 2 με 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η σύσταση των διαλυμάτων χρώσης και αποχρωματισμού που χρησιμοποιούνται αναφέρεται στα υλικά 7 σελ.32.

## ✦ 17. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στην αгарόζη είναι το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της GST, η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη. Χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (σειρά-pGEX) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χμαιρικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια καθαρής γλουταθειόνης η οποία ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των



σφαιριδίων της στήλης για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χιμαιρικές GST-πρωτεΐνες επώαζεται για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH- Sepharose (Amersham) (500μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2lt καλλιέργειας), τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλες στήλες των 10ml όπου κατακρατούνται τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνεται το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10ml διαλύματος λύσης και μία φορά με 10ml διαλύματος λύσης απουσία απορρυπαντικού. Η έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στα σωματίδια έγινε με 1,5ml διαλύματος GSH Elution Buffer (βλ. υλικά 8 σελ.32 ). Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

## ✚ 18. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο ιστιδινών

Η μέθοδος αυτή απομόνωσης στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας αγκιστείας μέσω ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC-immobilized metal affinity chromatography). Σε αгарόζη ακινητοποιείται η χηλική ένωση NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) η οποία δεσμεύει ιόντα νικελίου. Τα ιόντα αυτά έχουν την τάση να συνδέονται με τους δακτυλίους των καταλοίπων ιστιδίνης.

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια που κωδικοποιούν για μια περιοχή ιστιδινών πριν ή μετά τη θέση του κλωνοποιημένου DNA είναι δυνατή η παραγωγή χιμαιρικών His-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να δεσμευτούν σε μια στήλη Ni-NTA σύμφωνα με τον παραπάνω τρόπο. Η έκλουση της πρωτεΐνης από το υλικό χρωματογραφίας γίνεται με τη βοήθεια ιμιδαζολίου, το οποίο είναι δομικά παρόμοιο με το κατάλοιπο ιστιδίνης. Το ιμιδαζόλιο δεσμεύεται πάνω στο νικέλιο προκαλώντας την αποσύνδεση των His-πρωτεϊνών όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του.

Το διαλυτό κλάσμα που προέκυψε από την λύση βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χιμαιρικές His-πρωτεΐνες επώαζεται για 1-2 ώρες στους 4°C με σφαιρίδια Ni-NTA της Qiagen (500μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2lt καλλιέργειας), τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλες στήλες όγκου 10ml (Qiagen) όπου κατακρατούνται τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνεται το διαλυτό κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολουθούν διαδοχικά 3 πλύσεις των σφαιριδίων με 10ml διαλύματος λύσης (βλ. υλικά 8 σελ.32 ). Τα σφαιρίδια ξεπλένονται με 10ml διαλύματος λύσης που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (20mM) για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Η έκλουση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών γίνεται με 2,5ml διαλύματος λύσης με υψηλή

συγκέντρωση ιμιδαζολίου (250mM). Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

## ↓ 19. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής Coomassie Brilliant blue σε όξινο περιβάλλον και τη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου. Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H<sub>2</sub>O σε αναλογία 1/4 προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα έως τελικό όγκο 1 ml, και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετριέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

## ↓ 20. Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών *in vitro*

Τα πειράματα συγκατακρήμνισης επιτρέπουν τη διερεύνηση της ικανότητας πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η τεχνική στηρίζεται στη δυνατότητα καθήλωσης διαφόρων πρωτεϊνών σύντηξης (π.χ με επιτόπους GST ή 10xHis) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων στηλών χρωματογραφίας (γλουταθειόνη-σεφαρόζη, Ni-NTA) με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία. Οι καθηλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία και οι οποίες είτε βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είτε περιέχονται σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ο έλεγχος της σύνδεσης επιτυγχάνεται με ανάλυση των καθηλωμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα.

Συγκατακρήμνιση με μέσο καθήλωσης την στήλη GST: 25μl σφαιρίδιων GSH εξισορροπούνται με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4°C, σε διάλυμα 1x PBS (Βλ. υλικά 9 σελ.32 ). Η δέσμευση της GST ή της GST- MgcRacGAP με την GSH στα σφαιρίδια της στήλης γίνεται παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4° C για 2 ώρες. Το υπερκείμενο της στήλης απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπούνται με το

διάλυμα σύνδεσης (Βλ. υλικά 9 σελ. ) στους 4° C. Στη συνέχεια περίπου 50μg GST ή GST-MgcRacGAP προσκολλημένης σε σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάζονται με περίπου 85μg καθαρής HisGFP-HIF-1α πρωτεΐνης σε μικροστήλες Mobicol (Mobitec) για 4 ώρες στους 4<sup>0</sup>C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και απομάκρυνση του υπερκείμενου, ακολουθούν 3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα που προαναφέρθηκε, στους 4° C. Τελικά, έγινε έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με προσθήκη 40μl διαλύματος επιφόρτωσης χωρίς DTT. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση τους στους 95<sup>0</sup>C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

Συγκατακρήμνιση με μέσο καθήλωσης σφαιρίδια Ni-NTA: 25μl σφαιριδίων Ni-NTA εξισορροπούνται με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4°C, σε διάλυμα λύσης (Βλ. υλικά 9 σελ.32 ). Η δέσμευση της HisGFP ή HisGFP-HIF-1α(244-532) ή HisGFP-HIF-1α στα σφαιρίδια νικελίου της στήλης γίνεται παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4° C για 2 ώρες. Το υπερκείμενο της στήλης απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπούνται με το διάλυμα σύνδεσης (Βλ. υλικά 9 σελ.32 ). Στη συνέχεια περίπου 25μg HisGFP ή HisGFP-HIF-1α(244-532) ή HisGFP-HIF-1α προσκολλημένης σε σφαιρίδια νικελίου επωάζονται με περίπου 50μg καθαρής GST ή GST-MgcRacGAP πρωτεΐνης σε μικροστήλες Mobicol (Mobitec) για 4 ώρες στους 4<sup>0</sup>C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και απομάκρυνση του υπερκείμενου, ακολουθούν 3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα που προαναφέρθηκε, στους 4° C. Τελικά, γίνεται έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με προσθήκη 30μl διαλύματος επιφόρτωσης χωρίς DTT. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση τους στους 95<sup>0</sup>C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

## ⚡ 21. Ανάλυση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση

### 21.1. Ανάλυση πρωτεϊνών

Μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Βλ. μέθοδο 15 σελ. 42) ακολουθεί και ανάλυση με χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου με *Coomassie Brilliant Blue* (Βλ. μέθοδο 16 σελ.43 )

### 21.2. Ανοσοαποτύπωση

Η τεχνική αυτή αποτελείται από δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη συνήθως νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε υγρή φάση (Wet transfer) ή σε ημίξηρη φάση (Semi-dry transfer). Η μεταφορά επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό πεδίο το οποίο μετακινεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες από την πηκτή πάνω στη μεμβράνη.

Το δεύτερο μέρος είναι η ανοσοανίχνευση. Ο εντοπισμός δηλαδή μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης (αντιγόνο) με τη βοήθεια αντισωμάτων. Η τεχνική βασίζεται στην αλληλεπίδραση του αντιγόνου με το ειδικό για αυτό αντίσωμα. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος το οποίο εκτός ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη (όπως το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP) το οποίο αντιδρώντας με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση ή εκλύει φωταύγεια καταδεικνύοντας έτσι τη ζώνη του αντιγόνου.

### 21.3. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)

Μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται η πηκτή διαχωρισμού για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Έξι διηθητικά χαρτιά Whatman των 3mm και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται στο διάλυμα μεταφοράς (Βλ. υλικά 10 σελ. ). Έπειτα τοποθετούνται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα «σάντουιτς» με τα χαρτιά Whatman τη μεμβράνη και την πηκτή. Το σάντουιτς τοποθετείται με το σωστό προσανατολισμό στη συσκευή Transport Electrophoration Unit της Høefer, η οποία είναι γεμάτη με το διάλυμα μεταφοράς

Η ηλεκτρομεταφορά συμβαίνει για 1,5 ώρες στα 400 mA, μετά η μεμβράνη χρωματίζεται προσωρινά με τη χρωστική Ponceau S 0,2% (Βλ. υλικά 11 σελ.32 ) για τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών και γίνεται αποχρωματισμός με PBS.

### 21.4. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η μεμβράνη επώάζεται για 1 ώρα με διάλυμα κορεσμού (Βλ. υλικά 11 σελ.32 ) για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις των διαφόρων πρωτεϊνών με το αντίσωμα. Μετά την επώαση ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με PBS+0,1% Tween 20.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C με το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS+0,1% Tween 20). Ακολουθούν 3 πλύσεις για 10 λεπτά για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη με PBS+0,1% Tween 20. Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με ένα 2ο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS+0,1% Tween 20). Ακολουθούν οι απαραίτητες πλύσεις με PBS+0,1% Tween 20.

Η μεμβράνη στη συνέχεια επωάζεται για ένα λεπτό με διάλυμα που περιέχει 10ml λουμινόλης (Βλ. υλικά 11 σελ.32 ), 10μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO). Στη συνέχεια εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham) το οποίο εμφανίζεται με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (διάλυμα ανάπτυξης, διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak)).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με τη βοήθεια του συστήματος των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι το τμήμα της πρωτεΐνης HAX-1 που συμπεριλαμβάνει τα αμινοξέα 49-246 (HAX-1<sup>49-246</sup>), αλληλεπιδρά με τον HIF-1α<sup>244-532</sup> in vivo, σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών και in vitro. Η πρωτεΐνη HIF-1α<sup>244-532</sup> ήταν δυνατόν να εκφραστεί και να απομονωθεί από βακτηριακά κύτταρα υπό τη μορφή χημειοκίτης His<sub>10</sub>GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> καθώς το cDNA του ήταν ήδη κλωνοποιημένο στον φορέα έκφρασης pHisGFP. Σημειωτέον, ότι και η πρωτεΐνη πλήρους μεγέθους HIF-1α είναι δυνατόν να παραχθεί με αυτόν τον τρόπο. Αντίθετα, το cDNA της HAX-1<sup>49-246</sup> είχε διατηρηθεί στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε κύτταρα σακχαρομύκητα, pVP16 και έτσι έπρεπε να μεταφερθεί σε φορέα έκφρασης σε βακτήρια. Αυτός επιλέχθηκε να είναι ο pGEX4T1-Ten από όπου η πρωτεΐνη είναι δυνατό να παραχθεί με τη μορφή GST-HAX-1<sup>49-246</sup> προκειμένου να μπορεί να ακινητοποιηθεί εύκολα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και να απομονωθεί με απλές διαδικασίες από τις υπόλοιπες βακτηριακές πρωτεΐνες.

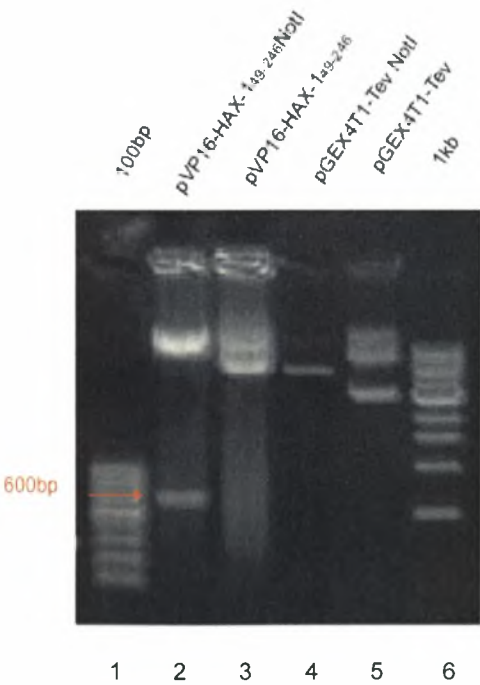
Αρχικά απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA pVP16- HAX-1<sup>49-246</sup> από βακτηριακές καλλιέργειες με τη μέθοδο Qiagen Midi Kit (Βλ. μέθοδο 1 σελ.36) με σκοπό την απομόνωση του ενθέματος. Ακολούθησε φωτομέτρηση του προϊόντος στα 260nm. Η συγκέντρωση του DNA pVP16- HAX-1<sup>49-246</sup> υπολογίστηκε σε 1,5μg/μl (Βλ. μέθοδο 2 σελ.36 ).

**Κλωνοποίηση του cDNA της HAX-1<sup>49-246</sup> σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης πρωτεϊνών (pGEX4T1-Tev)**

**Απομόνωση της HAX-1<sup>49-246</sup> από τον πλασμιδιακό φορέα pVP16 και προετοιμασία του φορέα pGEX4T1-Tev για την αντίδραση σύνδεσης**

Πραγματοποιήθηκε αρχικά πέψη 15μg πλασμιδίου pVP16- HAX-1<sup>49-246</sup> με 60u ενζύμου περιορισμού NotI σε τελικό όγκο 100μl (Βλ.μεθοδο 3 σελ.37) με σκοπό να παραλάβουμε απομονωμένο το ένθεμα HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε πέψη 10μg φορέα pGEX4T1-Tev με 60u του ίδιου ενζύμου περιορισμού σε τελικό όγκο 200μl (Βλ.μεθοδο 3 σελ.37). Έτσι, το ένθεμα HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX4T1-Tev/NotI θα χρησιμοποιηθούν για τη μετέπειτα αντίδραση σύνδεσης διότι διαθέτουν τα κατάλληλα άκρα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής.

Για να ελεγχθεί η πέψη των δειγμάτων, αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% (Βλ. μέθοδο 4 σελ.37 ) (Εικ.12).

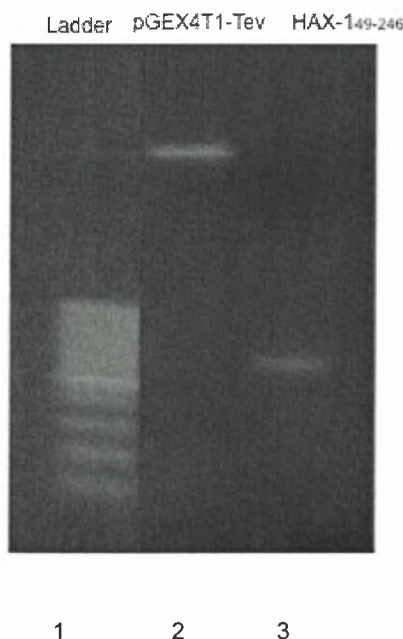


Εικ. 12: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%  
Διαδρομή 1:μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (M1), διαδρομή 2:pVP16/HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI, διαδρομή 3:pVP16- HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 4:pGEX4T1-Tev/NotI, διαδρομή 5:pGEX4T1-Tev, διαδρομή 6:μάρτυρας μοριακού βάρους

Ακολούθησε επεξεργασία όλης της ποσότητας της αντίδρασης πέψης του pGEX4T1-Tev/NotI με 30u αλκαλικής φωσφατάσης (CIP), η οποία αφαιρεί τα 5' φωσφορικά άκρα για την αποφυγή της επανακυκλοποίησης του φορέα (Βλ. μέθοδο 5 σελ.38) και τα δείγματα pGEX4T1-Tev/NotI/CIP και pVP16- HAX-1<sup>49-246</sup> /NotI ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0,8% (Βλ. μέθοδο 4 σελ.37).

Στη συνέχεια, αφού απομονώθηκαν και ζυγίστηκαν τα επιθυμητά κομμάτια της πηκτής pGEX4T1-Tev/NotI/CIP και HAX-1<sup>49-246</sup> /NotI, καθαρίστηκαν με τη μέθοδο “Gel Extraction” της Qiagen (Βλ. μέθοδο 6 σελ.38 ).

Σε επόμενο βήμα, έγινε ποσοτικοποίηση των DNA των δύο δειγμάτων (Βλ. μέθοδο 7 σελ.39 ). Η ποσότητα υπολογίστηκε σε σύγκριση με τη φωτεινότητα του μάρτυρα από τον οποίο φορτώθηκε 1μg (Εικ.13) .



Εικ.13: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1%.

Διαδρομή 1: M1, διαδρομή 2: pGEX4T1-Tev/NotI/CIP, διαδρομή 3: HAX-1<sup>49-246</sup> /NotI

Τελικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση του pGEX4T1-Tev/NotI/CIP 100ng/μl και της HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI 50ng/μl.

#### **Αντίδραση σύνδεσης του pGEX4T1-Tev/NotI/CIP με το DNA της HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI**

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση το οποίο καταλύει την σύνδεση των 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων του DNA (Βλ. μέθοδο 8 σελ.39).

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιήθηκε με 50ng pGEX4T1-Tev/NotI/CIP και 150ng HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI σε τελικό όγκο 20μl (αντίδραση 1). Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον 2 αντιδράσεις σύνδεσης. Αυτές ήταν ίδιες με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι η μία δεν περιείχε το ένζυμο λιγάση με σκοπό να ελεγχθεί αν υπάρχει άκοπο DNA του φορέα (αντίδραση 2) ενώ η δεύτερη δεν περιείχε το ενθεμα της HAX-1<sup>49-246</sup>/NotI με σκοπό αυτή τη φορά να ελεγχθεί εάν έχει γίνει σωστή αποφωσφορυλίωση (αντίδραση 3).

#### **Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Top10 με τα προϊόντα**

Μετασχηματίστηκαν (Βλ. μέθοδο 10 σελ.40 ) δεκτικά βακτήρια Top10 (competent cells) (Βλ. μέθοδο 9 σελ.39 ) με τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης και στη συνέχεια επωάστηκαν σε τριβλία LB (Βλ. υλικά 1 σελ.31 ) στα οποία έχει προστεθεί αμικικιλίνη. Χρησιμοποιήθηκε και ένα ακόμα τριβλίο-μάρτυρας με Top10 κύτταρα Top10 (τριβλίο 4) που δεν είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο, με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχουν μολύνσεις των δεκτικών κυττάρων από κύτταρα ανθεκτικά στην αμικικιλίνη.

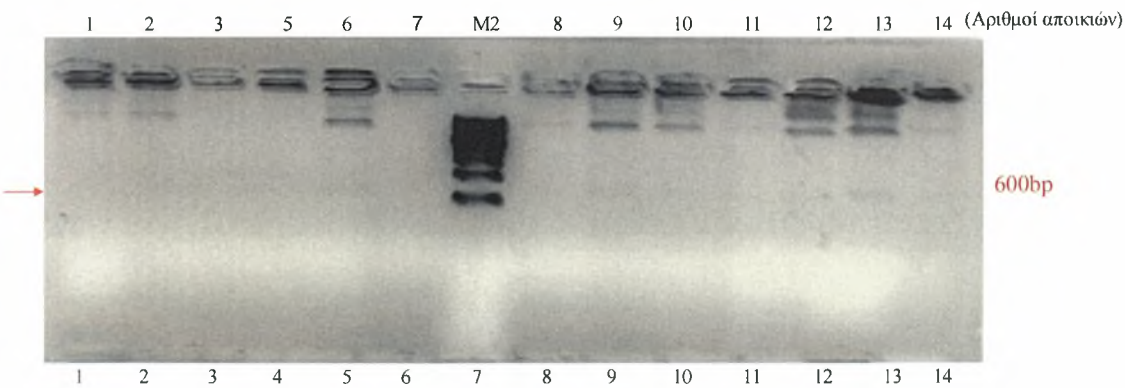
Έτσι, στο τριβλίο (1) μετρήθηκαν 1360 αποικίες , στο τριβλίο (2) μετρήθηκαν 420 αποικίες, στα (3) και (4) 600 και 0 αποικίες αντίστοιχα. Στο τριβλίο (4) δεν βρέθηκαν αποικίες άρα δεν υπήρχαν επιμολύνσεις. Στα τριβλία (2) και (3) δεν θα έπρεπε θεωρητικά να υπάρχουν αποικίες , κάτι που σημαίνει ότι υπάρχει ποσοστό άκοπου

και μη αποφωσφορυλιωμένου φορέα. Ωστόσο, από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι ένα πολύ καλό ποσοστό (περισσότερες από τις μισές) από τις αποικίες στο τριβλίο (1) περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

**Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation)**

Επιλέχθηκαν τυχαία 15 αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες LB αμικικιλίνης, αριθμήθηκαν και παρασκευάσθηκε από αυτές DNA μικρής κλίμακας (Βλ. μέθοδο 11 σελ.40 ) ώστε να ελεγχθεί στη συνέχεια η εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα pGEX4T1-Tev.

Έγινε πέψη του DNA των 15 αποικιών με 5u του ενζύμου NotI (Βλ. μέθοδο 12 σελ.41 ) (στο μίγμα της πέψης είχε προστεθεί και μικρή ποσότητα RNAase) και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικ.14)



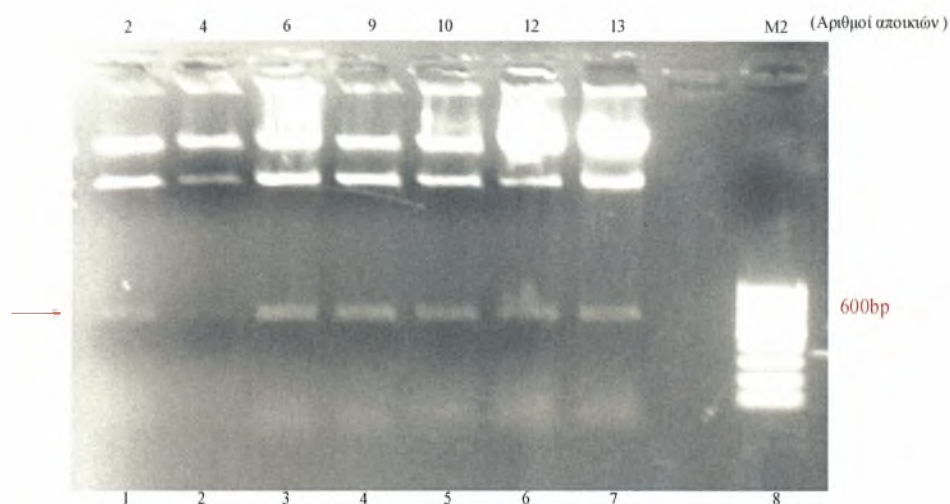
Εικ.14 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1%.  
Διαδρομές 1-6, 8-14: Πέψη με NotI του DNA αποικιών οι οποίες αναγράφονται, διαδρομή 7: M2



Σημείωση: Η αποικία με αριθμό 4 θα ηλεκτροφορηθεί στη συνέχεια.

Παρατηρήθηκε ότι το ένθεμα της HAX-1<sup>49-246</sup> που αναμένεται στις 591 bp εμφανίζεται στις αποικίες με αριθμούς 2,6,9,10,12,13 αντίστοιχα. Άρα τα δεκτικά βακτήρια στις αποικίες αυτές, έλαβαν τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης (pGEX4T1-Tev/ HAX-1<sup>49-246</sup>).

Επαναλήφθηκε η πέψη των DNA των αποικιών αυτών για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, ενώ αυτή τη φορά έγινε πέψη και του DNA που προήλθε από την αποικία με αριθμό 4 (Βλ. μέθοδο 3 σελ.37). Τα προϊόντα της πέψης και πάλι ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικ.15)



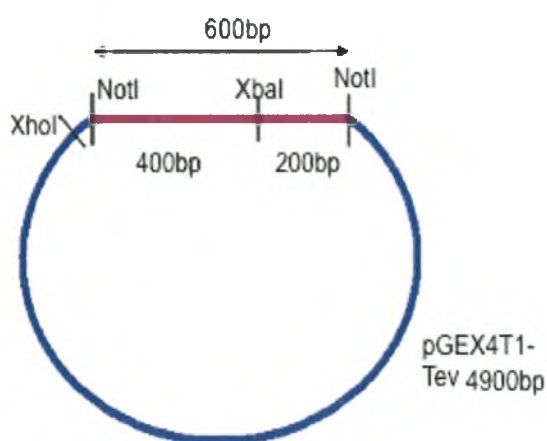
Εικ. 15: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 1%.

Διαδρομές 1-7: Πέψη με NotI του DNA αποικιών οι οποίες αναγράφονται, διαδρομή 8: M2

Επιβεβαιώθηκε ότι τα πλασμίδια τα οποία περιείχαν ένθεμα ήταν τα: 2,6,9,10,12,13. Αυτό με τον αριθμό 4 δεν διαθέτει το επιθυμητό ένθεμα.

Ωστόσο, η εξασφάλιση μόνο της παρουσίας του ενθέματος δεν ήταν αρκετή. Έπρεπε να ελεγχθεί και ο προσανατολισμός του, ώστε να υπάρχει το σωστό αναγνωστικό πλαίσιο και έτσι έκφραση της χημεικής πρωτεΐνης GST/HAX-1<sup>49-246</sup>. Πιο συγκεκριμένα, το ένθεμα έπρεπε να διαβαστεί με την σωστή κατεύθυνση από

τους μηχανισμούς μεταγραφής και μετάφρασης ώστε να προκύψει ο σωστός συνδυασμός αμινοξέων της πρωτεΐνης HAX-1<sup>49-246</sup> μετά από το αναγνωστικό πλαίσιο της GST. Διαφορετικά θα μπορούσαν να προκύψουν είτε λανθασμένα αμινοξέα με αποτέλεσμα η τελική πρωτεΐνη να μην είναι λειτουργική, είτε ένα πολυπεπτίδιο άγνωστο, η έκφραση του οποίου πολύ πιθανό να σταματούσε πρόωρα. Για τον σκοπό αυτό έγινε διπλή πέψη με τα ένζυμα XhoI και XbaI (βλ. μέθοδο 3 σελ.37) (στο μίγμα της πέψης είχε προστεθεί και μικρή ποσότητα RNAase). Χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα ένζυμα καθώς το XhoI κόβει μία φορά το φορέα κοντά στη θέση ένθεσης και το XbaI κόβει μία φορά μέσα στην αλληλουχία του ενθέματος ασύμμετρα αφήνοντας περίπου ένα τμήμα των 400bp και ένα των 200bp (Σχημα 2)

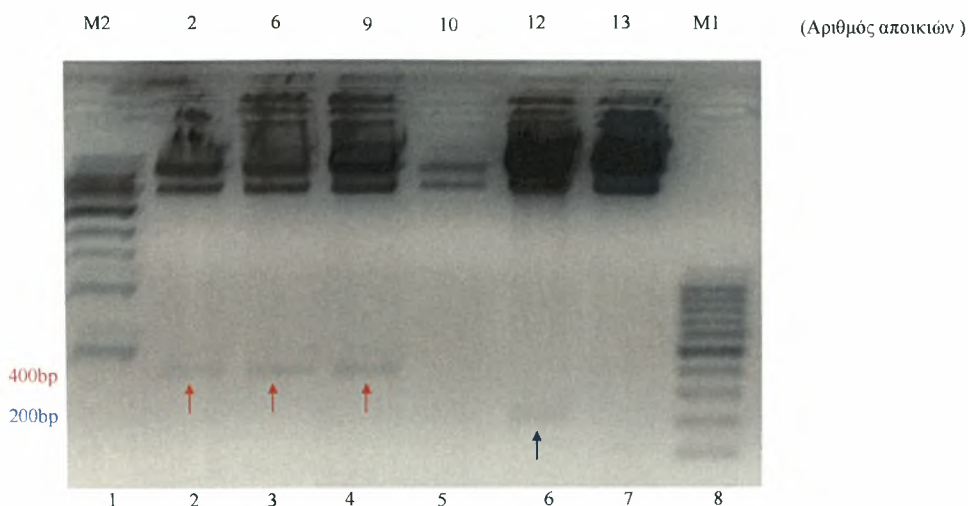


Σχημα.2: Χάρτης περιορισμού.

Σημεία πέψης του φορέα pGEX4T1-Tev για τα ένζυμα NotI, XhoI και XbaI.

Έτσι για το σωστό προσανατολισμό θα πρέπει να παραλάβουμε ένα τμήμα 5100bp και ένα τμήμα 400bp ενώ για το λάθος θα παραλάβουμε ένα τμήμα 5300bp και ένα 200bp.

Τα αποτελέσματα της πέψης των πλασμιδίων 2,6,9,10,12,13 ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικ.16)



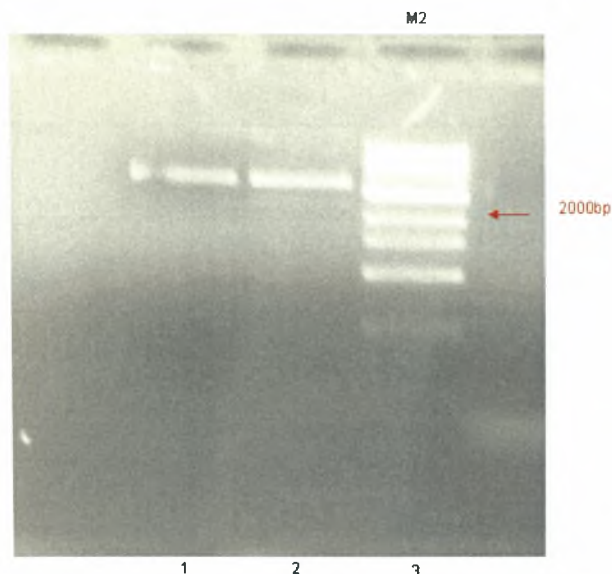
Εικ.16: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 1%.

Διαδρομή 1: M2, διαδρομές 2-7: πέψη με *XhoI* και *XbaI* του DNA αποικιών οι οποίες αναγράφονται, διαδρομή 8: M1.

Συμπερασματικά οι θετικές για τον προσανατολισμό αποικίες ήταν αυτές με αριθμούς 2,6,9 ενώ η 12 έχει ανάποδο προσανατολισμό.

### Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το QIAprep Spin Miniprep Kit και μικροφυγόκεντρο.

Επιλέχθηκαν τυχαία οι αποικίες με τον αριθμό 2 και 6 από τις οποίες παράχθηκε μικρής κλίμακας DNA (βλ. μέθοδο 11 σελ.40 ). Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του DNA με βάση τη φωτεινότητα της ζώνης σχετικά με το μάρτυρα M2 σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικ.17)



Εικ. 17: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 1%. 1μl

Διαδρομή 1: 1μl DNA αποικίας με αριθμό 2, διαδρομή 2: 1μl DNA αποικίας με αριθμό 6, διαδρομή 3: 1μl M2.

Η φωτεινότητα της ζώνης του DNA των αποικιών 2 και 6 μοιάζει με αυτή των 2000bp του μάρτυρα. Με βάση το συμπέρασμα αυτό και τα στοιχεία του M2, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA των παραπάνω αποικιών σε 50ng/μl.

## Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX1<sup>49-246</sup>, GST/GAP<sup>138</sup>, GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>

### Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 RIL

Αφού κύτταρα BL21 RIL μετατράπηκαν σε δεκτικά (competent cells) (Βλ. μέθοδο 12 σελ.41 ) μετασχηματίστηκαν (Βλ. μέθοδο 10 σελ.40) με οχτώ διαφορετικά DNA όπως αυτά φαίνονται στον πίνακα 2.

pGEX4T1-Tev/GST	Αρνητικός μάρτυρας. Η GST μόνη δεν συνδέεται με τον HIF1-α
pGEX4T1-Tev/ HAX-1 <sup>49-246</sup> (αποικία 2)	DNA για έλεγχο σύνδεσης HAX-1 <sup>49-246</sup> και HIF-1 <sup>α</sup>
pGEX4T1-Tev/ HAX-1 <sup>49-246</sup> (αποικία 6)	DNA για έλεγχο σύνδεσης HAX-1 <sup>49-246</sup> και HIF-1 <sup>α</sup>
pGEX4T1-Tev/ GST/GAP <sup>138</sup>	Θετικός μάρτυρας. Η GAP <sup>138</sup> έχει δειχθεί με το σύστημα δύο υβριδίων ότι συνδέεται με τον HIF-1 <sup>α</sup>
pHis/GFP	Αρνητικός μάρτυρας. Η GFP μόνη δεν συνδέεται με τη HAX-1 <sup>49-246</sup>
pHis/GFP/HIF-1 <sup>α</sup>	DNA για έλεγχο σύνδεσης HIF-1α και HAX-1 <sup>49-246</sup>
pHis/GFP/HIF-1α <sup>244-532</sup>	Θετικός μάρτυρας. Ο HIF-1α <sup>244-532</sup> έχει δειχθεί με το σύστημα δύο υβριδίων ότι συνδέεται με τη HAX-1 <sup>49-246</sup>
1ng γνωστού DNA	Μάρτυρας για τον έλεγχο δεκτικότητας των κυττάρων BL21 RIL με βάση τον αριθμό αποικιών

Πίνακας 2:  
DNA (θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες) με τα οποία μετασχηματίστηκαν τα δεκτικά κύτταρα BL21 RIL.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επωάστηκαν σε τριβλία LB στα οποία είχε προστεθεί αντιβιοτικό αμπικιλίνη με σκοπό να επιζήσουν αυτά που έχουν μετασχηματιστεί καθώς ο φορέας pGEX4T1-Tev όπως και ο pHisGFP προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό. Είχε όμως παράλληλα προστεθεί και χλωραμφαινικόλη στην οποία είναι ανθεκτικά τα στελέχη BL21 RIL. Από το τριβλίο με το 1ng γνωστού DNA που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο δεκτικότητας των κυττάρων BL21 RIL αναπτύχθηκαν 100 αποικίες, που ήταν ικανοποιητικός αριθμός δεκτικότητας κυττάρων για το σκοπό που προοριζόταν (10<sup>5</sup>/μg).



## **Έπαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG**

Εμβολιάστηκαν επτά καλλιέργειες LB των 200ml με τα μετασχηματισμένα κύτταρα με κάθε ένα από τα διαφορετικά DNA του πίνακα 1 και ακόμα μία ως control (στις καλλιέργειες προστέθηκε αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη).

Ακολούθησε επαγωγή των πρωτεϊνών με προσθήκη IPTG (Βλ. μέθοδο 13 σελ.41 ) τελικής συγκέντρωσης 1mM. Κρατήθηκαν και φωτομετρήθηκαν δείγματα πριν και μετά την επαγωγή των 4h με IPTG με σκοπό να γίνουν υπολογισμοί που θα επιτρέπουν στα δείγματα να ισοφορτωθούν κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε SDS-PAGE (η οποία θα ακολουθήσει) και τελικά να γίνει η σύγκριση επαγωγής των πρωτεϊνών χωρίς και με τη βοήθεια του IPTG .

## **Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα βακτήρια**

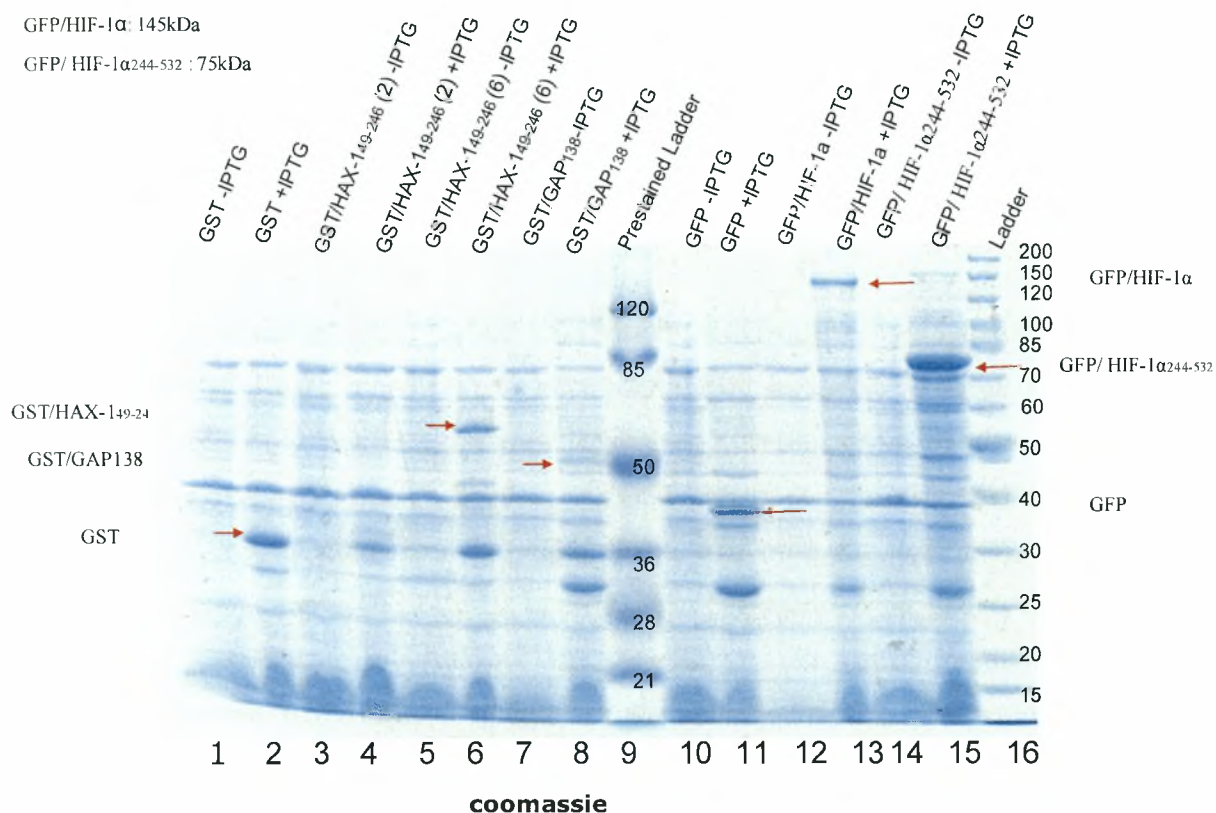
Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα βακτήρια παραλήφθηκε μετά τη διάσπαση των κυττάρων και με τη βοήθεια υπερήχων (Sonication) και φυγοκέντρηση (Βλ. μέθοδο 14 σελ.42 ). Το εκχύλισμα αυτό στη συνέχεια ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

## **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)**

Οι πρωτεΐνες που συλλέχθηκαν με τη μορφή εκχυλίσματος αποδιατάχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Βλ. μέθοδο 15 σελ.42 ).

Τα δείγματα στην ηλεκτροφόρηση αυτή φορτώθηκαν σε τέτοιες ποσότητες ώστε αυτά να είναι συγκρίσιμα ανά δύο (Δηλαδή δείγμα χωρίς την επαγωγή με IPTG σε σύγκριση με δείγμα με επαγωγή με IPTG) για κάθε καλλιέργεια ξεχωριστά (εικ.18).

GST/GAP<sup>138</sup>: 50kDa  
 GST/HAX-1<sup>49-246</sup>: 57kDa  
 GFP/HIF-1α: 145kDa  
 GFP/ HIF-1α<sup>244-532</sup> : 75kDa



Εικ. 18: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομές 1-8: GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup> από τις αποικίες (2), (6) αντίστοιχα και GST/GAP<sup>138</sup> χωρίς (-) και με (+) επαγωγή IPTG όπως φαίνονται στην εικόνα, διαδρομή 9: pretained ladder (M3), διαδρομές 10-15: GFP, GFP/HIF1α και GFP/HS χωρίς (-) και με (+) επαγωγή IPTG όπως φαίνεται στην εικόνα, διαδρομή 16: 10μl protein ladder 10-200kDa (M4).

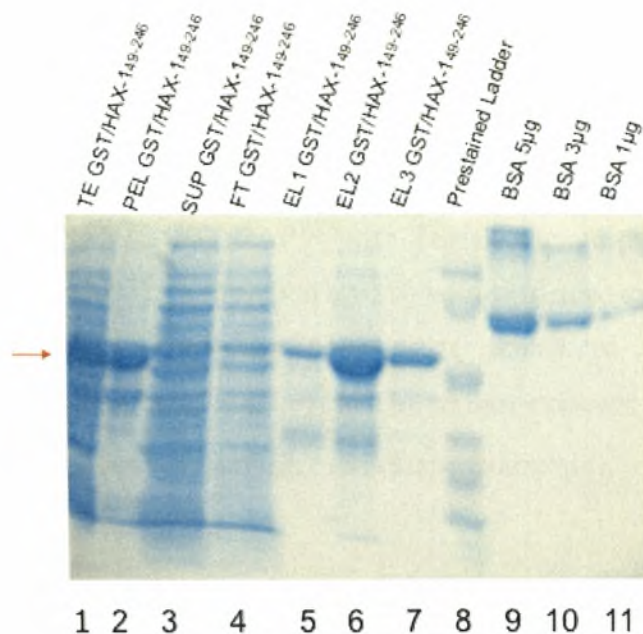
Συμπερασματικά υπήρξε καλή επαγωγή της GST η οποία εμφανίζεται κοντά στα 36kDa. Η GST/HAX-1<sup>49-246</sup> επάχθηκε μόνο από την καλλιέργεια της αποικίας 6 και εμφανίζεται στα 57kDa όπως ήταν αναμενόμενο καθώς GST (36kDa) + HAX-1<sup>49-246</sup> (21kDa)= 57kDa. Υπήρξε επαγωγή της GST/GAP<sup>138</sup> στα 50kDa, καθώς GST (36kDa) + GAP<sup>138</sup> (14kDa)= 50kDa, η οποία όμως δεν ήταν αρκετά καλή. Οι πρωτεΐνες GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HS επάχθηκαν στα 40,145 και περίπου στα 75kDa αντίστοιχα όπως ήταν και πάλι αναμενόμενο καθώς GFP (40kDa) + HIF-1α (120kDa) =145kDa και GFP (40kDa) + HIF-1α<sup>244-532</sup> (32kDa) =72kDa . Η GFP/HIF-1α όμως επάχθηκε σε μικρότερη ποσότητα.

## **Καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup> , GST/GAP<sup>138</sup>,GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>**

### **Καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup> ,GST/GAP<sup>138</sup>**

Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup> , GST/GAP<sup>138</sup> απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας στήλες αγγιστείας οι οποίες περιείχαν σφαιρίδια γλουταθειόνης (GSH) (βλ. μέθοδο 17 σελ.43 ). Οι τρεις πρωτεΐνες συνδέθηκαν με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης στις στήλες με τη βοήθεια της GST ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες παρασύρθηκαν και πέρασαν από τη στήλη. Έτσι, στη συνέχεια ήταν εύκολη η έκλυση των επιθυμητών πρωτεϊνών με τα κατάλληλα διαλύματα, ώστε τελικά να τις παραλάβουμε καθαρές. Προκειμένου να ελεγχθεί η όλη αυτή διαδικασία, κρατήθηκαν κάποια δείγματα κατά τη διάρκεια του καθαρισμού. Πιο συγκεκριμένα, επαναδιαλύθηκε το ίζημα που είχε παραληφθεί από την επαγωγή με IPTG και έγινε κατεργασία με υπερήχους. Τότε κρατήθηκε το πρώτο δείγμα, αυτό του συνολικού εκχυλίσματος (TE). Μετά την επεξεργασία με υπερήχους (sonication) ακολούθησε φυγοκέντρηση και κρατήθηκαν δείγματα και από το υπερκείμενο (SUP) και από το ίζημα (PEL). Έπειτα έγινε εξισορρόπηση της κάθε στήλης με κατάλληλο διάλυμα και περάστηκε από αυτές το υπερκείμενο στο οποίο βρίσκονται όλες οι βακτηριακές πρωτεΐνες. Μετά το πέραςμα του υπερκειμένου κρατήθηκε ακόμα ένα δείγμα (FT). Τέλος κρατήθηκαν δείγματα για τα τρία εκλούσματα (EL) που ακολούθησαν με ειδικό διάλυμα έκλυσης, το οποίο περιέχει ανηγμένη γλουταθειόνη και αποσυνδέει τη GSH από τη GST, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται οι επιθυμητές πρωτεΐνες από της στήλης. Τα δείγματα αυτά κρατήθηκαν με σκοπό να ελεγχθεί και να συγκριθεί η ποσότητα των πρωτεϊνών που βρίσκονται σ'αυτά. Στα δείγματα αυτά ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

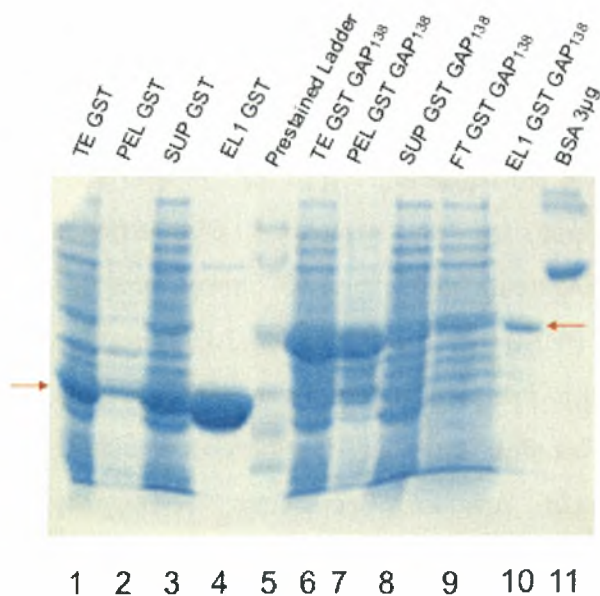
Οι πρωτεΐνες των δειγμάτων αποδιατάχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικ.19 και Εικ.20). Στις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε και BSA για μια πρώτη ποσοτικοποίηση.



Εικ. 19: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομή 1: 10μl TE/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 2: 10μl PEL/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 3: 10μl SUP/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 4: 20μl FT/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 5: 15μl EL1/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 6: 15μl EL2/GST/HAX-1<sup>49-24</sup>, διαδρομή 7: 15μl EL3/GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, διαδρομή 8: 5μl M3, διαδρομή 9: 5μl BSA 1μg/μl, διαδρομή 10: 3μl BSA 1μg/μl, διαδρομή 11: 1μl BSA 1μg/μl.

Τα βέλη υποδεικνύουν την καθαρή πρωτεΐνη.



Εικ. 20: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομή 1: 10μl TE/GST, διαδρομή 2: 10μl PEL/GST, διαδρομή 3: 20μl SUP/GST, διαδρομή 4: 15μl EL1/GST, διαδρομή 5: 5μl M3, διαδρομή 6: 10μl TE/GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 7: 10μl PEL/GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 8: 20μl SUP/GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 9: 20μl FT/GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 10: 15μl EL1/GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 11: 3μl BSA 1μg/μl. Τα βέλη υποδεικνύουν την καθαρή πρωτεΐνη.

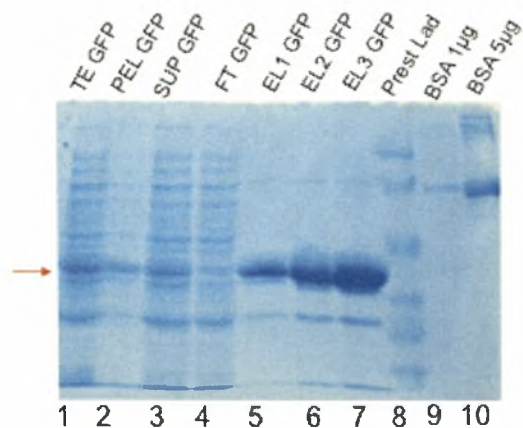
Στις εικόνες 19 και 20 παρατηρήθηκε ότι υπήρχε αρκετή ποσότητα πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, GST/GAP<sup>138</sup> στο TE. Ένα μικρό μέρος αυτών χάθηκε δυστυχώς στο ίζημα, ωστόσο υπήρχε και αρκετή ποσότητά τους στο υπερκείμενο που πέρασε από τη στήλη, με αποτέλεσμα αυτές τελικά να παραληφθούν στα εκλούσματα σε ικανοποιητικό βαθμό, σχετικά με το υπερκείμενο (για την GST/HAX-1<sup>49-246</sup> μεγαλύτερη ποσότητα υπήρχε στο δεύτερο έκλουσμα).

### **Καθαρισμός των χμαιορικών πρωτεϊνών GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>**

Οι χμαιορικές πρωτεΐνες GFP, GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας στήλες αγκιστείας οι οποίες περιείχαν σφαιρίδια νικελίου (Ni), καθώς το νικέλιο συνδέεται με τις 10 ιστοδίνες (H<sub>10</sub>) που περιέχει στην αρχή της κάθε πρωτεΐνης (Βλ. μέθοδο 18 σελ.44). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή του καθαρισμού των χμαιορικών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-1<sup>49-246</sup>, GST/GAP<sup>138</sup> με τη μόνη διαφορά ότι σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα διαλύματα για της στήλες νικελίου. Στη διαδικασία αυτή κρατήθηκαν επίσης δείγματα των πρωτεϊνών από το συνολικό εκχύλισμα (TE), από το ίζημα (PEL), από το υπερκείμενο (SUP) πριν την Επώαση με τη στήλη, από το SUP που αφήνεται να περάσει από τη στήλη μετά την επώαση και πριν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα έκλουσης (FT) και από τρία εκλούσματα (EL).

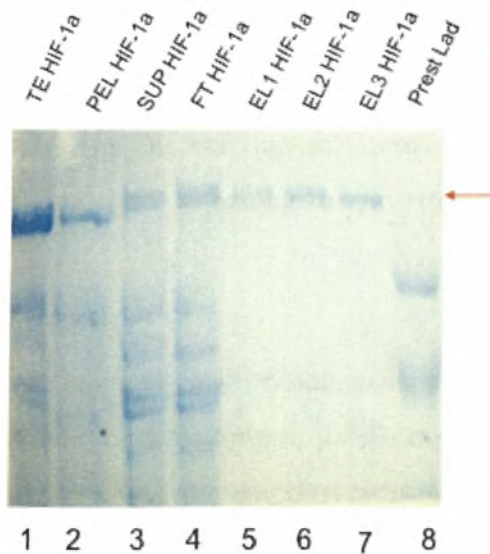
Οι πρωτεΐνες των δειγμάτων αποδιατάχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικ.21, Εικ.22 και Εικ.23). Στις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε και BSA για μια πρώτη ποσοτικοποίηση.





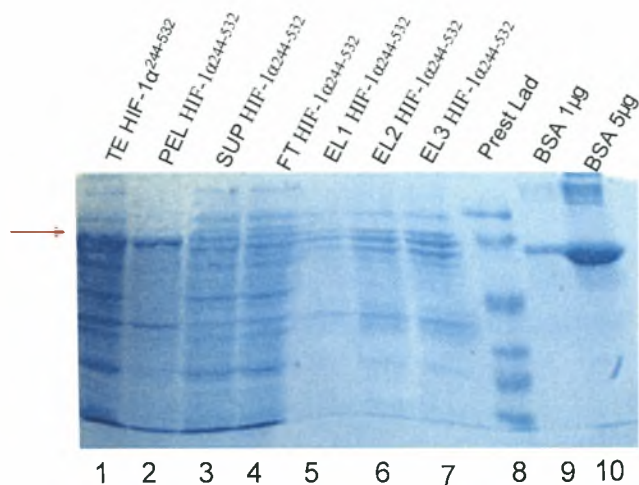
Εικ.21: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομή 1: 10µl TE/GFP, διαδρομή 2: 10µl PEL/GFP, διαδρομή 3: 20µl SUP/GFP, διαδρομή 4: 20µl FT/GFP, διαδρομή 5: 15µl EL1/GFP, διαδρομή 6: 15µl EL2/GFP, διαδρομή 7: 15µl EL3/GFP, διαδρομή 8: 5µl M3, διαδρομή 9: 1µl BSA 1µg//µl , διαδρομή 10: 5µl BSA 1µg//µl. Τα βέλη υποδεικνύουν την καθαρή πρωτεΐνη.



Εικ.22: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομή 1: 10µl TE/GFP/HIF-1α, διαδρομή 2: 10µl PEL/GFP/HIF-1α, διαδρομή 3: 20µl SUP/GFP//HIF-1α, διαδρομή 4: 20µl FT/GFP/HIF-1α, διαδρομή 5: 15µl EL1/GFP/HIF-1α, διαδρομή 6: 15µl EL2/GFP/HIF-1α, διαδρομή 7: 15µl EL3/GFP/HIF-1α, διαδρομή 8: 5µl M3. Τα βέλη υποδεικνύουν την καθαρή πρωτεΐνη.



Εικ.23: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομή 1: 10μl TE/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 2: 10μl PEL/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 3: 20μl SUP/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 4: 20μl FT/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 5: 15μl EL1/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 6: 15μl EL2/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 7: 15μl EL3/GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 8: 5μl M3, διαδρομή 9: 1μl BSA 1μg/μl, διαδρομή 10: 5μl BSA 1μg/μl. Τα βέλη υποδεικνύουν την καθαρή πρωτεΐνη.

Στις εικόνες 21,22 και 23 εμφανίζονται οι ποσότητες των πρωτεϊνών GFP, GFP/HIF1α και GFP/HIF1α<sup>244-532</sup>. Φαίνεται ότι υπήρχε αρκετή ποσότητά τους στο TE όμως και πάλι χάθηκε τμήμα τους στο ίζημα. Παρ' όλα αυτά φάνηκε ικανοποιητικό αποτέλεσμα στα εκλούσματα για τον GFP/HIF1α και τον GFP/HIF1α<sup>244-532</sup>, παρά την μερική πρωτεόλυση του τελευταίου. Μεγάλη ποσότητα παραλήφθηκε στα τρία εκλούσματα για την GFP και ιδιαίτερα στο τελευταίο.

Ακολούθησε επιπλέον καθαρισμός των εκλουόμενων πρωτεϊνών με διαπίδυση σε collodion bags (sartorius) και ποσοτικοποίηση με ηλεκτροφόρηση και με Bradford (Βλ. μέθοδο 19. σελ.45 ). Τελικά οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν ήταν:

GST: 30 μg/μl

GST/GAP<sup>138</sup>: 2 μg/μl

GST/HAX-1<sup>49-246</sup>: 5 µg/µl

GFP: 7 µg/µl

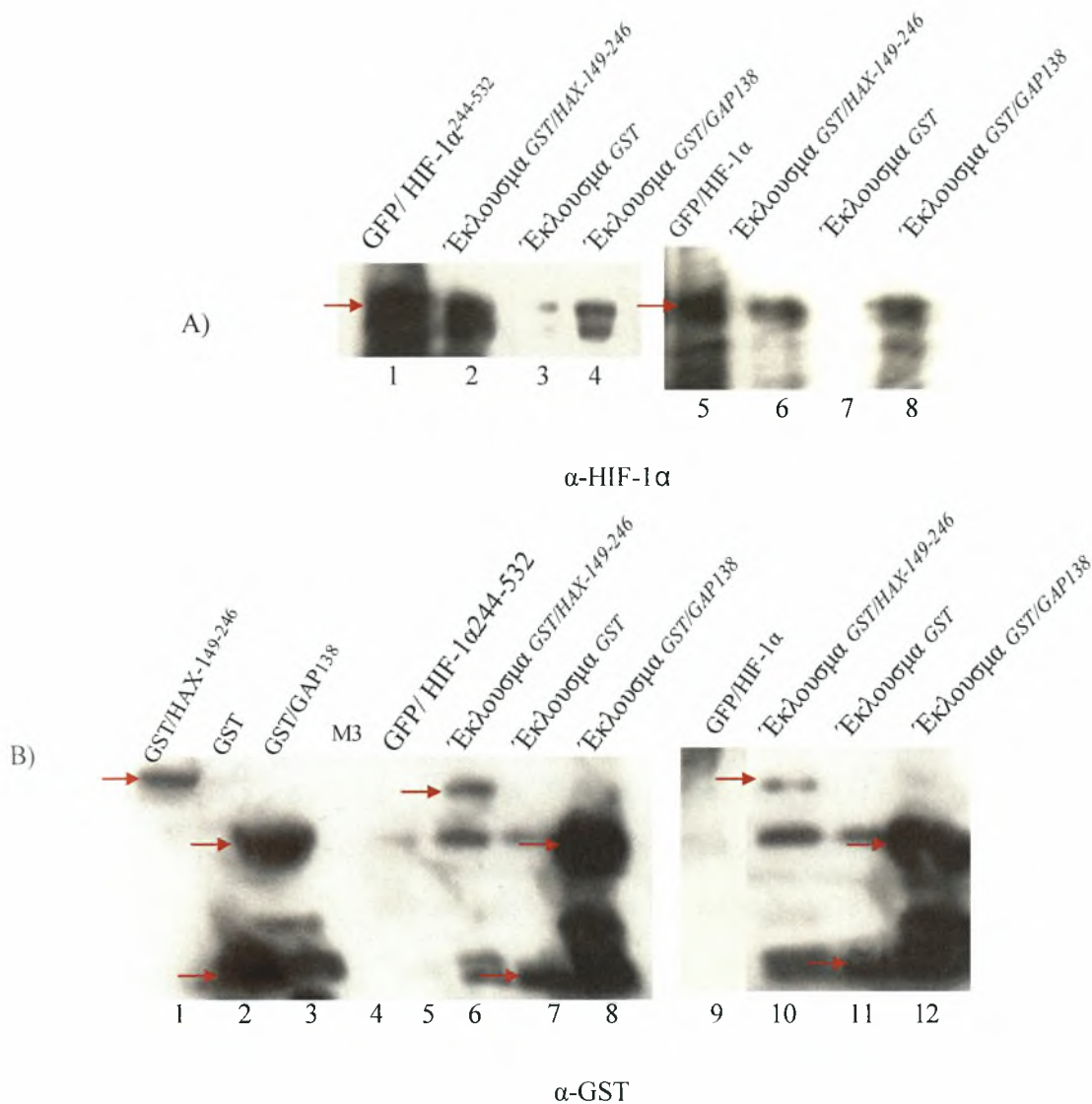
GFP/HIF-1α: 2 µg/µl

GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>: 1 µg/µl

**In vitro ειδική σύνδεση (pull down assay) του GFP/HIF-1α και του GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> με την GST, GST/GAP<sup>138</sup> και την GST/HAX-1<sup>49-246</sup> και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση.**

Χρησιμοποιήθηκαν έξι στήλες αγκιστείας σε κάθε μια από τις οποίες τοποθετήθηκαν 15µl σφαιριδίων GSH. Οι στήλες αυτές εξισορροπήθηκαν με διάλυμα εξισορρόπησης και έπειτα σε δύο από αυτές δεσμεύτηκαν από 25µg καθαρής πρωτεΐνης GST (αρνητικός μάρτυρας) παρουσία του ίδιου διαλύματος εξισορρόπησης. Αντίστοιχα, δεσμεύτηκαν και από 25µg των καθαρών πρωτεϊνών GST-GAP<sup>138</sup> (θετικός μάρτυρας) και GST-HAX<sup>49-246</sup> στις υπόλοιπες τέσσερις στήλες (ανά δύο στήλες για κάθε πρωτεΐνη) παρουσία και πάλι του ίδιου διαλύματος εξισορρόπησης. Η δέσμευση αυτή πραγματοποιήθηκε χάρη στη σύνδεση GSH και GST. Στη συνέχεια οι στήλες εξισορροπήθηκαν και πάλι αλλά με διάλυμα σύνδεσης αυτή τη φορά. Η μία στήλη του κάθε ζεύγους επώαστηκε με 30µg καθαρής πρωτεΐνης HisGFP/HIF-1α, ενώ η άλλη με 60µg καθαρής πρωτεΐνης GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>. Μετά από τις κατάλληλες πλύσεις ακολούθησε έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στις στήλες (Βλ. μέθοδο 20 σελ.45 ) με διάλυμα φόρτωσης και τα εκλούσματα (Βλ. μέθοδο 21.1 σελ.46 ) αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE στην οποία αναλύθηκαν ταυτόχρονα και δείγματα των καθαρών πρωτεϊνών όπως αυτά χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων. Αφού τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Βλ. μέθοδο 21.3. σελ.47 ) και χρησιμοποιήθηκε βαφή Ponceau για μια πρώτη και προσωρινή ένδειξή τους, πραγματοποιήθηκε

ανοσοανίχνευση (Βλ. μέθοδο 21.4. σελ.47 ) με τη βοήθεια των αντισωμάτων α-GST (Το αντίσωμα α-GST είχε παραχθεί σε ορό κατσίκας και βρισκόταν σε αραίωση 1:1000 ενώ το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα βρισκόταν σε αραίωση 1:3000) και α-HIF-1α (Το αντίσωμα α-HIF-1α είχε παραχθεί σε ορό κουνελιού και βρισκόταν σε αραίωση 1:3000 ενώ το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα γι' αυτό βρισκόταν σε αραίωση 1:5000). Με το αντίσωμα α-GST ανιχνεύτηκε ειδικά σε ποια από τα εκλούσματα βρισκόταν οι πρωτεΐνες GST, GST/GAP<sup>138</sup> και GST/HAX-1<sup>49-246</sup> ενώ με τη βοήθεια του αντισώματος α-HIF-1α ανιχνεύτηκε σε ποια από τα εκλούσματα βρισκόταν οι πρωτεΐνες HIF-1α και HIF-1α<sup>244-532</sup> (Το α-HIF-1α έχει την ιδιότητα να ανιχνεύει και τον HIF-1α<sup>244-532</sup>). Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης εμφανίζονται στη Εικ. 24.



Εικ.24: Χρωματογραφία αχιστείας των καθαρών πρωτεϊνών GST, GST/HAX-I<sup>49-246</sup> και GST/GAP<sup>138</sup> με σφαιρίδια GSH-σεφαρόζης επωασμένα με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> και HisGFP/HIF-1α.

A) Στα πλαίσια παρουσιάζεται η ανοσοαποτύπωση που έγινε με πολυκλωνικό αντίσωμα α-HIF-1α. Διαδρομή 1: 3 μg από την πρωτεΐνη HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 2: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/HAX-I<sup>49-246</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 3: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 4: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/GAP<sup>138</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 5: 3 μg από την πρωτεΐνη HisGFP/HIF-1α, 6: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/HAX-I<sup>49-246</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α, διαδρομή 7: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α, διαδρομή 8: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/GAP<sup>138</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α. Τα βέλη υποδεικνύουν την πρωτεϊνική ζώνη της HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> και HisGFP/HIF-1α.

B) Στα πλαίσια παρουσιάζεται η ανοσοαποτύπωση που έγινε με πολυκλωνικό αντίσωμα α-GST. Διαδρομή 1: 3,5 μg από την πρωτεΐνη GST/HAX-I<sup>49-246</sup>, διαδρομή 2: 3,5 μg από την πρωτεΐνη GST, διαδρομή 3: 3,5 μg από την πρωτεΐνη GST/GAP<sup>138</sup>, διαδρομή 4: M3, διαδρομή 5: 3 μg από την πρωτεΐνη HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 6: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/HAX-I<sup>49-246</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 7: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 8: έκλουσμα



της στήλης με καθηλωμένη την GST/GAP<sup>138</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α<sup>244-532</sup>, διαδρομή 9: 3 μg από την πρωτεΐνη HisGFP/HIF-1α, 10: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/HAX-1<sup>49-246</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α, διαδρομή 11: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α, διαδρομή 12: έκλουσμα της στήλης με καθηλωμένη την GST/GAP<sup>138</sup> που είχε επωαστεί με HisGFP/HIF-1α. Τα βέλη υποδεικνύουν σχετικές με το πείραμα πρωτεϊνικές ζώνες.

Με τη βοήθεια του αντισώματος α- GST γίνονται διακριτές οι ζώνες των πρωτεϊνών GST, GST/GAP<sup>138</sup> και GST/HAX-1<sup>49-246</sup> οι οποίες καθηλώθηκαν στη στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Για να μπορέσουμε να διακρίνουμε διακρίνουμε τις ζώνες των πρωτεϊνών GFP/HIF-1α και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> με τις οποίες επώαστηκαν τα σφαιρίδια αχιστείας έγινε ανοσοαποτύπωση με το αντίσωματος α- HIF-1α. Έτσι, γίνεται φανερό ότι στο ίδιο έκλουσμα που εμφανίζεται η ζώνη της πρωτεΐνης GST [Εικ. 24 B) διαδρομή 7] δεν εμφανίζεται η ζώνη του GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> [Εικ. 24 A) διαδρομή 3], κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς η GST αποτελεί το αρνητικό μάρτυρα. Το αντίθετο συμβαίνει με την πρωτεΐνη GST/GAP<sup>138</sup> η ζώνη της οποίας εμφανίζεται [Εικ. 24 B) διαδρομή 8] στο ίδιο έκλουσμα στο οποίο εμφανίζεται και η ζώνη του GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> [Εικ. 24 A) διαδρομή 4] δείχνοντας την αλληλεπίδραση τους αποτελώντας το θετικό μάρτυρα του πειράματος καθώς ήταν ήδη γνωστό ότι συνδέονται μεταξύ τους. Η εμφάνιση των ζωνών της GST/HAX-1<sup>49-246</sup> [Εικ. 24 B) διαδρομή 6] και GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> [Εικ. 24 A) διαδρομή 2] όταν συνεπώαστηκαν στα σφαιρίδια δείχνει την αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Όσον αφορά τον πλήρους μεγέθους GFP/HIF-1α παρατηρούμε ότι: Στο έκλουσμα που παρατηρείται η ζώνη της πρωτεΐνης GST [Εικ. 24 B) διαδρομή 11] δεν βλέπουμε τη ζώνη του GFP/HIF-1α [Εικ. 24 A) διαδρομή 7]. Εδώ και πάλι η GST αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα της αλληλεπίδρασης. Στο έκλουσμα που διακρίνουμε τη ζώνη της πρωτεΐνης GST/GAP<sup>138</sup> [Εικ. 24 B) διαδρομή 12] εμφανίζεται και αυτή του GFP/HIF-1α [Εικ. 24 A) διαδρομή 8] όπου όπως και προηγούμενος αποτελεί τον θετικό μάρτυρα των αλληλεπιδράσεων που παρατηρούμε. Τέλος στο έκλουσμα στο οποίο διακρίνεται η ζώνη της πρωτεΐνης GST/HAX-1<sup>49-246</sup> [Εικ. 24 B) διαδρομή 10] παρατηρείται και αυτή του GFP/HIF-1α [Εικ. 24 A) διαδρομή 6] δείχνοντας και πάλι την δημιουργία του μεταξύ τους συμπλόκου.

Τελικά, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι οι διάφορες μορφές του HIF-1α δεν αλληλεπιδρούν με τη GST άρα μπορούμε να αποφανθούμε για τη εξειδίκευση της σύνδεσης του GFP/HIF-1α<sup>244-532</sup> και του GFP/HIF-1α με τις πρωτεΐνες GAP<sup>138</sup> και HAX-1<sup>49-246</sup>.

Συμπερασματικά: Αποδείχθηκε in vitro η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη HAX-1.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο για το κύτταρο σε καταστάσεις μειωμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου. Ακόμα ο HIF-1α μπορεί να ρυθμιστεί και από χημικές ουσίες αλλά και από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια [60].

Με τη βοήθεια του συστήματος των δύο υβριδίων ανιχνεύτηκαν πολλές μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α, ωστόσο η παρούσα ερευνητική εργασία εστιάζεται στη διερεύνηση της σύνδεσης του HIF-1α με την πρωτεΐνη HAX-1<sup>49-246</sup>.

Η HAX-1 είναι μια πρωτεΐνη που αρχικά αναγνωρίστηκε εξαιτίας της σύνδεσής της με την πρωτεΐνη HS-1 (Hematopoietic Lineage cell-specific protein-1). Η λειτουργία της HAX-1 δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ωστόσο διαθέτει κυρίως αντιαποπτωτική δράση καθώς εμπλέκεται στο μονοπάτι των κασπασών 3 και 9. Έτσι, η HAX-1 ουσιαστικά προστατεύει τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα έχει αποδειχτεί η σχέση της HAX-1 με ασθένειες όπως η ουδετεροπενία, η πολυκυστική νόσος των νεφρών, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας καθώς και με καρκινώματα εφόσον προωθεί τη διείσδυση και με μεταφορά καρκινικών κυττάρων [52].

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η έκφραση και ο καθαρισμός της HAX-1<sup>49-246</sup> και του HIF-1α<sup>244-532</sup> και η *in vitro* επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης τους, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή είχε ήδη ανιχνευτεί *in vivo* σε κύτταρα σακχαρομήκυτα.

Συνοπτικά, τα αντίστοιχα για την κάθε πρωτεΐνη cDNA αρχικά κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους βακτηριακούς φορείς έκφρασης. Ακολούθησε επαγωγή και καθαρισμός των χημαιρικών πρωτεϊνών. Η *in vitro* σύνδεση (pull down assay) μεταξύ της HAX-1<sup>49-246</sup> και του HIF-1α<sup>244-532</sup> δοκιμάστηκε καθλώνοντας τη GST/HAX-1<sup>49-246</sup> σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης στα οποία ειδικά κατακρατήθηκε ο HIF-1α. Η εξειδίκευση της παραπάνω αλληλεπίδρασης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας μόνο τον επίτοπο GST (βλ. Εικ. 24 A) διαδρομές 3 και 7, B) διαδρομές 7 και 11 αντίστοιχα), όπου ο HIF-1α δε συγκρατείται. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και μία ήδη γνωστή αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών GAP<sup>1-138</sup> με τον HIF-1α για την επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων (βλ. Εικ. 24 A) διαδρομές 4 και 8, B) διαδρομές 8 και 12 αντίστοιχα). Οι μη ειδικές ζώνες μικρότερης έντασης που εμφανίζονται στις διαδρομές Εικ. 24 B) 6, 7 και 10, 11 στο ίδιο ύψος με τη GST/GAP<sup>1-138</sup>, πιθανότατα οφείλονται σε βακτηριακές

πρωτεΐνες ή σε πρωτεολυμμένα τμήματα του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

Φυσικά, για την επιβεβαίωση της παραπάνω αλληλεπίδρασης είναι επιβεβλημένο να γίνουν περαιτέρω πειράματα. Αρχικά, θα επιχειρηθεί να γίνει επανάληψη της *in vitro* δοκιμασίας αλληλεπίδρασης με τον αντίστροφο τρόπο, όπου ο HIF-1α θα είναι καθηλωμένος στα σφαιρίδια και η HAX-1 θα βρίσκεται σε διαλυτή μορφή στο βακτηριακό εκχύλισμα. Εφόσον, επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση αυτή, κρίνεται αναγκαίο να διερευνηθεί και ο φυσιολογικός της ρόλος. Με βάση τη βιβλιογραφία, μετά από ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης (SAGE) σε νεφρικά καρκινικά κύτταρα (RCC), έχειδειχθεί ότι αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης HAX-1 σε συνθήκες υποξίας [61]. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική καθώς δείχνει ότι η μείωση των επιπέδων οξυγόνου στο περιβάλλον των κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών. Άρα, εφόσον ευνοείται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο στις ίδιες συνθήκες, αυξάνει η πιθανότητα ότι η αλληλεπίδραση που παρατηρήσαμε *in vitro* να συμβαίνει και στο κύτταρο. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί η έκφραση της HAX-1 έχει αντιαποπτωτική δράση και συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι η δράση του HIF-1 στο υποξικό μικροπεριβάλλον που αναπτύσσεται σε πολλούς ανθρώπινους όγκους ευνοεί στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [4]. Άρα, ο βιολογικός ρόλος των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να είναι παρόμοιος. Έτσι η περαιτέρω επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης αυτής *in vivo* και η μελέτη της ρύθμισης τους σε κύτταρα θα ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Προκειμένου να διασαφηνιστεί ο βιολογικός ρόλος του συμπλόκου που σχηματίζει η HAX-1 με τον HIF-1, είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του cDNA της HAX-1 σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς που να επιτρέπουν την έκφραση της σε ανθρώπινα κύτταρα. Στη συνέχεια η ταυτόχρονη παροδική επιμόλυνση ανθρώπινων κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν το cDNA και των δύο πρωτεϊνών θα επιτρέψει την *in vivo* επιβεβαίωση της δημιουργίας συμπλόκου με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Παράλληλα, η ταυτόχρονη έκφραση των δύο πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά θα παρατηρηθεί με μικροσκοπία φθορισμού ώστε ναδειχθεί ο πιθανός υποκυτταρικός εντοπισμός του συμπλόκου. Φυσικά, θα πρέπει να ελεγχθεί και η πιθανότητα η HAX-1 να ρυθμίζει μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε πειράματα όπου θα ελέγχεται η επαγωγή γονιδίων που φέρουν στοιχεία απόκρισης στην υποξία στους προαγωγείς τους.

Συνοπτικά, στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η έκφραση και ο καθαρισμός ενός τμήματος της πρωτεΐνης HAX-1 από βακτήρια και επιβεβαιώθηκε *in vitro* η αλληλεπίδραση του με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α. Δεδομένης της σημασίας του HIF-1 στην βιολογία του καρκίνου και την πιθανολογούμενη αντιαποπτωτική δράση της HAX-1 η περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης τους είναι ελκυστική. Άρα, η επιβεβαίωση της δημιουργίας του συμπλόκου

HIF-1α-HAX-1 και η πιθανότητα αυτό να αποτελεί ένα νέο μηχανισμό ρύθμισης του HIF-1α μπορεί να προσφέρει ένα νέο πεδίο έρευνας, το οποίο πιθανά να συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lyberopoulou, A., et al., *MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 995-1006.
2. Jiang, B.H., et al., *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19253-60.
3. Wang, G.L., B.H. Jiang, and G.L. Semenza, *Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(2): p. 550-6.
4. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
5. Goldberg, M.A., S.P. Dunning, and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. Science, 1988. **242**(4884): p. 1412-5.
6. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
7. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
8. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1999. **15**: p. 551-78.
9. Jiang, B.H., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 1): p. C1172-80.
10. Semenza, G.L., *Chairman's summary: mechanisms of oxygen homeostasis, circa 1999*. Adv Exp Med Biol, 2000. **475**: p. 303-10.
11. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem. Pharmacol., 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
12. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression*. FASEB J., 2002. **16**(10): p. 1151-62.
13. Bardos, J.I. and M. Ashcroft, *Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(2): p. 107-20.
14. Erbel, P.J., et al., *Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15504-9.
15. Hogenesch, J.B., et al., *Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8581-93.
16. Pugh, C.W., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11205-14.
17. Kallio, P.J., et al., *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6573-86.
18. Semenza, G.L., *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 167-71.
19. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
20. Mylonis, I., et al., *Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33095-106.

21. Mylonis, I., et al., *Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27620-7.
22. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 535-40.
23. Masson, N., et al., *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation*. Embo J, 2001. **20**(18): p. 5197-206.
24. Hon, W.C., et al., *Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 975-8.
25. Berra, E., et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4082-90.
26. Yuan, Y., et al., *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha*. J Biol Chem. 2003. **278**(18): p. 15911-6.
27. Chachami, G., et al., *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, 2004. **31**(5): p. 544-51.
28. Triantafyllou, A., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism*. Free Radic Res, 2006. **40**(8): p. 847-56.
29. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha 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, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
30. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
31. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 149-62.
32. Peng, J., et al., *The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8386-91.
33. Tian, H., et al., *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3320-4.
34. Maltepe, E., et al., *Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT*. Nature, 1997. **386**(6623): p. 403-7.
35. Kline, D.D., J.L. Overholt, and N.R. Prabhakar, *Mutant mice deficient in NOS-1 exhibit attenuated long-term facilitation and short-term potentiation in breathing*. J Physiol, 2002. **539**(Pt 1): p. 309-15.
36. O'Reilly, J.P. and G.G. Haddad, *Chronic hypoxia in vivo renders neocortical neurons more vulnerable to subsequent acute hypoxic stress*. Brain Res, 1996. **711**(1-2): p. 203-10.
37. Semenza, G.L., *Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer*. Intern Med, 2002. **41**(2): p. 79-83.
38. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
39. Talks, K.L., et al., *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 411-21.
40. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
41. Lee, S.W., et al., *Death effector domain of a mammalian apoptosis mediator, FADD, induces bacterial cell death*. Mol Microbiol, 2000. **35**(6): p. 1540-9.
42. Bergeron, M., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(12): p. 4159-70.

43. Carrero, P., et al., *Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 402-15.
44. Baek, J.H., et al., *OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha*. Mol Cell, 2005. **17**(4): p. 503-12.
45. Kaidi, A., A.C. Williams, and C. Paraskeva, *Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 210-7.
46. Moon, H.E., et al., *Negative regulation of hypoxia inducible factor-1alpha by necdin*. FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3797-801.
47. Bae, M.K., et al., *Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 9-12.
48. Katschinski, D.M., et al., *Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9262-7.
49. Isaacs, J.S., et al., *Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29936-44.
50. Liu, Y.V., et al., *RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 207-17.
51. Neckers, L., *Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer*. Curr Top Med Chem, 2006. **6**(11): p. 1163-71.
52. Fadeel, B. and E. Grzybowska, *HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1139-48.
53. Hippe, A., et al., *Expression and tissue distribution of mouse Hax1*. Gene, 2006. **379**: p. 116-26.
54. Grzybowska, E.A., et al., *Identification and expression analysis of alternative splice variants of the rat Hax-1 gene*. Gene, 2006. **371**(1): p. 84-92.
55. Radhika, V., et al., *Galphal3 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49406-13.
56. Vafiadaki, E., et al., *The role of SERCA2a/PLN complex, Ca(2+) homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate*. Pflugers Arch, 2009. **457**(3): p. 687-700.
57. Vafiadaki, E., et al., *The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 306-18.
58. Mirmohammadsadegh, A., et al., *HAX-1, identified by differential display reverse transcription polymerase chain reaction, is overexpressed in lesional psoriasis*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1045-51.
59. Gallagher, A.R., et al., *The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4017-22.
60. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.
61. Jiang, Y., et al., *Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(6): p. 453-62.