

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ
ΕΙΔΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ
HIF1- α ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΚΑΤΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8230/1

Ημερ. Εισ.: 28-04-2010

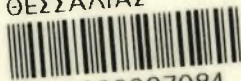
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΚΑΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



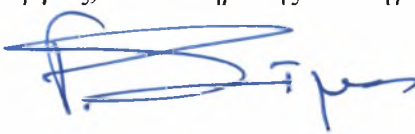
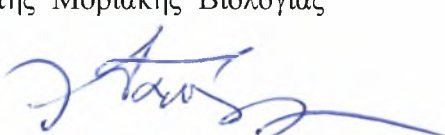
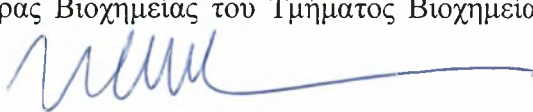
004000087084

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ
ΕΙΔΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ
HIF1- α ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa**

Υπεύθυνος καθηγητής:

- ❖ Σίμος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής
Λάρισας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Σίμος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής
Λάρισας 
- ❖ Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας 
- ❖ Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας Λάρισας 

Ευχαριστώ θερμά:

Τον κ. Σίμο Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής που μου έδωσε τη δυνατότητα διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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.

Τον κ. Μυλωνή Ηλία, διδάσκοντα 407 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με καθοδήγησε 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.

Περιεχόμενα

1.1. Περίληψη	6
1.2. Abstract	7
2. Εισαγωγή	8
2.1. Υποξία	8
2.2. Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1	8
2.3. Δομή και λειτουργία του HIF-1α	10
2.4. Η ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο	11
2.5. Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1α	13
2.6. Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α	15
2.7. Φωσφορυλίωση του HIF-1α	16
2.8. Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση	17
2.9. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α	20
2.10 HIF-1α και καρκίνος	21
3. Σκοπός	23
4. Υλικά και μέθοδοι	24
4.1 Υλικά	24
4.1.1. Βακτηριακά στελέχη	24
4.1.2. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)	24
4.1.3. Μάρτυρες μοριακών βαρών	25
4.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> TOP 10 και BL21RIL	25
4.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση	25
4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση του Qiagen Midi Kit	27
4.5. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	28
4.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	28
4.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
4.8. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και των ενθεμάτων για την αντίδραση λιγάσης	31
4.9. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης με χρήση kit της Qiagen για gel Extraction	32
4.10. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης)	32
4.11. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών GST-HIF-1α-348-826 S→E, GST-MTD, GST-MTD S→A και GST-MTD S→E σε κύτταρα BL21RIL με IPTG	33
4.12. Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος	34
4.13. Καθαρισμός πρωτεϊνών με επίτοπο GST	35
4.14 Διαπίδυση	35
4.15. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	36
4.16. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	36
4.17. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250	37
4.18. Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃)	37
4.19. Λύση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa	38

4.20. Δοκιμή in vitro αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών πάνω σε σφαιρίδια αγκιστείας (pull down assays)	39
5. Αποτελέσματα	41
5.1. Κλωνοποίηση μικρών τμημάτων του HIF-1α που φέρουν την φωσφομιμητική μετάλλαξη S641→E (HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και MTD S→E) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1	41
5.2. Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E	42
5.3. Ενίσχυση των τμημάτων MTD S→E και HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E με PCR	43
5.4 Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX-4T1- MTD S→E και pGEX-4T-HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και έλεγχος με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	44
5.5 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA MTD S→E και HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E	48
5.6 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-MTD, GST-MTD S→A, GST-MTD S→E και GST-HIF- 1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E σε BL21RIL και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης	49
5.7 Δοκιμή αλληλεπίδρασης σε σφαιρίδια αγκιστείας γλουταθειόνης-σεφαρόζης (pulldown assays) πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa με τις πρωτεΐνες GST, GST-MTD wt, GST-MTD S→A και GST-MTD S→E	52
5.8 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa που αλληλεπιδρούν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-MTD S→E	54
6. Συζήτηση	55
Βιβλιογραφία	60

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-1α, αποτελεί τη ρυθμιζόμενη υπομονάδα του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Ο HIF-1 ρυθμίζει, σαν απόκριση στην υποξία, την έκφραση μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων, που σχετίζονται με την ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, το μεταβολισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ρύθμιση του HIF-1α γίνεται σε διάφορα επίπεδα ενώ σημαντικό ρόλο σε αυτήν παίζουν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του HIF-1α μέσω της συσσώρευσης του στον πυρήνα λόγω της 'απόκρυψης' ενός γειτονικού σήματος πυρηνικής εξαγωγής (NES). Επιπλέον είναι πιθανόν η φωσφορυλίωση αυτή να προκαλεί την ειδική αλληλεπίδραση του HIF-1α με κάποιες πρωτεΐνες του πυρήνα, που υποβοηθούν τη δράση του.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών του πυρήνα που αλληλεπιδρούν ειδικά με την τροποποιημένη στη σερίνη 641 μορφή του HIF1-α. Για το σκοπό αυτό έγινε η κλωνοποίηση ενός μικρού τμήματος (MTD) του HIF1-α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641→Glu καθώς και του τμήματος (348-826) του HIF-1α που φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (pGEX-4T-1) ώστε να εκφραστούν σε βακτήρια ως πρωτεΐνες σύντηξης με τη GST. Μόνο η GST-MTD S→E εκφράστηκε επιτυχώς. Η GST-MTD S→E χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σε συνδυασμό με τις GST, GST-MTD wt και GST-MTD S→A (που φέρει τις μεταλλάξεις Ser641→Ala και Ser643→Ala που δεν επιτρέπουν τη φωσφορυλίωση) σε δοκιμή αλληλεπίδρασης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένες σε σφαιρίδια πρωτεΐνες (pull down assay). Από το πείραμα αυτό προέκυψαν δύο πρωτεΐνες που φαίνεται να αλληλεπιδρούν ειδικά με την MTD S→E. Η πρώτη με M.B. 42kDa, η οποία δεν κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθεί, και η δεύτερη με M.B. 100kDa, η οποία με φασματοσκοπία μάζας ταυτοποιήθηκε ως η πρωτεΐνη TUT-4.

1.2. ABSTRACT

HIF-1 α is the regulatory subunit of the transcription factor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). HIF-1 activates, as response to hypoxia, a number of genes related to erythropoiesis, angiogenesis, metabolism and cell proliferation. Apart from oxygen HIF-1 α is regulated by major signalling pathways and its post-translational modifications are critical for the modulation of its activity. HIF-1 α is phosphorylated by p44/42 MAPK at two serine residues (641/643) and becomes activated as it accumulates inside the nucleus due to the 'masking' of a neighboring nuclear export signal (NES). In addition to that, it is possible that this modification regulates also the specific interaction of HIF-1 α with other nuclear proteins enhancing, thus, its activity.

This study aimed to the isolation and identification of nuclear proteins that specifically associate with the modified form of HIF-1 α at serine 641. To this end, cDNAs coding for a small HIF-1 α fragment (MTD) or for a larger part of HIF-1 α (348-826) carrying both the phosphomimetic mutation (Ser641 \rightarrow Glu) were subcloned to pGEX-4T-1 expression vector in order to bacterially express the relevant GST-tagged proteins. Only GST-MTD S \rightarrow E could be successfully expressed in bacteria. Purified GST-MTD S \rightarrow E along with GST, GST-MTD wt and GST-MTD S \rightarrow A (carrying the mutations Ser641 \rightarrow Ala and Ser643 \rightarrow Ala that abolish the phosphorylation by MAPK) were bound onto glutathione-sepharose beads and used in pull down assays with HeLa protein extracts. Two proteins with apparent molecular weights 42 kDa and 100 kDa were found to interact specifically with MTD S \rightarrow E. The 42 kDa protein was not possible to be identified but mass spectrometry showed that the 100 kDa protein corresponds to TUT-4.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

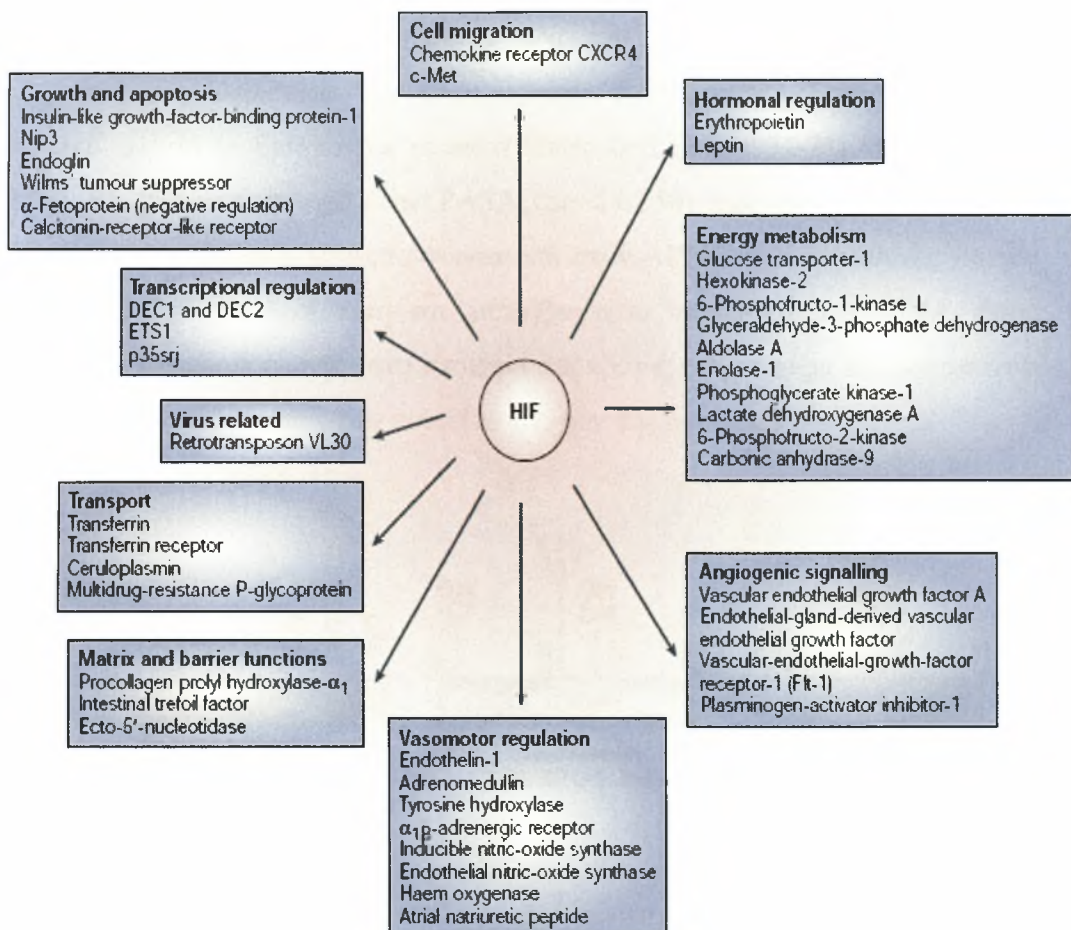
2.1. Υποξία

Η διατήρηση των κυτταρικών επιπέδων του οξυγόνου σε φυσιολογικά επίπεδα είναι καίριας σημασίας για την επιβίωση γι' αυτό και όλοι οι οργανισμοί από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου. Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξία) οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής ATP από τα κύτταρα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνεχιστεί ο αερόβιος μεταβολισμός και να προξενούνται βλάβες στο κύτταρο ενώ η αύξηση στα επίπεδα του οξυγόνου (υπεροξία) μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικές βλάβες.

Σε συνθήκες υποξίας τα κύτταρα των θηλαστικών αντιδρούν τροποποιώντας την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση [1, 2]. Αν και η προσαρμοστική απόκριση στην υποξία συμβαίνει μέσω ποικίλων μοριακών μηχανισμών κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική και συστηματική απόκριση της ομοιοστασίας του O₂ έχει ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (Hypoxia Inducible Factor HIF-1) [3].

2.2. Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1

Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από μία ρυθμιζόμενη α υπομονάδα (HIF-1α) η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου 21%) συντίθεται και αποικοδομείται συνεχώς, ενώ σταθεροποιείται κατά την υποξία (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου χαμηλότερη από 6%), και την συνεχώς εκφραζόμενη β υπομονάδα (HIF-1β ή ARNT). Και οι δύο πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων basic helix-loop-helix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) [4].

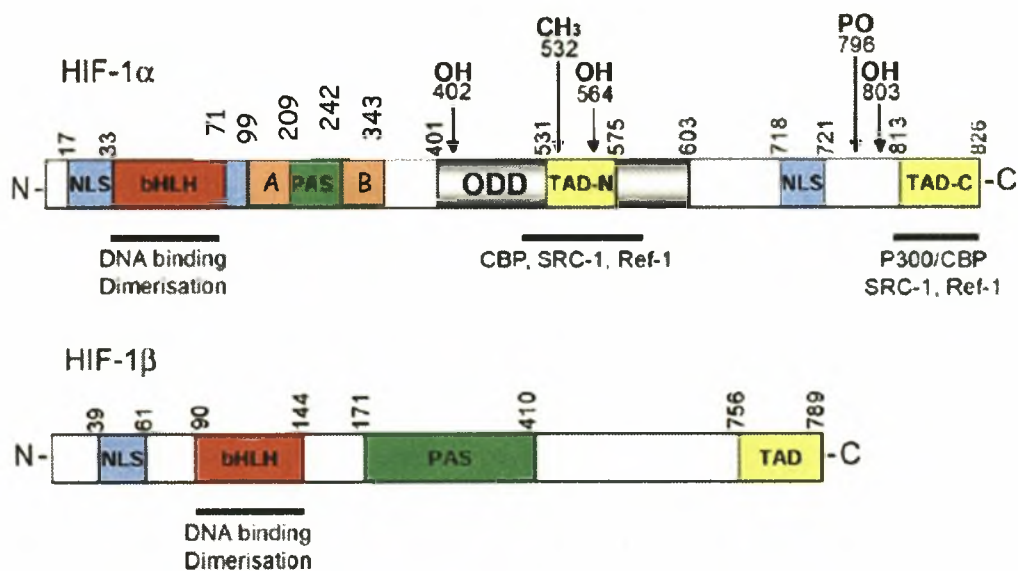


Εικόνα 1: Γονίδια στόχοι του HIF-1. Ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τον ενεργειακό μεταβολισμό, την ορμονική ρύθμιση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μεταγραφική ρύθμιση, τη μετάσταση κ.α.
Από Schofield, Nature RMCB 2004

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 70 διαφορετικά γονίδια που επάγονται άμεσα από τον HIF-1. Τα γονίδια αυτά περιέχουν στους υποκινητές τους συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (A/G)CGTG, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements, HRE), τις οποίες αναγνωρίζει ο HIF-1 και προσδένεται σε αυτές. Τα προϊόντα των γονιδίων στόχων του HIF-1 είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με συγκεκριμένες και σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και του σιδήρου, η διατήρηση του αγγειακού τόνου, η ερυθροποίηση και η αγγειογένεση [2] (Εικόνα 1).

2.3. Δομή και λειτουργία του HIF-1α

Ο HIF-1α, η ρυθμιζόμενη υπομονάδα του HIF-1, αποτελείται από 826 αμινοξέα ενώ η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη (Εικόνα 2). Στο αμινοτελικό του άκρο βρίσκονται οι επικράτειες bHLH (αα 31-71) και PAS που διαιρείται σε δύο υποπεριοχές, την PASA (αα 85-158) και την PASB (αα 228-298)[4]. Οι περιοχές αυτές, που απαντώνται και στον ARNT είναι υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό και τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA, όπου αναγνωρίζουν και προσδέονται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία που βρίσκονται στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων στόχων της υποξίας [5].



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση των υπομονάδων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, του HIF-1α και του HIF-1β. Και οι δυο υπομονάδες διαθέτουν τις περιοχές bHLH και PASA/PASB απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό τους και την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Ο HIF-1α έχει 2 περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, την N-TAD και την C-TAD και την αμινοξική περιοχή 401-603 που είναι περιοχή αποικοδόμησης εξαρτώμενη από το οξυγόνο (ODDD). Ο HIF-1β διαθέτει μία περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό άκρο.

Από Dery et al., 2004

Ο HIF-1α περιέχει επίσης και μία περιοχή οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD, Oxygen Dependent Degradation domain αα 401-603) οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της οποίας οδηγούν στην αποικοδόμηση του σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής η N-TAD (αα 531-575) και η C-TAD (αα 786-826), οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ρυθμιστική περιοχή (ID, Inhibitory Domain αα 576-785) η οποία καταστέλλει την δράση των TADs ειδικά σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου [3]. Ο HIF-1α περιέχει δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα προς το αμινοτελικό άκρο (αα 17-74) και ένα προς το καρβοξυτελικό άκρο (αα 718-721) [6] καθώς και ένα σήμα εξαγωγής του από τον πυρήνα NES (αα 631-639) [7].

2.4. Η ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία) η πρωτεΐνη HIF-1α είναι πολύ ασταθής, με χρόνο ημιζωής περίπου 5 λεπτά [8, 9]. Παρουσία οξυγόνου ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης, ουβικιτινιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα (Εικόνα 3).

Η υδροξυλίωση αυτή συμβαίνει στις προλίνες 402 και 564 και πραγματοποιείται από τρία οξυγονο-εξαρτώμενα ένζυμα της οικογένειας των πρόλυλο-υδροξυλασών (PHD 1-3) [10, 11]. Εκτός από το οξυγόνο οι PHDs απαιτούν ως υπόστρωμα το 2-κετογλουταρικό (2-OG) και σαν συμπαραγόντες Fe^{2+} και ασκορβικό [12]. Οι PHDs συναντώνται σε τρεις ισομορφές τις PHD1, PHD2 και PHD3. Πιστεύεται ότι πρωταγωνιστικό ρόλο στην υδροξυλίωση έχει η PHD 2. Από πειράματα που έγιναν σε κυτταρικό επίπεδο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η σίγαση του RNA της PHD 2 οδήγησε σε σταθεροποίηση του HIF-1α, και δημιουργία του συμπλόκου HIF-1 σε συνθήκες νορμοξίας [13].

Ο υδροξυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (pVHL) που αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος μιας λιγάσης E3 της ουβικιτίνης. Η πρόσδεση του HIF-1α στο σύμπλεγμα της λιγάσης της ουβικιτίνης (pVHL-elonginB-elonginC-Cul2-Rbx) έχει σαν αποτέλεσμα τη ουβικιτινίωση του και στη συνέχεια αναγνώριση και πρωτεόλυση του από το πρωτεάσωμα [14, 15].

Έτσι, παρουσία οξυγόνου και μέσα σε 5 λεπτά από τη σύνθεσή του, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται, ουβικιτινιώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Αν και αυτός είναι ο κύριος τρόπος αποικοδόμησης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας έχουν βρεθεί μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων κι άλλα μονοπάτια που οδηγούν σε αποικοδόμηση του HIF-1α τα οποία αναλύονται παρακάτω.

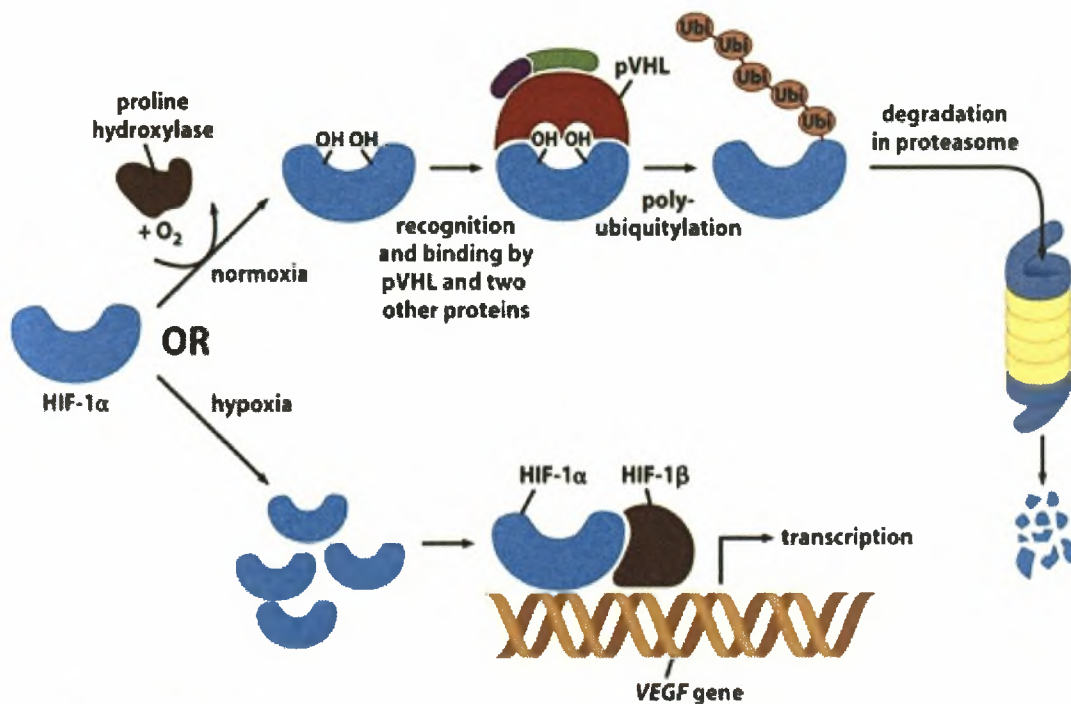


Figure 7-28a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Εικόνα 3: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1. Το οξυγόνο ρυθμίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του HIF-1α. Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες 402 και 564 του HIF-1α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της προλίνης (PHD) 1-3 και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη VHL που αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Η ουβικιτινίωση του HIF-1α οδηγεί την πρωτεΐνη για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα. Αντίθετα η υποξία τον σταθεροποιεί και με την είσοδο του στον πυρήνα ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.

Από *The Biology of Cancer*

Η μείωση των επιπέδων του οξυγόνου (υποξία) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή των PHDs, λόγω έλλειψης μοριακού οξυγόνου. Έτσι, ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται και σταθεροποιείται, επειδή η μη υδροξυλιωμένη του μορφή δεν αναγνωρίζεται από τον pVHL (Εικόνα 3). Ακολούθως, ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα όπου και συνδέεται με τον HIF-1β σχηματίζοντας το λειτουργικό σύμπλοκο του HIF-1. Αυτός, στη συνέχεια, αναγνωρίζει και συνδέεται στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που περιέχουν τις αλληλουχίες HRE ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση των γονιδίων στόχων της υποξίας.

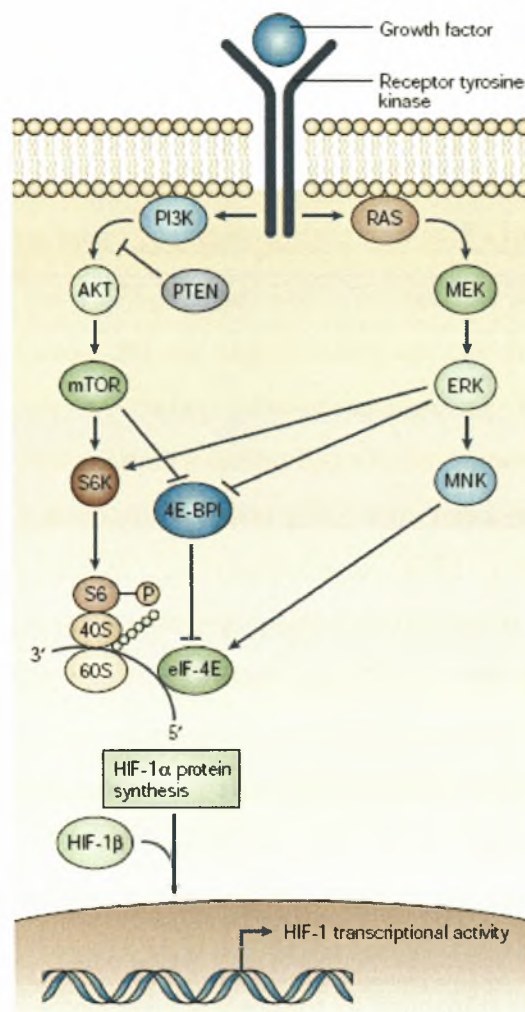
Να σημειωθεί εδώ πως οι PHDs ρυθμίζονται σε διαφορετικά επίπεδα καθώς η συγκέντρωση του οξυγόνου όχι μόνο καθορίζει την ενεργότητα των PHDs αλλά και την έκφρασή τους. Η έκφραση των *phd2* και *phd3* γονιδίων αυξάνεται κατά την υποξία κάτι που δεν παρατηρείται και για το *phd1* γονίδιο [12]. Αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε υψηλά επίπεδα. Επίσης οι PHDs υπόκεινται σε αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος, όπως και ο HIF-1α αλλά μέσω διαφορετικών λιγασών ουβικιτίνης τις *Siah1α* και *Siah2* [16] οι οποίες ρυθμίζονται από τον HIF.

Ένα δεύτερο σημείο ελέγχου της ρύθμισης του HIF-1α από το O₂ αφορά τη μεταγραφική του ενεργότητα και εξαρτάται από μια ακόμη οξυγονοεξαρτώμενη υδροξυλίωση των *παράγοντα αναστολής του HIF-1 (FIH-1)*. Η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης στη θέση 803 της C-TAD περιοχής του HIF-1α από τον FIH-1 εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι CBP/p300, εμποδίζοντας τελικά τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων [17].

2.5. Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1α

Εκτός από την επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου στη σταθεροποίηση και την επαγωγή του HIF-1α, υπάρχουν περιπτώσεις ενεργοποίησής του σε συνθήκες νορμοξίας. Ο HIF-1α κατά τη νορμοξία είναι δυνατόν να επαχθεί από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, [18] σιδηροδεσμευτικές ενώσεις και μιμητές της υποξίας (π.χ. CoCl₂, δεσφερριόξαμίνη, το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και το μονοξειδίο του άνθρακα (CO)) [19, 20] καθώς και από ογκογονίδια όπως το *ras* και το *src* [21, 22].

Η επαγωγή του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ρυθμίζεται από δύο κυρίως σηματοδοτικά μονοπάτια, της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK). Οι μηχανισμοί της ενεργοποίησης του HIF-1α δεν είναι απόλυτα γνωστοί αλλά θεωρείται πως το μονοπάτι της PI-3K/AKT επάγει την σύνθεση του HIF-1α αυξάνοντας τα επίπεδα μετάφρασης του mRNA, ενώ το μονοπάτι της p42/44 MAPK επιδρά τόσο στην σύνθεση, όσο και στην μεταγραφική του ενεργότητα μέσω φωσφορυλίωσης του HIF-1α (Εικόνα 4) [18, 23].



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

Από Semenza G., *Nature reviews*, 3:721-732, 2003

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί και η ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση της αποικοδόμησης του HIF-1α που εμπλέκει την αλληλεπίδραση της PAS περιοχής του με την Hsp90 και την RACK1. Αρχικά, είχε ανακαλυφθεί η σύνδεση της Hsp90 στην PAS περιοχή του HIF-1α και ο ρόλος της στην σταθεροποίηση του. Όπως έχει αναφερθεί, η αναστολή της οδηγεί στην αποικοδόμηση του HIF-1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου, ακόμη και σε κύτταρα χωρίς λειτουργικό pVHL [24]. Τελικά, βρέθηκε πως η αποικοδόμηση του HIF-1α κατευθύνεται από την αλληλεπίδραση του με την RACK1 η οποία ανταγωνίζεται με την Hsp90 για την πρόσδεση στην PAS περιοχή του HIF-1α. Μέσω της RACK1 ο HIF-1α προσδένεται στο σύμπλεγμα της Elongin-C, ουβικιτινιώνεται με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση του στο πρωτεάσωμα [25].

2.6. Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α

Στη ρύθμιση του HIF1-α σημαντικό ρόλο παίζουν και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του. Εκτός από την υδροξυλίωση και την ουβικιτινίωση το μόριο του HIF-1α υπόκειται και σε άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι απαραίτητες για την συντονισμένη δράση του. Οι πιο σημαντικές είναι:

Φωσφορυλίωση: Η φωσφορυλίωση του HIF-1α σε διαφορετικές θέσεις φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική του ενεργότητα αλλά και τη σταθερότητα των πρωτεϊνικών επιπέδων του και θα περιγραφεί πιο αναλυτικά παρακάτω.

Ακετυλίωση: Η λυσίνη 532 (K532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD του HIF-1α βρέθηκε να ακετυλιώνεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης, της arrest-defective-1 (ARD1) [26]. Η ακετυλίωση της λυσίνης K532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του HIF-1α. Μετάλλαξη της λυσίνης 532 σε αργινίνη είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη σταθερότητα του HIF-1α [27].

S-νιτροζυλίωση: Η S-νιτροζυλίωση φαίνεται να επηρεάζει τόσο την σταθερότητα όσο και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) φαίνεται να αυξάνει ή να μειώνει τη σταθεροποίηση του HIF-1α ανάλογα με τη συγκέντρωσή του και το είδος των κυττάρων [28]. Επιπλέον έχει δειχθεί πως ο HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στην κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του, τροποποίηση που επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον μεταγραφικό

συνενεργοποιητή CBP/p300 αλλά τα δεδομένα για το αν η επίδραση αυτή είναι θετική ή αρνητική είναι αντικρουόμενα [29, 30].

Σουμοϋλίωση: Πρόσφατα βρέθηκε πως ο HIF-1α υφίσταται σουμοϋλίωση [31]. Ο HIF-1α περιέχει 3 αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, στις λυσίνες στις θέσεις 391, 477 και 532. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην σταθεροποίηση ή μη του HIF-1α δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί καθώς τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν συγκλίνουν [31-34].

2.7. Φωσφορυλίωση του HIF-1α

Ο HIF-1 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη [35]. Αναστολή των κινασών σερίνης/θρεονίνης και κινασών τυροσίνης αναστέλλει την πρόσδεση του HIF στο DNA και μειώνει τη σταθερότητά του κάτω από υποξικές συνθήκες [36], ενώ αναστολή των MAPK, (με χρήση PD98059), αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 [14]. Οι μέχρι σήμερα γνωστές φωσφορυλιώσεις του HIF-1α και ο πιθανός βιολογικός τους ρόλος στη ρύθμιση του συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Μια κινάση, η δράση της οποίας φαίνεται να επηρεάζει θετικά τον HIF-1α είναι η κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) [37], η οποία φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη θρεονίνη 796 [30]. Ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης αυτής δεν είναι ακόμη γνωστός αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον CBP είτε άμεσα [38], είτε έμμεσα παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της FIH-1 με τον HIF-1α, αναστέλλοντας έτσι την υδροξυλίωση του στην Asn803 [39]. Ακόμη η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον HIF-1α σε τρία αμινοξικά κατάλοιπα της N-TAD περιοχής (Ser551, Thr555 και Ser589) προκαλώντας την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το οξυγόνο και την pVHL [40, 41].

Ο HIF-1α βρέθηκε να φωσφορυλιώνεται από τις p42/44 MAPK στις σερίνες 641 και 643 [42] ενώ ο βιολογικός ρόλος αυτής της φωσφορυλίωσης είναι να αναστέλλει την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα εξουδετερώνοντας ένα υδρόφοβο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) που αναγνωρίζει η εξπορτίνη CRM1 [7].

Δράση κινάσης	Θέση	Ρόλος (πιθανός)
CK2	T796	Παρεμποδίζει την υδροξυλίωση της N803 από τον FIH
GSK3	S551/T555/S589	Αποικοδόμηση HIF-1α (ανεξάρτητη από τη VHL)
p44/42 MAPK	S641/S643	Νουκλεοπλασματική μεταφορά του HIF1-α, ενεργότητα
N-terminal kinase (CK1)	S247	Αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF1-α, παρεμποδίζοντας τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT

Πίνακας 1: Οι μέχρι σήμερα γνωστές φωσφορυλιώσεις του HIF-1α και ο πιθανός βιολογικός τους ρόλος στη ρύθμιση του

Τέλος έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση του HIF-1α και στο αμινοτελικό του τμήμα από μια άγνωστη μέχρι τώρα κινάση πρωτεϊνών [42]. Πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κινάση αυτή είναι η CK1 και η θέση που φωσφορυλιώνει είναι η Ser 247, όπως προέκυψε μετά από έρευνα του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που έχει υποβληθεί για δημοσίευση. Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF1-α, παρεμποδίζοντας τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT.

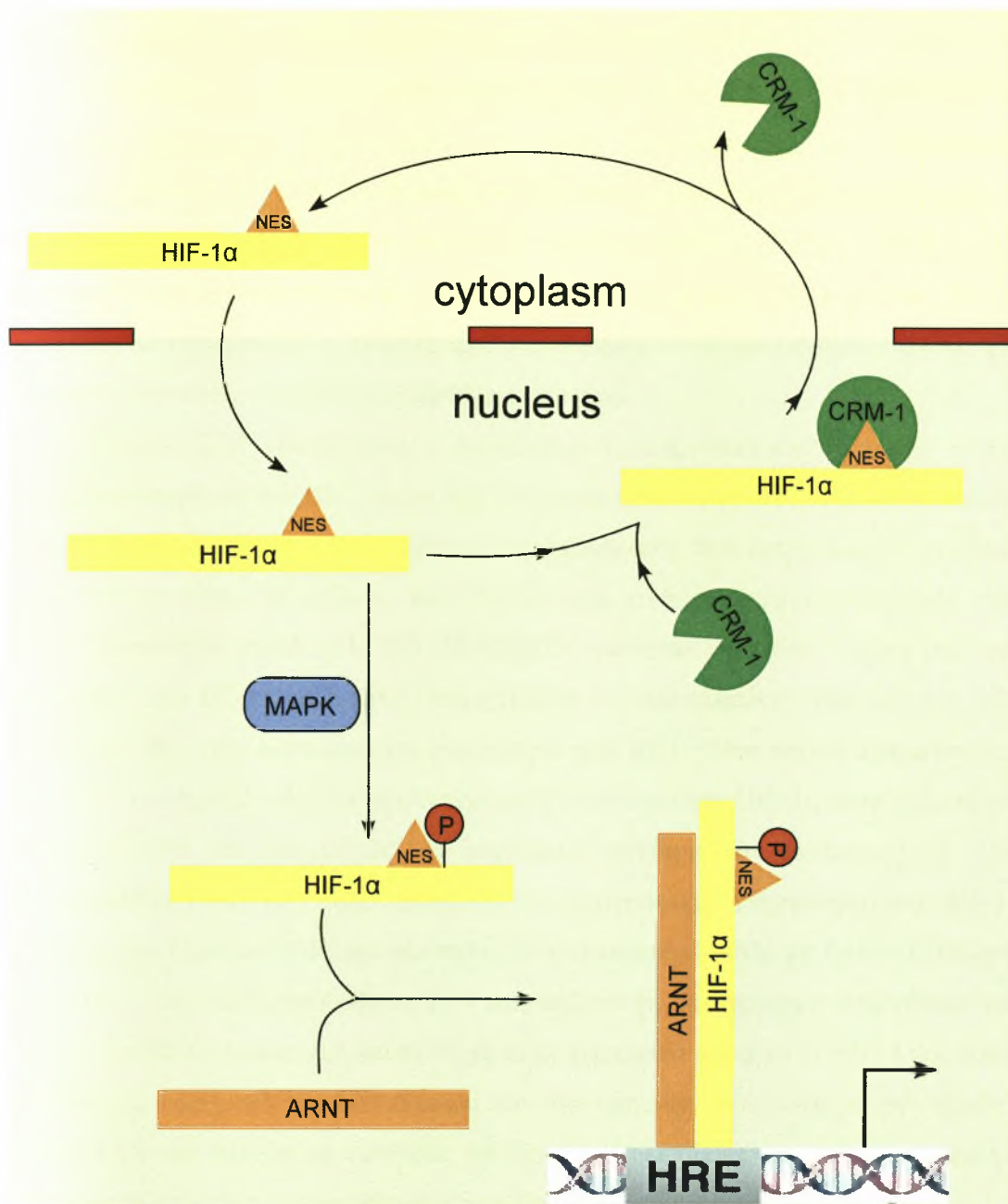
2.8. Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση

Αν και η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAP κινάση είναι εδώ και καιρό γνωστή [43, 44], μόλις πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν οι θέσεις της φωσφορυλίωσης στις Ser641 και Ser643 [42]. Δείχθηκε επίσης, πως η αναστολή της φωσφορυλίωσης μέσω μεταλλαξιγένεσης, με χρήση αναστολέων των MAPK ή με κατεργασία με φλαβονοειδή αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα αλλά και τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα [42, 45]. Η συσσώρευση στον πυρήνα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τους σχετικούς ρυθμούς εισαγωγής της και εξαγωγής της [46]. Ένα μη τυπικό, υδρόφοβο σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) εντοπίστηκε στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 631-639 του HIF-1α, σε γειτνίαση

δηλαδή, με τις θέσεις φωσφορυλίωσης από την p44/42 MAP κινάση. Όπως δείχθηκε με πειράματα ελέγχου του υποκυτταρικού εντοπισμού με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού καθώς και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης παρουσία λεπτομυκίνης B (ενός εξειδικευμένου αναστολέα της CRM1) το NES αλληλεπιδρά με την εξαπορτίνη CRM1 όταν τα γειτονικά κατάλοιπα Ser641-Ser643 δεν είναι φωσφορυλιωμένα [7].

Έτσι προτάθηκε ένας ακόμη ανεξάρτητος από το οξυγόνο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α που εμπλέκει τη ρυθμιζόμενη εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 ‘κρύβει’ το γειτονικό NES από την CRM1 με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της υποξίας (Εικόνα 5). Όπως φαίνεται και από μελέτες με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες [47-50], η αναστολή της εξαγωγής από τον πυρήνα μέσω φωσφορυλίωσης είναι πιθανόν να αποτελεί έναν ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο για να επιτευχθεί η πλήρης ενεργοποίηση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α.

Να σημειωθεί εδώ ότι η φωσφορυλίωση από την p44/42 MAPK φαίνεται να επηρεάζει και με κάποιον επιπρόσθετο τρόπο τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α όπως για παράδειγμα την αλληλεπίδραση του με συνενεργοποιητές της μεταγραφής. Σε πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού και μεταγραφικής ενεργότητας με χρήση του PD98059 (αναστολέα των MAPK), η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας HIF1-α αγρίου τύπου ήταν δυσανάλογη της μείωσης της πυρηνικής συσσώρευσης του HIF1-α. Ακόμη, σε πειράματα ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε συσσώρευση στον πυρήνα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GFP-MTD και FLAG-MTD (MTD: MAPK Target Domain, aa 616-658 του HIF-1α) παρόλο που το μικρό τους μέγεθος επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση τους διαμέσω των πυρηνικών πόρων. Έτσι είναι πολύ πιθανό το τμήμα MTD να περιλαμβάνει εκτός του NES και των θέσεων φωσφορυλίωσης και μια αλληλουχία που συνδέεται, μετά από την φωσφορυλίωση του, με μια άγνωστη πυρηνική πρωτεΐνη, απαραίτητη για την βέλτιστη λειτουργία του HIF-1α [7].



Εικόνα 5: Βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις MAPK. Ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα αφού σταθεροποιηθεί και εξέρχεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη CRM1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK προκαλεί φωσφορυλίωση του HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 μέσω των p42/44 MAPK και αναστολή της εξόδου του από τον πυρήνα. Έτσι ο HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στα HREs των γονιδίων στόχων και διεγείρει τη μεταγραφή τους μέσω των συνεργοποιητών CBP/p300. Η αλληλεπίδραση με τους συνεργοποιητές CBP/p300 ενισχύεται περαιτέρω μέσω φωσφορυλίωσης από MAPK.

2.9. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α

Ο HIF-1α σε όλα τα στάδια της ρύθμισής και δράσης του αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες προκειμένου να είναι λειτουργικός. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α επηρεάζουν την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (π.χ. ARNT, CBP/p300), τη σταθερότητα του (π.χ. pVHL, HSP90, RACK1) ενώ περιλαμβάνουν και πρωτεΐνες που τροποποιούν το μόριο του HIF-1α (PHDs, FIH, οι διάφορες κινάσες, ARD1). Πόλλες από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις έχουν ήδη περιγραφεί εκτενώς και δε θα αναλυθούν περαιτέρω.

Ο p300/CBP είναι ο γενικός συμπαράγοντας της μεταγραφής και έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του. Δυο ακόμη συμπαράγοντες της μεταγραφής που ενεργοποιούν τη δράση του HIF-1α είναι οι SRC-1 και TIF-2 που ανήκουν στην οικογένεια των συνενεργοποιητών p160 [51, 52]. Η HDAC7 φαίνεται να είναι η μόνη από την οικογένεια των HDACs (Histone Deacetylases) που αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-1α και αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητά του [53]. Μια ακόμη πρωτεΐνη που φαίνεται να επηρεάζει θετικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι η β-catenin που συνδέεται με τον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του εντέρου [54]. Μια αλληλεπίδραση που επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α είναι με την MgcRacGAP, μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού με δράση GTPάσης [55]. Τέλος στις αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α πρέπει να αναφερθεί και αυτή με το μεταγραφικό παράγοντα HNF4 που όπως βρέθηκε με εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων συνδέεται με την περιοχή bHLH-PAS του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, αλληλεπίδραση η οποία φαίνεται να απαραίτητη για την ενεργοποίηση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης [52].

Ο HIF-1α συνδέεται με το προϊόν του ογκογονιδίου p53 σε συνθήκες υποξίας, σύνδεση που φαίνεται να προωθεί την ουβικτινίωση και αποικοδόμησή του σε συνθήκες υποξίας μέσω της MDM2 που ανήκει σε σύμπλοκο E3 λιγάσης της ουβικτινίνης [56, 57]. Τη σύνδεση του HIF-1α με την p53 ανταγωνίζεται η πρωτεΐνη Jab1 η οποία σταθεροποιεί τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [58, 59]. Μια ακόμη αλληλεπίδραση που διευκολύνει την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση είναι η σύνδεση της πρωτεΐνης OS-9, που εκφράζεται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος με τον υδροξυλιωμένο από τις PHDs HIF-1α στην περιοχή ODD [60]. Στην ανεξάρτητη του οξυγόνου αποικοδόμηση του HIF-1α που έχει ήδη περιγραφεί φαίνεται πως

παίζει ρόλο και η πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού sept9-v1 η οποία δεσμευόμενη στην περιοχή bHLH του HIF-1α αποτρέπει την αποικοδόμηση που εξαρτάται από τη RACK1 [61].

2.10 HIF-1α και καρκίνος

Η απώλεια λειτουργικότητας διάφορων γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό απόκρισης στην υποξία έχειδειχθεί πως συμβάλλει στην υπερέκφραση του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα στο σύνδρομο VHL, η απώλεια του VHL είχε σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση του HIF-1α σε ηπατικό καρκίνωμα και αιμαγγειοβλάστωμα [15]. Μεταλλάξεις της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) και της φουμαράσης (FH) αναστέλλουν τις προλυλ-υδροξυλάσες με αποτέλεσμα μη φυσιολογική σταθεροποίηση του HIF-1α και ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του σε διάφορους τύπους καρκίνου [62].

Η απορύθμιση βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών συμβάλλει επίσης στην υπερέκφραση του HIF-1α στον καρκίνο. Καρκινικά κύτταρα στα οποία τα μονοπάτια Ras-MAPK ή P13-AKT εκφράζονται συνεχώς παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του HIF-1α [22, 63]. Απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως της PTEN (πιθανότατα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των PI3K/AKT) και της p53 μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα του HIF-1α και έκφραση γονιδίων μέσω του HIF [64, 65]. Επίσης ενεργοποίηση του ογκογονιδίου v-Src μέσω μεταλλάξεων βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση του HIF-1α και των επαγόμενων γονιδίων του [66].

Ο HIF-1α επάγεται σε καρκινικά κύτταρα ως απόκριση στην υποξία και τους αυξητικούς παράγοντες και έτσι δεν προκαλεί έκπληξη η υπερέκφραση του σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο παγκρεατικός [67], ο νεφρικός [68], ο καρκίνος του μαστού [69, 70] και των ωοθηκών [71].

Σε πολλές μελέτες έχει σημειωθεί συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του HIF-1 και της θνησιμότητας, κακή πρόγνωση ή αντίσταση στη θεραπεία [67, 72]. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός πως η υπερέκφραση του HIF-1α προσφέρει ένα προσαρμοστικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα για τις συνθήκες υποξίας που παρατηρούνται στους όγκους. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυτό γίνεται όταν τα κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο και αρχίζουν να αποπίπτουν [2, 73, 74]. Αυτή η διαφορά καταδεικνύει το διπλό ρόλο του HIF-1α στη πρόιμη καρκινογένεση: Μπορεί

είτε να την ενισχύσει προωθώντας την αγγειογένεση και συμβάλλοντας στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στην υποξία είτε να την αποτρέψει συνεργάζομενος με τον αποπτωτικό μηχανισμό του κυττάρου ως απόκριση στο κυτταρικό στρες [75].

3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης (από την p44/42 MAPK) μορφής του HIF-1α με πρωτεΐνες του πυρήνα. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η κατασκευή μικρών τμημάτων του HIF-1α που φέρουν τη φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641→Glu, των MTD S→E (MAPK Target Domain, HIF-1α⁶¹⁶⁻⁶⁵⁸ S→E) και HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E, και χρήση των τμημάτων αυτών σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα τμήματα αγρίου τύπου και τμήματα που φέρουν τη μετάλλαξη Ser641→Ala, Ser643→Ala σε δοκιμές αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες καρκινικών κυττάρων HeLa.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

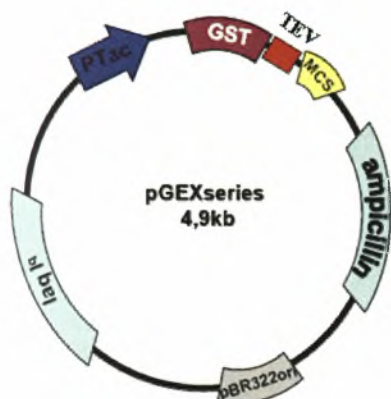
4.1.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

TOP10 (InVitrogen): Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

BL21 RIL (Stratagene): Τα συγκεκριμένα *E.coli* κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Από τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν οι Lon και OmpT πρωτεάσες. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αυτά των αργινίνης, ισολευκίνης και λευκίνης) μέσω του RIL πλασμιδίου.

4.1.2. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia)

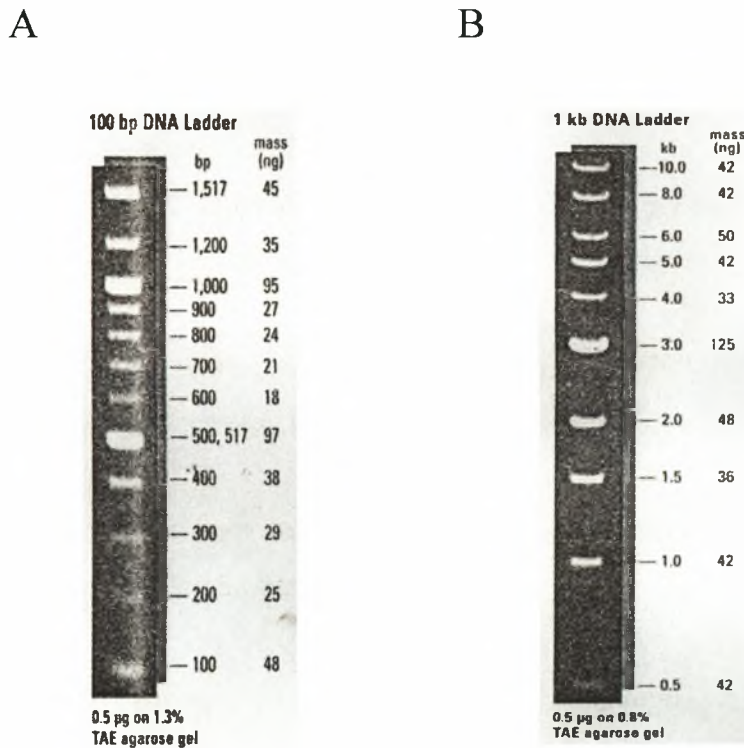


Εικόνα 6: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX-4T1 : Φαίνονται σχηματικά ο υποκινητής του πλασμιδίου, η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ori), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, το γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI, η περιοχή κωδικοποίησης της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS) καθώς και η περιοχή που κωδικοποιεί για τη θέση αναγνώρισης από την πρωτεάση Tev .

Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (MCS). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των τμημάτων του HIF-1α (S641→E) 348-826 και 616-658 στη θέση του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI, η οποία βρίσκεται μέσα στην MCS περιοχή και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη GST. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1-Tev έχει μέγεθος 4,9 kb, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI και τον υποκινητή PTac.

4.1.3. Μάρτυρες μοριακών βαρών

Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων του DNA ήταν της εταιρίας New England Biolabs και παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 7: Μάρτυρες μοριακών βαρών 100bp (A) και 1kb (B) της New England Biolabs

4.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* TOP 10 και BL21RIL

Σε δεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* Top10 έγινε εισαγωγή των πλασμιδίων pGEX4T1-HIF-1α S→E και των προϊόντων αντίδρασης λιγάσης pGEX4T1-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX4T1-MTD S→E. Σε δεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21RIL έγινε εισαγωγή των καθαρισμένων πλασμιδίων pGEX4T1-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX4T1-MTD S→E. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Επώαση 200 μl δεκτικών κυττάρων για 30 min στον πάγο με το προς μετασχηματισμό DNA (0.5μl όταν πρόκειται για έτοιμο πλασμίδιο, 10μl για προϊόν αντίδρασης λιγάσης).
- Θερμικό σοκ στους 42°C για 1 min.
- Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα σε 500μl υγρό LB.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 4500-5000rpm.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου έως ότου μείνουν 50μl και επαναδιάλυση του ιζήματος σε αυτόν τον όγκο.
- Μεταφορά σε τρυβλία LB με αντιβιοτικά επιλογής (LB-Amp για τα TOP 10, LB-Amp-Chl για τα BL21RIL) και επώαση στους 37 °C όλη τη νύχτα.

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

τρυβλία LB-Amp: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin

τρυβλία LB-Amp-Chl: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0.1mg/ml ampicilin, chloramphenicol 34 μg/μl.

4.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση

- Εμβολιασμός αποικιών από κύτταρα Top10 μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια pGEX4T1-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX4T1-MTD S→E σε αποστειρωμένα σωληνάκια με 3ml LB-Amp και επώαση O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση.
- Μεταφορά σε σωληνάκι φυγοκέντρου 1,5 ml καλλιέργειας και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 12 δευτερόλεπτα.
- Απόρριψη υπερκειμένου, προσθήκη 300 μl TENS και ανάδευση σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex).
- Προσθήκη 150μl CH₃COONa 3M pH 5.2 και ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 2 min στις 3000 rpm και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι
- Προσθήκη 1 ml 100% αιθανόλη και ψύξη στους -20 °C για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκειμένου και πλύση του ιζήματος με 70% ψυχρής αιθανόλη
- Στέγνωμα του ιζήματος και αιώρηση σε 30μl ddH₂O

Διάλυμα TENS	Διάλυμα TE
- 0,1N NaOH	- 10 mM Tris pH 7,5
- 0,5 % SDS σε TE	-1 mM EDTA

Για τον έλεγχο του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε ακολουθεί πέψη με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

4.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση του Qiagen Midi Kit

- Ολονύκτια επώαση καλλιιεργειών των 100 ml E.coli Top10 (μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια pGEX4T1-HIF-1α S→E, pGEX4T1-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX4T1-MTD S→E) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση
- Μοίρασμα της κάθε καλλιέργειας σε δύο πλαστικά σωληνάκια (50 ml σε κάθε σωληνάκι) και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 20 min στους 4 °C
- Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση βακτηριακού ιζήματος σε 4ml buffer P1 (Resuspension Buffer + RNase) από το kit της Qiagen με ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) και ένωση των διαλυμάτων.
- Προσθήκη 4ml Buffer P₂ (Lysis Buffer) από το kit της Qiagen και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου μετά από καλή ανάμιξη
- Προσθήκη 4ml παγωμένου Buffer P₃ (Neutralization Buffer) από το kit της Qiagen, καλή ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min.
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 45 min στους 4 °C
- Εξיסορρόπηση στήλης Qiagen 100 με 4 ml Buffer QBT (χρησιμοποιείται μια στήλη για κάθε πλασμίδιο)
- Μεταφορά υπερκειμένου στη στήλη (αφού περάσει από γάζα)
- Πλύσιμο στήλης με 2x10ml buffer QC
- Έκλουση DNA με 5ml Buffer QF (συλλογή σε 6 σωληνάκια φυγοκέντρου του 1,5ml)
- Κατακρήμιση DNA με 3,5 ml ισοπροπανόλης (0.6ml σε κάθε σωληνάκι) με μίξη και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 30 min στους 4 °C

- Ξέπλυμα με 70% αιθανόλη (200μl σε κάθε σωληνάκι) και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 3min στους 4 °C
- Στέγνωμα ιζήματος και επαναδιάλυση σε 100 μl νερό (σε κάθε σωληνάκι)

4.5. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA ακολούθησε πέψη για έλεγχο των πλασμιδίων pGEX4T1-HIF-1α S→E, pGEX4T1-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX4T1-MTD S→E με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι AgeI, HindIII, BamHI, EcoNI, SacI.

Το μείγμα κάθε πέψης περιείχε:

- Πλασμιδιακό DNA: 1μg DNA
- Buffer 10x (κατάλληλο για το ένζυμο που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση): 2 μl
- Ένζυμο περιορισμού 0,5 μl
- Τελικός όγκος αντίδρασης: 20μl.

Η επώαση των δειγμάτων έγινε στους 37°C για 1 με 2 ώρες.

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

4.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αγαρόζης με διάλυση της αγαρόζης σε κατάλληλο θερμό ρυθμιστικό διάλυμα έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το μέγεθος και η διαμόρφωση των τμημάτων του DNA, η

συγκέντρωση της αγαρόζης, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04 M Tris-οξικό, 0.001 M EDTA pH 8.0), παρουσία και βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή.

4.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) δίνει τη δυνατότητα της ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA από μικρές ποσότητες ενός DNA εκμαγείου με χρήση θερμοάαντοχων πολυμερασών κατάλληλων εκκινήτων και δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Η μέθοδος περιλαμβάνει την επανάληψη κύκλων (συνήθως 30) συνθηκών αποδιάταξης του DNA εκμαγείου (91-94 °C για 30 δευτερόλεπτα-5λεπτά), υβριδοποίησης του με τους εκκινήτες (40°-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα) και επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας (70 °C, χρόνος ανάλογος του μήκους του τμήματος που ενισχύεται).

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε ενίσχυση των τμημάτων που κωδικοποιούν τα τμήματα 348-826 και 616-658 (MTD) της μορφής του HIF1-α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (S641→E) με χρήση του πλασμιδίου pGEX4T1-HIF-1α S→E ως εκμαγείου.

Οι αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινήτων είναι οι εξής:

HMTDF: 5'-TTTTTGGATCCACTACCACTGCCACCACTGATG-3'

H348F: 5'-TTTTTGGATCCATGCACGACTTGATTTTCTCCCTTC-3'

Οι αλληλουχίες των ανάστροφων εκκινήτων είναι οι εξής:

HMTDR: 5'-TTTTGGATCCGAGCTCTCATGGTGATGATGTGCACTAG TAG-3'

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

Με υπογράμμιση έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *Bam*HI (GGATCC) και *Sac*I (GAGCTC), ενώ με έντονα

γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων λήξης της μετάφρασης (TCA).

Αρχικά, έγινε δοκιμαστική PCR με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράσης για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών της PCR και έπειτα χρησιμοποιήθηκε Vent πολυμεράση λόγω της μεγαλύτερης της ακρίβειας στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στις ίδιες συνθήκες.

Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

Δείγμα	MTD S→E (μl)	HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (μl)
pGEX4T1-HIF-1α S→E	1	1
Buffer 10x	5	5
dNTPs 2mM each	5	5
Vent 2u/μl	1	1
HMTDF	0,5	-
HMTDR	0,5	-
H348F	-	0,5
HIF-C-B	-	0,5
dd H ₂ O	37	37
Τελικός όγκος	50	50

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 30 sec → 95°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec → 52°C στάδιο υβριδοποίησης
- 2 min → 72° στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min → 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min → 72°C

Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5μl της αντίδρασης σε πηκτική αγαρόζη 1%. Ακολούθησε κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση του DNA σε 30μl ddH₂O.

4.8. Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα και των ενθεμάτων για την αντίδραση λιγάσης

Τα κομμάτια του HIF-1α που ενισχύθηκαν με την PCR καθώς και το πλασμίδιο pGEX-4T1 όπου πρόκειται να εισαχθούν υφίστανται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bam*HI ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα για την αντίδραση λιγάσης.

Το μείγμα της πέψης των τμημάτων του HIF-1α περιείχε:

- 20μl DNA HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E/MTD S→E
- 5μl Buffer *Bam*HI 10x
- 2μl *Bam*HI 5u/μl
- 23μl H₂O

Για το πλασμίδιο pGEX-4T1 το μείγμα της πέψης περιείχε:

- 10 μg pGEX-4T1
- 5 μl Buffer *Bam*HI 10x
- 2 μl *Bam*HI 5u/μl
- H₂O σε τελικό όγκο 100μl

Ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C

Στο τέλος της πέψης έγινε αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) του pGEX-4T1 για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του πλασμιδίου. Έτσι προστέθηκαν 2 μl ενζύμου CIP για 30 min στους 37°C και προσθήκη άλλου 1μl CIP για άλλα 30 min στους 37°C. Τέλος το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75°C για 10 min.

Όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστική πηκτή (1% αγαρόζης σε 1x TAE, 1:20.000 βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml) με πηγαδάκια των 50 και 100μl. Ηλεκτροφορήθηκε όλη η ποσότητα των δειγμάτων στα 90V και στο τέλος της ηλεκτροφόρησης αποκόπηκαν οι ζώνες από την πηκτή με τη βοήθεια λυχνίας UV(364nm). Ακολούθησε ανάκτηση από την πηκτή με τη χρήση του kit της Qiagen για gel extraction.

4.9. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης με χρήση κιτ της Qiagen για gel Extraction

- Ζύγισμα των τμημάτων της πηκτής και προσθήκη 3 όγκων buffer QG σε ένα όγκο πηκτής (100 mg~100 μ l) και επώαστηκαν για 10 min στους 50°C έτσι ώστε να λιώσει η πηκτή.
- Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης και ανάδευση.
- Μεταφορά δείγματος σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 1 min
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) προσθήκη 0,5 ml buffer QG και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 1 min
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 1 min
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 1 min
- Μεταφορά στήλης σε καθαρό σωληνάκι και έκλουση με 30 μ l ddH₂O και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 1 min (αφού πρώτα αφεθεί το ddH₂O στη στήλη για 1 min) .

4.10. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση λιγάσης)

Για την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση, το οποίο καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων. Το μείγμα της αντίδρασης σύνδεσης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με τα τμήματα MTD S→E και HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E ήταν το εξής: (Πραγματοποιήθηκαν και 2 αντιδράσεις control)

	Ligation MTD S→E (μl)	Ligation HIF- 1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (μl)	Control 1 (μl)	Control 2 (μl)
pGEX-4T-1	1	1	1	1
MTD S→E	4	-	-	-
HIF-1α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E	-	4	-	-
T4 ligase Buffer 10x	2	2	2	2
T4 DNA ligase	0.5	0.5	-	0.5
H ₂ O	12.5	12.5	17	16.5
Τελικός όγκος	20	20	20	20

Ακολούθησε επώαση για 16-18 ώρες των αντιδράσεων σε θερμοκρασία 16 °C.

4.11. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών GST-HIF-1α-348-826 S→E, GST-MTD, GST-MTD S→A και GST-MTD S→E σε κύτταρα *E.coli* BL21RIL με IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή, ο οποίος συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το *lacI* γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής:

- Επιλογή μιας αποικία από τρυβλίο που περιείχε BL21RIL με τα μετασηματισμένα πλασμίδια και εμβολιασμός 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB που περιείχε τα αντιβιοτικά αμικιλίνη και χλωραμφενικόλη
- Επώαση της καλλιέργειας υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C.

- Εμβολιασμός 1-2 lt LB (με αντιβιοτικά) με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια και επώαση υπό ανακίνηση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε στα 0.6-0.7 (μέτρηση στα 600 nM).
- Προσθήκη 1 mM IPTG και η επώαση στους 25° C.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 6000rpm και συλλογή του βακτηριακού ιζήματος.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με H₂O και αποθήκευση τους στους -20⁰C.

4.12. Λύση των κυττάρων με υπερήχους και απομόνωση του διαλυτού κλάσματος

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 φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 12000rpm για 30min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης πραγματοποιείται χρωματογραφία αγγιστείας όπου χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στους 4⁰C.

- Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (10 ml διαλύματος για την επαναιώρηση κυττάρων από 500 ml αρχικής καλλιέργειας).
- Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων)
- Έγινε φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στις 12000rpm για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγγιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιείχε 20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5% γλυκερόλη, 0,1 % Tween 20, και 5 mM DTT.

4.13. Καθαρισμός πρωτεϊνών με επίτοπο GST

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν ως επίτοπο την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στα σφαιρίδια είναι το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η οποία αναγνωρίζει τη γλουταθειόνη.

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (συνήθως από το *Schistosoma japonicum*) πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χμαιρικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν από τις υπόλοιπες με τον παραπάνω τρόπο. 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. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον συγκεκριμένο τρόπο απομόνωσης ήταν η εξής:

Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εξέφραζαν τις χμαιρικές GST-πρωτεΐνες επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (500 με 700 μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2 lt καλλιέργειας), τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Στη συνέχεια το παραπάνω μίγμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλες στήλες των 10 ml όπου κατακρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολούθησαν 3 ή 4 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος λύσης. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με επώαση των σφαιριδίων με 3x 0,5 ml διαλύματος 10mM γλουταθειόνης, 25mM Tris pH 8.5 για 5 λεπτά και επακόλουθη συλλογή του κλάσματος.

4.14. Διαπίδυση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει αλλαγή των μικρομοριακών συστατικών του διαλύματος μιας πρωτεΐνης. Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO 6000-8000 της Spectrum). Η μεμβράνη με το δείγμα εισήχθη στη συνέχεια στο διάλυμα διαπίδυσης (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδυσης) και ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4°C. Μετά το πέρας των 16 ωρών το δείγμα συλλέχθηκε από το εσωτερικό της μεμβράνης και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 12000rpm και στους 4°C για την απομάκρυνση ιζήματος που πιθανόν δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

4.15. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα 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.

4.16. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη και φέρουν καθαρό 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.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffeur και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel) (3,33 ml 30% acrylamide, 2.5 ml 4x Separating Buffer, 4,15 ml ddH₂O, 40μl 10% APS και 20μl TEMED) αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) (1.2 ml 30% acrylamide, 2.0 ml 4x stacking buffer, 4.7 ml ddH₂O, 50μl 10% APS, 50μl TEMED). Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα με τη βοήθεια της πιπέτας Hamilton και το gel ηλεκτροφορήθηκε στα 150V.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

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

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

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

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

4.17. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250

Για να βαφούν οι πρωτεϊνικές ζώνες, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη, όπου και ανακινείται για διάστημα 1 ώρας. Στο διάλυμα αυτό γίνεται συγχρόνως και στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση σε διάλυμα 10% οξικό οξύ, 10% μεθανόλη.

4.18. Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO₃)

Η βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με Coomassie Brilliant Blue R-250 για τη μεγαλύτερη ευαισθησία της στην ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών. Οι

ποσότητες των πρωτεϊνών που μπορεί να ανιχνεύσει είναι μέχρι 1 ng έχοντας περίπου 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Εμβάπτιση τη πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε διάλυμα που αποτελείται από 50% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ για 30 λεπτά προκειμένου να στερεωθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών.
- Ανακίνηση της πηκτής σε απιονισμένο νερό για τουλάχιστον 2 ώρες, με αρκετές αλλαγές του νερού κατά τη διάρκεια της πλύσης.
- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα 5 $\mu\text{g/ml}$ DTT για 30 λεπτά
- Εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα AgNO_3 (0.1% w/v) για 30 λεπτά υπό συνεχή ανακίνηση.
- Δύο γρήγορες πλύσεις της πηκτής με απιονισμένο νερό, και εμβάπτιση στο διάλυμα εμφάνισης των πρωτεϊνικών ζωνών (3% w/v NaCO_3 , 0.0185% HCHO).
- Προσθήκη κιτρικού οξέως για τερματισμό της αντίδρασης όταν οι πρωτεϊνικές ζώνες στην πηκτή αποκτήσουν την επιθυμητή ένταση.
- Πλύση της πηκτής και φύλαξή της σε απιονισμένο νερό.

4.19. Λύση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa

Για την παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος:

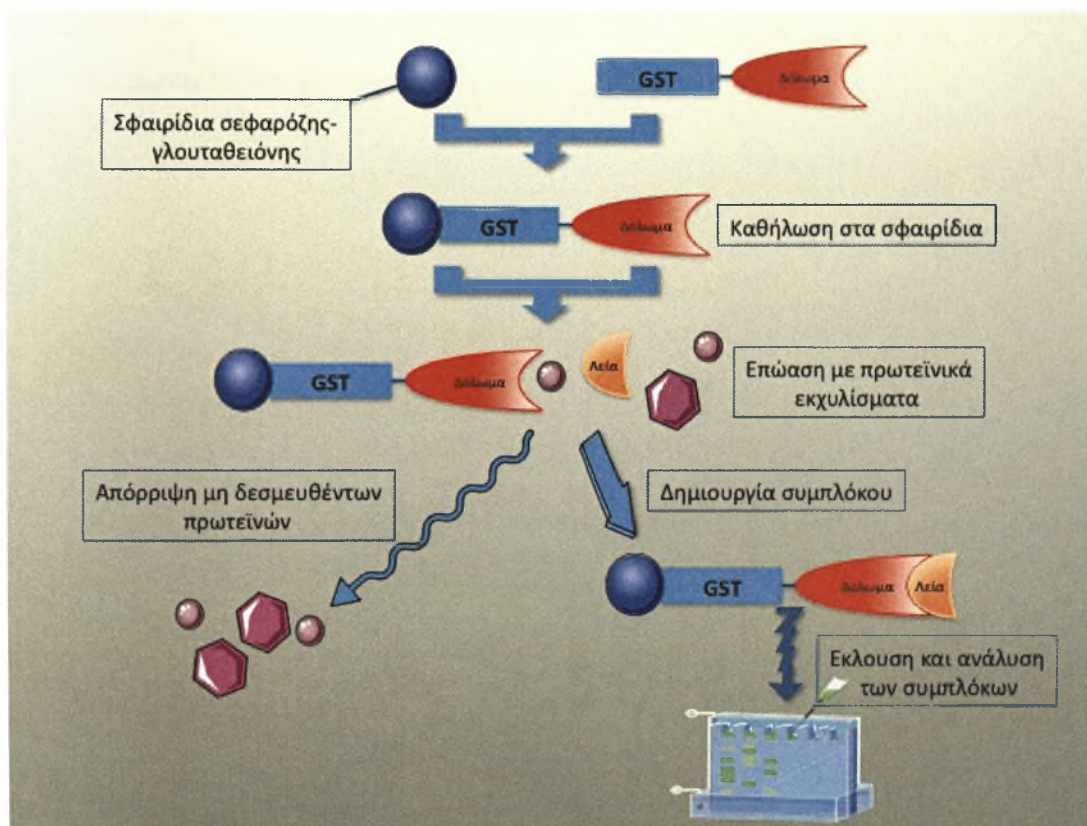
- Πλύση 6 τρυβλίων με κύτταρα HeLa με PBS και στη συνέχεια απομάκρυνση του PBS
- Προσθήκη σε κάθε τρυβλίο 200 μL κατάλληλου διαλύματος λύσης .
- Επώαση στον πάγο για 15min
- Φυγοκέντρηση στις 12000rpm
- Συλλογή υπερκείμενου

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.76 mM KH_2PO_4

Διάλυμα λύσης: 25 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1% Triton, και 0,5 mM DTT

4.20. Δοκιμή *in vitro* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών πάνω σε σφαιρίδια αγγιστείας (pull down assays)

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 στην συγκεκριμένη περίπτωση) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων ρητινών (γλουταθειόνη-σεφαρόζη) με τις οποίες παρουσιάζουν αγγιστεία. Οι καθηλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες παρουσιάζουν αγγιστεία και οι οποίες είτε βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είτε περιέχονται σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Εικόνα 8). Ο έλεγχος της σύνδεσης επιτυγχάνεται με ανάλυση των καθηλωμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με SDS-PAGE και χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών ή με ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση δοκιμής *in vitro* αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης.

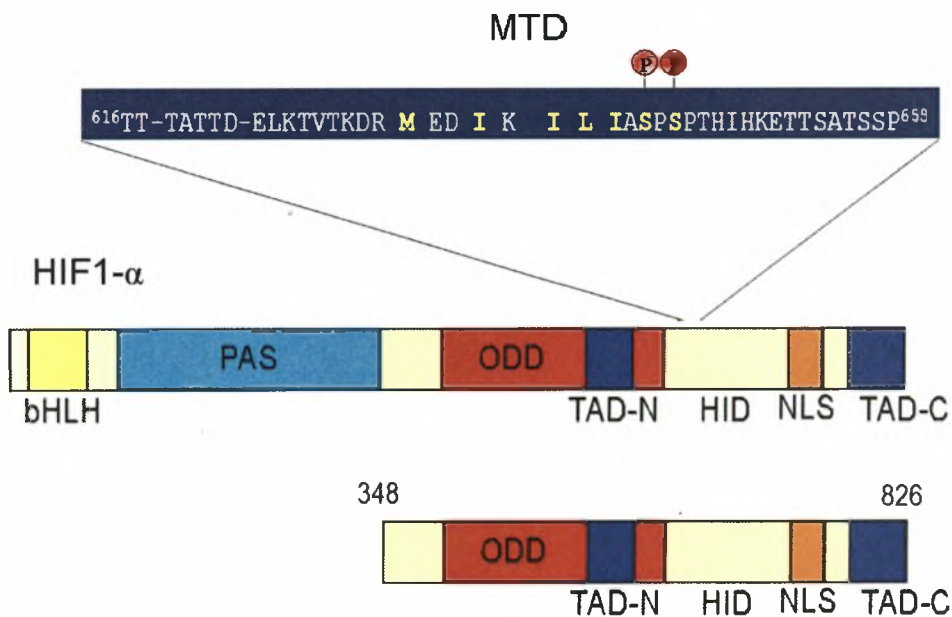
Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Ξέπλυμα των σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης (GSH-Sepharose) (50μl) με το διάλυμα λύσης για πρωτεΐνες με επίτοπο GST(Υλικά και μέθοδοι 4.12) (3x10min).
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από την κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και επώαση υπό ανακίνηση για 1h στους 4°C.
- Ξέπλυμα για 3x10min με κατάλληλο διάλυμα λύσης (25 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton, 1 mM PMSF και 0,5 mM DTT).
- Προσθήκη 200 μl (1,6mg) κυτταρικού εκχυλίσματος HeLa και 400μL διαλύματος λύσης
- Ξέπλυμα για 3x10min με κατάλληλο διάλυμα λύσης (25 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton, 1 mM PMSF και 0,5 mM DTT).
- Εκχύλιση των δεσμευθέντων πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με 60 μl 2x Laemmli Buffer και θέρμανση στους 95°C για 10 min.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Κλωνοποίηση μικρών τμημάτων του HIF-1α που φέρουν την φωσφομιμητική μετάλλαξη S641→E (HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και MTD S→E) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1

Σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα [7, 42] η αγρίου τύπου μορφή των τμημάτων MTD (MAPK Target Domain, HIF-1α⁶¹⁶⁻⁶⁵⁸) και HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ (Εικόνα 9) παραλαμβάνεται σε ικανοποιητική ποσότητα και σε αρκετά καθαρή μορφή όταν εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα E. Coli BL21RIL σε αντίθεση με τον πλήρους μήκους HIF-1α. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η κλωνοποίηση των τμημάτων του γονιδίου του HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (Ser641→Glu) που αντιστοιχούν στα τμήματα.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του HIF-1α που έγινε προσπάθεια να κατασκευαστούν.

Απεικονίζεται ο πλήρους μήκους HIF-1α (826 αα) με σημειωμένες τις διάφορες δομικές περιοχές του και το τμήμα 348-826. Απεικονίζεται επίσης η αμινοξική αλληλουχία του τμήματος MTD (616-658) ενώ επισημαίνονται ακόμη οι θέσεις φωσφορυλίσωσης (Ser641-Ser643) και το σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα NES

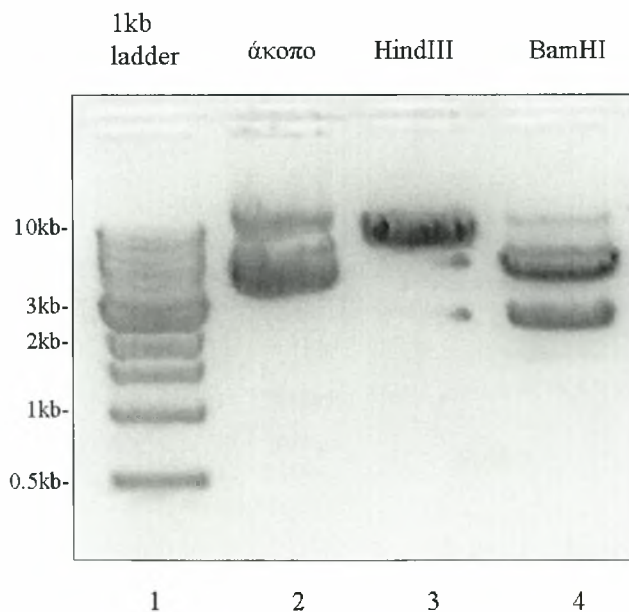
(αρίθμηση σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία).

5.2. Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E

Για την κλωνοποίηση των μικρότερων τμημάτων του HIF-1α S→E έγινε παρασκευή μεσαίας κλίμακας του πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1α S→E ώστε να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την PCR.

Αρχικά έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. Coli TOP 10 με το πλασμίδιο pGEX4T1-HIF-1α S→E και την επόμενη μέρα έγινε εμβολιασμός μιας αποικίας σε 100ml καλλιέργειας (LB/Amp) και επώαση στους 37°C O/N υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με χρήση του Qiagen Midi Kit (§ 4.2, 4.4)

Για να ελεγχθεί το πλασμίδιο έγινε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% του πλασμιδίου άκοπου, καθώς και μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού HindIII και BamHI (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX4T1-HIF-1αS→E

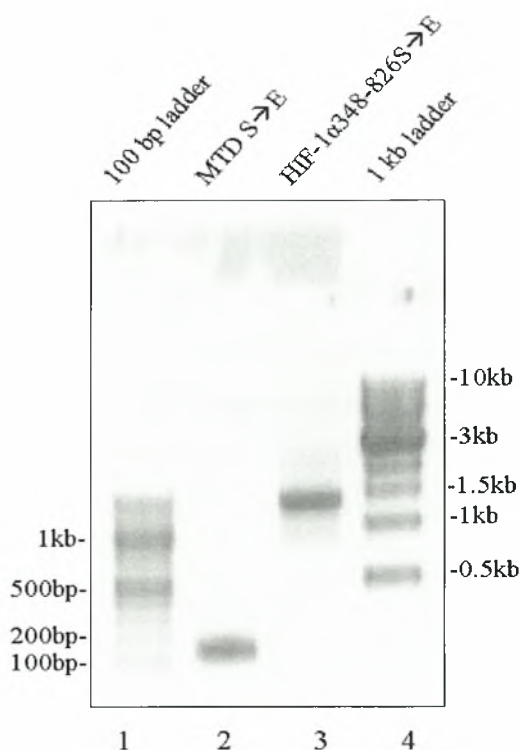
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, διαδρομή 2: pGEX4T1-HIF-1αS→E άκοπο, διαδρομή 3: pGEX4T1-HIF-1αS→E-HindII, διαδρομή 4: pGEX4T1-HIF-1αS→E-BamHI

Η ενδονουκλεάση περιορισμού HindIII πέπτει το ένθεμα σε μία θέση άλλα όχι τον πλασμιδιακό φορέα. Έτσι η πέψη καθιστά το πλασμίδιο pGEX4T1-HIF-1αS→E γραμμικό. Στην ηλεκτροφόρηση έχουμε την αναμενόμενη ζώνη στις 8.5kb. Ο HIF-1αS→E κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό φορέα pGEX4T1 στη θέση BamHI, άρα πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο αυτό δίνει δύο ζώνες 2.6kb και 4.9kb που αντιστοιχούν στο ένθεμα και στο φορέα (Εικόνα 10).

5.3 Ενίσχυση των τμημάτων MTD S→E και HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E με PCR

Με χρήση του πλασμιδίου pGEX4T1-HIF-1α S→E ως εκμαγείου έγινε ενίσχυση του τμημάτων HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και MTD S→E με PCR (§ 4.7).



Εικόνα 11: Ενίσχυση των τμημάτων του HIF-1α MTD(616-658) και 348-826 με PCR.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, διαδρομή 2: MTD S→E, διαδρομή 3: HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E, διαδρομή 4: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb

Το τμήμα MTD δίνει προϊόν στα 150bp ενώ το τμήμα 348-826 στα 1500bp.

Το μέγεθος των τμημάτων είναι το αναμενόμενο στα 150bp για το MTD S→E και στα 1500bp για το HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (Εικόνα 11).

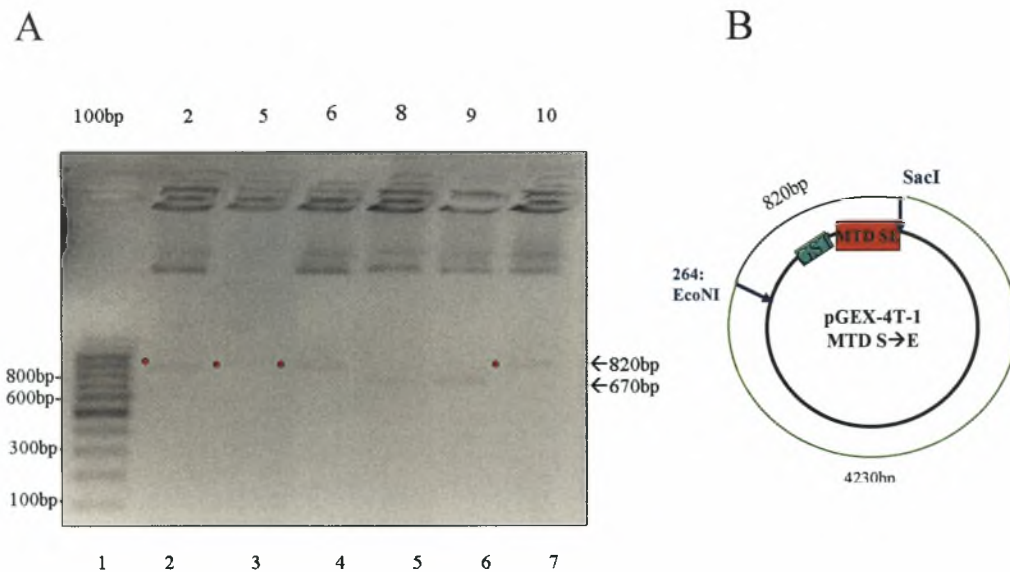
5.4 Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA pGEX-4T1- MTD S→E και pGEX-4T- HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και έλεγχος με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Τα προϊόντα της PCR MTD S→E και HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E καθώς και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 υπέστησαν πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης. (Υλικά και μέθοδοι 4.8-4.10) Με τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli TOP10. (§ 4.2) Από τα τρυβλία επιλέχθηκαν τυχαία κάποιες αποικίες για ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια και απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. (§4.3) Ακολούθησε πέψη του DNA των αποικιών αυτών με BamHI για έλεγχο της εισαγωγής των ενθεμάτων και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. (Εικόνα 12)

Η εισαγωγή των τμημάτων του γονιδίου του HIF1- α στον πλασμιδιακό φορέα έγινε στη θέση BamHI άρα η πέψη των νέων πλασμιδιακών κατασκευών με το ένζυμο αυτό τη διαχωρίζει στο φορέα και το ένθεμα ενώ πέψη μόνο του πλασμιδιακού φορέα τον καθιστά γραμμικό. Έτσι στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 12) μπορούμε να ξεχωρίσουμε σε ποιες αποικίες έχει προσληφθεί το ένθεμα από το φορέα καθώς εμφανίζουν μια ζώνη επιπλέον που αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος (150bp για το MTD S→E και 1500bp για το HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E) σε σχέση με τις αποικίες στις οποίες το ένθεμα δεν έχει προσληφθεί.

περιορισμού ώστε να ελεγχθεί και ο προσανατολισμός των ενθεμάτων (Εικόνα 13, 14).

Ο έλεγχος των αποικιών για το MTD S→E έγινε με διπλή πέψη με τα ένζυμα EcoNI και SacI. Η EcoNI πέπτει τον πλασμιδιακό φορέα στη θέση 264 ενώ δεν πέπτει το ένθεμα. Η SacI πέπτει μόνο το ένθεμα σε μία θέση που κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο του MTD S→E (§4.7). Να σημειωθεί επίσης ότι η κλωνοποίηση του ενθέματος στο φορέα έγινε στη θέση 930 (που αναγνωρίζεται από την BamHI). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω προκύπτει πως διπλή πέψη EcoNI και SacI πλασμιδίων με το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό δίνει τμήματα ~820bp και ~4230bp πέψη EcoNI και SacI πλασμιδίων με το ένθεμα με τον λάθος προσανατολισμό δίνει τμήματα ~670bp και ~4380bp (Εικόνα 13 B)



Εικόνα 13: (A) Έλεγχος του προσανατολισμού της ένθεσης του MTD S→E στον pGEX-4T-1 με διπλή πέψη με SacI και EcoNI.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

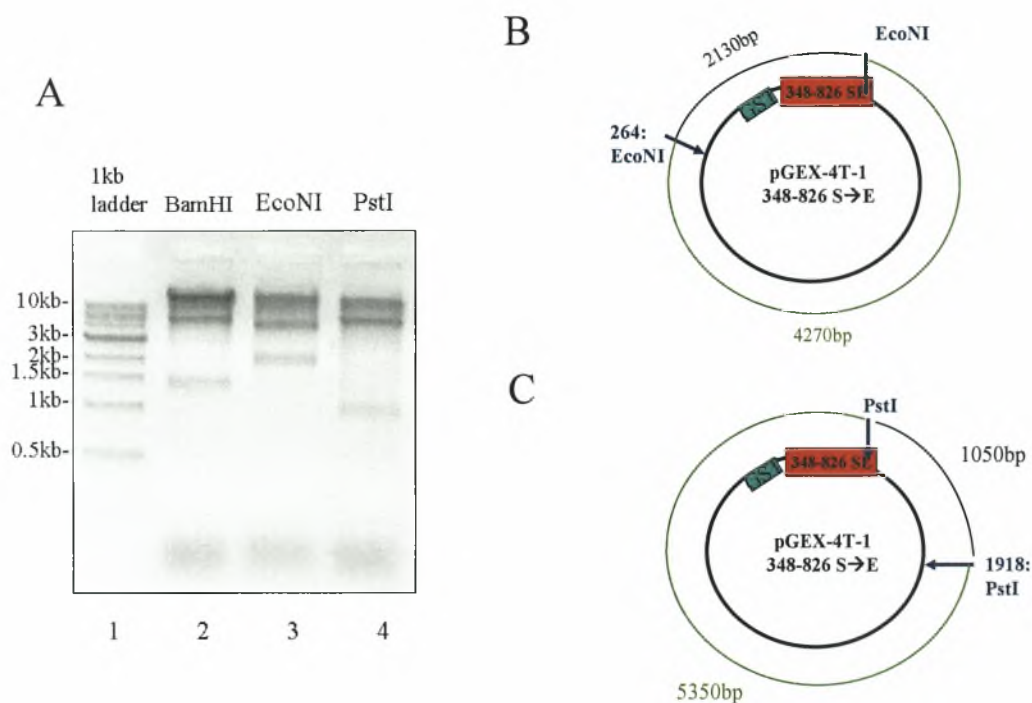
Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, διαδρομές 2-7 2:DNA αποικιών 2,5,6,8,9,10-SacI-EcoNI,

Στις αποικίες 2,5,6 και 10 ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι σωστός

(B) Σχηματική απεικόνιση της νέας πλασμιδιακής κατασκευής pGEX-4T-1 MTD S→E. Σημειώνονται οι θέσεις πέψης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoNI και SacI και το μέγεθος των τμημάτων που προκύπτει μετά από τη διπλή πέψη.

Παρατηρούμε πως στις αποικίες 2, 5, 6 και 10 ο προσανατολισμός των ενθεμάτων είναι σωστός (Εικόνα 13 A)

Όσον αφορά τον έλεγχο του DNA της αποικίας 2 για το ένθεμα HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E έγιναν δύο πέψεις μία με την ενδονουκλέαση περιορισμού EcoNI και μία με την PstI. Η EcoNI πέπτει το ένθεμα 40 νουκλεοτίδια περίπου από το 3' άκρο του. Έτσι πέψη με EcoNI πλασμιδίων με το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό δίνει τμήματα ~2130bp και ~4270bp ενώ πέψη πλασμιδίων με το ένθεμα με λάθος προσανατολισμό τμήματα ~710bp και ~5690bp. (Εικόνα 14B) Η PstI πέπτει τον πλασμιδιακό φορέα στη θέση 1918 και το ένθεμα περίπου 60 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο του. Άρα η πέψη με PstI πλασμιδίων με το ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό δίνει τμήματα ~1050bp και ~5350 ενώ πέψη πλασμιδίων με το ένθεμα με λάθος προσανατολισμό τμήματα ~2450bp και ~3950bp (Εικόνα 14C)



Εικόνα 14: (A) Έλεγχος του προσανατολισμού της ένθεσης του HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E στον pGEX-4T με πέψεις με EcoNI και PstI.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, διαδρομή 2: DNA αποικίας 2-BamHI, διαδρομή 3: DNA αποικίας 2-EcoNI, διαδρομή 4: DNA αποικίας 2-PstI

Ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι σωστός

(B,C) Σχηματική απεικόνιση της νέας πλασμιδιακής κατασκευής pGEX-4T-HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E.

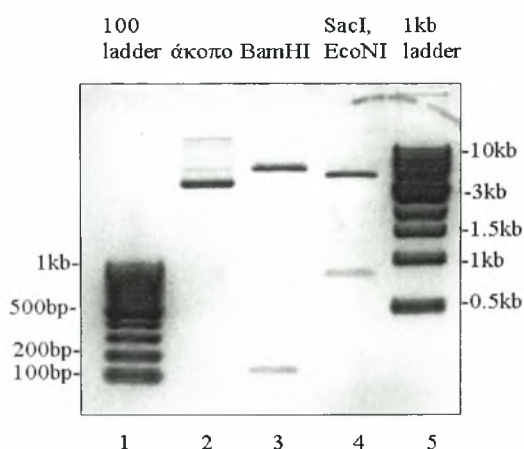
Σημειώνονται οι θέσεις πέψης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoNI (B) και PstI (C) και το μέγεθος των τμημάτων που προκύπτει μετά τις δύο πέψεις.

Ο προσανατολισμός του ενθέματος είναι σωστός.

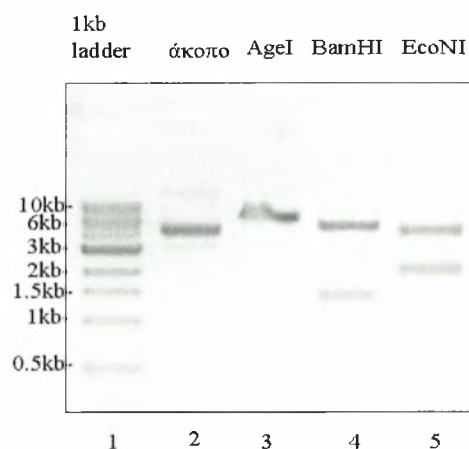
5.5 Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA MTD S→E και HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E

Ακολούθως επιλέχθηκε τυχαία μια από τις αποικίες που είχαν το ένθεμα MTD S→E με το σωστό προσανατολισμό για παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση κιτ της Qiagen (§ 4.4) ενώ το ίδιο έγινε και με τη μοναδική αποικία στην οποία είχε προσληφθεί το ένθεμα HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E. Στη συνέχεια έγινε νέος έλεγχος των πλασμιδιακών κατασκευών με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο έλεγχος αυτός έδωσε και πάλι προϊόντα με το προ-υπολογισμένο μοριακό βάρος (Εικόνα 15)

A



B



Εικόνα 15: Παρασκευή μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA MTD S→E (A) και HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (B) και έλεγχος με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

(A) Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp, διαδρομή 2: pGEX-4T-MTD-S→E άκοπο, διαδρομή 3: pGEX-4T-MTD-S→E/BamHI, διαδρομή 4: pGEX-4T-MTD-S→E/SacI/EcoNI, διαδρομή 5: μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb

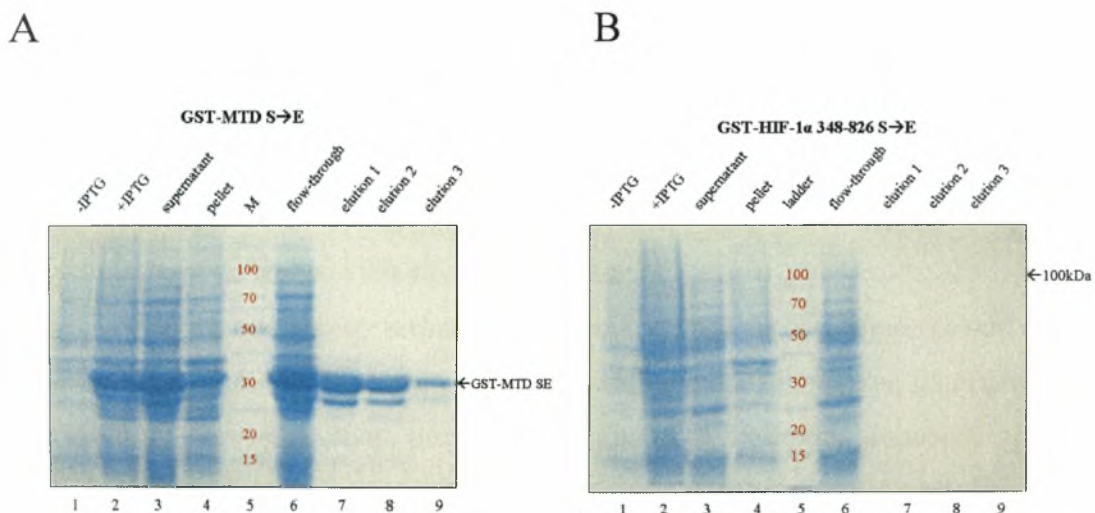
(B) Διαδρομή 1: : μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb, Διαδρομή 2: pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E άκοπο, Διαδρομή 3: pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E/AgeI, Διαδρομή 4: pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E/BamHI Διαδρομή 5: pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E/ EcoNI

Και στις δύο περιπτώσεις οι πύψεις έδωσαν προϊόντα με το αναμενόμενο μοριακό βάρος

5.6 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-MTD, GST-MTD S→A, GST-MTD S→E και GST-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E σε BL21RIL και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης

Στη συνέχεια ακολούθησε εισαγωγή των νέων πλασμιδιακών κατασκευών pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E και pGEX-4T-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E. σε κύτταρα E.coli BL21RIL με μετασηματισμό (§ 4.2) με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε καλλιέργειες αυτών των κυττάρων. Στα πλασμίδια που κατασκευάσαμε, τα ενθέματα εισάχθηκαν στον pGEX-4T-1 αμέσως μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Έτσι κατά την έκφραση δημιουργούνται GST-χημεικές πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να απομονωθούν ευκολότερα.

Συνοπτικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν σε λογαριθμική φάση ($OD_{600nm} \sim 0.6$ A) και τότε προστέθηκε στις καλλιέργειες ο επαγωγέας IPTG για χρονικό διάστημα 4 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 4 ωρών συλλέχθηκαν τα κύτταρα, υπέστησαν λύση με υπερήχους και τελικά απομονώθηκε το διαλυτό κλάσμα, το οποίο και πέρασε από στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης για την απομόνωση των GST-πρωτεϊνών μας (§ 4.11-4.13).



Εικόνα 16: Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-MTD S→E (A) και GST-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (B) και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομές 1-4 και 6: δείγματα που λήφθηκαν κατά την υπερέκφραση και τον καθαρισμό, διαδρομή 5: unstained protein ladder, διαδρομές 7-9: δείγματα από τις εκλούσεις

Η πρωτεΐνη GST-MTD S→E υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε επιτυχώς (ζώνη στα 30kDa), ενώ η πρωτεΐνη GST-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E (που αναμενόταν στα 100kDa) δεν υπερεκφράστηκε

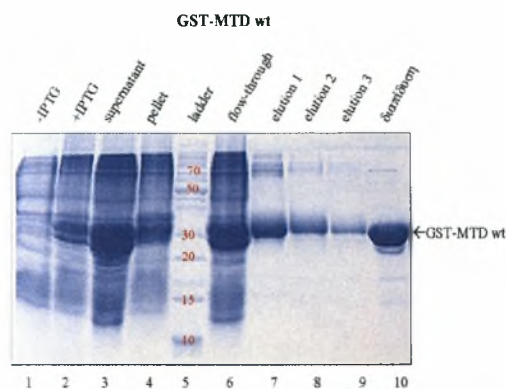
Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης των GST-πρωτεϊνών ληφθήκαν δείγματα από κάθε στάδιο. Πιο συγκεκριμένα λήφθηκαν δείγματα πριν και μετά την προσθήκη IPTG, από το υπερκείμενο, το ίζημα, το αδέσμευτο κλάσμα της στήλης (flow through), και από τις 3 εκλούσεις. Τα δείγματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (§ 4.16) ώστε να ελεγχθεί αν η υπερέκφραση και ο καθαρισμός ήταν επιτυχείς . (Εικόνα 16)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 16A, με την προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια εμφανίζεται έντονα μια ζώνη στα 30 kDa, μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στη GST-MTD S→E, ενώ μετά τον καθαρισμό με στήλη γλουταθειόνης-σεφαρόζης παρατηρείται απομόνωση της σε σχετικά καθαρή μορφή. Αντίθετα δεν παρατηρείται υπερέκφραση της GST- HIF-1 α ³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E, που αναμενόταν στα 100 kDa κάτι που μπορεί να αποδοθεί στην εισαγωγή μίας τυχαίας μετάλλαξης κατά την PCR που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κάποιας ασταθούς μορφής της πρωτεΐνης αντί της αναμενόμενης .

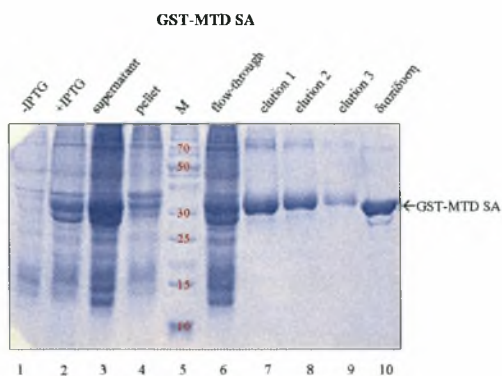
Έτσι αποφασίστηκε η συνέχιση του πειράματος με τη GST-MTD S→E. Για τη δοκιμή αλληλεπίδρασης (pull down assay) που θα ακολουθήσει απαιτούνται και η αγρίου τύπου μορφή του MTD καθώς και η μορφή του που φέρει μεταλλάξεις που αποτρέπει τη φωσφορυλίωση (Ser641→Ala, Ser643→Ala) ώστε να εντοπιστούν οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ειδικά με το MTD S→E. Τα τμήματα αυτά είχαν ήδη κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1. Έτσι έγινε μετασχηματισμός BL21RIL με τις πλασμιδιακές κατασκευές pGEX-4T-MTD wt και pGEX-4T-MTD S→A και ακολούθησε υπερέκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-MTD wt και GST-MTD S→A. (Εικόνα 17) Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε εκ νέου και για την GST-MTD S→E.

Αυτή τη φορά πραγματοποιήθηκε επιπλέον ένα ακόμα βήμα, ένωση των 3 εκλουσμάτων από κάθε πρωτεΐνη και διαπίδυση σε ειδική μεμβράνη με πόρους που συγκρατούν την πρωτεΐνη μας αλλά αποκλείουν μικρού μοριακού βάρους ανεπιθύμητες ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη και άλατα (§ 4.14). Οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να δημιουργήσουν πρόβλημα στη σύνδεση των πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης για τη δοκιμή αλληλεπίδρασης που θα ακολουθήσει. Και από αυτό το βήμα έγινε λήψη δείγματος και ηλεκτροφόρηση.

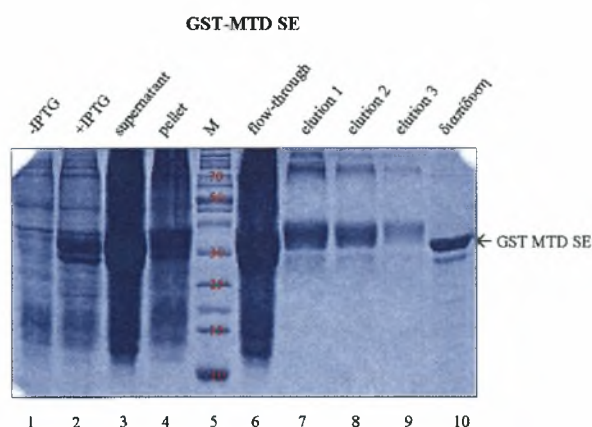
A



B



C



Εικόνα 17: Υπερέκφραση των πρωτεϊνών GST-MTD wt (A), GST-MTD S→A (B) και GST-MTD S→E (C) και καθαρισμός με σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρώζης

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Διαδρομές 1-4 και 6: δείγματα που λήφθηκαν κατά την υπερέκφραση και τον καθαρισμό, διαδρομή 5: unstained protein ladder, διαδρομές 7-9: δείγματα από τις εκλούσεις, διαδρομή 8: δείγμα μετά τη διαπίδυση

Οι πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν και καθαρίστηκαν επιτυχώς (ζώνη στα 30kDa)

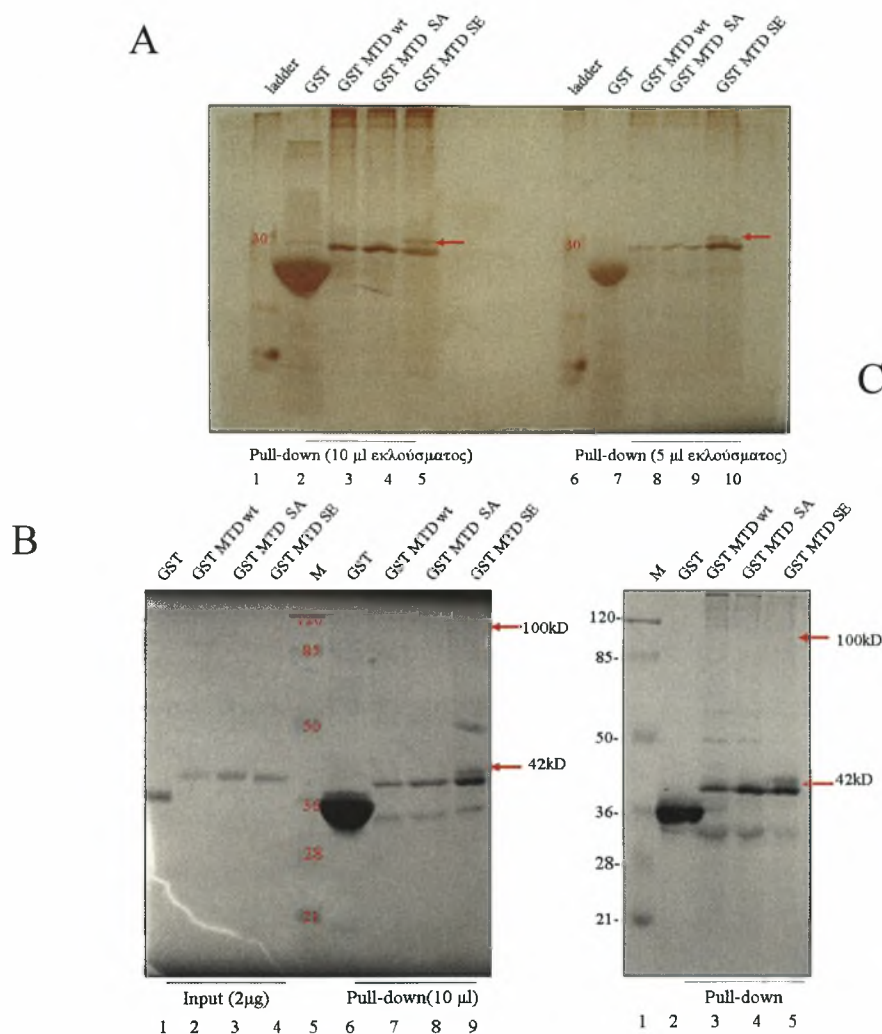
Μετά το τέλος της υπερέκφρασης και του καθαρισμού πήραμε τις πρωτεΐνες GST-MTD wt, GST-MTD S→A και GST-MTD S→E σε ικανοποιητική ποσότητα και αρκετά καθαρή μορφή (Εικόνα 17).

5.7 Δοκιμή αλληλεπίδρασης σε σφαιρίδια αγγιστείας γλουταθειόνης σεφαρόζης (pulldown assays) πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa με τις πρωτεΐνες GST και GST-MTD wt, GST-MTD S→A και GST-MTD S→E

Μετά την υπερέκφραση και τον καθαρισμό οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες καθώς και η GST χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή αλληλεπίδρασης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa, ώστε να εντοπιστούν πιθανές πρωτεΐνες των κυττάρων HeLa που αλληλεπιδρούν μόνο με τη μορφή του MTD που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη.

Αρχικά προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford η συγκέντρωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, της GST καθώς και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων HeLa (§ 4.15). Ο προσδιορισμός αυτός ήταν απαραίτητος καθώς για να εξασφαλιστεί η σύνδεση των πρωτεϊνών στα 50 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης-σεφαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν απαιτούνται τουλάχιστον 250μg πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa είναι επίσης απαραίτητος ώστε να εξασφαλιστεί πως θα χρησιμοποιηθεί σε περίσσεια.

Στη συνέχεια έγινε πρόσδεση των κατάλληλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (300μg) καθώς και της GST στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης και επώασή τους με 200μl (~1,6mg) εκχυλίσματος από κύτταρα HeLa. Ακολούθησε ξέπλυμα των σφαιριδίων για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια παραλαβή των εκλουσμάτων που περιέχουν τις ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες (§ 4.20).



Εικόνα 18: Δοκιμή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγχιστείας (pull-down assay)

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

(Α) Χρώση με AgNO_3 . Διαδρομές 1,6: unstained protein ladder, διαδρομές 2-5: 1μl από κάθε έκλουσμα, διαδρομές 7-10: 5μl από κάθε έκλουσμα

(Β) Χρώση με Coomassie. Διαδρομές 1-4: 2μg κάθε πρωτεΐνης, διαδρομή 5: prestained protein marker, διαδρομές 6-10: 10μl από κάθε έκλουσμα

(Γ) Χρώση με Coomassie. Διαδρομή 1: prestained protein marker, διαδρομές 2-5: εκλούσματα

Παρατηρούμε την εμφάνιση δύο ζωνών, στα 100kDa και στα 42kDa που εμφανίζονται αποκλειστικά στα εκλούσματα της GST-MTD S→E

Με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και στη συνέχεια χρώση είτε με AgNO_3 είτε με Coomassie (§4.17, 4.18) έγινε δυνατή η σύγκριση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν σε καθεμία από τις μορφές του MTD (Εικόνα 18).

Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήσαμε 2 δύο ζώνες που εμφανίζονται αποκλειστικά στο έκλουσμα της GST-MTD S→E και όχι στα εκλούσματα των GST, GST-MTD wt και GST-MTD S→A ούτε στην ηλεκτροφόρηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-MTD S→A (άρα δεν πρόκειται για επιμόλυνση από μη σωστό καθαρισμό της GST-MTD S→E στο προηγούμενο στάδιο. Έτσι μπορεί να υποτεθεί

πως οι ζώνες αυτές, στα 101kDa και 42.8 kDa αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες των κυττάρων HeLa που αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με τη μορφή του MTD που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη.

5.8 Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa που αλληλεπιδρούν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-MTD S→E

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που βρέθηκε να αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με τη μορφή του MTD που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη (Ser641 →E) έγινε με φασματοσκοπία μάζας στο εργαστήριο του Δρ Γ. Παναγιώτου στο ινστιτούτο Φλέμινγκ. Η ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας έδειξε:

- Η ανάλυση της πρωτεϊνικής ζώνης των 42 kDa έδωσε πεπτίδια που αντιστοιχούν στην ανασυνδυασμένη μορφή της GST-MTD S→E που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στον μη επαρκή διαχωρισμό κατά την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου της άγνωστης πρωτεΐνης και της πρωτεΐνης GST-MTD S→E καθώς οι δύο πρωτεΐνες παρουσιάζουν παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Καθώς η GST είναι σε μεγάλη ποσότητα και δίνει πολύ εύκολα πεπτίδια με τρυψινόλυση που προηγείται της φασματοσκοπίας ταυτοποιήθηκαν μόνο πεπτίδια της. Έτσι δεν έγινε δυνατή η ταυτοποίηση της άγνωστης πρωτεΐνης και απαιτείται επανάληψη του πειράματος.
- Κατά τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης με MB 100 kDa ταυτοποιήθηκε το πεπτίδιο MDDFQLKGIVEEKFVK. Σύμφωνα με την αλληλουχία του πεπτιδίου η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με μορφή του MTD που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη είναι η TUT-4 (Terminal Uridyl Transferase 4), μια πρωτεΐνη που η κύρια βιολογική δράση έχει δειχθεί να είναι η απενεργοποίηση miRNAs μέσω ουριδυλίωσης του 3' άκρου τους.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία, καθώς επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τον ενεργειακό μεταβολισμό, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, συνδεδεμένος με τα HREs των υποκινητών τους. Ο HIF-1 αποτελείται από τη συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β ή ARNT και τη ρυθμιζόμενη υπομονάδα HIF-1α. Η συγκέντρωση οξυγόνου αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του HIF-1α. Κατά την νορμοξία η πρωτεΐνη pVHL συνδέεται στο HIF-1α με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση του και αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα ενώ κατά την υποξία σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τα γονίδια στόχους. Εκτός από τις συνθήκες οξυγόνου όμως ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν όλα τα επίπεδα της ρύθμισης του HIF-1α, ενώ ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η φωσφορυλίωση.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες ο κύριος βιολογικός ρόλος μιας συγκεκριμένης φωσφορυλίωσης του HIF-1α, της φωσφορυλίωσης από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 είναι η 'απόκρυψη' ενός γειτονικού NES με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον διμερισμό του με τον ARNT και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων της υποξίας [7, 42]. Στις μελέτες αυτές όμως είχε παρατηρηθεί πως είναι πολύ πιθανόν η φωσφορυλίωση αυτή να προκαλεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με πρωτεΐνες του πυρήνα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης των πρωτεϊνών αυτών.

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η κατασκευή μικρότερων τμημάτων του HIF-1α που φέρουν τη φωσφομιμητική μετάλλαξη Ser641→Glu, του MTD και του 348-826 ώστε να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα τμήματα που φέρουν τις μεταλλάξεις που δεν επιτρέπουν τη φωσφορυλίωση (Ser641→Ala και Ser643→Ala) και τα αγρίου τύπου τμήματα σε δοκιμή αλληλεπίδρασης με εκχύλισμα πρωτεϊνών κυττάρων HeLa πάνω σε σφαιρίδια ρητίνης αγχιστείας.

Έτσι χρησιμοποιώντας τον πλήρους μήκους HIF-1α S→E, που είχε ήδη κατασκευαστεί, έγινε ενίσχυση των τμημάτων αυτών με PCR και ακολούθησε κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T-1. Ακολούθησε

προσπάθεια υπερέκφρασης των τμημάτων αυτών, ως πρωτεΐνες σύντηξης με τη GST, σε βακτηριακά κύτταρα BL21RIL με επαγωγή με IPTG. Όμως ενώ η πρωτεΐνη GST-MTD S→E εκφράστηκε σε ικανοποιητική ποσότητα, δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης GST-HIF-1α³⁴⁸⁻⁸²⁶ S→E. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην εισαγωγή κατά την PCR κάποιας μετάλλαξης στη νουκλεοτιδική αλληλουχία, κάτι καθόλου απίθανο λόγω του μεγάλου μεγέθους του τμήματος (~1500bp) παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η Vent πολυμεράση για μεγαλύτερη ακρίβεια. Η μετάλλαξη αυτή, είτε είναι παρερμηνεύσιμη και οδήγησε στην αντικαταστάση ενός αμινοξέος είτε ανερμηνεύσιμη και οδήγησε στην εισαγωγή ενός πρώιμου κωδικωνίου λήξης. Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης θα πρέπει να είναι η δημιουργία μιας ιδιαίτερα ασταθούς πρωτεΐνης καθώς δεν παρατηρείται υπερέκφραση κάποιας πρωτεΐνης μετά την επαγωγή με IPTG, ούτε καν διαφορετικού μεγέθους από την αναμενόμενη.

Το πείραμα συνεχίστηκε μόνο με το τμήμα MTD, με υπερέκφραση και καθαρισμό με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-MTD wt, GST-MTD S→A GST-MTD S→E. (Τα τμήματα MTD wt και MTD S→A υπήρχαν ήδη κλωνοποιημένα στον pGEX-4T-1). Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε ικανοποιητική ποσότητα ενώ και ο καθαρισμός τους μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής. Ακολούθησε η δοκιμή αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών αυτών με εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Η δοκιμή αυτή έδειξε πως δυο τουλάχιστον πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη 42kDa και 100kDa, των κυττάρων HeLa αλληλεπιδρούν αποκλειστικά με τη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας της πρωτεΐνης των 42kDa έδωσε πεπτίδια που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη-δόλωμα GST-MTD S→E. Αυτό είναι πιθανόν να συμβαίνει επειδή η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την GST-MTD S→E εμφανίζεται πολύ κοντά στην πηκτή με την ίδια την GST-MTD S→E, με αποτέλεσμα η μεγάλη ποσότητα της GST-MTD S→E και η ευκολία με την οποία δίνει πεπτίδια να εμποδίζει την ταυτοποίηση της άγνωστης πρωτεΐνης. Άρα το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί και ταυτόχρονα να αλλάξουν οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πηκτή ή να γίνει ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών παραπλήσιου μοριακού βάρους, λόγω του διαφορετικού ισοηλεκτρικού σημείου τους. Εναλλακτικά θα μπορούσε να τροποποιηθεί η δοκιμή αλληλεπίδρασης ώστε να εκλουστούν μόνο οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και όχι οι ανασυνδυασμένες κάτι που θα μπορούσε για παράδειγμα να επιτευχθεί με έκλυση

με διάλυμα υψηλής αλατότητας το οποίο δε θα επηρεάσει την ισχυρή σύνδεση γλουταθειόνης-GST αλλά μόνο τις πιθανόν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών από το εκχύλισμα HeLa με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Μπορεί επίσης να γίνει επώαση με την πρωτεάση Τεν η οποία θα αποκόψει τα τμήματα MTD από την GST, που θα μείνει συνδεδεμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, και θα δώσει μετά από έκλουση τα τμήματα MTD και τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτά, λύνοντας το πρόβλημα καθώς τα τμήματα MTD είναι πολύ μικρά και δε επιμολύνουν την πρωτεϊνική ζώνη των 42 kDa. Τέλος το πείραμα θα επαναληφθεί και με το τμήμα 348-826 το οποίο δίνει ζώνη μεγέθους 100 kDa μακριά δηλαδή από τα 42 kDa.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας της πρωτεΐνης των 100 kDa παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς έδωσε ένα πεπτίδιο το οποίο αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη TUT-4. Η TUT-4 (terminal uridyl transferase 4) -που αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως Zcchc11 (Zinc finger CCHC domain-containing protein 11)- είναι μια ουριδυλοτρανφεράση που ο κύριος ρόλος της πρόσφατα βρέθηκε πως είναι η αναστολή της βιοσύνθεσης micro-RNAs μέσω της ουριδυλίωσης του 3' άκρου τους.

Τα microRNAs είναι μικρά μόρια RNA ~22nt που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταμεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε ποικίλες αναπτυξιακές και φυσιολογικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, η αιματοποίηση, η έκκριση ινσουλίνης, η μορφογένεση του εγκεφάλου και η μυϊκή διαφοροποίηση [76]. Ο τρόπος δράσης τους περιλαμβάνει τη σύνδεση μέσω συμπληρωματικότητας με την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των mRNA στόχων τους που συνήθως οδηγεί στην αποσιώπηση τους, μέσω αποικοδόμησης τους ή παρεμπόδισης της μετάφρασης [77]. Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των miRNA συνοπτικά περιλαμβάνει δύο στάδια: την επεξεργασία του πρώιμου μεταγράφου miRNA (pri-miRNA) με την RNAση III Drosha με αποτέλεσμα τη δημιουργία του πρόδρομου miRNA (pre-miRNA) , την εξαγωγή από τον πυρήνα με την εξορτίνη 5 και την επεξεργασία με μια ακόμη RNAση III την Dicer [78-81]. Η ρύθμιση της βιογένεσης του miRNA μπορεί να γίνει σε διάφορα στάδια όμως οι λεπτομέρειες των μηχανισμών της μεταμεταγραφικής του ρύθμισης είναι ακόμα άγνωστες.

Η TUT-4 πρόσφατα δείχθηκε πως παίζει ρόλο στη ρύθμιση αυτή μέσω ουριδυλίωσης του 3' άκρου είτε του πρόδρομου pre-miRNA είτε του ώριμου miRNA. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως ουριδυλίωση από την TUT-4 του pre-let-7 εμποδίζει την

επεξεργασία του από τη Dicer με αποτέλεσμα να μην παράγεται ώριμο miRNA let-7, και πως στη στρατολόγηση της TUT-4 μεσολαβούν οι πρωτεΐνες Lin28 και Lin28B. [82, 83]. Ο νέος ρυθμιστικός αυτός μηχανισμός φαίνεται πως είναι εξελικτικά συντηρημένος καθώς έχει αναφερθεί ρύθμιση του pre-let-7 από ένα ομόλογο μονοπάτι στο *C.elegans* [84]. Ακόμη η TUT-4 φαίνεται να καταλύει την 3' ουριδυλίωση των ώριμων miR-26A (μιας οικογένειας miRNAs που στοχεύουν το mRNA της IL6), αναιρώντας έτσι την αποσιώπηση της έκφρασης της Ιντερλευκίνης 6 [85].

Αν ο ρόλος της TUT-4 βρεθεί πως επεκτείνεται στη ρύθμιση και άλλων μονοπατιών miRNA η TUT-4 μπορεί να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό στόχο καθώς τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν σημαντικές διαδικασίες της ανάπτυξης. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς αυτή την κατεύθυνση παρουσιάζει η εμπλοκή της στη ρύθμιση του let 7 miRNA. Το let-7 miRNA στοχεύει πολλά ογκογονίδια όπως το RAS, το HMGA2 και το c-myc δρώντας σαν ογκοκατασταλτικό κυρίως στον καρκίνο του πνεύμονα [86-89] ενώ οι LIN28 και LIN28B έχουν πρόσφατα περιγραφεί ως πρωτοογκογονίδια [90, 91]. Έτσι η TUT4 μπορεί να αποτελέσει στόχο αντικαρκινικής θεραπείας σε περιπτώσεις καρκίνου που οι LIN28 και LIN28B αναστέλλουν την ογκοκατασταλτική δράση του let-7.

Η πιθανή αλληλεπίδραση λοιπόν του HIF-1α με την TUT-4, μια πρωτεΐνη που συμμετέχει σε ένα μονοπάτι ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που πολύ πρόσφατα ανακαλύφθηκε παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω έρευνας. Πρέπει κατά πρώτον να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση αυτή και στη συνέχεια να διερευνηθεί ο βιολογικός της ρόλος. Θα πρέπει να εξεταστεί η πιθανότητα η TUT-4 να είναι η άγνωστη πυρηνική πρωτεΐνη που συνδέεται με τον φωσφορυλιωμένο, και άρα ήδη ενεργό HIF-1α, και είναι απαραίτητη για την βέλτιστη μεταγραφική του ενεργότητα (§2.8). Πιο πιθανό όμως, γνωρίζοντας τον κύριο βιολογικό ρόλο της TUT-4, φαντάζει το σενάριο ο HIF-1α να είναι αυτός που ενεργοποιεί την TUT-4 φέρνοντας την σε επαφή με πρώιμα μετάγραφα των miRNA που αποτελούν και τα μόρια-στόχους της ενζυμικής δράσης της TUT-4. Όποιος κι αν είναι ο ρόλος της η αλληλεπίδραση αυτή ανοίγει το δρόμο για την ανακάλυψη ενός νέου, άγνωστου μέχρι σήμερα σηματοδοτικού μονοπατιού που εμπλέκει τις δύο πρωτεΐνες. Το αν αυτό το μονοπάτι αποτελεί κύριο τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ή συναντάται μεμονωμένα σε κάποιους κυτταρικούς τύπους ή για συγκεκριμένα γονίδια πρέπει επίσης να διερευνηθεί.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ιατρική έρευνα φυσικά παρουσιάζει η συμμετοχή της TUT-4 σε μονοπάτια που σχετίζονται με την καρκινογένεση λαμβάνοντας υπόψιν και την εμπλοκή του HIF-1 σε αυτήν. Υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες αναφέρουν την υπερέκφραση του HIF-1 σε πολλούς τύπους καρκίνου καθώς και το ρόλο του στα πρώιμα στάδια σχηματισμού του όγκου. Ο HIF-1α συμβάλλει στο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων επάγοντας την αναερόβια γλυκόλυση, την επαναπρόσληψη γλυκόζης την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η ογκογόνος δράση της TUT-4 βρέθηκε πως εστιάζεται στα μονοπάτια που εμπλέκουν τα γονίδια RAS και c-myc τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α [21, 22] ή στην περίπτωση του c-myc ρυθμίζονται από αυτόν [92, 93]. Έτσι ιδιαίτερα ελκυστική φαντάζει η πιθανότητα σύγκλισης των μονοπατιών αυτών σε ένα κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκει τις δυο πρωτεΐνες και επηρεάζεται από ή επηρεάζει τη διαταραταγμένη κυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί τελικά στην καρκινογένεση. Κατά συνέπεια η διερεύνηση του θα μπορούσε να συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης ή ακόμη και να προσφέρει νέους θεραπευτικούς στόχους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 343-54.
2. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
3. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1999. **15**: p. 551-78.
4. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
5. 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.
6. 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.
7. Mylonis, I., et al., *Atypical CRML-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27620-7.
8. Guo, Q., et al., *Recognition by tryptophanyl-tRNA synthetases of discriminator base on tRNA^{Trp} from three biological domains*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14343-9.
9. Min, J.H., et al., *Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1886-9.
10. 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.
11. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
12. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Signalling hypoxia by HIF hydroxylases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 617-26.
13. 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.
14. Salceda, S., et al., *Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 556-9.
15. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
16. Nakayama, K. and Z. Ronai, *Siah: new players in the cellular response to hypoxia*. Cell Cycle, 2004. **3**(11): p. 1345-7.
17. Lando, D., et al., *A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4618-27.
18. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem. Pharmacol., 2002. **64**(5-6): p. 993-8.

19. 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.
20. Zagorska, A. and J. Dulak, *HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(3): p. 563-85.
21. Mazure, N.M., et al., *Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3436-40.
22. Karni, R., et al., *Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42919-25.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Jeong, J.W., et al., *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
27. Tanimoto, K., et al., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4298-309.
28. Bilton, R.L. and G.W. Booker, *The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation*. Eur J Biochem, 2003. **270**(5): p. 791-8.
29. Yasinska, I.M. and V.V. Sumbayev, *S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity*. FEBS Lett, 2003. **549**(1-3): p. 105-9.
30. Cho, H., et al., *Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha*. FEBS Lett, 2007. **581**(8): p. 1542-8.
31. Berta, M., C. Brahim-Horn, and J. Pouyssegur, *[Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research]*. J Soc Biol, 2004. **198**(2): p. 113-20.
32. Bae, S.H., et al., *Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(1): p. 394-400.
33. Brahim-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
34. Carbia-Nagashima, A., et al., *RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia*. Cell, 2007. **131**(2): p. 309-23.
35. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21513-8.
36. Wang, G.L., B.H. Jiang, and G.L. Semenza, *Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(2): p. 669-75.

37. Mottet, D., et al., *Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity*. Int J Cancer, 2005. **117**(5): p. 764-74.
38. Gradin, K., et al., *The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23508-14.
39. Lancaster, D.E., M.A. McDonough, and C.J. Schofield, *Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 943-5.
40. Flugel, D., et al., *Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(9): p. 3253-65.
41. Mottet, D., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31277-85.
42. 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.
43. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
44. Minet, E., et al., *ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation*. FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 53-8.
45. Triantafyllou, A., et al., *Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(4): p. 657-70.
46. Pemberton, L.F. and B.M. Paschal, *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 187-98.
47. Zhang, Y. and Y. Xiong, *A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1910-5.
48. Lee, H. and W. Bai, *Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5835-45.
49. Ikuta, T., Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, *Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19209-16.
50. Sasaki, T., et al., *Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role*. Mol Cell, 2006. **24**(1): p. 63-75.
51. 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.
52. Zhang, W., T. Tsuchiya, and Y. Yasukochi, *Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia*. J Hum Genet, 1999. **44**(5): p. 293-9.
53. Kato, H., S. Tamamizu-Kato, and F. Shibasaki, *Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41966-74.

54. 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.
55. Lyberopoulou, A., et al., *MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 995-1006.
56. Ravi, R., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
57. Fels, D.R. and C. Koumenis, *HIF-1alpha and p53: the ODD couple?* Trends Biochem Sci, 2005. **30**(8): p. 426-9.
58. Bae, M.K., et al., *Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 9-12.
59. Larsen, M., et al., *Interactions between HIF-1 and Jab1: balancing apoptosis and adaptation. Outline of a working hypothesis*. Adv Exp Med Biol, 2005. **566**: p. 203-11.
60. 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.
61. Amir, S., et al., *SEPT9_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11142-51.
62. Pollard, P.J., et al., *Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(15): p. 2231-9.
63. Berra, E., G. Pages, and J. Pouyssegur, *MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression*. Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 139-45.
64. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
65. Bardos, J.I. and M. Ashcroft, *Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling*. Bioessays, 2004. **26**(3): p. 262-9.
66. Jiang, B.H., et al., *V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5328-35.
67. Miyake, K., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation*. Pancreas, 2008. **36**(3): p. e1-9.
68. Klatte, T., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(24): p. 7388-93.
69. Bos, R., et al., *Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(6): p. 1573-81.
70. Gruber, G., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter?* Breast Cancer Res, 2004. **6**(3): p. R191-8.
71. Osada, R., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, hypoxia-inducible factor 2alpha, and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of*

- hypoxia-inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma.* Hum Pathol, 2007. **38**(9): p. 1310-20.
72. Winter, S.C., et al., *The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer.* Cancer, 2006. **107**(4): p. 757-66.
73. Fillies, T., et al., *HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor.* BMC Cancer, 2005. **5**: p. 84.
74. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
75. Sumiyoshi, Y., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5112-7.
76. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 175-205.
77. Kim, S., W. Hwang do, and D.S. Lee, *A study of microRNAs in silico and in vivo: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation.* Febs J, 2009. **276**(8): p. 2165-74.
78. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
79. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.* Rna, 2004. **10**(2): p. 185-91.
80. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.* Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
81. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans.* Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
82. Heo, I., et al., *TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation.* Cell, 2009. **138**(4): p. 696-708.
83. Hagan, J.P., E. Piskounova, and R.I. Gregory, *Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells.* Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1021-5.
84. Lehrbach, N.J., et al., *LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in Caenorhabditis elegans.* Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1016-20.
85. Jones, M.R., et al., *Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1157-63.
86. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family.* Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
87. Lee, Y.S. and A. Dutta, *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene.* Genes Dev, 2007. **21**(9): p. 1025-30.
88. Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel, *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation.* Science, 2007. **315**(5818): p. 1576-9.
89. Sampson, V.B., et al., *MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells.* Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9762-70.

90. Dangi-Garimella, S., et al., *Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7*. *Embo J*, 2009. **28**(4): p. 347-58.
91. Guo, Y., et al., *Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma*. *Gene*, 2006. **384**: p. 51-61.
92. Koshiji, M., et al., *HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc*. *Embo J*, 2004. **23**(9): p. 1949-56.
93. Zhang, H., et al., *HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(5): p. 407-20.

