

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛΗΡ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ

**Μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης του
παράγοντα που επάγεται από την υποξία HIF-1α
in vitro και σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων
μυϊκών κυττάρων αεραγωγών**

ΓΕΩΡΓΙΑ ΧΑΧΑΜΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝΑΠΛΗΡ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ

**Μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης του
παράγοντα που επάγεται από την υποξία HIF-1α
in vitro και σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων
μυϊκών κυττάρων αεραγωγών**

ΓΕΩΡΓΙΑ ΧΑΧΑΜΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων καθηγητής:

-Γεώργιος Σίμος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Μέλη:

-Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας.

-Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

-Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ

-Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Καθηγητής Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ

-Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

-Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής του Π.Θ.

-Γεώργιος Σίμος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

- Έλενα Γεωργάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

-Ευφροσύνη Παρασκευά, Λέκτορας Κυτταρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Στους γονείς μου που πάντα με στηρίζουν

*Στους καθηγητές μου Γιώργο Σίμο
και Ευφροσύνη Παρασκευά*

Στο Γιώργο που στάθηκε δίπλα μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ HIF-1α	11
1.1.1 Απόκριση των κυττάρων στην υποξία	11
1.1.2 Γονίδια στόχοι του HIF-1	12
1.1.3 Δομή του HIF-1	12
1.2 ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟΝ ARNT ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΤΟ DNA	16
1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α	19
1.3.1 Μηχανισμός ενεργοποίησης του HIF-1α σε υποξικές συνθήκες	19
1.3.2 Ενεργοποίηση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα	21
1.4 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	34
1.4.1 Μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα	34
1.4.2 Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα	38
1.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ HIF-1α	40
1.5.1 HIF-1α και καρκίνος	40
1.5.2 HIF-1α και καρδιοαγγειακές παθήσεις	43
1.5.3 HIF-1α και λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) του αναπνευστικού	44
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	47
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	48
2.1.1 Πλασμίδια και βακτηριακά στελέχη	48
2.1.2 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού	52
2.1.3 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA	53
2.1.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	53
2.1.5 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης	54
2.1.6 Αντίδραση λιγάσης	54
2.1.7 Παρασκευή βακτηρίων (<i>E.coli</i>) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	55
2.1.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων	55
2.1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E.coli</i>	56
2.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ <i>E.coli</i>	57
2.2.1 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	57
2.2.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια	58
2.2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας	58
2.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακής διήθησης	61
2.2.5 Διαπίδυση	62
2.2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	62
2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	63
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	63
2.3.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση	65

2.4	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ DNA ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΑΓΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	68
2.4.1	Παρασκευή ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου	69
2.4.2	Δοκιμασία αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας	70
2.5	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ IN VITRO ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ	70
2.6	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ	70
2.6.1	Απομόνωση λείων μυϊκών κυττάρων από τραχεία κουνελιού	71
2.6.2	Καθιέρωση καλλιιεργειών λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας	72
2.6.3	Πάγωμα κυττάρων και επανένταξη καλλιιεργειών	72
2.7	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ	73
2.7.1	In vitro διαφοροποίηση	73
2.7.2	Μελέτη της επαγωγής του HIF-1α	73
2.7.3	Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ΛΜΚ	73
2.7.4	Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμο	74
2.7.5	Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια pEGFP	75
2.7.6	Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α	76
2.8	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ IN VITRO ..	77
2.9	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ	78
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
3.1	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ (ΛΜΚΑ) ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ	80
3.1.1	Επαγωγή του HIF-1α από CoCl ₂	80
3.1.2	Ο ρόλος της πρωτεϊνοσύνθεσης	83
3.1.3	Ο ρόλος των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και του μονοπατιού της PI-3K	86
3.1.4	Ο ρόλος του NO	87
3.2	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΛΜΚΑ	88
3.2.1	Επαγωγή του HIF-1α	88
3.2.2	Διερεύνηση του ρόλου της σταθεροποίησης	91
3.2.3	Ο ρόλος της σύνθεσης του HIF-1α	92
3.2.4	Ο ρόλος των μονοπατιών της PI-3K και των MAP κινασών	94
3.2.5	Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από ορό ή CoCl ₂	96
3.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ARNT ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	98
3.3.1	Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης και παραγωγή ανασυνδυασμένου HIF-1α	98
3.3.2	Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης και παρασκευή ανασυνδυασμένου ARNT	104
3.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ HIF-1α ΚΑΙ ARNT ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΩΝ ΤΟΥΣ	106

3.4.1	Ανίχνευση του διμερισμού του HIF-1α με τον ARNT μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας	106
3.4.2	Απομόνωση του συμπλόκου HIF-1α/ARNT	108
3.4.3	Απομόνωση των συμπλόκων HIF-1α-PAS _A /ARNT-PAS _A , GST-HIF-1α/ARNT-PAS _A και GFP-HIF-1α/ARNT-PAS _A	111
3.5	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HIF-1α/ARNT ΜΕ ΤΟ DNA.....	114
3.6	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΗΝ p42 MAPK	119
3.7	ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	121
3.7.1	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός του GFP-HIF-1α σε ΛΜΚΑ	121
3.7.2	In vitro μελέτη της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα σε διαπερατά κύτταρα HeLa	122
3.7.3	Αλληλεπίδραση ιμφορτινών με τον ανασυνδυασμένο HIF-1α.....	123
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	128
4.1	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΛΜΚΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	128
4.2	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIF-1α.....	136
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	146
	SUMMARY	147
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	148
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	150
	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	167

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 με τίτλο «Μοριακοί μηχανισμοί απόκρισης στην υποξία: Ενεργοποίηση και δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1» και επιστημονικό υπεύθυνο την κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη. Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη: τις μελέτες ενεργοποίησης του HIF-1α σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας κουνελιού που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Λάρισας και στις μελέτες των μοριακών ιδιοτήτων του HIF-1α που έγιναν στο εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας.

Για την επίτευξη αυτής της εργασίας θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Σίμο, καταρχήν για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο Βιοχημείας και για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε, την υπομονή που επέδειξε και την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας. Η συνεργασία μαζί του αποτέλεσε πηγή πολύτιμων γνώσεων και σωστού τρόπου σκέψης και θεώρησης της επιστήμης της Βιοχημείας. Ευχαριστώ επίσης θερμά την Λέκτορα Κυτταρικής Φυσιολογίας κ. Ευφροσύνη Παρασκευά, κάτω από την άμεση καθοδήγηση της οποίας έγινε η μελέτη του HIF-1α στα λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας, για την συνεχή και σωστή επίβλεψη των πειραμάτων μου στο εργαστήριο Φυσιολογίας, για τις ουσιαστικές υποδείξεις και παραινέσεις της, την άψογη συνεργασία και τη σημαντική βοήθεια και ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφερε, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Η συμβολή της στην πραγματοποίηση της διατριβής μου υπήρξε καθοριστική.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη διευθύντρια του εργαστηρίου Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές της και την ουσιαστική στήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Πολλά ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Βιοχημείας: την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας και μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής κ. Έλενα Γεωργιάτσου, τον Λέκτορα Ιατρικής Χημείας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ και τον Λέκτορα Ιατρικής Βιοχημείας κ. Παναγιώτη Λιάκο για την άψογη

συνεργασία και τις χρήσιμες υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια της διατριβής. Οφείλω επίσης ειλικρινείς ευχαριστίες στον Καθηγητή Φυσιολογίας και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για το ενδιαφέρον που έδειξε για τη διατριβή μου και τις εύστοχες επισημάνσεις του.

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Κ. Γουργουλιάνη και κ. Θ. Φώτση, μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και το χρόνο που διέθεσαν διορθώνοντας τα κείμενα μου.

Ευχαριστώ τον Dr. D. Görlich (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Γερμανία) για την ευκαιρία που μου έδωσε να επισκεφθώ και να εκτελέσω πειράματα στο εργαστήριο του, καθώς και τον Dr. Jose-Manuel Mingot για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Η συμβολή τους υπήρξε πολύτιμη και ουσιαστική μεταφέροντας μου την εμπειρία τους και τις γνώσεις τους πάνω σε θέματα μεταφοράς πρωτεϊνών στον πυρήνα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Γ. Παναγιώτου και τους συνεργάτες του στο Ε.ΚΕ.Β.Ε «Α. Φλέμινγκ» για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φασματομετρίας μαζών του φωσφορυλιωμένου HIF-1α.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Α. Χατζηευθυμίου για την πολύτιμη βοήθεια της στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μου και για τη συνεργασία που μου προσέφερε.

Επίσης από το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ευχαριστώ τον κ. Η. Μυλωνή για την κλωνοποίηση και έκφραση των καρβοξυτελικών τμημάτων του HIF-1α σε βακτήρια και την κ. Α. Καλούση για την κλωνοποίηση των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τμημάτων του HIF-1α στους pBLUESCRIPT φορείς έκφρασης. Επιπλέον ευχαριστώ την κ. Π. Μηνά και τον κ. Κ. Καλοειδά για την κλωνοποίηση του cDNA του HIF-1α σε διάφορους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.

Ευχαριστίες οφείλω και σ' όλο το προσωπικό και συναδέλφους των Εργαστηρίων Βιοχημείας και Φυσιολογίας για τη συνεργασία τους και τη δημιουργία του ευχάριστου συναδελφικού κλίματος μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλω στους γονείς μου και στον αδελφό μου γιατί με την ενθάρρυνση, την αμέριστη υλική και κυρίως ηθική τους συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια μπόρεσα να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ HIF-1α

1.1.1 Απόκριση των κυττάρων στην υποξία

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη ζωή. Η σταθερότητα της γήινης βιόσφαιρας βασίζεται στην ευαίσθητη ισορροπία που εγκαθιδρύθηκε τα περασμένα 1-2 δισεκατομμύρια χρόνια, ανάμεσα στην παραγωγή μοριακού οξυγόνου από φωτοσυνθετικά φυτά και στην χρησιμοποίησή του από άλλους οργανισμούς. Παρόλο που ο κύριος ρόλος του ατμοσφαιρικού οξυγόνου είναι να δρα ως αποδέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση βιολογικών υποστρωμάτων, με την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας, το οξυγόνο επηρεάζει πολλές άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Η έλλειψη οξυγόνου (υποξία) έχει σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργία των κυττάρων και θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση τους, κυρίως λόγω ανεπάρκειας ATP. Η έκθεση σε μεγάλες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υπεροξία) είναι επίσης τοξική, ιδιαίτερα για τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA, λόγω της δημιουργίας δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Για αυτούς τους λόγους κατά την εξέλιξη οι οργανισμοί ανέπτυξαν διάφορους μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου σε κυτταρικό και συστηματικό επίπεδο. Οι μηχανισμοί αυτοί δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να αισθάνονται και να προσαρμόζονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης οξυγόνου [1-3].

Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έδειξαν ότι τα κύτταρα θηλαστικών αποκρίνονται στη μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου με αλλαγές της έκφρασης ορισμένων γονιδίων. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων δρουν αντιρροπιστικά και μειώνουν τις επιπτώσεις της υποξίας, προάγοντας κυρίως τον αναερόβιο μεταβολισμό και αυξάνοντας την ερυθροποίηση, το ρυθμό αναπνοής, την αγγειοδιαστολή και την αγγειογένεση [4-7]. Συγκεκριμένα η αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν για γλυκολυτικά ένζυμα και μεταφορείς γλυκόζης, στα πλαίσια της μειωμένης παροχής οξυγόνου, έχει ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της αναερόβιας παραγωγής ATP. Η αύξηση της παραγωγής ερυθροποιητίνης και της υδροξυλάσης της τυροσίνης προάγει την ερυθροποίηση και το ρυθμό αναπνοής αντίστοιχα, αυξάνοντας τα επίπεδα του οξυγόνου στο αίμα. Η επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και την επαγωγίμη συνθάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS) οδηγούν σε αυξημένη αγγειογένεση και αγγειοδιαστολή. Η επαγωγή από την υποξία των διαφορετικών

αυτών γονιδίων, ορισμένα από τα οποία εκφράζονται γενικά και ορισμένα ιστοειδικά, φαίνεται ότι εξαρτάται από ένα κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, τον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1).

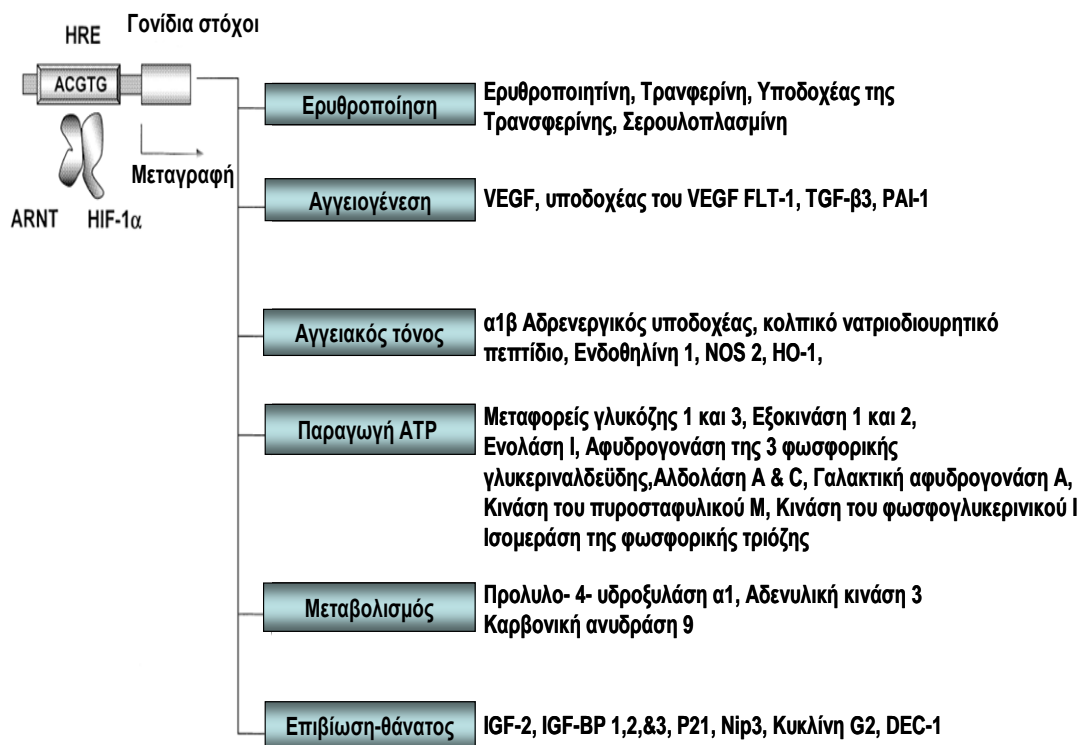
1.1.2 Γονίδια στόχοι του HIF-1

Ο HIF-1 επάγει την μεταγραφή περισσότερων από 60 γονιδίων που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στόχο έχουν την κυτταρική και φυσιολογική απόκριση στο υποξικό στρες (**Εικ. 1**). Το κοινό όλων αυτών των γονιδίων είναι ότι περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία ή HRE (Hypoxia Response Elements) στα οποία συνδέεται ο HIF-1 [8, 9]. Τα HRE εντοπίζονται μέσα στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων του HIF-1 και περιέχουν την αλληλουχία (A/G)CGTG που είναι και το κατεξοχήν στοιχείο σύνδεσης στον HIF-1. Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται γονίδια των οποίων τα προϊόντα επιδρούν σε λειτουργίες όπως η ερυθροποίηση και η μεταφορά σιδήρου στους ιστούς. Μια άλλη ομάδα γονιδίων που ελέγχονται από τον HIF-1 κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αύξηση και λειτουργία του αγγειακού συστήματος και την προσαρμογή του αγγειακού τόνου. Επιπλέον ο HIF-1 επάγει γονίδια των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στον αναερόβιο μεταβολισμό και την παραγωγή ATP. Τέλος επιδρά στην μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

1.1.3 Δομή του HIF-1

Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές δύο bHLH-PAS πρωτεϊνών: Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 (HIF-1) δεν υπάρχει σε μονοκυττάριους οργανισμούς και εμφανίζεται κατά την εξέλιξη στα έντομα. Πρωτοανακαλύφθηκε το 1992 μέσω της ανάλυσης των μοριακών μηχανισμών επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) από την υποξία. Αρχικά ανακαλύφθηκε ότι μια αλληλουχία στον 3' ενισχυτή του γονιδίου προκαλούσε ενεργοποίηση της μεταγραφής σε συνθήκες υποξίας [11-14] και συνδεόταν σε μια άγνωστη ως τότε πρωτεΐνη [14]. Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε από στήλη αγκιστείας που περιείχε ακινητοποιημένη την DNA αλληλουχία του ενισχυτή της EPO καιδείχθηκε πως αποτελούνταν από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 120-130 kD και 91-94 kD, οι οποίες προσδιορίστηκαν ως HIF-1α και HIF-1β αντίστοιχα [15]. Μελέτες της δομής του HIF-1 έχουν δείξει ότι

οι δύο υπομονάδες του περιέχουν δυο χαρακτηριστικές περιοχές: μία περιοχή με μοτίβο έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH: basic Helix-Loop-Helix) καθώς και την περιοχή PAS. Οι bHLH περιοχές είναι υπεύθυνες για το διμερισμό και την σύνδεση



Εικόνα 1: Γονίδια στόχοι του HIF-1α [10].

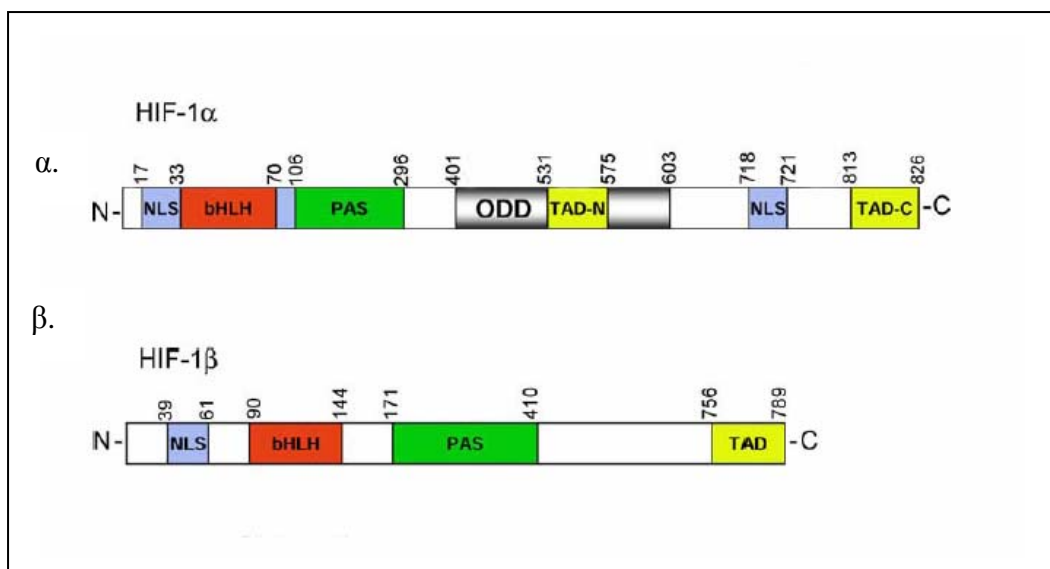
ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Το όνομα της περιοχής PAS προήλθε από τα πρώτα γνωστά μέλη της οικογένειας: των γονιδίων period (Per) και single-minded (Sim) της *Drosophila* και των γονιδίων aryl hydrocarbon receptor (AHR) και aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) των θηλαστικών [15]. Η περιοχή PAS περιέχει δύο εσωτερικές ομόλογες υποπεριοχές τις A και B που έχουν βασικά αμινοξέα και οι οποίες εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών.

HIF-1α: Ο HIF-1α είναι μία πρωτεΐνη 826 αμινοξέων (**Εικ. 2α**) η οποία εμφανίζει μέγεθος 100-120 kDa κατά την ηλεκτροφόρηση της σε αποδιατακτική πηκτή (SDS-PAGE). Στο αμινοτελικό του άκρο περιέχει μια περιοχή βασικών αμινοξέων (17-30) την περιοχή HLH (αμινοξέα 31-71) και την περιοχή PAS (αμινοξέα 85-298) με τις A (85-158) και B (228-298) υποπεριοχές [15]. Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται δύο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, οι N-TAD (N-terminal transactivation

domain, αμινοξέα 531-575) και C-TAD (C-terminal transactivation domain, αμινοξέα 786-826). Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει επίσης μια περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (ODD: oxygen dependent degradation domain, αμινοξέα 401-603) και η οποία περιέχει δυο μοτίβα PEST, περιοχές δηλαδή πλούσιες σε αμινοξέα προλινών, γλουταμινικού οξέος, σερίνης και θρεονίνης (αμινοξέα 499-518 και 581-600) [16, 17]. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear localization signals) τα N-NLS (αμινοξέα 17-74) και C-NLS (αμινοξέα 718-721) [18].

HIF-1β: Ο HIF-1β είναι ταυτόσημος με την πρωτεΐνη ARNT η οποία έχει την ικανότητα να ετεροδιμερίζεται με τον παράγοντα AHR προς σχηματισμό του λειτουργικού υποδοχέα της διοξίνης. Εντοπίζεται σε δυο ισομορφές των 774 και 789 αμινοξέων οι οποίες εμφανίζουν μεγέθη 92 και 94 kDa αντίστοιχα κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε αποδιατακτική πηκτή (SDS-PAGE). Οι δυο αυτές ισομορφές διαφέρουν σε ένα εξόνιο μήκους 45 βάσεων. Και ο ARNT περιέχει περιοχές bHLH (αμινοξέα 90-144) και PAS (αμινοξέα 171-410) καθώς και μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο τη C-TAD (αμινοξέα 756-789) (*Εικ. 2β*).

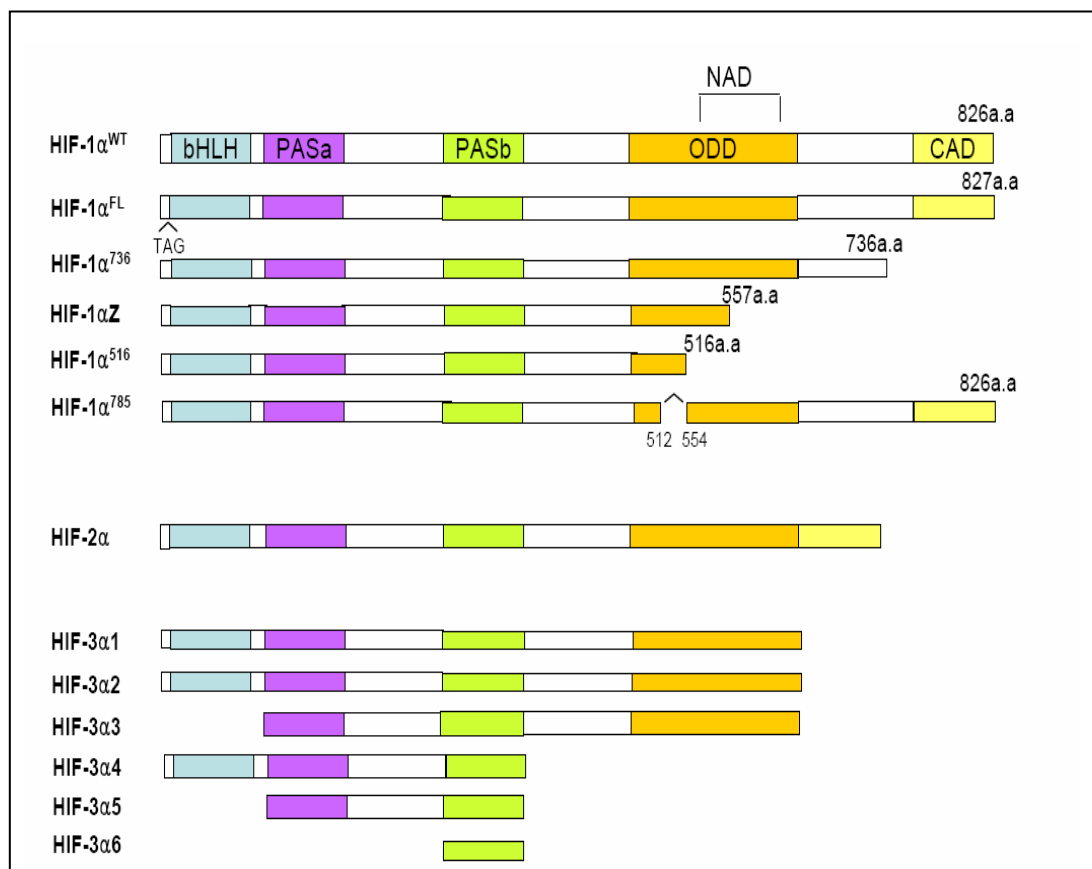
HIF-2α/HIF-3α: Εκτός του HIF-1α υπάρχουν άλλα δύο μέλη της οικογένειας των bHLH-PAS πρωτεϊνών: ο HIF-2α ονομαζόμενος και EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1) και ο HIF-3α [19]. Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες μεταξύ τους και αποικοδομούνται σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου με όμοιο τρόπο με αυτό του HIF-1α, όμως ο ειδικός ρόλος τους δεν είναι λεπτομερώς γνωστός. Είναι γνωστό πως ο HIF-2α επάγει τη μεταγραφή γονιδίων μετά από υποξία (όπως αυτό του VEGF). Η δράση των διαφόρων μελών της οικογένειας των HIF παραγόντων διαφέρει σε αρκετούς τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα ενώ τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α εκφράζονται σε αφθονία στους νεφρούς, η υπερέκφραση του HIF-2α και όχι του HIF-1α επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων του νεφρικού καρκινώματος. Ωστόσο στην περίπτωση κυτταρικών σειρών από καρκίνο του μαστού ο HIF-1α είναι η κύρια πρωτεΐνη της οικογένειας των HIF παραγόντων που απαιτείται για την επαγωγή των γονιδίων στόχων της υποξίας [20].



Εικόνα 2: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α (α) και HIF-1β (β). Φαίνονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα οι περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA. Οι περιοχές ενεργοποίησης φαίνονται με κίτρινο και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) με μπλέ χρώμα. Η θέση της ODD φαίνεται με γκρι χρώμα [17].

Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος: Οι πρωτεΐνες HIF-1α και HIF-3α παρουσιάζονται με τη μορφή διαφόρων προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος (**Εικ. 3**). Όσον αφορά στο HIF-1α έχουν μέχρι στιγμής αναφερθεί στη βιβλιογραφία 5 ισομορφές του. Η ισομορφή HIF-1α^{FL} διαφέρει από την κανονική HIF-1α σε 3 επιπλέον βάσεις TAG που περιέχονται μεταξύ των εξονίων 1 και 2. Η HIF-1α⁷³⁶ έχει χάσει το εξόνιο 14 με αποτέλεσμα να μην περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης του καρβοξυτελικού άκρου. Η HIF-1α^{FL} και η HIF-1α⁷³⁶ ενεργοποιούν τον υποκινητή του VEGF στην υποξία [22]. Σε αντίθεση με τις δυο αυτές μορφές ο HIF-1α⁵⁵⁷ (HIF-1αZ) και ο HIF-1α⁵¹⁶ δρουν σαν επικρατείς αρνητικές μορφές του HIF-1α. Η HIF-1αZ δεν περιέχει το εξόνιο 12 και η HIF-1α⁵¹⁶ δεν έχει τα εξόνια 11 και 12 [23, 24]. Η πρόσφατα γνωστή HIF-1α⁷⁸⁵ δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής αλλά στερείται του εξονίου 11 στην ODD περιοχή [20, 25]. Για τον ανθρώπινο HIF-3α έχουν αναφερθεί επίσης αρκετές ισομορφές. Τα hHIF-3α1, 2 και 3 περιέχουν την ODD περιοχή. Ένας αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α ο IPAS (inhibitory PAS domain protein) ανακαλύφθηκε ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του HIF-3α (HIF-3α2) [21]. Ο IPAS εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT λόγω του διμερισμού του HIF-1α με το IPAS. Το HIF-1α/IPAS σύμπλοκο δεν έχει την ικανότητα

δέσμευσης στο HRE. Για το λόγο αυτό ο IPAS και γενικότερα ο HIF-3α θεωρούνται ως αναστολείς της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α.

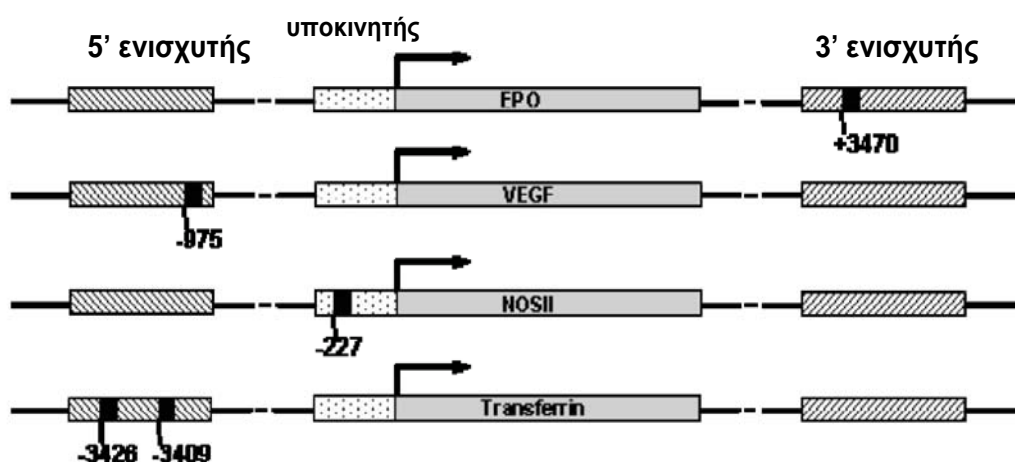


Εικόνα 3: Τα γονίδια της οικογένειας των α υπομονάδων του HIF και τα προϊόντα εναλλακτικού splicing τους. Φαίνονται με γαλάζιο οι bHLH περιοχές, με μοβ και πράσινο οι PAS περιοχές, με πορτοκαλί η ODD περιοχή και με κίτρινο η περιοχή ενεργοποίησης στο καρβοξυτελικό άκρο [20].

1.2 ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟΝ ARNT ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΤΟ DNA

Στοιχεία σύνδεσης στο DNA: Προκειμένου ο HIF-1 να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του πρέπει να συνδεθεί σε μια περιοχή του DNA τους που είναι γνωστή ως HRE (Hypoxia Response Element). Τα HRE εντοπίζονται μέσα στους υποκινητές ή στους ενισχυτές (που βρίσκονται στο 5' ή στο 3' άκρο ή και στο εσωτερικό) των γονιδίων στόχων του HIF-1 (**Εικ. 4**). Η περιοχή HRE περιέχει την αλληλουχία (A/G)CGTG η οποία είναι το κατεξοχήν στοιχείο σύνδεσης στο HIF-1 και ονομάζεται HBS (Hypoxia Binding Site). Θεωρείται πως το στοιχείο HBS είναι η ελάχιστη αλληλουχία που απαιτείται για τη σύνδεση του HIF-1 στο DNA. Η

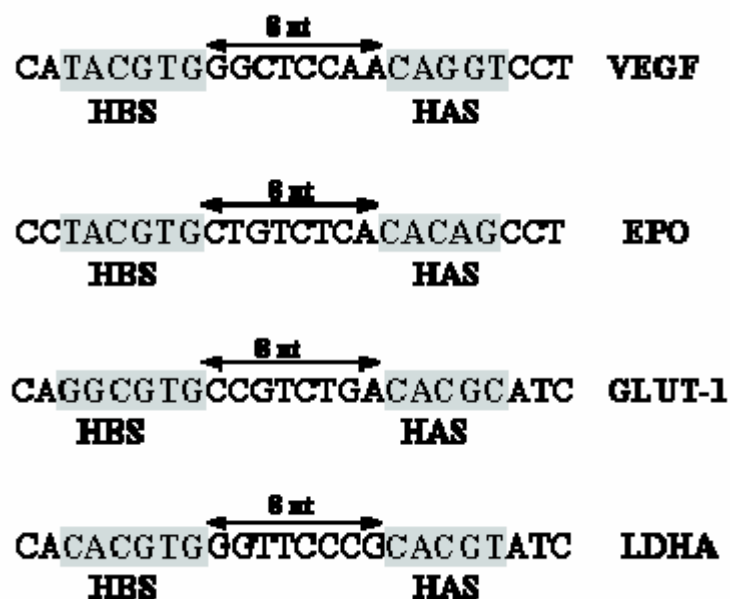
πλειονότητα των γονιδίων στόχων του HIF-1 περιέχουν και μια άλλη χαρακτηριστική αλληλουχία που ονομάζεται HAS (HIF-1 Ancillary Sequence) και η οποία εντοπίζεται μέσα στην HRE περιοχή, 8 με 9 νουκλεοτίδια εμπρός ή πίσω από τα HBS. Η HAS είναι μια ατελής ανάστροφη επανάληψη του HBS (**Εικ. 5**) η οποία θεωρείται απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων από τον HIF-1 [26]. Φαίνεται λοιπόν πως η δευτεροταγής δομή του HRE στοιχείου είναι κρίσιμη για την λειτουργία του ως ενεργοποιητή της μεταγραφής, ενώ είναι γνωστό πως στο HAS στοιχείο συνδέονται και άλλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα εκτός του HIF-1 [26].



Εικόνα 4: Εντοπισμός των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HRE) σε διάφορα γονίδια στόχους του HIF-1. Το στοιχείο HRE μπορεί να βρίσκεται στην 5' (στο VEGF και στην τρανσφερίνη) ή στην 3' (EPO) περιοχή του ενισχυτή ή μέσα στον υποκινητή (NOSII) γονιδίων στόχων [9].

Η CpG αλληλουχία που βρίσκεται στο στοιχείο HBS πιστεύεται πως μεθυλιώνεται οδηγώντας έτσι στην αναστολή της σύνδεσης του HIF-1[27]. Η μεθυλίωση της συγκεκριμένης περιοχής πιθανόν να παρεμποδίζεται από τη σύνδεση άλλων πρωτεϊνών πάνω στο HBS. Πιθανόν η μεθυλίωση του HBS χρησιμεύει σαν ρυθμιστικός μηχανισμός της ιστοειδικής έκφρασης γονιδίων από την υποξία [27].

Ετεροδιμερισμός και σύνδεση στο DNA: Με πειράματα αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA: electrophoretic mobility shift assay)δείχθηκε πως ο HIF-1α παραγόμενος με in vitro μετάφραση από εκχύλισμα δικτυοκυττάρων (reticulocyte lysate) δεν μπορεί από μόνος του να συνδεθεί σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει την HRE περιοχή του ενισχυτή του γονιδίου της



Εικόνα 5: Στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) των VEGF, EPO, GLUT-1 (Μεταφορέας Γλυκόζης 1) και LDHA (Γαλακτική αφυδρογονάση Α) γονιδίων. Φαίνονται οι περιοχές HBS (Hypoxia Binding Site) και HAS (HIF-1 Ancillary Sequence) καθώς και οι θέσεις τους μέσα στα HRE [26].

ερυθροποιητίνης. Αντίθετα παρουσία του ARNT ο HIF-1α μπορεί να ετεροδιμεριστεί μαζί του in vitro και να συνδεθούν στο DNA [28]. Με παρόμοια πειράματα δείχθηκε πως ο ενδογενής HIF-1 που συνδέεται σε DNA από πυρηνικά εκχυλίσματα υποξικών κυττάρων περιέχει τόσο τον HIF-1α όσο και τον ARNT [15].

Η bHLH μαζί με την PAS_A περιοχή είναι απαραίτητες για τον διμερισμό των δύο παραγόντων. Επιπλέον για τη σύνδεση του HIF-1 στο DNA απαιτούνται και οι δυο παραπάνω περιοχές αλλά φαίνεται πως η ύπαρξη ολόκληρης της PAS περιοχής οδηγεί στην βέλτιστη πρόσδεση. Ιδιαίτερα η βασική περιοχή αμινοξέων (4-27αα) είναι απολύτως αναγκαία για τη σύνδεση στο DNA [28].

Μελέτες υποστηρίζουν πως κατά το διμερισμό του με τον ARNT ο HIF-1α υπόκειται σε μια αλλαγή διαμόρφωσης. Η αλλαγή αυτή οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα του HIF-1α σε πρωτεολυτική πέψη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως αν και μικρά αμινοτελικά τμήματα του ARNT (αμινοξέα 1-140 και 1-407) μπορούν να ετεροδιμεριστούν με τον HIF-1α δεν προκαλούν αυτή την αλλαγή διαμόρφωσης και δεν δημιουργούν σύμπλοκο ικανό για σύνδεση στο DNA. Αυτό υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβοξυτελικών περιοχών των δυο υπομονάδων του HIF-1 πιθανόν επιδρούν τόσο στη στερεοδιαμόρφωση τους όσο και στην ικανότητα σύνδεσης τους στο DNA παρόλο που δεν συμμετέχουν άμεσα σε

αυτόν [29]. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί πως ο HIF-1α δεν μπορεί να πάρει την κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση κατά το διμερισμό του με τον ARNT απουσία της πρωτεΐνης Hsp90 [29-31].

Συνοψίζοντας, φαίνεται πως για τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και τη σύνδεση στο DNA απαιτείται η bHLH μαζί με την PAS περιοχή των δυο παραγόντων. Είναι όμως πιθανόν σε αυτή τη διαδικασία να παίζει σημαντικό ρόλο η γενικότερη στερεοδιαμόρφωση του HIF-1α. Επιπλέον οι καρβοξυτελικές περιοχές των δυο παραγόντων πιθανόν να συμμετέχουν έμμεσα τόσο στη διαμόρφωση του μορίου του HIF-1α όσο και στη σύνδεση του στο DNA. Μέχρι στιγμής όμως ο ακριβής ρόλος των καρβοξυτελικών τμημάτων των δυο μορίων στη σύνδεση στο DNA αποτελεί ένα μεγάλο ερώτημα. Επίσης δεν είναι γνωστό αν κάποιοι άλλοι παράγοντες όπως οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α έχουν κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδρασή του με τον ARNT και στη σύνδεση του ετεροδιμερούς στο DNA. Γενικότερα το συγκεκριμένο κομμάτι του μηχανισμού δράσης του HIF-1α βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα.

1.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

1.3.1 Μηχανισμός ενεργοποίησης του HIF-1α σε υποξικές συνθήκες

Η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 γίνεται μέσω της α-υπομονάδας και κυρίως μέσω της σταθεροποίησης της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα υπό φυσιολογικές συνθήκες O₂ αν και οι δυο υπομονάδες του HIF-1 (HIF-1α και ARNT) μεταγράφονται και μεταφράζονται συνεχώς, ο HIF-1 δεν είναι ενεργός εξαιτίας της ταχείας αποικοδόμησης του HIF-1α (ημιζωή < 5 min). Στην υποξία η αποικοδόμηση αναστέλλεται, ο HIF-1α σταθεροποιείται, εισάγεται στον πυρήνα όπου εκεί αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα του ARNT μέσω των bHLH-PAS περιοχών και προσδένονται στο DNA. Στη συνέχεια αλληλεπιδρά με διάφορους γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως η CBP/p300, ο SRC-1 και ο TIF-2 μέσω της σύνδεσης τους στις TAD περιοχές του και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (*Εικ. 6*) [33].

Αποικοδόμηση: Σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου ο HIF-1α ουβικιτινιώνεται και αποικοδομείται μέσω της 26S υπομονάδας του πρωτεοσώματος [34]. Στην ουβικιτινίωση του HIF-1α κύριο ρόλο παίζει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel-Lindau (pVHL), η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με την ODD περιοχή του HIF-1α [35]. Η VHL αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Elongin B, C,

Cullin2 και RBX1 σχηματίζοντας έτσι το σύμπλεγμα της E3 λιγάσης που προκαλεί τελικά την ουβικιτινίωση του HIF-1α. Η απενεργοποίηση της VHL σχετίζεται με το σύνδρομο Von Hippel-Lindau, μιας κληρονομικής μορφής καρκίνου η οποία χαρακτηρίζεται από συνεχή έκφραση του HIF-1α εξαιτίας της μη ουβικιτινίωσης και μη αποικοδόμησης του [36].

Η αλληλεπίδραση μεταξύ VHL και HIF-1α εξαρτάται από το O₂: Η σύνδεση HIF-1α/VHL προϋποθέτει μια μεταμεταφραστική τροποποίηση, την υδροξυλίωση των προλινών στις θέσεις 402 και 564 του HIF-1α, η οποία πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου [36]. Η υδροξυλίωση των προλινών οδηγεί σε δέσμευση της VHL στην ODD περιοχή και σε επακόλουθη ουβικιτινίωση του HIF-1α. Τα αμινοξέα στις θέσεις 402 και 564 βρίσκονται σε μια αμινοξική περιοχή με μοτίβο LXXLAP. Έχειδειχθεί πως η Leu⁵⁶² της συγκεκριμένης περιοχής είναι απαραίτητη για την υδροξυλίωση της Pro⁵⁶⁴ [36]. Σε υποξικές συνθήκες η υδροξυλίωση δεν συμβαίνει εξαιτίας μείωσης του οξυγόνου και ο VHL δεν δεσμεύεται στον HIF-1α με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α [37].

HIF-1α προλυλο-υδροξυλάσες: Η υδροξυλίωση των προλινών της ODD περιοχής του HIF-1α καταλύεται από τις HIF-1α προλυλο-υδροξυλάσες. Τα ένζυμα αυτά είναι μέλη της υπεροικογένειας των διοξυγενασών, περιέχουν Fe⁺² και απαιτούν κετογλουταρικό και ασκορβικό για τη δράση τους. Το μοριακό οξυγόνο αποτελεί υπόστρωμα των ενζύμων αυτών ενώ τα παραπροϊόντα της αντίδρασης είναι το CO₂ και το ηλεκτρικό οξύ. Η δράση των προλυλο-υδροξυλασών μοιάζει με τη δράση των γνωστών προλυλο-υδροξυλασών του προκολλαγόνου [38, 39].

Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν αρχικά σαν προϊόντα του γονιδίου *egl-9* του *Caenorhabditis elegans* [40]. Αργότερα ανακαλύφθηκαν τρία ομόλογα της Egl-9 στα θηλαστικά οι λεγόμενες PHDs 1, 2 και 3 (PH-domain containing proteins). Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες διαφέρουν στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους. Η PHD1 ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD2 στο κυτταρόπλασμα ενώ η PHD3 βρέθηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα [41]. Επιπλέον η αποσιώπηση της PHD2 χρησιμοποιώντας siRNA σταθεροποίησε τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας, ενώ αντίστοιχη αποσιώπηση των PHD1 και PHD3 δεν είχε καμία επίδραση, δείχνοντας πως πιθανόν το κύριο ένζυμο για την υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α είναι η PHD2 [42].

Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε και μια τέταρτη PHD [43]. Όλα αυτά τα ένζυμα υδροξυλιώνουν την Pro⁵⁶⁴ ενώ μόνο οι PHD1 και 2 υδροξυλιώνουν την Pro⁴⁰².

Σύμφωνα με μελέτες τόσο το mRNA όσο και η πρωτεΐνη PHD2 επάγονται από την υποξία σε πολλούς τύπους κυττάρων, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη ενός αρνητικού μηχανισμού ανάδρασης [44].

Υδροξυλίωση Ασπαραγίνης: Εκτός από την υδροξυλίωση των προλινών του HIF-1α λαμβάνει χώρα και μια άλλη υδροξυλίωση παρουσία μοριακού οξυγόνου που είναι η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης στη θέση 803 του καρβοξυτελικού άκρου του HIF-1α. Η υδροξυλίωση αυτή γίνεται από την πρωτεΐνη FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1, παράγοντας αναστολής του HIF-1) η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α [45-48]. Η FIH-1 είναι και αυτή μέλος της υπερικογενείας των διοξυγενασών και απαιτεί Fe^{+2} και κετογλουταρικό για τη δράση της καθώς και βιταμίνη C για τη διατήρηση του σιδήρου στη δισθενή κατάσταση [46]. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης αυτής στο καρβοξυτελικό άκρο καταργεί την δέσμευση της p300 στον HIF-1α με αποτέλεσμα να μένει μεταγραφικά ανενεργός.

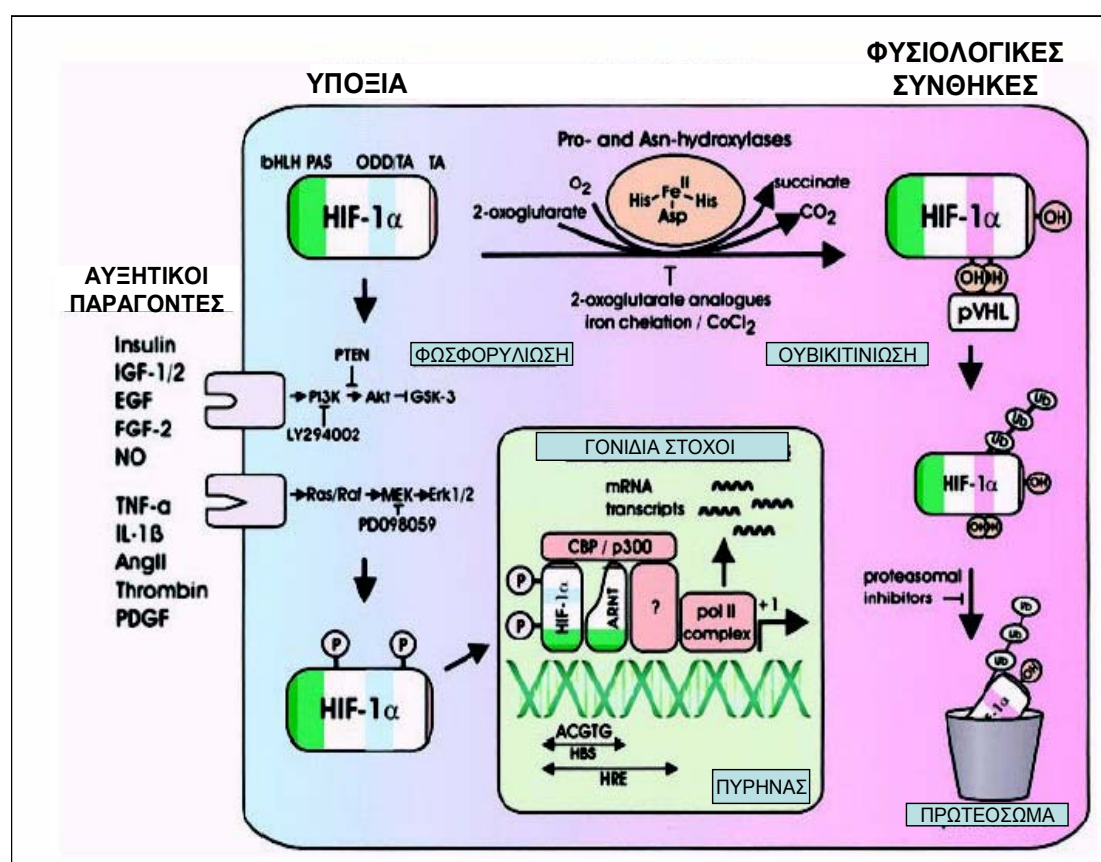
Συνοπτικά φαίνεται πως η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή για τη δράση του HIF-1α. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες, ουβικιτινιώνεται μέσω του συμπλόκου της E3 λιγάσης και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα, ενώ ταυτόχρονα η μεταγραφική του ικανότητα αναστέλλεται. Αντίθετα όταν το οξυγόνο μειώνεται σε συνθήκες υποξίας, τα παραπάνω ένζυμα είναι ανενεργά με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α λόγω αναστολής της πρωτεόλυσής του και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας.

1.3.2 Ενεργοποίηση του HIF-1α από μη υποξικά ερεθίσματα

1.3.2.1 Δεσφериοξαμίνη και Κοβάλτιο

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

Έχει παρατηρηθεί πως δισθενή μέταλλα όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο προκαλούν επαγωγή του HIF-1α [15]. Ιδιαίτερα για το κοβάλτιο η ακριβής δράση του στην επαγωγή του HIF-1α δεν είναι λεπτομερώς γνωστή. Είναι πιθανόν το κοβάλτιο να αντικαθιστά το σίδηρο στο ενεργό κέντρο των υδροξυλασών αναστέλλοντας έτσι τα συγκεκριμένα ένζυμα και προκαλώντας τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Παρόλα αυτά το κοβάλτιο ίσως να έχει και άλλους ρόλους αφού σε μια μελέτη φαίνεται να αλληλεπιδρά και άμεσα με τον HIF-1α αναστέλλοντας την σύνδεση του με τον VHL [49].



Εικόνα 6: Μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α σε νορμοξία, υποξία ή υπο την επίδραση αυξητικών παραγόντων, ορμονών ή κυτοκινών. Ο HIF-1α σε νορμοξία υδροξυλιώνεται από τις προλυλ-υδροξυλάσες και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα. Στην υποξία ή υπο την επίδραση παραγόντων όπως η DFO και το CoCl_2 τα ένζυμα αυτά καθίστανται ανενεργά, ο HIF-1α σταθεροποιείται και μετακινείται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με τον ARNT, τη CBP/p300 και άλλους παράγοντες επάγοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες επιδρούν στον HIF-1α είτε μέσω αύξησης της σύνθεσης του από το PI3K μονοπάτι ή μέσω τροποποιήσεων του ενεργοποιώντας τις ERK 1 και 2 κινάσες [27].

1.3.2.2 *Αυξητικοί παράγοντες*

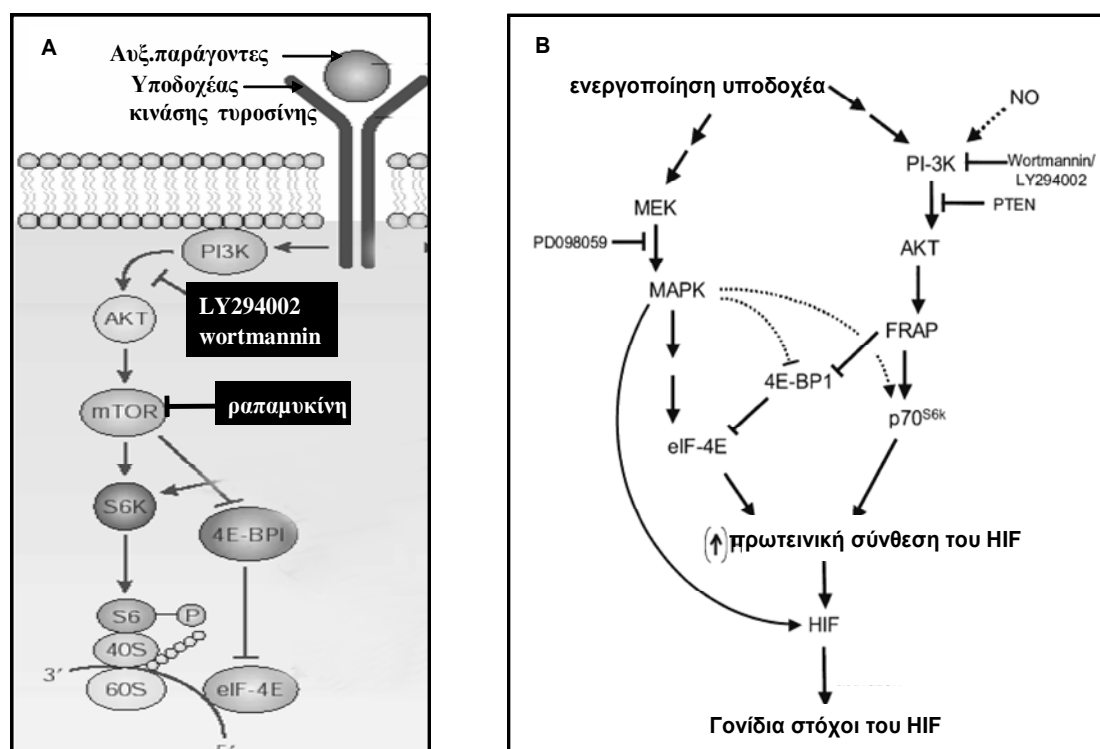
Η επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων, όπως η ινσουλίνη, ο IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) και IGF-2 (Insulin-like Growth Factor-2), ο EGF (Epidermal Growth Factor), ο PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) [50, 51], κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-1 και ο TNF α (Tumor Necrosis Factor α) [52] αγγειακών ορμονών, όπως η αγγειοτενσίνη και η θρομβίνη [51, 53] και ιικών πρωτεϊνών [54, 55] οδηγούν σε επαγωγή και ενεργοποίηση του HIF-1 α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Αντίθετα με την υποξία, ο μηχανισμός που οδηγεί στην παρατηρούμενη μη υποξική επαγωγή ενέχει συνήθως την αύξηση της σύνθεσης του HIF-1 α . Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του HIF-1 α δεν φαίνεται να αναστέλλεται, αντίθετα παρατηρείται αύξηση είτε της σύνθεσης είτε κυρίως της μετάφρασης του mRNA του η οποία είναι ικανή να οδηγήσει σε συσσώρευση της πρωτεΐνης λόγω μετακίνησης της ισορροπίας σύνθεσης-αποικοδόμησης προς την πλευρά της πρώτης.

Μελέτες έδειξαν πως η αύξηση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1 α εμπλέκει την PI-3K (κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης). Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και η πρόσδεση αυτή είναι το εναρκτήριο σήμα για μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλίσεων. Αρχικά μέσω της κινάσης της τυροσίνης ενεργοποιείται η PI-3K η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης και συγκεκριμένα τη φωσφορυλίωση της PIP₂ σε PIP₃ (3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt (γνωστή και ως PKB). Η ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή της Akt εν συνεχεία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη mTOR (Target Of Rapamycin, γνωστή και σαν FRAP). Η ενεργή TOR φωσφορυλιώνει την 4E-BP1 απενεργοποιώντας την. Η ενεργή 4E-BP1 συνδέεται στην πρωτεΐνη eIF-4E εμποδίζοντας την να συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης eIF-4F. Έτσι η απενεργοποίηση της 4E-BP1 από το μονοπάτι της PI-3K έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του μεταφραστικού μηχανισμού του κυττάρου. Επιπλέον έχει προταθεί πως η ενεργή TOR φωσφορυλιώνει την κινάση p70S6 η οποία φωσφορυλιώνει την υπομονάδα S6 της ριβοσωμικής πρωτεΐνης 40S. Η φωσφορυλίωση της S6 αυξάνει τη μετάφραση των mRNA τα οποία έχουν στο 5' άκρο τους περιοχή 4-14 πυριμιδινών. Ένα τέτοιο mRNA είναι και του HIF-1 α (**Εικ. 7A**, [56]). Πιθανόν ο παραπάνω μηχανισμός δράσης του μονοπατιού της PI-3K να οδηγεί στην επαγωγή του HIF-1 α από ορμόνες

όπως η αγγειοτενσίνη II, η θρομβίνη, η ινσουλίνη και η ενδοθηλίνη σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [57] και από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στα μακροφάγα [58]. Το μονοπάτι της PI-3K αναστέλλεται από τις ουσίες LY294002 και βορτμανίνη (wortmannin), οι οποίες αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της Akt από την PI-3K. Κατεργασία λείων μυϊκών κυττάρων αγγείων με τους παραπάνω αναστολείς οδήγησε σε μείωση των επιπέδων του HIF-1α που παρατηρήθηκαν μετά τη δράση της αγγειοτενσίνης υποδεικνύοντας τη δράση του μονοπατιού της PI-3K στην παρατηρούμενη επαγωγή [57]. Η ενεργοποίηση της Akt αναστέλλεται από την φωσφατάση PTEN η οποία χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Η υπερέκφραση της PTEN οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του HIF-1α, ενώ έλλειψη της PTEN σχετίζεται με δημιουργία όγκων και αυξημένη αγγειογένεση πιθανόν λόγω συνεχούς έκφρασης του HIF-1α [59]. Η φωσφορυλίωση της TOR αναστέλλεται αντίστοιχα από τη δράση της ραπαμυκίνης.

Θεωρείται πως οι ορμόνες όπως η αγγειοτενσίνη II και τα LPS αυξάνουν και το ρυθμό της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α εκτός από τη δράση τους στη μετάφραση του mRNA του [51, 58]. Η αύξηση αυτή της γονιδιακής μεταγραφής πιθανόν υποβοηθείται από την ενεργοποίηση της PKC (protein kinase C) μέσω δράσης της διακυκλο γλυκερόλης (DAG) [57].

Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί πως οι αυξητικοί παράγοντες και οι αγγειοδραστικές ορμόνες ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών (Mitogen-Activated protein kinases) [60, 61]. Ως μονοπάτι των MAP κινασών χαρακτηρίζεται μια ακολουθία πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στην μοριακή σηματοδότηση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι γνωστότερες MAP κινάσες είναι οι ERK. Η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων κινασών γίνεται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων της τυροσίνης, των RAS/RAF και MEK κινασών (**Εικ. 6 και 7B**). Χρησιμοποιώντας αναστολείς του παραπάνω μονοπατιού όπως το PD98059 παρατηρήθηκε πως μειώθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του παρέμειναν ανέπαφα [60]. Οι p42-44 MAP κινάσες (ERK1 και 2) φωσφορυλιώνουν τον παράγοντα eIF-4E ενώ φαίνεται να δρουν και στην απενεργοποίηση της 4E-BP1 και στην φωσφορυλίωση της p70^{s6k} [62]. Για αυτό το λόγο θεωρείται πως το μονοπάτι των MAP κινασών μπορεί να δρα και στην αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης του HIF-1α με μηχανισμό παρόμοιο με αυτό της PI-3K που αναφέρθηκε παραπάνω (**Εικ. 7**).



Εικόνα 7: Α) Απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης, των αναστολέων του μονοπατιού και της δράσης του στην αύξηση του μεταφραστικού μηχανισμού μέσω ενεργοποίησης της S6 ριβοσωμικής υπομονάδας και απενεργοποίησης της 4E-BP1. Β) Το μονοπάτι της PI3K δρα στην αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης της p70^{S6k} και αναστολής της 4E-BP1. Αντίθετα το μονοπάτι των MAP κινασών φέρεται να δρα στην αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α αλλά και στην αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης eIF-4E και πιθανής αναστολής της 4E-BP1 και ενεργοποίησης της p70^{S6k} [56].

Εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες, έχει βρεθεί πως και η υποξία προκαλεί την ενεργοποίηση των MAP κινασών σε διάφορες κυτταρικές σειρές [62, 63]. Μολαταύτα, η ενεργοποίηση των MAP κινασών στην υποξία δεν απαιτείται πάντα για την ενεργοποίηση του HIF-1α [64]. Θεωρείται λοιπόν πως οι MAP κινάσες είναι υπεύθυνες κυρίως για την μη υποξική ενεργοποίηση του HIF-1α. Τέλος και άλλες κινάσες όπως οι p38α, p38γ και η JNK φαίνεται να εμπλέκονται στην δράση του HIF-1α [65] αλλά ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη.

1.3.2.3 Μιτοχόνδρια και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Η εμπλοκή των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση του HIF-1α αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας. Ειδικότερα οι μελέτες εστιάζονται στο ρόλο των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη σταθερότητα του HIF-1α. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν πως τα μιτοχόνδρια δρουν σαν αισθητήρες οξυγόνου αυξάνοντας τη δημιουργία ROS στην υποξία και προκαλώντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία οδηγούν σε επαγωγή του HIF-1α [66, 67]. Έκθεση κυττάρων σε ουσίες που παράγουν ROS όπως το H_2O_2 , το βανάδιο, το χρώμιο, η ακτινοβολία, ο TNF-α, η AngII, και η υπερέκφραση της NAD(P)H οξειδάσης-1, οδηγούν σε σταθεροποίηση του HIF-1α σε νορμοξία [68]. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί πως η σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες ανοξίας δεν απαιτεί τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και πως κύτταρα που δεν περιέχουν ενεργά μιτοχόνδρια δείχνουν να έχουν κανονική απόκριση στην υποξία [68].

Επίσης μη υποξικά ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες επάγουν τον HIF-1α μέσω κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών με μηχανισμούς που εμπλέκουν την παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα, κατεργασία με ασκορβικό οξύ το οποίο αναστέλλει την παραγωγή ROS ανέστειλε και την έκφραση του HIF-1α από θρομβίνη και $CoCl_2$ σε λεία μυϊκά κύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας ή από IGF-1 σε PC3 κύτταρα προστάτη [69, 70]. Άλλα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E ή N-ακετυλο-κυστεΐνη (NAC) έχουν την ίδια επίδραση στη επαγωγή του HIF-1α από τη θρομβίνη [53]. Πιθανόν τα ROS επιδρούν στον HIF-1α μέσω της επαγωγής σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το PI3K μονοπάτι ή οι MAP κινάσες που είναι γνωστό πως ενεργοποιούνται από τα παραπάνω μη υποξικά ερεθίσματα [71]. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε το ασκορβικό παίζει ρόλο στην δράση των υδροξυλασών του HIF-1α για τη διατήρηση του σιδήρου τους στη δισθενή κατάσταση [46]. Φαίνεται λοιπόν πως η οξειδοαναγωγική κατάσταση και τα ROS πιθανόν να εμπλέκονται και στη ρύθμιση της δράσης των υδροξυλασών του HIF-1α [71].

1.3.2.4 Ρύθμιση του HIF-1α μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων

Η ρύθμιση της διαφορικής μεταγραφής γονιδίων σε διαφορετικούς ιστούς των ευκαρυωτικών οργανισμών εμπλέκει αρκετές τροποποιήσεις των μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών του μεταγραφικού μηχανισμού. Αλλαγές στο εξωκυττάριο περιβάλλον προκαλούν την εκκίνηση σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία προκαλούν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες ρυθμίζουν τον

κυτταρικό εντοπισμό, τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, τη σταθερότητα, τη σύνδεση στο DNA, και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων που τις φέρουν. Ο HIF-1α ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στην έκφραση πλήθους γονιδίων υπόκειται και ο ίδιος σε μια σειρά μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που σαν σκοπό έχουν τη ρύθμιση της λειτουργίας του (**Εικ. 8**).

Υδροξυλίωση και Ουβικιτινίωση: Όπως ήδη αναφέρθηκε, η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις προλυλ-υδροξυλάσες είναι το κλειδί για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας. Επιπλέον η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 803 καθιστά τον HIF-1α μεταγραφικά ανενεργό. Μια άλλη τροποποίηση που επίσης αναφέρθηκε είναι η πολυουβικιτινίωση του HIF-1α από το σύμπλεγμα της E3 λιγάσης που ως αποτέλεσμα έχει την αναγνώριση του HIF-1α από το πρωτεόσωμα και την αποικοδόμηση του. Πρόσφατα προτάθηκε πως αυτός δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός αποικοδόμησης του HIF-1α. Θεωρείται πως ο HIF-1α μπορεί να ουβικιτινωθεί και από την MDM2 (Murine Double Minute 2) E3 λιγάση η οποία πιθανόν προκαλεί την ουβικιτινίωσή του μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει την p53 [72].

Σουμοϋλίωση (Sumoylation): Πρόσφατα βρέθηκε πως ο HIF-1α υφίσταται σουμοϋλίωση [73]. 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 στον HIF-1α δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί όμως πιστεύεται πως η τροποποίηση αυτή δρα αρνητικά στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 [74].

Ακετυλίωση: Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την αλληλεπίδραση της ARD-1 (ARrest Defective-1 protein) με τον HIF-1α μέσω του συστήματος των δυο υβριδίων. Πιστεύεται πως ο HIF-1α ακετυλιώνεται από την ARD-1 και μάλιστα η τροποποίηση αυτή φαίνεται να μεγιστοποιεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη VHL οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη αποικοδόμηση του HIF-1α [75]. Με ανάλυση MALDI-TOF-MS δείχθηκε πως η ακετυλίωση γίνεται στη λυσίνη που βρίσκεται στη θέση 532 της ODD περιοχής. Μετάλλαξη της λυσίνης 532 σε αργινίνη είχε προηγουμένως αναφερθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη σταθεροποίηση του HIF-1α [76]. Επίσης διατήρηση της ακετυλίωσης με επίδραση με βουτυρικό οξύ το οποίο είναι αναστολέας των απακετυλασών, οδήγησε σε αυξημένη αποικοδόμηση του HIF-1α. Πρόσφατες όμως μελέτες υποστηρίζουν πως η υπερέκφραση ή η διακοπή της

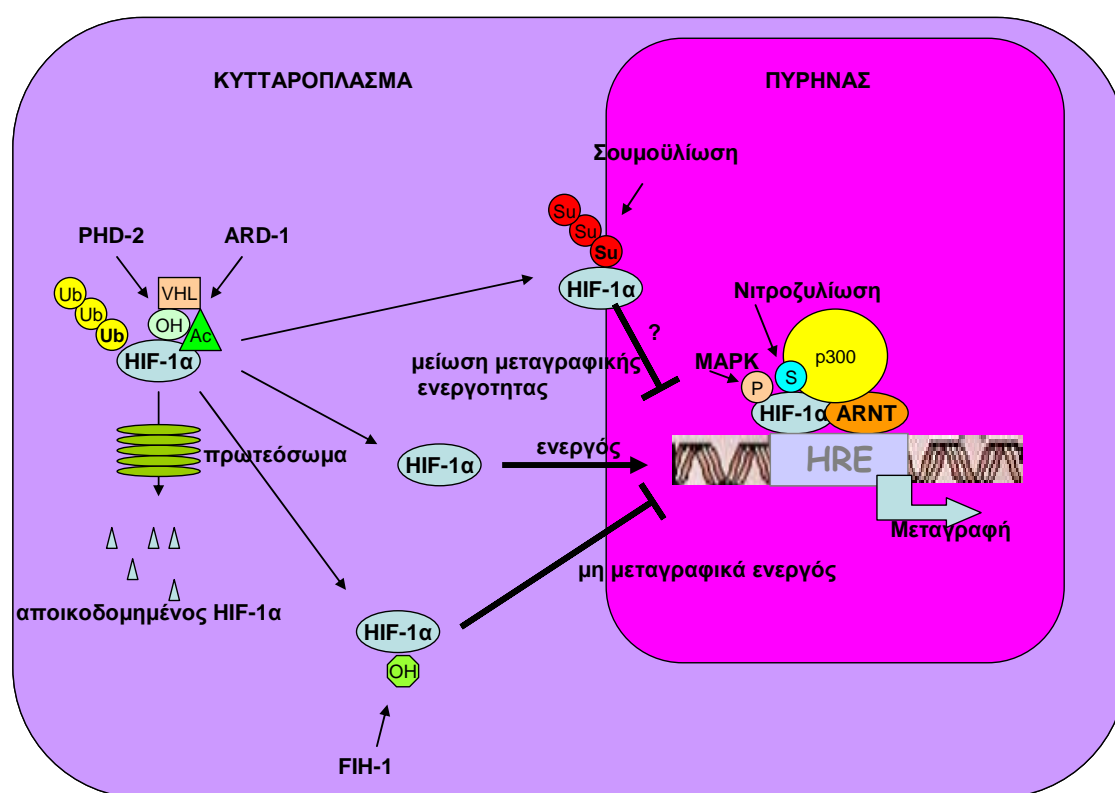
έκφρασης της ARD-1 με siRNA δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-1α [77, 78]. Ένα ακόμη θέμα αντιπαράθεσης είναι αν η ARD-1 ελέγχεται από την υποξία. Από τους Jeong et al [75] υποστηρίζεται πως κατά την υποξία παρατηρείται πολύ λιγότερη ακετυλίωση του HIF-1α εξαιτίας της μείωσης του mRNA της ARD-1 ενώ οι Bilton et al [77] υποστηρίζουν πως τόσο το mRNA όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ARD-1 δεν ρυθμίζονται από την υποξία.

S-Νιτροζυλίωση (S-Nitrosation): Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) έχειδειχθεί να αυξάνει αλλά και να μειώνει τη σταθεροποίηση του HIF-1α και η δράση του φαίνεται να εξαρτάται άμεσα τόσο από τη συγκέντρωσή του όσο και από το είδος των κυττάρων [56]. Επιπλέον έχειδειχθεί πως ο HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στην κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του. Πιστεύεται πως η τροποποίηση αυτή ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την p300 και έτσι αυξάνεται η μεταγραφική ενεργότητα του [79].

Φωσφορυλίωση: Η φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων είναι ένας γνωστός μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητάς τους [80]. Οι πρώτες ενδείξεις πως ο HIF-1 είναι στόχος φωσφορυλίωσης δόθηκαν από τους Wang και Semenza [81]. Χρησιμοποιώντας πειράματα αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA) έδειξαν πως όταν πυρηνικά εκχυλίσματα υποξικών κυττάρων Hep3B κατεργάστηκαν με φωσφατάση δεν παρουσίασαν σύνδεση του HIF-1 στο DNA. Επίσης αναστολείς κινασών Ser/Thr και κινασών τυροσίνης εμπόδισαν τόσο τη σύνδεση του HIF-1 στο DNA όσο και τη σταθεροποίησή του σε υποξικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, ο αναστολέας των MAP κινασών PD98059 ανέστειλε την ενεργότητα του HIF-1α [82, 83].

Η άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p42/44 MAPK αναφέρθηκε από διάφορες ερευνητικές ομάδες και φαίνεται να παίζει ρόλο μετά τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία. Με in vitro μελέτεςδείχθηκε πως πιθανόν το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 531-826 είναι αυτό το οποίο φωσφορυλιώνεται από τη MAPK [65] αν και οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης δεν είναι γνωστές. Η παρατηρούμενη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAP κινάσες δεν φαίνεται να επιδρά στη σταθεροποίηση του HIF-1α αλλά αυξάνει τη μεταγραφική του ικανότητα [84]. Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 είναι ίσως η αποδοτικότερη σύνδεση της φωσφορυλιωμένης μορφής του HIF-1α στον ARNT. Ένα άλλο πιθανό σενάριο είναι ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α ρυθμίζει τη μεταφορά του HIF-1α

στον πυρήνα. Έχει επίσης προταθεί πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAP κινάσες οδηγεί σε αυξημένη αγχιστεία του με την p300 με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργοποίησης [84] αν και πρόσφατα δείχθηκε πως η φωσφορυλίωση της p300 από την MAP κινάση είναι αυτή η οποία αυξάνει τη σύνδεση της p300 στο C-TAD του HIF-1α [85]. Η ίδια μελέτη διευκρινίζει πως το C-TAD δεν φωσφορυλιώνεται άμεσα και πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α γίνεται μεταξύ των αμινοξέων 530-744. Υπάρχουν τέλος κάποιες ενδείξεις για φωσφορυλίωση της θρεονίνης 796, όμως πιθανόν στη φωσφορυλίωση αυτή να ενέχεται η κινάση Casein kinase II-like [86].



Εικόνα 8: Επίδραση των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και τις λειτουργίες του HIF-1α. Κυτταροπλασματικός νεοσυντιθέμενος HIF-1α υδροξυλιώνεται σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου από τις PHD και ακετυλιώνεται από την ARD-1 ακετυλοτρανσφεράση. Οι τροποποιήσεις αυτές οδηγούν σε σύνδεση με το VHL/E3 σύμπλεγμα και στην ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α από το πρωτεόσωμα. Ο HIF-1α επιπλέον υδροξυλιώνεται από την FIH-1 με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον ARNT και την CBP/p300 ενεργοποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Η φωσφορυλίωση και η S-νιτροζυλίωση που υφίσταται πιθανόν συνδέονται με την αύξηση της ενεργότητας του HIF-1α [87]. Επιπλέον ο HIF-1α πιθανόν σουμοϋλιώνεται καθώς περνά το

σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων μέσω της σύνδεσης του με την RanBP2 E3 Sumo λιγάση. Η σουμοϋλίωση πιθανά δρά μειώνοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

1.3.2.5 Ρύθμιση του HIF-1α από άλλους παράγοντες

Παράλληλα με την αρνητική ρύθμιση που υφίσταται ο HIF-1α μέσω αποικοδόμησης από το πρωτεόσωμα υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που προκαλούν μείωση είτε της ενεργότητας του HIF-1α ή των πρωτεϊνικών του επιπέδων τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου όσο και σε υποξία (**Πίν. 1**). Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (protein-protein interaction) είναι το βασικό εργαλείο για την άμεση ή έμμεση αναστολή του HIF-1α.

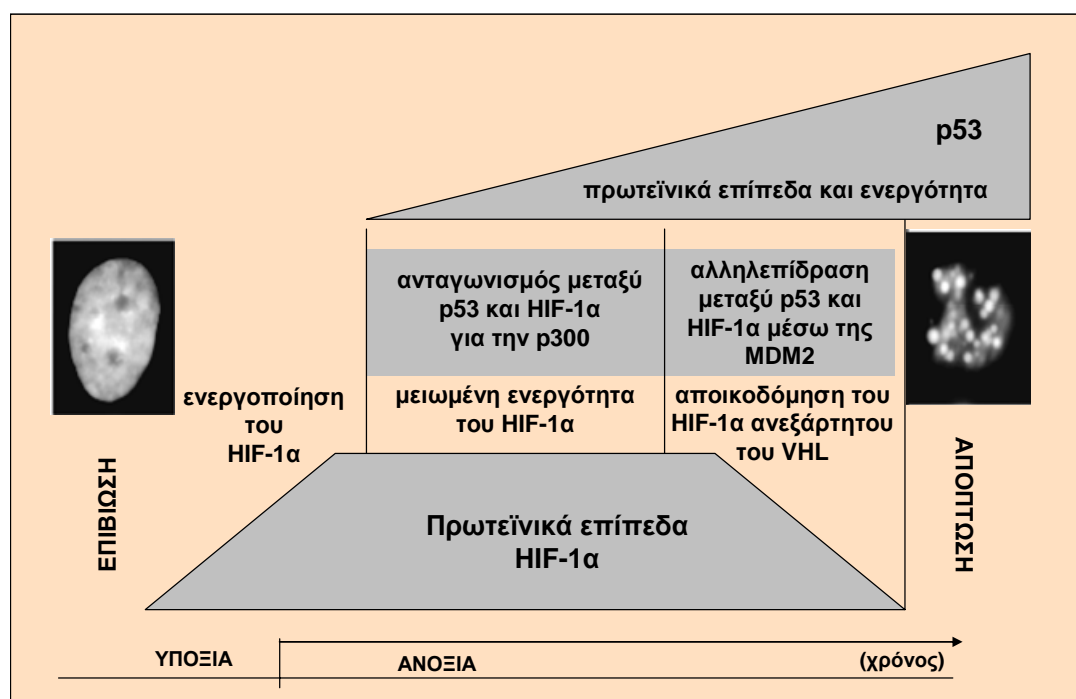
Αρνητικοί ρυθμιστές του HIF-1α	
Παράγοντας	Λειτουργία
PHDs	Υδροξυλίωση του HIF-1α, αναγνώριση από τον VHL
VHL	Αλληλεπίδραση με τον HIF-1α, δημιουργία E3 συμπλόκου λιγάσης, στόχευση του HIF-1α για αποικοδόμηση μέσω πρωτεοσώματος
FIH-1	Υδροξυλίωση ασπαραγίνης του HIF-1α, σταματά την αλληλεπίδραση με την p300, αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα
ARD-1	Ακετυλίωση λυσίνης του HIF-1α, ενισχύει την αλληλεπίδραση VHL με τον HIF-1α
CITED2/CITED4	Εμποδίζει την αλληλεπίδραση HIF-1α- p300, αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα
HIF-3α/IPAS	Αρνητική επικρατής δράση στην έκφραση των γονιδίων από τον HIF-1α
p53	Αλληλεπίδραση με τον HIF-1α, αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α, έλλειψη της αυξάνει τη σταθεροποίηση και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α
FOXO4	Υπερέκφραση του οδηγεί σε μείωση της δράσης του HIF-1α
PTEN	Έλλειψη του οδηγεί σε αύξηση της δράσης του HIF-1α, υπερέκφραση οδηγεί σε μείωση του HIF-1α

Πίνακας 1: Παράγοντες που προκαλούν αρνητική ρύθμιση στο HIF-1α [68].

CITED 2/CITED 4: Η αλληλεπίδραση της p300 με τον HIF-1α είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1. Η CITED 2 είναι μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται στην πρωτεΐνη p300 και αναστέλλει την δράση του HIF-1α μειώνοντας τη σύνδεση HIF-1α/p300. Η έκφραση της CITED 2 ενεργοποιείται από την υποξία και πιθανόν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δρα με έναν αρνητικό μηχανισμό ανάδρασης για τη ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1α [88]. Πρόσφατα παρατηρήθηκε πως ακόμη μια πρωτεΐνη της οικογένειας CITED, η CITED 4 προσδένεται στην p300

εμποδίζοντας τη σύνδεση της με τον HIF-1α [89]. Επιπρόσθετα, μείωση της κυτταροπλασματικής CITED 4 σε καρκινογένεση οδήγησε σε αύξηση των όγκων και της αγγειογένεσης τους, υποδεικνύοντας την CITED 4 ως αρνητικό ρυθμιστή του HIF-1α [68].

p53: Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής p53 πρωτεΐνης στη ρύθμιση του HIF-1α είναι πολύπλοκος. Το μοντέλο που έχει προταθεί μέχρι στιγμής υποστηρίζει πως η αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και HIF-1α μπορεί να είναι άμεση και έμμεση. Η υποξία προκαλεί συσσώρευση της p53 η οποία ανταγωνίζεται με τον HIF-1α στις θέσεις δέσμευσης της p300. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας του HIF-1. Σε συνθήκες έντονης υποξίας ή ανοξίας (0% O₂) τα επίπεδα της p53 αυξάνονται περισσότερο [90, 91]. Η p53 αποικοδομείται στη συνέχεια αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη HDM2 η οποία προκαλεί την ουβικιτινίωση της. Πιστεύεται πως η σύνδεση p53/ HDM2 οδηγεί και σε αποικοδόμηση του HIF-1α (*Εικ. 9*) [92]. Τελευταίες μελέτες όμως δείχνουν πως η MDM2 του ποντικού (αντίστοιχη της ανθρώπινης HDM2) συνδέεται με τον HIF-1α ανεξάρτητα από την p53 και μάλιστα φαίνεται να δρα σαν ρυθμιστής της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α [93].



Εικόνα 9: Προτεινόμενο μοντέλο των αλληλεπιδράσεων του HIF-1α με την p53. Η υποξική ενεργοποίηση του HIF-1 αναστέλλεται όταν η p53 αρχίζει να συσσωρεύεται και να ανταγωνίζεται τις

θέσεις σύνδεσης με την p300. Σε ανοξία η p53 συσσωρεύεται περισσότερο και προκαλεί την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω ενός μονοπατιού που δεν ενέχει την VHL-E3 λυγίαση [92]

Μεταγραφικοί παράγοντες: Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο HIF-1α αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο p300, ο SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) και ο TIF2 (transcription intermediary factor-2) για τη δημιουργία συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α. Η δράση αυτή ενισχύεται περισσότερο από τη σύνδεση της πρωτεΐνης Ref-1 (REdox Factor-1) στον HIF-1α με τρόπο που εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου [94]. Η p300 συνεργάζεται και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο HNF-4 για τη μέγιστη δράση του HIF-1α σε υποξία. Επιπλέον έχειδειχθεί πως ο HNF-4 συνδέεται με τον HIF-1α και την p300 και σε νορμοξία κατά την ενεργοποίηση γονιδίων από το μονοπάτι της PI-3K [95].

Hsp90: Η αντίληψη πως η μοριακή συνοδός πρωτεΐνη Hsp90 είναι ρυθμιστής του HIF-1α δημιουργήθηκε αρχικά από την παρατήρηση πως οι δυο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν in vitro [30]. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως η σύνδεση αυτή συμβαίνει τόσο σε υποξία όσο και σε νορμοξία [96]. Επίσης αναστολή της δράσης της Hsp90 παρεμπόδισε τη συσσώρευση του HIF-1α και τη σύνδεσή του στο DNA σε υποξία. Η σύνδεση του HIF-1α με την Hsp90 θεωρείται ότι αφορά στη ρύθμιση ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από αυτό του VHL, αφού είναι γνωστό πως αναστολείς της Hsp90 προκαλούν ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση του HIF-1α σε κύτταρα όπου λείπει ο VHL [97]. Πρόσφαταδείχθηκε πως η υπεύθυνη περιοχή του HIF-1α για τη σύνδεση του με την Hsp90 είναι η περιοχή PAS υποδεικνύοντας πως η Hsp90 ανταγωνίζεται πιθανά με τον ARNT για τις θέσεις σύνδεσης στον HIF-1α. Το μοντέλο λοιπόν που προτάθηκε [98] είναι το εξής: σε υποξία η απενεργοποίηση των προλυλ-υδροξυλασών εμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω VHL και η Hsp90 η οποία προσδένεται στον συσσωρευμένο πλέον HIF-1α τον προστατεύει από κάθε άλλου είδους μη ειδική αποικοδόμηση. Στη συνέχεια ο ARNT εκτοπίζει την Hsp90 από την PAS περιοχή του HIF-1α συνδέεται μαζί του για τη δημιουργία του λειτουργικού HIF-1 συμπλόκου. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό η ύπαρξη της Hsp90 και ο ανταγωνισμός για την PAS περιοχή να αποτελούν ένα διαφορετικό επίπεδο ρύθμισης του HIF-1α.

NO: Η επίδραση του NO στην σταθερότητα και την ενεργοποίηση του HIF-1α δεν είναι ξεκάθαρη. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν πως το NO δρά αρνητικά στο HIF-

1α που επάγεται από την υποξία αλλά όχι στο HIF-1α που επάγεται από παράγοντες που μιμούνται την υποξία. Άλλοι υποστηρίζουν πως ο HIF-1α επάγεται από το NO σε συνθήκες νορμοξίας. Προφανώς η φύση και το είδος του δότη NO που κάθε φορά χρησιμοποιείται παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-1α [99]. Η υπερέκφραση επίσης της συνθάσης του NO (iNOs) οδηγεί σε συσσώρευση του HIF-1 μαρτυρώντας ένα πιθανό μηχανισμό θετικής ανάδρασης του NO καθώς η iNOs αποτελεί και γονίδιο στόχο του HIF-1. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε πως και η συγκέντρωση του NO καθορίζει το είδος της δράσης του πάνω στο HIF-1α. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πως υψηλές συγκεντρώσεις NO (>1μM) σταθεροποιούν το HIF-1α ανεξάρτητα της συγκέντρωσης οξυγόνου, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις (<400nM) οδηγούν σε μείωση των επιπέδων του HIF-1α σε υποξία [100]. Η αποσταθεροποίηση αυτή του HIF-1α από το NO θεωρείται πως γίνεται λόγω της αναστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής η οποία οδηγεί σε αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης οξυγόνου η οποία με τη σειρά της προκαλεί αύξηση της δράσης των προλυλ-υδροξυλασών.

Η σύνοψη των παραπάνω θετικών δράσεων στο HIF-1α απεικονίζεται στον **Πιν. 2**.

Θετικοί ρυθμιστές του HIF-1α	
Παράγοντας	Λειτουργία
Υποξία/Μιμητές υποξίας	Αναστολή των πρόλυλο-υδροξυλασών, σταθεροποίηση του HIF-1α και μεταγραφική ενεργοποίηση του
PI3K/AKT	Αύξηση της σύνθεσης του HIF-1α
MAPK	Φωσφορυλίωση του HIF-1α, αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας, πιθανή δράση στη σύνθεση του HIF-1α
HDM2	Η επαγωγή του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες ενέχει την HDM2, άμεση αλληλεπίδραση με τον HIF-1α
mTOR	Κατεργασία με ραπαμυκίνη (αναστολέας του mTOR) εμποδίζει τη σταθεροποίηση του HIF-1α
p300	Αλληλεπίδραση με τον HIF-1α, δημιουργία συμπλόκου έναρξης μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α
Hsp90	Αλληλεπίδραση με τον HIF-1α, αναστολή της οδηγεί σε μείωση της δράσης του
ROS	Δημιουργία ROS οδηγεί σε επαγωγή του HIF-1α

Πίνακας 2: Παράγοντες που προκαλούν θετική ρύθμιση στο HIF-1α [68].

1.4 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

1.4.1 Μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα

Ο πυρηνικός φάκελος περικλείει το DNA και ορίζει το πυρηνικό διαμέρισμα του κυττάρου. Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από δυο μεμβράνες οι οποίες διαπερνώνται από τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Μετακίνηση μορίων προς τη διευθύνση του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα συμβαίνει συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου. Οι πρωτεΐνες οι οποίες δρουν στον πυρήνα όπως οι ιστόνες, οι DNA- και RNA-πολυμεράσες και οι μεταγραφικοί παράγοντες εισάγονται εκλεκτικά στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα όπου και συντίθενται. Παράλληλα tRNA, rRNA και mRNA συνθέτονται στον πυρήνα και εξάγονται προς το κυτταρόπλασμα.

Το σύμπλοκο των πυρηνικών πόρων διαπερνά τον πυρηνικό φάκελο: Ο πυρηνικός φάκελος είναι διάτρητος από ογκώδεις πρωτεϊνικές δομές που ονομάζονται πυρηνικοί πόροι. Στα ζωικά κύτταρα κάθε πόρος έχει μοριακό βάρος 125 MDa και αποτελείται από 50 διαφορετικές πρωτεΐνες που ονομάζονται νουκλεοπορίνες και οι οποίες είναι διευθετημένες με οκταγωνική συμμετρία. Ο πυρηνικός φάκελος ενός τυπικού κυττάρου θηλαστικών περιέχει 3000-4000 πόρους. Τα μικρά μόρια (μέχρι 5000 daltons) διαχέονται ελεύθερα μέσω των πυρηνικών πόρων μέσω ενός υδατικού κυλινδρικού καναλιού διαμέτρου 9nm. Τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους μόρια περνούν τους πόρους με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών στις οποίες και προσδένονται.

Σήματα πυρηνικού εντοπισμού οδηγούν τις πρωτεΐνες στον πυρήνα: Η επιλεκτικότητα της εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα στηρίζεται στην ύπαρξη των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Πρόκειται για αλληλουχίες οι οποίες είναι παρούσες μόνο σε πυρηνικές πρωτεΐνες. Τα πρώτα δυο NLS που χαρακτηρίστηκαν περιέχουν περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Το πρώτο είναι αυτό του T-αντιγόνου του ιού SV40 και αποτελείται από μια αλληλουχία 5 βασικών αμινοξέων λυσίνης και αργινίνης. Ο δεύτερος τύπος NLS χαρακτηρίστηκε στην νουκλεοπλάσμινη του *Xenopus*. Στο συγκεκριμένο NLS υπάρχουν δυο βασικές περιοχές ανάλογες με αυτές του T-αντιγόνου του SV40 οι οποίες διακόπτονται από μια περιοχή 5 έως 20 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη hnRNPA1 περιέχει ένα διαφορετικό NLS που ονομάζεται ακολουθία M9. Η M9 δεν είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα και δρα ως σήμα πυρηνικής εισόδου και εξόδου. Υπάρχουν όμως πολλές πυρηνικές

πρωτεΐνες που δεν περιέχουν τις παραπάνω χαρακτηρισμένες NLS ακολουθίες. Εκεί τα ακριβή σήματα εισόδου δεν έχουν διευκρινιστεί.

Υποδοχείς πυρηνικής εισόδου συνδέονται στα NLS και τις νουκλεοπορίνες: Για να ξεκινήσει η διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών στον πυρήνα πρέπει τα NLS να αναγνωριστούν από ειδικές πρωτεΐνες υποδοχείς. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με FG-μοτίβα των νουκλεοπορινών επιτρέποντας έτσι το πέρασμα των πρωτεϊνών υποστρωμάτων τους μέσα από το κανάλι των πυρηνικών πόρων. Η μεγαλύτερη τάξη των πρωτεϊνικών υποδοχέων μεταφοράς είναι η οικογένεια των ιμφορτινών β (importin β-related proteins). Υπάρχουν 14 γνωστά μέλη της οικογένειας στις ζύμες και πάνω από 20 μέλη στα θηλαστικά και χαρακτηρίζονται ως ιμφορτίνες (importins) ή εξπορτίνες (exportins) ανάλογα με το αν μεσολαβούν για την είσοδο ή την έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα. Στον **Πιν. 3** απεικονίζονται οι γνωστές ιμφορτίνες των θηλαστικών (περίπου 16) καθώς και τα χαρακτηρισμένα υποστρώματά τους. Όλες οι ιμφορτίνες περιέχουν θέσεις σύνδεσης για την πρωτεΐνη Ran, έχουν παρόμοια δομή και όξινο ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 90 ως 145 kDa. Έχει βρεθεί πως κάποιες ιμφορτίνες μεσολαβούν τόσο για την είσοδο όσο και για την έξοδο πρωτεϊνών π.χ. η ιμφορτίνη 13. Κάθε ιμφορτίνη είναι εξειδικευμένη για τη μεταφορά μιας ομάδας πυρηνικών πρωτεϊνών π.χ ριβοσωμικές πρωτεΐνες, ιστόνες κ.α. που μοιράζονται δομικά παρόμοιο NLS. Συχνά κάποιες ομάδες πρωτεϊνών όπως οι ιστόνες H2A και H2B αναγνωρίζονται από περισσότερες από μία διαφορετικές ιμφορτίνες [102]. Πολλές φορές οι ιμφορτίνες δεν προσδένονται άμεσα στα υποστρώματά τους αλλά χρειάζονται και κάποιες βοηθητικές πρωτεΐνες που δρουν ως προσαρμογείς (adaptors). Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η ιμφορτίνη α. Η ιμφορτίνη α αναγνωρίζει τα χαρακτηρισμένα NLS των SV40 και της νουκλεοπλάσμινης ενώ στη συνέχεια σχηματίζει σύμπλοκο με την ιμφορτίνη β για τη μεταφορά των υποστρωμάτων της στον πυρήνα. Ένα άλλο παράδειγμα βοηθητικής πρωτεΐνης είναι η Snurportin 1 η οποία αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο άκρο των μικρών πυρηνικών RNA (U snRNAs) και στη συνέχεια προσδένεται στην ιμφορτίνη β για να εισαχθεί στον πυρήνα [101]. Η ιμφορτίνη β συνδέεται όχι μόνο με τις βοηθητικές πρωτεΐνες adaptors αλλά και με άλλες ιμφορτίνες όπως η ιμφορτίνη 7 για τη μεταφορά της ιστόνης H1 ή κάποιων ριβοσωμικών υπομονάδων. Η ιμφορτίνη 7 μπορεί όμως και μόνη της να εισάγει κάποιες ριβοσωμικές πρωτεΐνες όπως οι rpl23a, rps7 και rpl5 [103]. Επίσης υπάρχουν ιμφορτίνες για τις οποίες έχει βρεθεί μέχρι στιγμής ένα υπόστρωμα π.χ. η

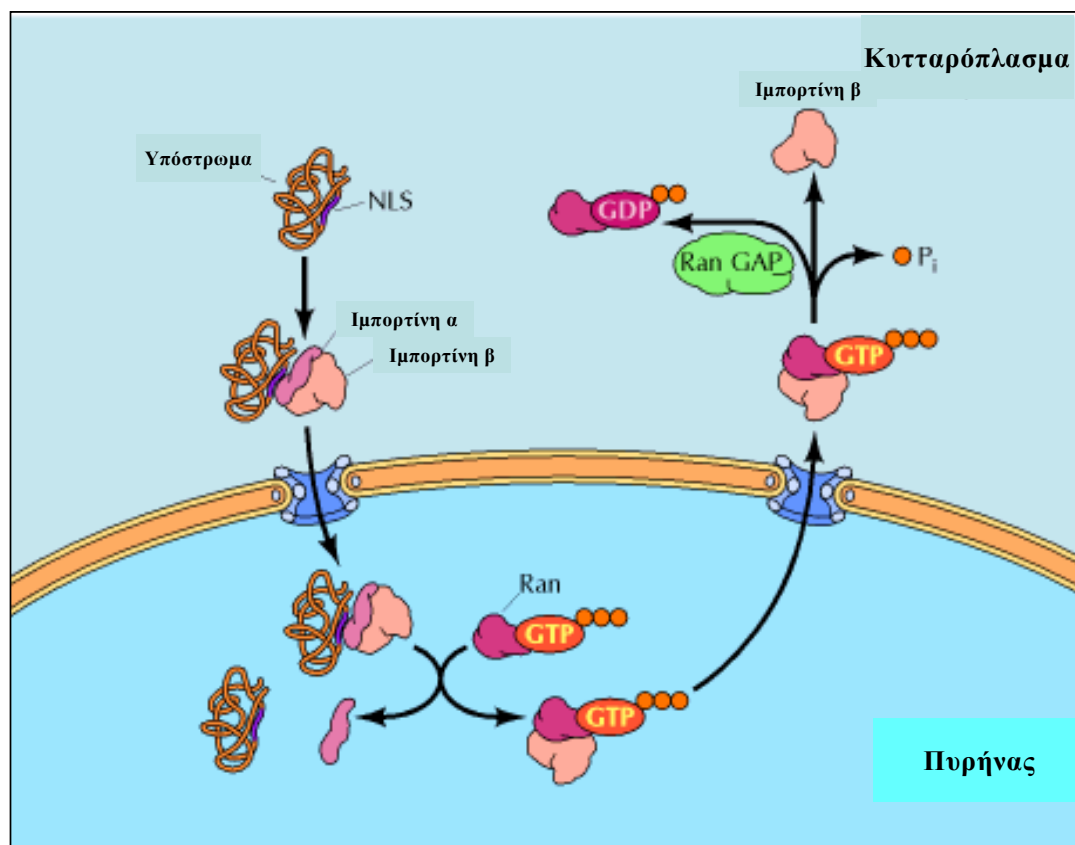
ιμπορτίνη 4 είναι γνωστό πως εισάγει μόνο την ριβοσωμική υπομονάδα rpS3a [104]. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως οι ακριβείς αλληλουχίες των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού που αναγνωρίζονται από τις περισσότερες από τις παραπάνω ιμπορτίνες είναι άγνωστες.

Όνομα (θηλαστικά)	Προσαρμογέας	Υπόστρωμα	Λειτουργία
Ιμπορτίνη β		Ριβ. πρωτεΐνες, HIV Rev και Tat, ιστόνες HTLV, κυκλίνη B	εισαγωγή
	Οικογένεια των ιμπορτινών α Snurportin 1 XRIPα	Πρωτεΐνες με τυπικά NLS	εισαγωγή
		U snRNPs	εισαγωγή
		RepA	εισαγωγή
Τρανσπορτίνη 1		Πρωτεΐνες συνδεόμενες σε mRNA, ριβ. πρωτεΐνες	εισαγωγή
Τρανσπορτίνη 2			εισαγωγή\ εξαγωγή?
Τρανσπορτίνη SR1		SR πρωτεΐνες	εισαγωγή
Τρανσπορτίνη SR2		SR πρωτεΐνες με περιοχές RS	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 4α		Ριβ. πρωτεΐνη S3a	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 4β		?	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 5		Ιστόνες, ριβ. πρωτεΐνες και άλλες βασικές πρωτεΐνες	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 7		Ιστόνες, ριβ. πρωτεΐνες και άλλες βασικές πρωτεΐνες	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 8		SRP19	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 9		Ιστόνες κυρίως H2B, ριβ. πρωτεΐνες	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 11		UbcM2, ριβ. πρωτεΐνη L2	εισαγωγή
Ιμπορτίνη 13		UBC9, Y14 eIF1A	εισαγωγή/ εξαγωγή

Πίνακας 3: Οικογένεια των ιμπορτινών στα θηλαστικά και τα χαρακτηρισμένα υποστρώματα τους [101].

Η RanGTPάση είναι το μόριο κλειδί της πυρηνικής μεταφοράς: Η πρωτεΐνη Ran βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων. Όπως όλες οι GTPασες η Ran μπορεί να υπάρχει σε δυο μορφές ανάλογα με το αν δεσμεύει GDP ή GTP. Η μετατροπή μεταξύ των δύο μορφών γίνεται από δυο ρυθμιστικές πρωτεΐνες την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη RanGAP (GTPase Activating Protein γνωστή και ως RnaP1 στις ζύμες), η οποία οδηγεί σε υδρόλυση του GTP και σε μετάπτωση της RanGTP μορφής σε RanGDP, και την RanGEF (Guanine Exchange Factor) ή RCC1 που οδηγεί στην ανταλλαγή του GDP από GTP. Επειδή η RanGAP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η RanGEF στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα περιέχει μόνο τη RanGDP μορφή ενώ ο πυρήνας περιέχει τη RanGTP μορφή.

Μετά τη μεταφορά του συμπλόκου ιμπορτίνης-υποστρώματος στον πυρήνα η RanGTP μορφή δεσμεύεται στις ιμπορτίνες προκαλώντας αποσύνδεση του συμπλόκου ιμπορτίνη-υποστρώματος. Τα σύμπλοκα των ιμπορτινών με το RanGTP επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, με τη βοήθεια της RBP (Ran Binding Protein) και της RanGAP, η Ran μεταπίπτει στη RanGDP μορφή της και αποσυνδέεται από την ιμπορτίνη η οποία στη συνέχεια μένει ελεύθερη για να εκτελέσει ένα νέο κύκλο εισόδου (*Εικ. 10*).



Εικόνα 10: Μηχανισμός μετακίνησης πρωτεϊνών μέσω ιμπορτινών και Ran στον πυρήνα.

Ρύθμιση της εισόδου στον πυρήνα μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων: Η ρύθμιση της πυρηνικής μεταφοράς είναι ιδιαίτερα σημαντική για το κύτταρο. Υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες πρέπει να μεταφερθούν άμεσα στον πυρήνα μετά τη σύνθεσή τους στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα όλα τα είδη του RNA πρέπει να εξαχθούν από τον πυρήνα για να συμμετάσχουν στην μετάφραση των πρωτεϊνών μόνο και εφόσον έχει ολοκληρωθεί πλήρως η ωρίμανσή τους στον πυρήνα. Επιπλέον κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες πρέπει να εισαχθούν στον πυρήνα και να συνδεθούν στο DNA επάγοντας τα γονίδια στόχους τους μόνο τη χρονική στιγμή που

τα γονίδια αυτά είναι αναγκαία για το κύτταρο π.χ. μετά από στρες ή επίδραση αυξητικών παραγόντων, ορμονών κ.λ.π. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών ρύθμισης της πυρηνικής μεταφοράς πρωτεϊνών. Οι κύριοι μηχανισμοί ρύθμισης είναι η τροποποίηση της πυρηνικής πρωτεΐνης υποστρώματος έτσι ώστε να ελέγχεται η πρόσδεσή της στην αντίστοιχη ιμφορτίνη ή εξορτίνη της, η δημιουργία αδιάλυτου συμπλόκου ιμφορτίνης-υποστρώματος ώστε να μην μπορεί να περάσει από τα NPC και η τροποποίηση των ίδιων των NPC [105].

Ο έλεγχος της πυρηνικής εισόδου των μεταγραφικών παραγόντων γίνεται κυρίως μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με τον αναστολέα του IκB ο οποίος καλύπτει το NLS του NF-κB μη επιτρέποντας την είσοδο του στον πυρήνα. Μετά τη δράση του TNF-α μέσω μεμβρανικών υποδοχέων ο IκB φωσφορυλιώνεται και αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο αποκαλύπτοντας το NLS του NF-κB και επιτρέποντας την είσοδο του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση αποπτωτικών γονιδίων [105]. Υπάρχει όμως και η περίπτωση η είσοδος στον πυρήνα να απαιτεί αποφωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα όπως συμβαίνει με τον NF-AT. Ο NF-AT διατηρείται στο κυτταρόπλασμα όταν βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη μορφή. Κατά την αύξηση των επιπέδων Ca^{+2} ο NF-AT αποφωσφορυλιώνεται. Η τροποποίηση αυτή οδηγεί σε αποκάλυψη του NLS και σε είσοδο του παράγοντα στον πυρήνα για την επαγωγή γονιδίων κυτοκινών [106]. Εκτός από τα παραπάνω παραδείγματα υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις κατά τις οποίες σουμυλιώσεις, ακετυλιώσεις και αλλαγές στερεοδιαμόρφωσης οδηγούν σε μεταφορά πρωτεϊνών στον πυρήνα [105].

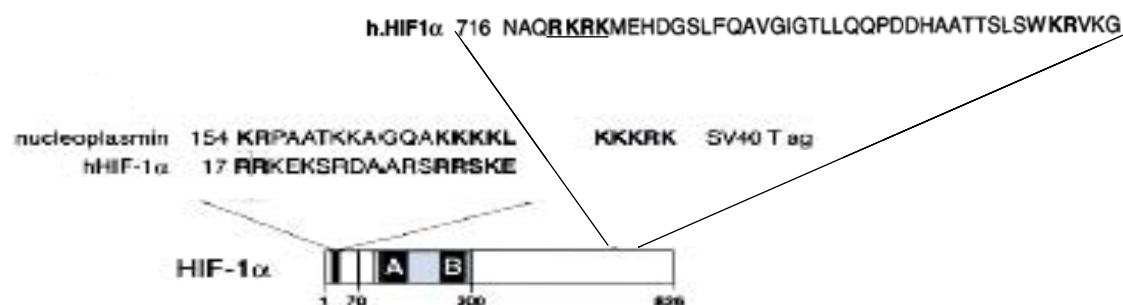
1.4.2 Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για την ενεργοποίηση του HIF-1 απαιτείται η εισαγωγή του HIF-1α στον πυρήνα και ο διμερισμός του με τον ARNT. Πειράματα ανοσοκυτταροχημείας έδειξαν πως ο HIF-1α εντοπίζεται στον πυρήνα υποξικών κυττάρων [107]. Πιστεύεται πως η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα αποτελεί ένα στάδιο ελέγχου του HIF-1α από την υποξία. Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν επιμολυσμένα κύτταρα τα οποία εξέφραζαν χημεικές πρωτεΐνες GFP-HIF-1α (GFP: Green Fluorescence Protein) έδειξαν πως η υποξία εκτός από σταθεροποίηση του HIF-1α προκαλεί επίσης την ενεργή μεταφορά του στο εσωτερικό του πυρήνα, λειτουργία η οποία είναι ανεξάρτητη από τη σταθεροποίηση [18]. Παρόλα αυτά

υπάρχει και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει πως η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα είναι συνεχής και ανεξάρτητη τόσο από την ύπαρξη του VHL όσο και από την συγκέντρωση του οξυγόνου στο κύτταρο [108].

Οι μελέτες των Kallio et al [18] οδήγησαν στην ταυτοποίηση δυο NLS στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, ένα στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 17-33) το οποίο είναι δομικά όμοιο με αυτό της νουκλεοπλασμίνης και ένα στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 719-723) το οποίο είναι ανάλογο με αυτό του SV40 (**Εικ. 11**). Το αμινοτελικό NLS θεωρείται ότι καταστέλλεται από την PAS B περιοχή του HIF-1α ενώ το καρβοξυτελικό NLS είναι πιθανώς απενεργοποιημένο σε νορμοξικά κύτταρα. Μολαταύτα, οι Luo et al [109] υποστηρίζουν πως η υποξία δεν είναι απαραίτητη για την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα αλλά η σταθεροποίηση του είναι αρκετή για τη μεταφορά της πρωτεΐνης. Επίσης θεωρούν πως το καρβοξυτελικό NLS αποτελείται από δύο περιοχές βασικών αμινοξέων (719-723 και 754-757) και όχι από μία [18] και μάλιστα τα ενδιάμεσα αμινοξέα (724-753) από τις δυο αυτές βασικές περιοχές είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του NLS (**Εικ. 11**). Αν και έχουν χαρακτηριστεί τα δύο NLS στον HIF-1α δεν έχει μέχρι στιγμής βρεθεί αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις ιμφορτίνες α και β οι οποίες είναι γνωστό ότι αναγνωρίζουν NLS αυτού του τύπου.

Τα ερωτήματα που συνεχίζουν να υπάρχουν είναι αρκετά, όπως αν και πως η υποξία ενεργοποιεί την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα, ποια είναι η υπεύθυνη ιμφορτίνη που οδηγεί τον HIF-1α στους πυρηνικούς πόρους και στη συνέχεια στο εσωτερικό του πυρήνα και επίσης πώς επηρεάζουν οι αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες (όπως ο ARNT) ή οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του (όπως η φωσφορυλίωση) την αναγνώριση του από τους μηχανισμούς πυρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς του κυττάρου.



Εικόνα 11: Ανάλυση της αλληλουχίας του ανθρώπινου HIF-1α έδειξε την ύπαρξη δυο πιθανών NLS. Το αμινοτελικό NLS δείχνει ομολογία με το κλασικό διμερές NLS της νουκλεοπλασμίνης [18] ενώ το

καρβοξυτελικό NLS βρέθηκε πως αποτελείται από δύο περιοχές βασικών αμινοξέων (719-723 και 754-757) [109]. Η περιοχή των αμινοξέων 719-723 μοιάζει με το χαρακτηρισμένο NLS του SV40.

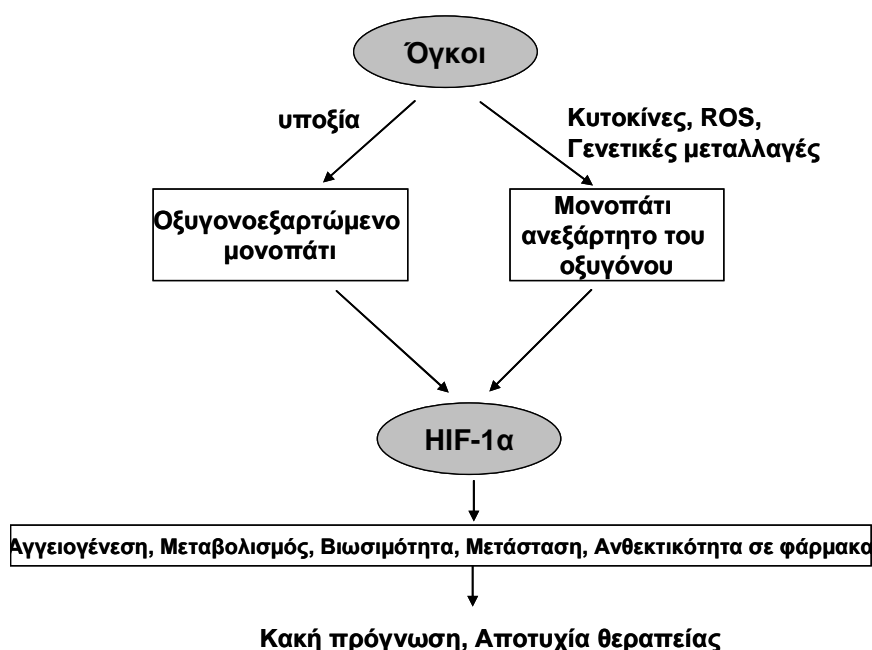
1.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ HIF-1α

1.5.1 HIF-1α και καρκίνος

Η υποξία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των αυξανόμενων όγκων και των μεταστάσεων που προκαλούν. Η υποξία δημιουργείται ως επί το πλείστον εξαιτίας της μη επαρκούς αιμάτωσης του όγκου και συμβαίνει από τα αρχικά στάδια της αύξησης του όταν η διάμετρος του φτάσει τα λίγα χιλιοστά [110]. Αφού η υποξία είναι το κύριο ερέθισμα για την επαγωγή του HIF-1α δεν είναι παράξενο που ο HIF-1α βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στα περισσότερα είδη όγκων. Παρόλα αυτά η υποξία δεν είναι το μόνο ερέθισμα που σταθεροποιεί και ενεργοποιεί τον HIF-1α στους όγκους (**Εικ. 12**). Γενετικές μεταβολές σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα έχουν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που προκαλούν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως τα HER2, FRAP, HRAS και CSRC ή την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως τα VHL, PTEN και το p53 έχουν αναφερθεί πως σχετίζονται με υπερέκφραση του HIF-1α σε αρκετά είδη καρκίνων [111]. Επιπλέον διάφοροι αυξητικοί παράγοντες ή κυτοκίνες όπως η ινσουλίνη, ο IGF (Insuline-like Growth Factor), ο EGF (Epidermal Growth Factor) και η ιντερλευκίνη που παράγονται σε καρκινικά κύτταρα φαίνεται να επάγουν τον HIF-1α με μηχανισμούς που ήδη αναφέρθηκαν. Τέλος οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) οι οποίες εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου θεωρείται πως μπορούν αφενός να σταθεροποιούν το HIF-1α και αφετέρου να επάγουν τη μεταγραφική ενεργότητα του. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η επαγωγή του HIF-1α που παρατηρείται σε καρκινικά γαστρικά κύτταρα και φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση των ROS [112].

Ένα πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών υποδεικνύει πως ο HIF-1α συμβάλλει θετικά στην εξέλιξη του όγκου και σε επικείμενη μετάσταση του. Ο HIF-1α επάγει μέσω του VEGF την αγγειογένεση στους όγκους, η οποία είναι απαραίτητη για την αιμάτωση τους και την περαιτέρω αύξηση τους [113]. Επιπλέον η επαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού από τον HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα του όγκου επιτρέπει την διατήρηση της ενεργειακής ομοιοστασίας τους και την προσαρμογή τους στο υποξικό περιβάλλον. Ένα σημαντικό εύρημα είναι πως ο HIF-1α σχετίζεται

με την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνων και την ανθεκτικότητα τους σε χημειοθεραπεία. Η υπερέκφραση του HIF-1α συνδέεται με αυξημένη θνησιμότητα ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο του μαστού σε αρχικά στάδια. Ασθενείς με καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου του φάρυγγα των οποίων οι όγκοι εκφράζουν υψηλά ποσοστά HIF-1α εμφανίζουν μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας σε ακτινοθεραπεία [114]. Ο ρόλος του HIF-1α στην εξέλιξη του καρκίνου απεικονίζεται στην **Εικ. 12**. Παρόλα αυτά υπάρχει μια αναφορά που υποστηρίζει πως σε μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με απόπτωση του όγκου και επιβίωση των ασθενών [115].



Εικόνα 12: Ο ρόλος του HIF-1α στην ανάπτυξη των όγκων. Ο HIF-1α υπερεκφράζεται σε όγκους λόγω υποξίας ή από μη υποξικά ερεθίσματα και ρυθμίζει με τη σειρά του την έκφραση γονιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση των όγκων, τη μετάσταση και την αυξημένη αντίσταση τους σε αντικαρκινικές θεραπείες [112].

Αφού η έκφραση του HIF-1α και η ενεργοποίησή του έχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου η αναστολή του αποτελεί πιθανό αντικαρκινικό στόχο. Εκτός από τους παράγοντες που προκαλούν αναστολή του HIF-1α και αναφέρονται στον **Πιν. 1** υπάρχουν και άλλες χημικές ουσίες οι οποίες έχει δειχθεί πως τον αναστέλλουν με γνωστό ή άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό και αποτελούν υποψήφιους για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι ουσίες αυτές οι οποίες αναφέρονται αναλυτικά στον **Πιν. 4** μπορούν να διαχωριστούν σε δύο

κατηγορίες: σε αυτές που αναστέλλουν γνωστά μονοπάτια που ελέγχουν τον HIF-1α και σε αυτές που προκαλούν αναστολή του HIF-1α αλλά δεν σχετίζονται με τη δράση του. Στην πρώτη κατηγορία βρίσκονται γνωστοί αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το LY294002, η ραπαμυκίνη (αναστολείς του PI-3K μονοπατιού) και το PD98059 (αναστολέας των MAPK). Θεωρείται πως οι ουσίες αυτές αναστέλλουν τον HIF-1α δρώντας στα μονοπάτια που επάγουν τη σύνθεση του. Αναστολή του HIF-1α μπορεί επίσης να γίνει με αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας από την ουσία κιννοκαρμικίνη. Επιπλέον αναστολή της δράσης δύο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α, της Hsp90 ή της θυρεοδοξίνης έχει βρεθεί πως οδηγεί σε επικείμενη αναστολή της δράσης του HIF-1α.

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ HIF1/HIF2	
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΣΤΟΧΟΣ
YC-1	Γουανυλική κυκλάση
2-ME2	Αποσταθεροποίηση μικροσωληνίσκων
Ταξόλη	Σταθεροποίηση μικροσωληνίσκων
Βινκριστίνη	Σταθεροποίηση μικροσωληνίσκων
1-Μεθυλοπρόπυλο-2-ιμιδαζολυλο δισουλφίδιο	Αναγωγή της θυρεοδοξίνης
Πλευροτίνη	Αναγωγή της θυρεοδοξίνης
Ραπαμυκίνη	TOR
LY294002, Βορτμανίνη	PI3K
Γκελνταναμυκίνη	Hsp90
Κιννοκαρμικίνη	HRE μεταγραφική ενεργότητα
Τοποτεκάνη	Τοποισομεράση I
PD98059	MEKK

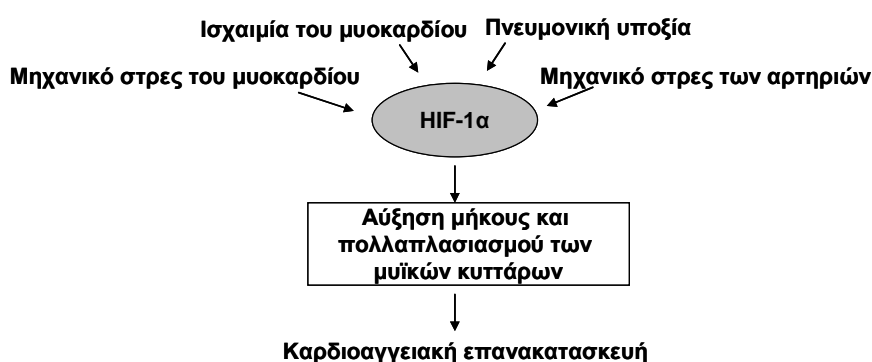
Πίνακας 4: Γνωστοί χημικοί αναστολείς του HIF-1 και HIF-2 και αντίστοιχοι στόχοι τους [117].

Πρόσφατα βρέθηκε πως δύο άλλες ουσίες μπορούν να αναστείλουν την σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Η πρώτη ουσία είναι η 2-ME2 (2-μεθυλοξυ-οιστραδιόλη) η οποία είναι ένα φυσικό παράγωγο της οιστραδιόλης και φαίνεται να έχει αντι-αγγειακή δράση. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η 2-ME2 αναστέλλει τον HIF-1α σε μεταμεταφραστικό επίπεδο [116]. Πιστεύεται πως η αναστολή του HIF-1 γίνεται εξαιτίας του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων δείχνοντας πως ο κυτταροσκελετός είναι αρκετά σημαντικός για τη δράση του HIF-1α. Μολαταύτα στην ίδια μελέτη αναφέρεται πως παράγοντες όπως η ταξόλη και η βινκριστίνη οι οποίες είναι γνωστό πως σταθεροποιούν τους

μικροσωληνίσκους οδηγούν επίσης σε αναστολή του HIF-1α. Απαιτούνται λοιπόν αρκετές μελέτες για την κατανόηση του ρόλου των μικροσωληνίσκων στη δράση του HIF-1α. Η δεύτερη ουσία που προκαλεί αναστολή είναι η YC-1 η οποία είναι ενεργοποιητής της γουανυλικής κυκλάσης. Κατεργασία καρκινικών κυττάρων με YC-1 οδηγεί σε καθυστερημένη αύξηση των όγκων και απώλεια του HIF-1α αλλά η δράση του στο HIF-1α δεν είναι ξεκάθαρη.

1.5.2 HIF-1α και καρδιοαγγειακές παθήσεις

Ο HIF-1α εμπλέκεται άμεσα στην αγγειογένεση, αγγειοδιαστολή και γενικότερα στη λειτουργία του καρδιοαγγειακού συστήματος. Είναι γνωστό πως ο HIF-1α επάγεται σε ιστούς μετά από ισχαιμικά επεισόδια [118, 119]. Σε δείγματα βιοψίας από ανθρώπινο μυοκάρδιο σε ισχαιμία έχουν ανιχνευθεί με ανοσοιστοχημεία τόσο VEGF όσο και HIF-1α. Πιστεύεται πως η επαγωγή του HIF-1α οδηγεί σε μεταγραφή του γονιδίου του VEGF για την άμεση δημιουργία νέων αγγείων και την επικείμενη προσαρμογή του μυοκαρδίου στην ισχαιμία. Πρόσφατα δείχθηκε πως ο HIF-1α ενεργοποιείται σε καρδιακά κύτταρα και σε μη ισχαιμικό μυοκάρδιο μέσω του μονοπατιού της PI-3K εξαιτίας μηχανικού στρες των αγγειακών τοιχωμάτων [120]. Εκτός από την επίδραση του HIF-1α στην καρδιά η υποξία φαίνεται πως επάγει αναδόμηση του αγγειακού συστήματος στον πνεύμονα [10]. Ο πολύπλοκος ρόλος του HIF-1α στην αγγειακή αναδόμηση και αναδιοργάνωση εμφανίζεται σχηματικά στην **Εικ. 13**.



Εικόνα 13: Συμβολή του HIF-1α στην αναδόμηση του καρδιοαγγειακού συστήματος. Η έκφραση του HIF-1α αυξάνεται στο μυοκάρδιο και στα λεία μυϊκά κύτταρα αρτηριών από την υποξία και από μηχανικό στρες επάγοντας τον VEGF και την αγγειογένεση. Ο HIF-1α επίσης επιδρά στη μυϊκή υπερτροφία και στη στένωση των αρτηριών [10].

1.5.3 HIF-1α και λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ) του αναπνευστικού

1.5.3.1 Επίδραση της υποξίας στο αναπνευστικό

Η διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου από τον οργανισμό είναι αναγκαία για την επιβίωση του. Το άνω αναπνευστικό εξυπηρετεί τη μεταφορά οξυγόνου στον οργανισμό και αποτελεί σημαντικό σημείο για τη ρύθμιση της ποσότητας του οξυγόνου που φτάνει στους πνεύμονες και μεταφέρεται στα διάφορα όργανα. Για να επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ αερισμού και αιμάτωσης το αναπνευστικό σύστημα έχει αναπτύξει διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς για να διορθώνει τυχόν μεταβολές της συγκέντρωσης του οξυγόνου.

Συγκεκριμένα είναι γνωστό πως σε οξεία υποξία προκαλείται σύσπαση της πνευμονικής αρτηρίας και αύξηση της αρτηριακής πίεσης η οποία συνοδεύεται από αναδιανομή της ροής του αίματος από τη βάση στην κορυφή των πνευμόνων [121]. Η χρόνια υποξία η οποία προκαλείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως άσθμα και κυστική ίνωση ή εμφανίζεται σε κατοίκους περιοχών με υψηλό υψόμετρο έχει ως αποτέλεσμα την ανακατασκευή της πνευμονικής αρτηρίας και χρόνια υπέρταση [122, 123]. Επιπλέον μελέτες σε ποντίκια τα οποία εκτέθηκαν για 3 βδομάδες σε υποξία (10% O₂) έδειξαν την πάχυνση του εσωτερικού τοιχώματος των μικρών αρτηριών της πνευμονικής κυκλοφορίας και πνευμονική υπέρταση. Κατά την διαδικασία της πνευμονικής υπέρτασης ένα πλήθος κυτοκινών όπως η ενδοθηλίνη I, η αγγειοτενσίνη II, ο PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) και η θρομβίνη επάγονται πιθανόν μέσω του HIF-1α και προκαλούν με τη σειρά τους συστολή και πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων των μικρών πνευμονικών αρτηριών [51, 10].

Ειδικότερα, η υποξία θεωρείται πως προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης των κυττάρων αυτών εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των τασεοεξαρτώμενων καναλιών K⁺ και στη συνέχεια αύξηση του Ca⁺² η οποία έχει ως αποτέλεσμα την συστολή και την υπερτροφία των πνευμονικών αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων [124]. Επιπρόσθετα φαίνεται πως η υποξία έχει άμεση επίδραση και στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Συγκεκριμένα ήπια υποξία επάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων ενώ έντονη υποξία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό [125].

1.5.3.2 Τα ΛΜΚ αεραγωγών και ο HIF-1α

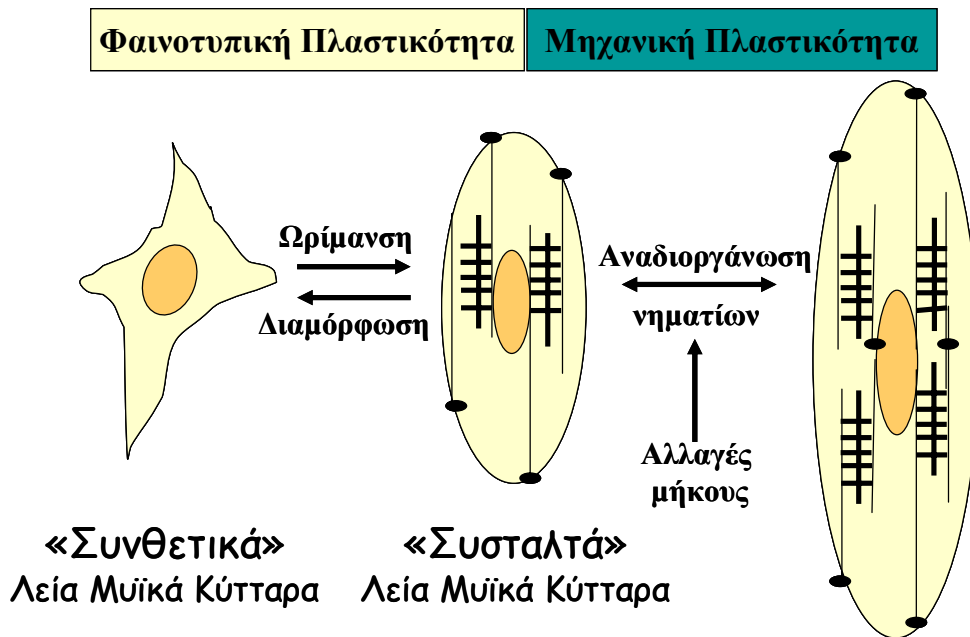
Ο HIF-1α επάγεται σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων αορτής από την υποξία ενώ φαίνεται πως σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων από πνευμονική αρτηρία εκφράζεται και σε μη υποξικές συνθήκες [121]. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές για επαγωγή του HIF-1α από αγγειοτενσίνη, θρομβίνη, FGF2 και PDGF σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [51]. Συγκεκριμένα στην επαγωγή του HIF-1α από αγγειοτενσίνη φαίνεται να εμπλέκεται το μονοπάτι της PI-3K αλλά και η αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης της PKC [57]. Τέλος στην περίπτωση της θρομβίνης θεωρείται πως ενεργοποιείται η NADPH οξειδάση η οποία δημιουργεί ROS και τα οποία σταθεροποιούν το HIF-1α πιθανόν μέσω κάποιων κινασών όπως η p38 και η Akt. Σε αντίθεση με τα ΛΜΚ των αγγείων πολύ λίγα είναι γνωστά για την έκφραση του HIF-1α σε ΛΜΚ αεραγωγών και την επίδραση του στη φυσιολογία τους.

Η σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών (ΛΜΚΑ) σχετίζεται κυρίως με παθολογικές καταστάσεις, όπως το άσθμα όπου εμφανίζεται στένωμα των αεραγωγών το οποίο προκαλεί δυσκολία της αναπνοής. Γενικά είναι γνωστό πως τα λεία μυϊκά κύτταρα εκτελούν αρκετές λειτουργίες εκτός της συστολής όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η σύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και η έκκριση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Για να επιτελέσουν τις λειτουργίες αυτές τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη πλαστικότητα καθώς και ικανότητα διαφοροποίησης [126] (*Εικ. 14*). Η φαινοτυπική πλαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων παρατηρήθηκε αρχικά σε πρωτογενείς καλλιέργειες. Όταν λεία μυϊκά κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό την παρουσία ορού εμφάνισαν ένα φαινότυπο με κύρια χαρακτηριστικά την αύξηση του πολλαπλασιασμού και την απώλεια της συσταλτής λειτουργίας τους και των συσχετιζόμενων με τη συστολή πρωτεϊνών. Όταν από τις καλλιέργειες αυτές αφαιρέθηκε ο ορός τότε τα κύτταρα άλλαξαν μορφολογικά αυξάνοντας τα μυοϊνίδια τους και τις συσταλτές πρωτεΐνες. [127, 128].

.

.

.



***Εικόνα 14:** Σχηματική αναπαράσταση της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων. Κατά την ωρίμανση τους τα ΛΜΚ παίρνουν το συσταλτό τους φαινότυπο ενώ κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μεταπίπτουν στον συνθετικό τους φαινότυπο χάνοντας την ικανότητα συστολής. Τα κύτταρα του συσταλτού φαινοτύπου διαφοροποιούνται περαιτέρω μηχανικά αυξάνοντας το μέγεθος τους και οργανώνοντας τον κυτταροσκελετό τους [126].*

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο HIF-1 (Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1) είναι ο κύριος μεταγραφικός ενεργοποιητής και ο παράγοντας κλειδί της κυτταρικής απόκρισης στην μειωμένη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (υποξία). Η ρύθμιση του HIF-1α, της μίας από τις δύο υπομονάδες του HIF-1 συμβαίνει σε πολλαπλά επίπεδα όπως στη σύνθεση ή τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης, στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες στην μεταμεταγραφική ενεργοποίηση της κ.α. Οι μοριακοί μηχανισμοί της ενεργοποίησης του HIF-1α άρχισαν μόλις πρόσφατα να μελετώνται διεξοδικά και αποτέλεσαν το βασικό αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

Ένας πρώτος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη του ρόλου του HIF-1α στη φυσιολογία των κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος χρησιμοποιώντας πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας κουνελιού. Το συγκεκριμένο σύστημα κυττάρων δεν έχει μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά στην απόκριση του στην υποξία ή σε παράγοντες όπως το κοβάλτιο και ο ορός, που είναι γνωστοί επαγωγείς του HIF-1α σε άλλους τύπους κυττάρων. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε λεπτομερειακά ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α και τα κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτήν.

Ο δεύτερος στόχος ήταν η μελέτη της λειτουργίας του HIF-1α σε μοριακό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό αρχικά επιχειρήθηκε η παραγωγή ανθρώπινου HIF-1α σε βακτήρια, ο οποίος στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της δράσης του όσον αφορά στον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και τη σύνδεση τους στο DNA. Με τη χρήση του μη τροποποιημένου βακτηριακού HIF-1α κατέστη επίσης δυνατή η διερεύνηση της φωσφορυλίωσης του από την p42 MAPK και η μελέτη του μηχανισμού μεταφοράς του στον πυρήνα.

Η διεξοδική ανάλυση των πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του HIF-1α, είτε *in vivo* είτε *in vitro*, είναι θεμελιώδους σημασίας και έχει ως στόχο όχι μόνο την παραγωγή νέας γνώσης σχετικά με βασικές κυτταρικές λειτουργίες αλλά και την κατανόηση και αντιμετώπιση πολλών ανθρωπίνων ασθενειών στις οποίες εμπλέκεται ο HIF-1α.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλωνα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημιαυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Το πλασμιδιακό DNA καθώς και το ξένο τμήμα DNA που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού μπορούν να επανακυκλοποιηθούν συνδεόμενα ομοιοπολικά στα άκρα τους μέσω της δράσης της λιγάσης του DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να εισαχθεί σε κύτταρα τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσονται παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών τα οποία επιτρέπουν την επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων έναντι των κυττάρων που δεν περιέχουν το πλασμίδιο [129].

2.1.1 Πλασμίδια και βακτηριακά στελέχη

Για την κλωνοποίηση και *in vitro* έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πλασμίδια:

2.1.1.1 Κενοί φορείς κλωνοποίησης

-pQE60 (Qiagen). Το χαρακτηριστικό του είναι ότι περιέχει τμήμα DNA που κωδικοποιεί για επίτοπο 6 ιστιδινών στην 3' περιοχή της θέσης MCS (multiple cloning site) (**Εικ. 15Α**).

-zzpQE60 [130]. Είναι ένα παράγωγο του pQE60 με τη διαφορά ότι μπροστά από το MCS κωδικοποιεί για 2 περιοχές σύνδεσης με την IgG που προέρχονται από την Protein A του *S.aureus* (**Εικ. 15Β**).

-pQE80 (Qiagen). Η διαφορά αυτού του πλασμιδίου από το pQE60 είναι ότι κωδικοποιεί για τον επίτοπο των 6 ιστιδινών στην 5' περιοχή του MCS (**Εικ. 15Γ**).

-H10GFP (παράγωγο του pQE80). Το τροποποιημένο αυτό πλασμίδιο κωδικοποιεί για επίτοπο 10 ιστιδινών και για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (**Εικ. 15Δ**), τα οποία βρίσκονται στην 5' περιοχή του MCS (χορηγήθηκε από το εργαστήριο του Dr.Görlich, ZMBH, Χαϊδελβέργη).

-pGEX-4T-1-Tev (Amersham Pharmacia). Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' περιοχή του MCS (*Εικ. 15Ε*).

-pEGFP (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού επαγωγέα CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει τη φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη στην 5' περιοχή του MCS (*Εικ. 15Ζ*).

-pET24d-GST-Tev (παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του Dr Hurt [131]. Η συγκεκριμένη κατασκευή προήλθε από το pET24d της Novagen με κλωνοποίηση της περιοχής κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της περιοχής αναγνώρισης από την Tev πρωτεάση στο συγκεκριμένο φορέα. (*Εικ. 15Η*).

2.1.1.2 Φορείς με κλωνοποιημένα ενθέματα

-TOPO-TA-HIF-1α: Το cDNA του HIF-1α (το οποίο χορηγήθηκε από τον Dr. P.J. Ratcliffe) κλωνοποιήθηκε στον συγκεκριμένο φορέα στο εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας από την κ. Π Μηνά.

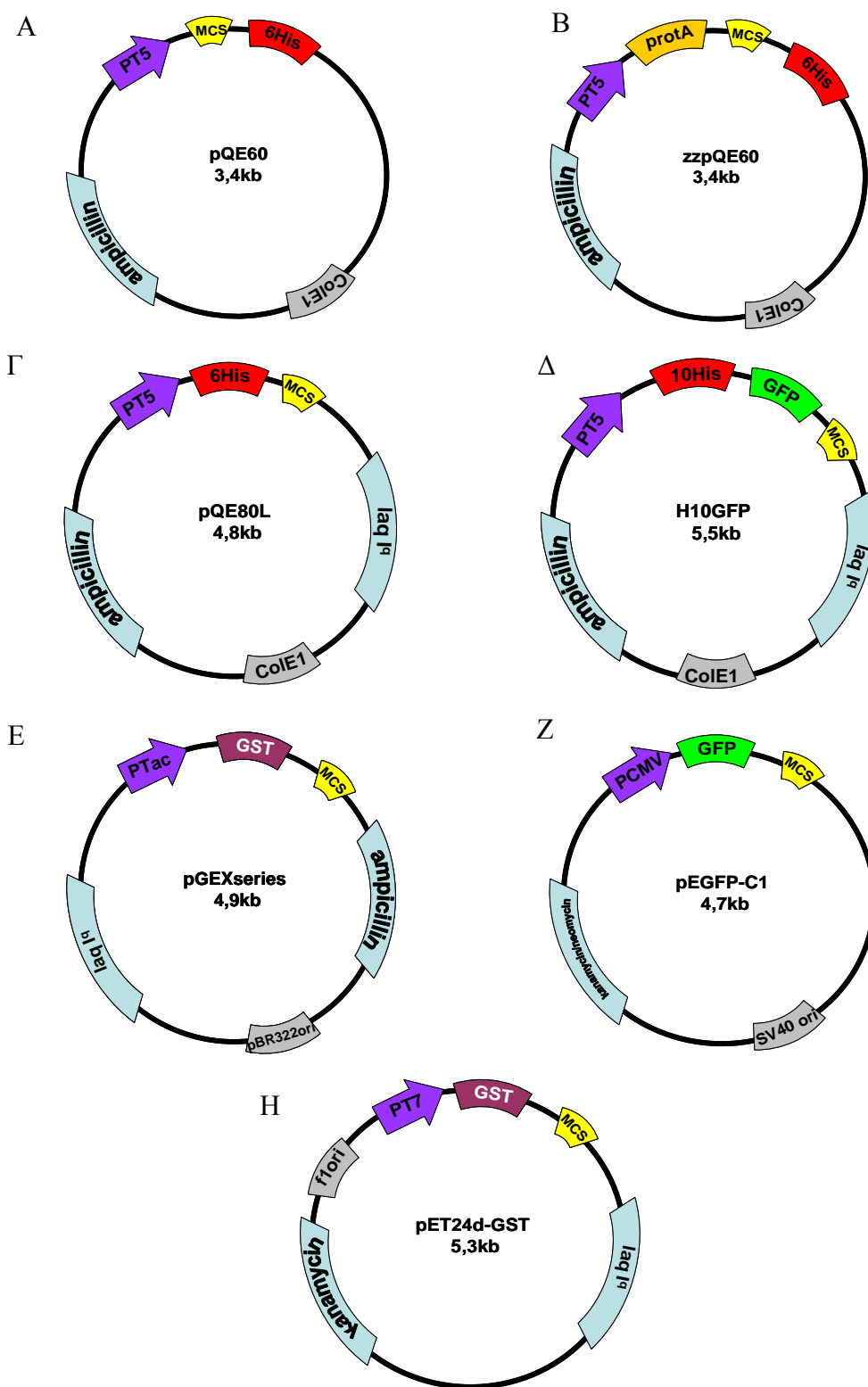
-pET32a-HIF1α.PasA (αμινοξέα 1-245) και pET32a-HIF1α.PasA.B (αμινοξέα 1-341): Ανήκουν στην κατηγορία των pET φορέων των οποίων τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή. Στους φορείς αυτούς έχουν κλωνοποιηθεί τα 245 πρώτα αμινοξέα του HIF-1α (περιέχεται δηλαδή η PASA περιοχή) στον πρώτο και τα 341 στο δεύτερο (περιέχεται η PASA και PAS B περιοχή).

-pAC28-ARNT.PasA (αμινοξέα 1-362) και pAC28-ARNT.PasA.B (αμινοξέα 1-474): Τα παραπάνω κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή. Στους συγκεκριμένους φορείς κλωνοποιήθηκαν τα 362 πρώτα αμινοξέα του ARNT (περιέχεται η PASA περιοχή του ARNT) στον πρώτο και τα 474 στο δεύτερο (περιέχεται η PASA και PAS B περιοχή).

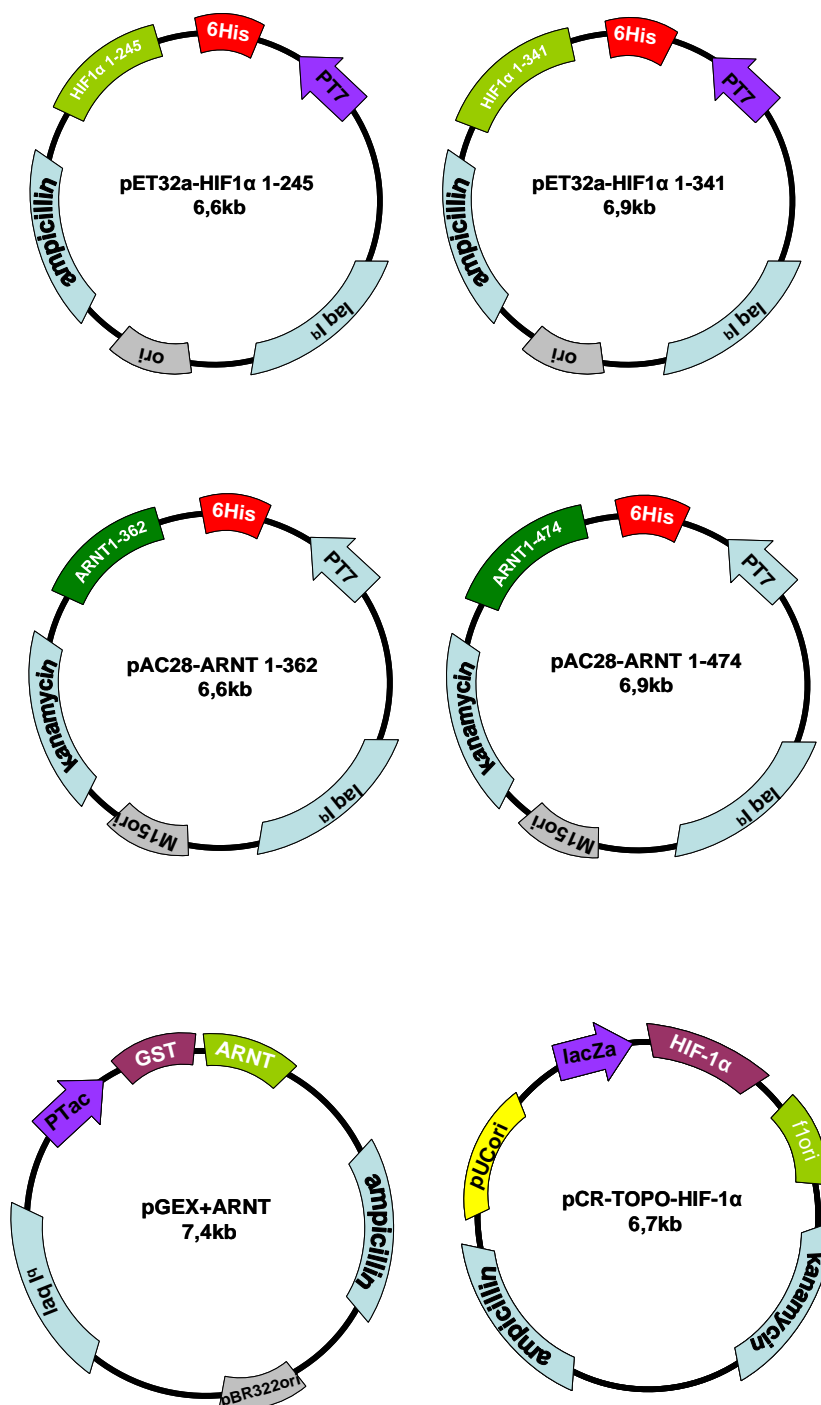
Τόσο οι pET32-HIF1α όσο και οι pAC28-ARNT φορείς κατασκευάστηκαν και παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του Dr. Whitelaw [32].

-pGEX-4T-3-ARNT (χορηγήθηκε από τον Dr. Whitelaw [132]: Ο συγκεκριμένος φορέας, εκτός από την περιοχή κωδικοποίησης της GST, περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA της πρωτεΐνης ARNT.

Τα παραπάνω πλασμίδια απεικονίζονται σχηματικά στην *Εικ. 16*.



Εικόνα 15: Κενοί φορείς κλωνοποίησης: Φαίνονται σχηματικά οι υποκινητές των πλασμιδίων, οι περιοχές έναρξης της αντιγραφής (ori), τα γονίδια ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου σε αντιβιοτικά, τα γονίδια (όπου υπάρχουν) για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI, οι περιοχές κωδικοποίησης των ιστιδινών (His) ή της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).



Εικόνα 16: Φορείς με κλωνοποιημένα ενθέματα: Φαίνονται σχηματικά οι υποκινητές των πλασμιδίων, οι περιοχές έναρξης της αντιγραφής (ori), τα γονίδια ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου σε αντιβιοτικά, τα γονίδια (όπου υπάρχουν) για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI, οι περιοχές κωδικοποίησης της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) καθώς και οι θέσεις των κλωνοποιημένων γονιδίων.

-Τα cDNA των μπορτινών α, β, 4 και 7 που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα in vitro σύνδεσης με τον HIF-1α είναι κλωνοποιημένα σε πλασμίδια τύπου pQE

(Qiagen) και φέρουν επιτόπους 6 ιστιδινών στην 5' ή στην 3' περιοχή του MCS (χορηγήθηκαν από το εργαστήριο του Dr.Görllich).

-pBlueScript: περιέχει τμήματα του HIF-1α με τα εξής αμινοξέα: 1-251, 1-530, 1-652, 348-826, 652-826. Τα τμήματα αυτά του cDNA του HIF-1α ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και κλωνοποιήθηκαν με τη βοήθεια της *Bam*HI ενδονουκλεάσης στο συγκεκριμένο φορέα στο εργαστήριο Βιοχημείας από την κ. Α. Καλούση.

2.1.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

TOP10 (InVitrogen) : Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε σχεδόν 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.

BL21(DE3)RIL (Stratagene): Έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με το προηγούμενο κυτταρικό στέλεχος με τη διαφορά ότι στο γονιδίωμα τους περιέχουν το DE3 γονίδιο για την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του lac οπερονίου. Χρησιμοποιούνται για την έκφραση πλασμιδίων που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή (pET σειρά).

BLRpREP4 (Stratagene): Τα στελέχη αυτά περιέχουν το pREP4 πλασμίδιο το οποίο εκφράζει τον καταστολέα του lac οπερονίου. Χρησιμοποιούνται για την έκφραση πλασμιδίων τα οποία από μόνα τους δεν περιέχουν το αντίστοιχο lacI γονίδιο (pQE60 σειρά).

2.1.2 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οποιοδήποτε κομμάτι του DNA μπορεί να κοπεί σε μικρότερα κομμάτια με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων που ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων.

Η ποσότητα κάθε ενζύμου που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητά του (Unit/μl). 1 unit ενζύμου ορίζεται ως η

ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl σε μια ώρα και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε είτε για τον έλεγχο του μεγέθους κομματιών DNA ή για την απομόνωση συγκεκριμένων κομματιών που προορίζονται για κλωνοποίηση. Στην πρώτη περίπτωση η αντίδραση πέψης έγινε σε 20 μl τελικού όγκου και περιείχε 1μg πλασμιδιακού DNA, 1 Unit του αντίστοιχου ενζύμου (New England Biolabs), 2μg BSA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρία παρασκευής, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 5μg πλασμιδιακού DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αντιδραστηρίων παρέμειναν οι ίδιες. Ακολούθησε επώαση για 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία [133].

2.1.3 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια) μετά από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση, εμποδίζοντας την επανασύνδεσή τους. Η αποφωσφορυλίωση έγινε με τη χρήση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (New England BioLabs). Η αντίδραση περιείχε 0,5μg DNA που είχε κοπεί με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ρυθμιστικό διάλυμα NEB3 (50mM Tris-Cl pH 7,9, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, New England BioLabs), 10 Units CIP (10.000 Unit/ml) και H₂O έως τα 30μl. Ακολούθησε επώαση στους 37⁰ C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης η CIP απενεργοποιήθηκε με προσθήκη 5mM EDTA με pH 8 και θέρμανση της αντίδρασης για 10 λεπτά στους 75⁰ C. Το αποφωσφορυλιωμένο DNA απομονώθηκε από τα λοιπά υλικά της αντίδρασης με κατακρήμνιση με 70% αιθανόλη.

2.1.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στη συγκεκριμένη τεχνική επιτυγχάνεται διαχωρισμός των διαφόρων κομματιών DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης [134]. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος κομμάτια μετακινούνται πιο αργά σε σχέση με τα μικρότερα εξαιτίας του μεγέθους των πόρων της πηκτής. Συγκέντρωση αγαρόζης 1% είναι ιδανική για το διαχωρισμό κομματιών DNA από 500 βάσεις έως 7000 βάσεις.

Για την παρασκευή της πηκτής προστέθηκε 1% αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA) και ακολούθησε θέρμανση στους

100⁰ C για την τήξη της αгарόζης. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος έπεσε στους 60⁰ C προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την εκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνεύονται τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή. Ακολούθησε τοποθέτηση του διαλύματος αгарόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για τον πολυμερισμό της σε πηκτή και προσθήκη TAE στη συσκευή ώστε να καλυφθεί η πηκτή.

Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστέθηκε 5% γλυκερόλη και μίγμα χρωστικών που αποτελούνταν από 0.42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.42% μπλε του ξυλενίου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις εγκοπές της πηκτής και ηλεκτροφορήθηκαν σε 100 V για 30 λεπτά τουλάχιστον.

2.1.5 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA από πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που προτείνεται από την εταιρία, με διαλύματα που παρέχονται από το συγκεκριμένο kit και έχει ως εξής:

Αρχικά το κομμάτι αгарόζης που περιείχε το προς απομόνωση DNA αφαιρέθηκε από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Το κομμάτι θερμάνθηκε με διάλυμα QG στους 50⁰ C για 10 λεπτά για τον αποπολυμερισμό της αгарόζης και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα. Προστέθηκε στη συνέχεια ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύτηκε κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Ακολούθησε απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών με πλύση με διάλυμα PE. Η έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA έγινε με 30 μl δις απεσταγμένου H₂O σε pH 8.

2.1.6 Αντίδραση λιγάσης

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 κομματιών DNA (π.χ. ενός ενθέματος και ενός πλασμιδίου) με συμπληρωματικά 3' και 5' άκρα.

Για την αντίδραση της λιγάσης πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε αναλογία 1/3 (απομονωμένα και καθαρισμένα από πηκτή αгарόζης) προστέθηκαν σε τελικό

όγκο 20μl με ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης, 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/μl, Fermentas) και H₂O. Το μίγμα επώαστηκε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η λιγάση απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 65°C για 10 λεπτά.

2.1.7 Παρασκευή βακτηρίων (E.coli) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Στη συγκεκριμένη τεχνική τα βακτήρια εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων κατιόντων. Έτσι οι κυτταρικές μεμβράνες ενός μικρού μέρους των κυττάρων γίνονται διαπερατές σε ξένο DNA με ένα μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός. Με την μέθοδο που ακολουθεί δημιουργήθηκαν δεκτικά κύτταρα μετά από κατεργασία των βακτηρίων με CaCl₂. Η απόδοση μετασχηματισμού με τη μέθοδο αυτή ήταν περίπου 10⁹ μετασχηματισμένες αποικίες ανά μg DNA [135].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Καλλιέργεια βακτηρίων επώαστηκε σε θρεπτικό μέσο TYM (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl και 10 mM MgSO₄) σε αντιβιοτικό επιλογής, στους 37°C για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, η καλλιέργεια αραιώθηκε 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml TYM με αντιβιοτικό επιλογής και επώαστηκε περαιτέρω στους 37°C για 2-3 ώρες. Ακολούθησε νέα αραιώση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό και επώαση της καλλιέργειας έως ότου η απορρόφηση (OD) στα 590 nm γίνει 0,35-0,4.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 1800xg για 5 λεπτά, επαναιωρήθηκαν σε 25ml διαλύματος TFB I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη) και επώαστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Το TFB I απομακρύνθηκε από τα κύτταρα, μετά από φυγοκέντρηση, στα 1800xg, για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν εκ νέου σε 2ml διαλύματος TFB II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl και 20% γλυκερόλη) και επώαστηκαν για 60 λεπτά στον πάγο. Μετά την παραπάνω επεξεργασία αποθηκεύτηκαν σε δείγματα όγκου 200μl σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου (τύπου eppendorf) στους -80°C.

2.1.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Το φαινόμενο του μετασχηματισμού επιτρέπει την είσοδο πλασμιδίων μέσα σε δεκτικά βακτήρια. Το εκάστοτε πλασμίδιο φέρει κάποιο γονίδιο επιλογής (συνήθως γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό) ώστε να επιλεγούν μόνο τα κύτταρα που το έχουν προσλάβει [135].

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων έγινε ως εξής: 1-200 ng πλασμιδιακού DNA (ή 10 μ l του προϊόντος της αντίδρασης λιάσης) προστέθηκαν σε 200 μ l δεκτικών κυττάρων τα οποία στη συνέχεια επώαστηκαν 30 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ των κυττάρων για 90 δευτερόλεπτα στους 42°C. Στα κύτταρα προστέθηκε 1ml θρεπτικού LB (Luria Broth) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1700xg. Αφού απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100-150 μ l LB και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο LB-άγαρ που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Τέλος το τρυβλίο επώαστηκε στους 37°C για περίπου 16 με 18 ώρες.

Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάστηκε ως εξής: Για 1 lt προστέθηκαν 10 gr τρυπτόνης, 5 g εκχυλίσματος ζύμης και 5 g NaCl. Ακολούθησε προσαρμογή του pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH. Στην περίπτωση παρασκευής στερεού θρεπτικού μέσου LB-άγαρ ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστέθηκαν επιπλέον 20 g άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώθηκε ενώ λίγο πριν την πήξη του διαλύματος έγινε προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού και επίστρωση σε τρυβλία.

2.1.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα E.coli

2.1.9.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (mini-preparation)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρές (3 ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων [136]. Μια αποικία που περιείχε το προς απομόνωση πλασμίδιο αναπτύχθηκε σε 3 ml LB παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής του πλασμιδίου για 14 με 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και ακολούθησε αλκαλική λύση τους με 300 μ l διαλύματος TENS (0,1N NaOH, 0,5% SDS σε TE). Έπειτα προστέθηκαν 150 μ l διαλύματος 3 M οξικού νατρίου, pH 5,2. και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 20800xg για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου και το DNA κατακρημνίστηκε μέσω προσθήκης αιθανόλης τελικής συγκέντρωσης 70%. Τέλος το ίζημα του DNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20 μ l διαλύματος TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

2.1.9.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγαλύτερες (100 ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων και έγινε με το Qiagen Midi Kit της Qiagen το οποίο επιτρέπει ανάκτηση περίπου 75-100 µg πλασμιδίου από 100 ml καλλιέργειας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η αρχή του συγκεκριμένου kit βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων με NaOH και CH₃COOK. Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA δεσμεύτηκε σε μια στήλη ανιοντοανταλλαγής σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας και pH. Το RNA και διάφορες πρωτεϊνικές προσμίξεις απομακρύνθηκαν από τη στήλη χρησιμοποιώντας διαλύματα μέτριας αλατότητας. Το πλασμιδιακό DNA εκλούστηκε σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος και στη συνέχεια αφαλατώθηκε με κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.

2.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ E.COLI

2.2.1 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή (π.χ. T5, T7 κ.α.), 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 [137].

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG έγινε ως εξής: Μια αποικία από τρυβλίο που περιείχε κύτταρα με τα μετασχηματισμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB (με κατάλληλο αντιβιοτικό) και η καλλιέργεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C. Με κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάστηκαν 1-2 lt LB (με κατάλληλο αντιβιοτικό) και επώαστηκαν υπό ανακίνηση στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας έφτασε στα 0.6-0.7 (μέτρηση στα 600 nm). Στην καλλιέργεια προστέθηκε 1 mM IPTG και η επώαση

συνεχίστηκε στους 25° C. Μετά την πάροδο 4 ωρών έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 3000xg. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με H₂O και αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

2.2.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (25 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) και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10000xg για 30 min για το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγκιστείας χρησιμοποιήθηκε το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

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, μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche) και 5 mM DTT. Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τις πρωτεΐνες με His-επίτοπο περιείχε 50 mM Tris 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1 mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche).

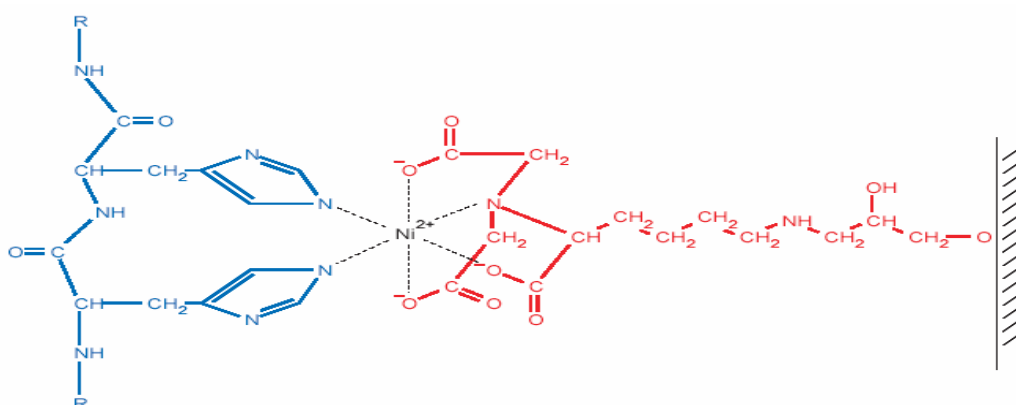
2.2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας

Η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με βάση την εξειδικευμένη και αντιστρεπτή δέσμευση της, πάνω σε προσδέτες (ligands) που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω σε αδρανές υλικό χρωματογραφίας. Προσδέτες που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι το υπόστρωμα ή ένα ανάλογο του υποστρώματος ενός ενζύμου, ένα συνένζυμο, ένας αναστολέας ή ακόμη μια άλλη πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην προς απομόνωση πρωτεΐνη. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τη στήλη επιτυγχάνεται είτε με τη διαβίβαση του ίδιου του ligand ή αναλόγου του από τη στήλη, είτε με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος του διαλύματος έκλυσης, προκαλώντας έτσι την εξασθένηση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ ligand-πρωτεΐνης [138].

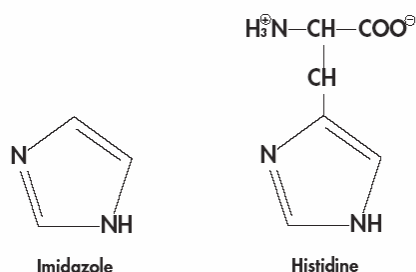
2.2.3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν επίτοπο ιστιδινών

Η μέθοδος αυτή απομόνωσης στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας αγκιστείας μέσω ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC-immobilized metal affinity chromatography). Συγκεκριμένα σε αгарόζη ακινητοποιείται η χηλική ένωση NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) η οποία δεσμεύει ιόντα νικελίου. Τα ιόντα αυτά έχουν την τάση να συνδέονται με τους δακτυλίους ιμιδαζολίου των καταλοίπων ιστιδίνης [139, 140] (*Εικ. 17*).

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια που κωδικοποιούν για μια περιοχή ιστιδινών (συνήθως 6) πριν ή μετά τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χημικών His-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να δεσμευτούν σε Ni-NTA-Sepharose σύμφωνα με τον παραπάνω τρόπο. Η έκλυση της πρωτεΐνης από το υλικό χρωματογραφίας γίνεται με τη βοήθεια ιμιδαζολίου (*Εικ. 18*).



Εικόνα 17: Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων ιστιδίνης του His-επιτόπου και της Ni-NTA αγαρόζης [140].



Εικόνα 18: Χημική δομή του ιμιδαζολίου και της ιστιδίνης [140].

Το ιμιδαζόλιο δεσμεύεται πάνω στο νικέλιο ανταγωνιζόμενο τις θέσεις σύνδεσης των ιστιδινών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η βαθμιαία αποσύνδεση των His-πρωτεϊνών από το νικέλιο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των His-πρωτεϊνών ήταν η εξής: Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εξέφραζαν τις χιμαιρικές His-πρωτεΐνες επώαστηκε για 1-2 ώρες με ανάδευση στους 4°C με σφαιρίδια Ni-NTA-Sepharose της Qiagen (500 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 όγκου 10 ml (Qiagen) όπου κατακρατήθηκαν τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνθηκε το διαλυτό κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολούθησαν διαδοχικά 3 πλύσεις των σφαιριδίων με 10 ml διαλύματος λύσης. Επιπλέον τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με 10 ml διαλύματος λύσης που περιείχε χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (20 mM) για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Η έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών έγινε με 2,5 ml διαλύματος λύσης με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (250 mM).

Για την αποθήκευση των κλασμάτων το ιμιδαζόλιο απομακρύνθηκε είτε με διαπίδυση (2.2.5) ή με διαβίβαση των εκλουσμάτων από στήλη μοριακής διήθησης (2.2.4). Στη συνέχεια τα κλάσματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μετά από προσθήκη 10% γλυκερόλης ή 250 mM σουκρόζης.

2.2.3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στην αгарόζη είναι το τριπεπίδιο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη [141].

Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (pGEX-σειρά, τροποποιημένοι pET-GST φορείς) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (συνήθως από το *Schistosoma japonicum*) πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χιμαιρικών 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 χιμαιρικές GST-πρωτεΐνες επώαστηκε για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH-Sepharose (Amersham) (500 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 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος λύσης και μία φορά με 10 ml διαλύματος λύσης απουσία απορρυπαντικού Tween 20. Η έκλουση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σωματίδια έγινε με 1,5 ml διαλύματος λύσης απουσία Tween 20 και παρουσία 10mM γλουταθειόνης σε ουδέτερο pH.

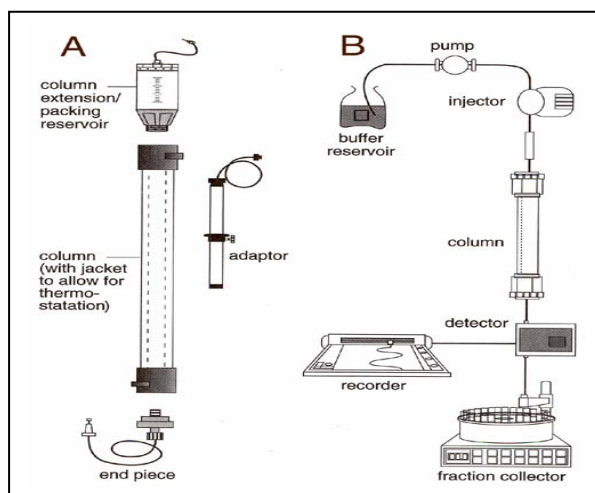
2.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η μοριακή διήθηση είναι μια τεχνική υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία διαχωρίζονται πρωτεϊνικά μόρια σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται εκτός από το διαχωρισμό ή την κλασμάτωση πρωτεϊνών και για αφαλάτωση ή αλλαγή του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Επίσης είναι χρήσιμη και για την απομάκρυνση μικρών μορίων όπως EDTA, φθορίζοντων ή ραδιενεργών μαρτύρων από το διάλυμα των πρωτεϊνών [142].

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε όχι μόνο ως ένα βήμα περαιτέρω καθαρισμού των πρωτεϊνών αλλά και ως μέθοδος διαχωρισμού συμπλόκων πρωτεϊνών από τα μεμονωμένα συστατικά τους.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Superdex S-200 (16/60) της Amersham και το σύστημα χρωματογραφίας το GradiFrac (Amersham) (*Εικ. 19*). Πριν την είσοδο του δείγματος της πρωτεΐνης, η στήλη ξεπλύθηκε με 4 όγκους στήλης H₂O και εξισορροπήθηκε με 2 όγκους στήλης κατάλληλου διαλύματος. Τα πρωτεϊνικά δείγματα (σε όγκο 0,5 με 1 ml) φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στα 10000xg για την αφαίρεση των αδιάλυτων συστατικών. Ακολούθησε είσοδος των δειγμάτων στην στήλη με σύριγγα του 1 ml. 120 κλάσματα του 1 ml συλλέχθηκαν με τη βοήθεια του

συλλέκτη κλασμάτων του Gradi-Frac συστήματος της Amersham με ρυθμό 0,6 ml/min στο διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης. Μετά το τέλος της συλλογής κλασμάτων η στήλη ξεπλύθηκε περαιτέρω με 1 όγκο στήλης διαλύματος εξισορρόπησης. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη αποθηκεύτηκαν στους -80°C.



Εικόνα 19: Εξοπλισμός για χρωματογραφία μοριακής διήθησης : A) Στήλη και υποδοχές, B) Ολοκληρωμένο αυτόματο σύστημα χρωματογραφίας (Amersham Pharmacia Biotech)

2.2.5 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 σε 500ml του νέου διαλύματος 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 30 λεπτά στις 10000xg και στους 4°C για την απομάκρυνση ιζήματος που πιθανόν δημιουργηθήκε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

2.2.6 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 [143, 144].

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

2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος που υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων μίας πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα (v) των πρωτεϊνών στο πήκτωμα εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης (q) σύμφωνα με την εξίσωση: $v = E * q / f$ όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες του πηκτώματος μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη [145, 146].

Ο σχηματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον συνπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους των οποίων το μέγεθος τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, με την προσθήκη του υπερθεϊκού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για τη διάδοση του.

Το σχήμα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι είτε κυλινδρικό είτε επίπεδο, ανάλογα με τη συσκευή στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής. Στη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για την πηκτή και για τα δοχεία των ηλεκτροδίων. Στην ασυνεχή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το *πήκτωμα επιστοίβαξης* που είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το *πήκτωμα διαχωρισμού* που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και τη σύστασή τους. Επίσης το ρυθμιστικό διάλυμα των δοχείων ηλεκτροφόρησης είναι διαφορετικό από τα δύο προηγούμενα.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται παρουσία του απορρυπαντικού SDS. Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε 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 η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

2.3.1.1 Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων κατά τη διάρκεια της εργασίας αποτελούνταν από πήκτωμα διαχωρισμού, ύψους 7,5 cm και πάχους 1 mm και πήκτωμα επιστοίβαξης ύψους 1 cm. Οι θέσεις εισαγωγής του δείγματος δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρέθηκε μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης.

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του συστήματος ήταν οι εξής: διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης: (50 mM Tris, 0.38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.9), πήκτωμα επιστοίβαξης: (4,5% ακρυλαμίδιο:bis, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 2 mM EDTA, για τον πολυμερισμό 0.08% APS, 0.04% TEMED, πήκτωμα διαχωρισμού: (8-12% ακρυλαμίδιο:bis, 0.1% SDS, 0.375 M Tris-Cl pH 8.8, 2 mM EDTA, για τον πολυμερισμό 0.04% APS, 0.04% TEMED)

2.3.1.2 Προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων

Τα δείγματα αναμίχθηκαν με ένα διάλυμα επιφόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης, 25 mM DTT). Ακολούθησε βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95°C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις εσοχές της πηκτής με τη βοήθεια σύριγγας τύπου Hamilton.

2.3.1.3 Ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση

Η ηλεκτροφόρηση της πηκτής έγινε στα 150-200 Volt, για 30-60 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώθηκε όταν το «μέτωπο» (μπλε γραμμή της χρωστικής) έφτασε στο χαμηλότερο άκρο της πηκτής.

Για τη στερέωση των πρωτεϊνών, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρώσης (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ) όπου και ανακινήθηκε για διάστημα 30 λεπτών. Ο αποχρωματισμός της πηκτής έγινε με ανακίνηση σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ).

2.3.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση

Η τεχνική αυτή αποτελείται από δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη συνήθως νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε υγρή φάση (Wet transfer) ή σε ημίξηρη φάση (Semi-dry transfer). Η μεταφορά επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό πεδίο το οποίο μετακινεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες από την πηκτή πάνω στη μεμβράνη [147].

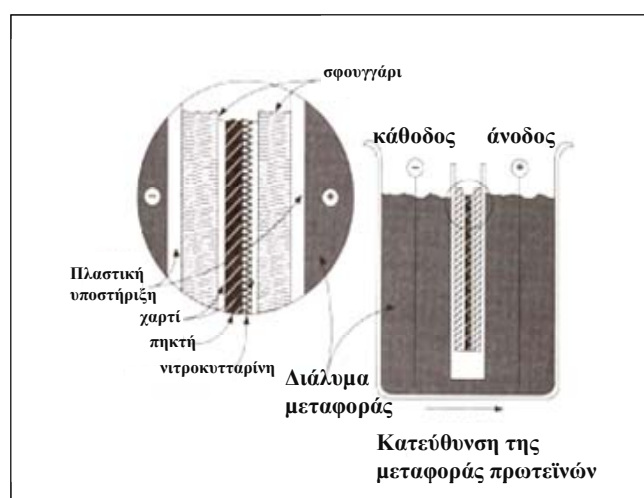
Το δεύτερο μέρος είναι η ανοσοανίχνευση που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης (αντιγόνο) με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος το οποίο εκτός ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου, είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο-δείκτη (όπως το ένζυμο HRP) το οποίο αντιδρώντας με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση ή εκλύει φωταύγεια.

2.3.2.1 Μεταφορά υγρής φάσης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή διαχωρισμού, 6 διηθητικά χαρτιά 3MM Whatman και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπήθηκαν στο διάλυμα μεταφοράς (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 1,3 mM SDS, 20% methanol). Στη

συνέχεια δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» με τα χαρτιά Whatman τη μεμβράνη και την πηκτή, η διάταξη του οποίου φαίνεται στην **Εικ. 20**. Το σάντουιτς τοποθετήθηκε με το σωστό προσανατολισμό στη συσκευή Transphor Electrophoration Unit της Höefer, η οποία ήταν γεμάτη με το διάλυμα μεταφοράς

Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά για 1,5 ώρες στα 400 mA. Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη χρωματίστηκε προσωρινά με τη χρωστική Ponceau S 0,2% για τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών. Ακολούθησε αποχρωματισμός με PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄)



Εικόνα 20: Διάταξη του σάντουιτς πηκτής-μεμβράνης στη μεταφορά πρωτεϊνών υγρής φάσης [147].

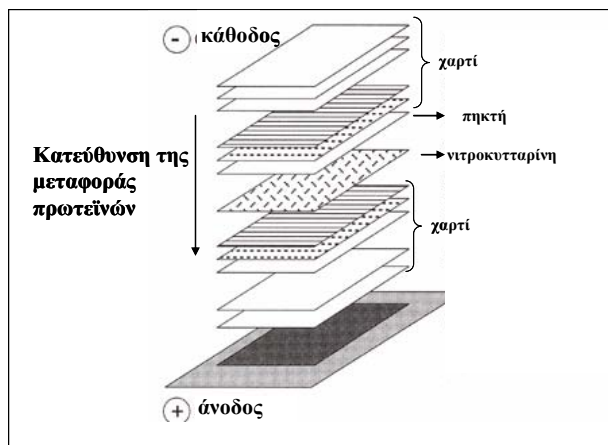
2.3.2.2 Μεταφορά ημίξηρης φάσης

Σε αυτή τη διαδικασία, η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μεταξύ 2 μεγάλων ηλεκτροδίων γραφίτη, χωρίς τη χρήση διαλύματος μεταφοράς (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 1,3 mM SDS). Ο τρόπος αυτός μεταφοράς δεν ενδείκνυται για μεγάλους χρόνους μεταφοράς (υπάρχει κίνδυνος καταστροφής των ηλεκτροδίων). Το «σάντουιτς» που δημιουργήθηκε τοποθετήθηκε σε οριζόντια θέση σε συσκευή Trans-Blot SD της BioRad (**Εικ. 21**). Η μεταφορά έγινε ηλεκτροφορετικά για 1 ώρα στα 10 Volts και χρωματίστηκε προσωρινά με τη χρωστική Ponceau S 0,2% όπως ήδη περιγράφηκε.

2.3.2.3 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη σε PBS και 0,1% Tween20) για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες

αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Μετά την επώαση ακολούθησαν πλύσεις της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με PBS και 0,1% Tween20 (που χρησιμοποιήθηκε και σε όλους τους υπολοίπους χειρισμούς).



Εικόνα 21: Διάταξη του σάντουιτς πηκτής-μεμβράνης κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών ημι-ξηρής φάσης [147].

Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C με το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση). Ακολούθησαν 3 πλύσεις για 10 λεπτά για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη. Έπειτα η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα με ένα 2ο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση) και ακολούθησαν οι απαραίτητες πλύσεις.

Τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα παρουσιάζονται στον **Πιν. 5**.

Η μεμβράνη στη συνέχεια επώαστηκε για ένα λεπτό με διάλυμα που περιείχε 10ml λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5), 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Στη συνέχεια καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Πρώτα Αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρία
αντι-HIF-1α	ποντίκι	1/500	BD Biosciences
αντι-ARNT	ποντίκι	1/500	BD Biosciences
αντι-α-ακτίνη ΛΜ	ποντίκι	1/400	Sigma
αντι-φωσφ. Akt	κουνέλι	1/1000	Cell Signalling
p42-44 MAPK	κουνέλι	1/1000	Cell Signalling
φωσφορ.p42-44 MAPK	κουνέλι	1/1000	Cell Signalling
αντι-GST	κατσίκια	1/1000	Amersham
αντι-tetra His	ποντίκι	1/1000	Qiagen
αντι-5His-HRP	ποντίκι	1/500	Qiagen
PAP	κουνέλι	1/1000	DAKO

Δεύτερα Αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρία
αντι-IgG ποντικού	κατσίκια	1/3000	BioRad
αντι-IgG κουνελιού	κατσίκια	1/3000	Cell Signalling
αντι-IgG κατσίκας	ποντίκι	1/3000	Jackson Immunores.
αντι-IgG ποντικού-FITC	κατσίκια	1/50	Amersham

Πίνακας 5: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση στα διάφορα πειράματα. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν.

2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ DNA ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΛΛΑΓΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, επιτρέπει την ανίχνευση της σύνδεσης πρωτεϊνών σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται ειδικά σε ένα σημασμένο κομμάτι DNA αλλάζουν την κινητικότητα του κατά την ηλεκτροφόρηση, οδηγώντας σε διακριτές ζώνες που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση σύνδεσης καθαρών πρωτεϊνών ή μη χαρακτηρισμένων παραγόντων από ένα εκχύλισμα κυττάρων σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Επίσης, επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγγένειας του συμπλόκου, τον καθορισμό των σταθερών σύνδεσης και αποσύνδεσης των συμπλόκων, καθώς και την ειδικότητα σύνδεσης πρωτεϊνών σε DNA αλληλουχίες [148].

Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της σύνδεσης του ανασυνδυασμένου μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 ή τμημάτων του σε ένα 18μερές

ολιγονουκλεοτίδιο που περιείχε την αλληλουχία HRE του 3' ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

2.4.1 Παρασκευή ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

-W18a: 5'-GCCCTACGTGCTGTCTCA-3'

-M18a: 5'-GCCCTAAAAGCTGTCTCA-3'

και τα συμπληρωματικά τους:

-W18c: 5'-TGAGACAGCACGTAGGGC-3'

-M18c: 5'-TGAGACAGCTTTTAGGGC-3'

Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια αγοράστηκαν από την MWG.

Για τη σήμανση του άκρου των ολιγονουκλεοτιδίων W18a και M18a έγινε επώαση 2,5 μl γ-P³²ATP (5000 Ci/mmol, της Amersham) με 0,5 μl ολιγονουκλεοτιδίου (10 pmol/μl) και 0,5 μl ενζύμου T4-πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (Fermentas) σε 10μl διαλύματος A (50 mM Tris-Cl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 μM EDTA, 100 μM σπερμιδίνη). Η επώαση διήρκησε 1 ώρα στους 37°C. Η αντίδραση τερματίστηκε με θέρμανση στους 68°C για 10 λεπτά.

Για να απομακρυνθεί το ελεύθερο ραδιενεργό ATP χρησιμοποιήθηκε το Nucleotide Removal Kit της Qiagen. Η ακριβής διαδικασία αναγράφεται λεπτομερώς στο ειδικό έντυπο της εταιρίας (Qiaquick Spin Handbook, 2002) και στηρίζεται στην αρχή προσρόφησης του DNA σε μια μεμβράνη (silica gel) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

Με τη βοήθεια μετρητή ραδιενέργειας υπολογίστηκε το αρχικό ποσό ραδιενέργειας και το ποσοστό αυτής που δεσμεύτηκε τελικά στο DNA. Συγκεκριμένα δείγματα 1 μl από τα παραπάνω βήματα προσροφήθηκαν σε διηθητικά χαρτιά Whatman τα οποία τοποθετήθηκαν σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες με 5 ml υγρού σπινθηρισμού (Zinsser) των οποίων το ποσό ραδιενέργειας μετρήθηκε σε μετρητή ραδιενέργειας τύπου Wallec 1409 liquid scintillation counter.

Τα ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια στη συνέχεια υβριδοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα μη ραδιοσημασμένα συμπληρωματικά τους. Για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 pmol του σημασμένου ανιχνευτή από την παραπάνω μέθοδο με 10 pmol του συμπληρωματικού ολιγονουκλεοτιδίου. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 94°C και για 10 λεπτά στους 56°C.

2.4.2 Δοκιμασία αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας

Χρησιμοποιήθηκε μη αποδιατακτική πηκτή, που περιείχε 4% ακρυλαμιδίου, 0,1% bis ακρυλαμιδίου, διάλυμα TGE (0,25 M Tris, 1,9 M glycine, 10 mM EDTA), 0,0833% APS και 0,116% TEMED. Η πηκτή προ-ηλεκτροφορήθηκε πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στα 100 V για 1 ώρα. Κατά τη διάρκεια της προ-ηλεκτροφόρησης της πηκτής έγινε η επώαση των πρωτεϊνών με τον σημασμένο δίκλωνο ανιχνευτή. Η αντίδραση περιείχε 200 ng πρωτεϊνικού υποστρώματος και 7,5 μg BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα EMSA (10 mM Tris-Cl pH7.4, 50 mM KCl, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ 10% γλυκερόλη). Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8 fmoles ανιχνευτή (≈60.000cpm) και 40 ng poly dI-dC σε τελικό όγκο 15 μl και η αντίδραση επώαστηκε περαιτέρω για 30 λεπτά στους 4⁰C ή σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας της επώασης πρωτεϊνών-DNA στα δείγματα προστέθηκε διάλυμα επιφόρτωσης (0,033% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην πηκτή και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 2 ώρες στα 150 V σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετήθηκε σε χαρτί Whatman για ξήρανση υπό κενό για 1 ώρα. Ακολούθησε αυτοραδιογραφία σε φιλμ Kodak BioMax MS στους -80⁰C.

2.5 ANTIΔΡΑΣΗ *IN VITRO* ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης περιείχε ως υπόστρωμα 250-500 ng καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, 100-200 U ενεργοποιημένης ανασυνδυασμένης p42 MAP κινάσης (New England BioLabs), 100 μM ATP σε διάλυμα MAPK (50 mM Tris-Cl, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 0.01 % Brij, pH 7.5) σε τελικό όγκο 20 μl. Για την ανίχνευση της φωσφορυλίωσης με αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση 5 μCi [γ -P³²] ATP (τελικής ειδικής ενεργότητας 2500 μCi/μl). Η αντίδραση επώαστηκε για 30 λεπτά με 1 ώρα στους 30⁰C και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικές συνθήκες.

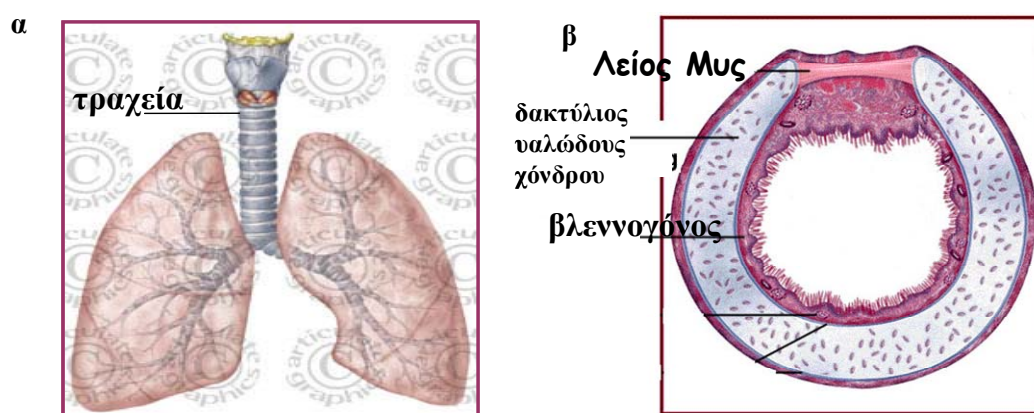
2.6 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Η δημιουργία και διατήρηση πρωτογενών καλλιιεργειών λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών (ΛΜΚΑ) από τραχεία κουνελιού έγινε σύμφωνα με τα παρακάτω πρωτόκολλα:

2.6.1 Απομόνωση λείων μυϊκών κυττάρων από τραχεία κουνελιού

Ενήλικα κουνέλια θυσιάστηκαν με Dolethal και η τραχεία τους (**Εικ. 22α**) αφαιρέθηκε κάτω από κατά το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε ξέπλυμα της τραχείας σε παγωμένο και αποστειρωμένο διάλυμα Krebs χαμηλού Ca^{+2} (139 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,47 mM MgSO_4 , 11 mM γλυκόζη, 1,47 mM KH_2PO_4 , 2,8 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM NaHCO_3 , 0,2 mM CaCl_2) και απομάκρυνση του λίπους από τον ιστό. Εν συνεχεία, ο χόνδρος της τραχείας κόπηκε ώστε να ανοίξει η τραχεία κατά μήκος, σε σημείο απέναντι από τις λείες μυϊκές ίνες και το επιθήλιο αφαιρέθηκε με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στειλεό. Τέλος αφαιρέθηκε και ο χόνδρος.

Οι λείες μυϊκές ίνες (**Εικ. 22β**) ξεπλύθηκαν με διάλυμα Krebs χαμηλού Ca^{+2} και μεταφέρθηκαν σε 2 ml του ιδίου διαλύματος που περιείχε 0,25% BSA, 2 mg/ml κολλαγενάση I και 10 U/ml ελαστάση IV. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 37°C με ανάδευση. Μετά την επώαση ακολούθησαν 2 πλύσεις με διάλυμα Krebs χαμηλού Ca^{+2} με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις 10 λεπτών στα 1000xg (4°C) για την αφαίρεση του υπερκειμένου.



Εικόνα 22: Απεικόνιση τραχείας (α) και ημικρικού τραχείας (β) όπου διακρίνεται η θέση των λείων μυών.

Ο ιστός καθώς και τα κύτταρα που αποκολλήθηκαν από την παραπάνω διαδικασία μεταφέρθηκαν εκ νέου σε 2 ml διαλύματος Krebs χαμηλού Ca^{+2} που περιείχε 0,25% BSA, 1 mg/ml κολλαγενάση I και 20 U/ml ελαστάση IV και επώαστηκαν 45-60 λεπτά στους 37°C με ανάδευση. Μετά τη δεύτερη επώαση ακολούθησε πλύση με θρεπτικό Dulbecco's modified Eagle's /Ham's F12 (DMEM-F12, GIBCO), το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνη and 100 g/ml στρεπτομυκίνη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 10 λεπτών στα 1000-1200xg

(4⁰C) και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM-F12 με απαλό πιπετάρισμα για την αποκόλληση των χαλαρά συνδεδεμένων κυττάρων από τον ιστό.

2.6.2 Καθιέρωση καλλιιεργειών λείων μυικών κυττάρων τραχείας

Τα ΛΜΚΑ που απομονώθηκαν τοποθετήθηκαν σε φλάσκες των 75 cm² με θρεπτικό υλικό DMEM-F12 το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 g/ml στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν στους 37⁰C σε θάλαμο επώασης με 5% CO₂. (περίπου 5x10⁴ κύτταρα ανά 2 ml θρεπτικού υλικού). Τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στη φιάσκα σε 24 ώρες. Όταν τα κύτταρα γέμισαν τη φιάσκα αποκολλήθηκαν με 0,2 % τρυψίνη. Ακολούθησαν επανακαλλιέργειες των κυττάρων σε φιάσκες ή σε τρυβλία καλλιιεργειών των 10 cm. Τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα ΛΜΚΑ βρίσκονταν στην 3^η με 6^η ανακαλλιέργεια.

2.6.3 Πάγωμα κυττάρων και επανένταξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: κύτταρα τα οποία ήταν προσκολλημένα σε μια φιάσκα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml 0,2% τρυψίνης σε PBS και η φιάσκα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 37⁰C για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 2 ml θρεπτικού υλικού ψύξης που περιείχε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο, GIBCO) και ακολούθησε μεταφορά σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και σταδιακή ψύξη τους στους -80⁰C.

Η επανένταξη καλλιιεργειών από τα αποθηκευμένα κύτταρα έγινε ως εξής: Τα παγωμένα κύτταρα ξεπάγωσαν γρήγορα με θέρμανση τους στους 37⁰C και στη συνέχεια προστέθηκαν σταγόνα σταγόνα 10 ml θρεπτικού υλικού DMEM-F12 που περιείχε 10% FBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 200xg για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φιάσκα για περαιτέρω επώαση στους 37⁰C σε 5% CO₂.

2.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΕΙΑΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

2.7.1 In vitro διαφοροποίηση

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν ώστε να γεμίσουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Το θρεπτικό υλικό τους αφαιρέθηκε, ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS και εν συνεχεία προστέθηκε στα κύτταρα θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, το οποίο περιείχε 100 U/ml πενικιλίνη, 100 g/ml στρεπτομυκίνη και μίγμα από ινσουλίνη (5 μg/ml), τρανσφερίνη (5 μg/ml) και σελήνιο (5 ng/ml). Ακολούθησε περαιτέρω επώαση των κυττάρων στους 37°C σε 5% CO₂, για 3 με 10 μέρες, με ενδιάμεσες αλλαγές του θρεπτικού ανά 2 μέρες.

2.7.2 Μελέτη της επαγωγής του HIF-1α

Η επαγωγή του HIF-1α στις καλλιέργειες των λείων μυϊκών κυττάρων προκλήθηκε με προσθήκη στο τρυβλίο καλλιέργειας 100 μM CoCl₂ (Sigma), 10% FBS (Gibco) ή με επίδραση υποξίας (1-2% O₂) με τη βοήθεια θαλάμου υποξίας (Billups-Rothenberg).

Η μελέτη της επαγωγής του HIF-1α στις καλλιέργειες των λείων μυϊκών κυττάρων έγινε με προσθήκη διαφόρων χημικών ουσιών σε συγκεντρώσεις και για χρόνους που φαίνονται στον πίνακα 6. Όλες οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Sigma. Την ημέρα του πειράματος έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού μια ώρα πριν την προσθήκη των διαφόρων ουσιών.

ΟΥΣΙΑ	ΔΡΑΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ
ΚΥΚΛΟΞΙΜΙΔΙΟ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ	10 μg/ml	Μετά την επαγωγή του HIF-1α
ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΙΝΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	0,5 μg/ml	15 λεπτά πριν την επαγωγή του HIF-1α
WORTMANNIN	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΡΙΖΚ ΜΟΝΟΦΑΤΙΟΥ	100-500 nM	15 λεπτά πριν την επαγωγή του HIF-1α
MG132	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΡΟΣΠΕΩΣΜΑΤΟΣ	10 μM	4 ώρες
LY 294002	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΡΙΖΚ ΜΟΝΟΦΑΤΙΟΥ	50 μM	15 λεπτά πριν την επαγωγή του HIF-1α
ΡΑΠΑΜΥΚΙΝΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΡΙΖΚ ΜΟΝΟΦΑΤΙΟΥ	50 nM	30 λεπτά πριν την επαγωγή του HIF-1α
SNP	ΕΚΛΥΣΗ NO	100 μM	1 ώρα πριν την επαγωγή του HIF-1α
DETA-NO	ΕΚΛΥΣΗ NO	100-1000 μM	1 ώρα πριν την επαγωγή του HIF-1α
NAC	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ	5 mM	2 ώρες πριν την επαγωγή του HIF-1α
DMOG	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΠΡΟΛΥΛ-ΥΔΡΟΞΥΛΑΣΩΝ	1 mM	4 ώρες

Πίνακας 6: Χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επαγωγής του HIF-1α στα ΑΜΚΑ

2.7.3 Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ΑΜΚ

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα λεία μυϊκά κύτταρα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά το τρυβλίο ξεπλύθηκε με κρύο

PBS, το οποίο περιείχε 100 µg/ml του αναστολέα πρωτεασών PMSF. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε 100µl διαλύματος λύσης (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 100 µg/ml PMSF, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerolphosphate) με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου eppendorff, επωάστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για 30 λεπτά στους 4⁰C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα επιφόρτωσης και ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 95⁰C για 3 λεπτά.

2.7.4 Μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Για την ανίχνευση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ειδικά αντισώματα τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που βρίσκονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στη συνέχεια επώαση των κυττάρων με δεύτερα αντισώματα ειδικά για τα πρώτα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες επιτρέπει τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός [149].

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση HIF-1α και α-ακτίνης των λείων μυών σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τραχείας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: ΛΜΚΑ αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την μέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με PBS/3% φορμαλδεύδη. Ακολούθησε νέα πλύση με PBS και κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4⁰C. Στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0,1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 4⁰C. Το πρώτο αντίσωμα (anti-α-ακτίνη λείων μυών σε αραιώση 1/400 ή anti-HIF-1α σε αραιώση 1/200) προστέθηκε για μια ώρα σε PBS-0,1% Tween/1% BSA, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικά πλυσίματα με PBS 0,1% Tween/1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το 2^ο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC σε αραιώση 1:50) για 30 λεπτά στους 4⁰C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με

διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν με 2 μl vectashield (Vector laboratories) σε αντικειμενοφόρους και ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.7.5 Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια pEGFP

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων [150].

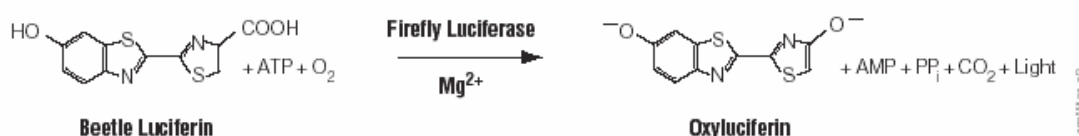
Η επιμόλυνση των ΛΜΚΑ έγινε με τη βοήθεια του DOTAP liposomal transfection kit της Roche και για την έκφραση του ανασυνδυασμένου GFP-HIF-1α ή της GFP τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP και pEGFP-HIF-1α. Με τη μέθοδο αυτή η εισαγωγή των πλασμιδίων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια λιποσωμάτων. Συγκεκριμένα, το DNA παγιδεύεται σε σωματίδια λιπιδίων τα οποία συντήκονται με τη μεμβράνη των κυττάρων μεταφέροντας το έτσι εντός του κυττάρου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Το DNA που επρόκειτο να εισαχθεί κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε H₂O (σε συγκέντρωση 0,3 μg/μl) πριν τις διαδικασίες του πειράματος. ΛΜΚΑ αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες των 12 mm. Πριν τη διαδικασία της επιμόλυνσης έγινε ανανέωση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Για τη δημιουργία του μίγματος επιμόλυνσης, 1,5 μg DNA προστέθηκε σε 15 μl τελικού όγκου διαλύματος HBS (20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl). Σε ξεχωριστό σωλήνα προστέθηκαν 15 μl αντιδραστηρίου DOTAP σε 50 μl τελικού όγκου HBS. Ακολούθησε ανάμιξη του DNA με το μίγμα του DOTAP με αργό πιπετάρισμα. Το νέο μίγμα που προέκυψε επώαστηκε 10-15 λεπτά στους 15-25⁰C και στη συνέχεια προστέθηκε σε 1,5 ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιείχε 10% FBS εμβρύου βοός. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το παραπάνω θρεπτικό υλικό για 6 ώρες. Μετά το πέρας των 6 ωρών έγινε αντικατάσταση με νέο θρεπτικό υλικό ίδιας σύστασης και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω για 24 με 48 ώρες. Μετά την επώαση έγινε πλύση των καλυπτρίδων με PBS και μονιμοποίηση τους με PBS-3% φορμαλδεύδη. Η φορμαλδεύδη απομακρύνθηκε με διαδοχικές πλύσεις με PBS και H₂O με τον τρόπο που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Τέλος οι καλυπτρίδες

τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο με 2μl vectashield (Vector laboratories) και ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.7.6 Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{+2} (Εικ. 23). Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς [151].



Εικόνα 23: Οξείδωση της λουσιφερίνης από το ένζυμο λουσιφεράση (Promega)

Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF/5HRE το οποίο περιέχει 5 HRE στοιχεία του γονιδίου του VEGF στην 5' περιοχή του γονιδίου της λουσιφεράσης και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pUC19/β-gal το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης [152].

Η επιμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια έγινε με το Fugene 6 αντιδραστήριο της Roche το οποίο επιτρέπει την επιμόλυνση κυττάρων χωρίς τη χρήση ορού στο θρεπτικό υλικό. 3 μl αντιδραστηρίου Fugene επώαστηκαν για 5 λεπτά με 50 μl θρεπτικού DMEM χωρίς ορό και χωρίς αντιβιοτικά. Στη συνέχεια προστέθηκε 0,5 μg από κάθε πλασμίδιο και η επώαση συνεχίστηκε για άλλα 15 λεπτά. Το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα που είχαν ήδη καλλιεργηθεί και διαφοροποιηθεί σε τρυβλία 12 θέσεων (διαμέτρου 22 mm) και ακολούθησε επώαση για 28 ώρες. Τα ΛΜΚΑ στη συνέχεια επώαστηκαν με τους επαγωγείς του HIF-1α για 18 ώρες. Τα κύτταρα σε κάθε θέση του τρυβλίου λύθηκαν με 75 μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay System kit της Promega). Ακολούθησε στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20000xg) και μεταφορά

του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκαν με 20 μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο.

Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 20 μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκαν με 200 μl μίγματος (170 μl διαλύματος lacZ (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 40 mM β-μερκαπταιθανόλης) + 30 μl ONPG 0,5 mg/ml, Sigma). Το μίγμα παρέμεινε στους 30⁰C μέχρι το χρωματισμό του διαλύματος σε κίτρινο. Η αντίδραση διακόπηκε με 40 μl ανθρακικού νατρίου 1 M. Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων έγινε στα 420 nm.

2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ IN VITRO

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται μια in vitro ανασύσταση του συστήματος εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα. Αρχικά, καλλιέργεια κυττάρων HeLa υπόκειται σε κατεργασία με το απορρυπαντικό διγτονίνη. Η κατεργασία αυτή οδηγεί στη δημιουργία διαπερατής κυτταροπλασματικής μεμβράνης εξαιτίας της σύνδεσης της διγτονίνης με τα μόρια χοληστερόλης της μεμβράνης, ενώ η πυρηνική μεμβράνη μένει ανέπαφη. Τα διαλυτά στοιχεία του κυτταροπλάσματος διαχέονται εκτός του κυττάρου μέσω της διάτρητης μεμβράνης. Στα «άδεια» πλέον κύτταρα προστίθενται in vitro τα απαραίτητα συστατικά για την είσοδο μιας πρωτεΐνης στον πυρήνα (ανασυνδυασμένες ιμπορτίνες, σύστημα ενέργειας, RanGDP κ.λ.π.) καθώς και η προς έλεγχο (για την είσοδο της στον πυρήνα) φθορίζουσα ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Ακολουθεί παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της φθορίζουσας πρωτεΐνης.

Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της εισόδου του GFP-HIF-1α στον πυρήνα παρουσία ή απουσία διαφόρων ιμπορτινών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν πάνω σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες την προηγούμενη μέρα του πειράματος. Την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν για 10 λεπτά με 40 μg/ml διγτονίνης σε κρύο διάλυμα A (20 mM Hepes pH 7,5, 110 mM οξικό κάλιο, 5 mM οξικό μαγνήσιο, 250 mM σακχαρόζη). Ακολούθησαν 3 πλύσεις με διάλυμα A χωρίς διγτονίνη. Στη συνέχεια πάνω σε κάθε καλυπτρίδα προστέθηκαν 40 μl μίγματος που περιείχε 2 μM ανασυνδυασμένης φθορίζουσας πρωτεΐνης, 2 μM από κάθε ανασυνδυασμένη ιμπορτίνη, μίγμα Ran (3 μM RanGDP, 0.3 μM NTF2, 0.2 μM

RanBP1 και 0.2 μ M RNA 1p), σύστημα ενέργειας (10 mM φωσφατάση της κρεατίνης, 0.5 mM ATP και GTP και 50 μ g/ml κινάση της κρεατίνης) σε διάλυμα A, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα μετά την επώαση μονιμοποιήθηκαν με 3.7% παραφορμαλδεύδης σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με PBS και H₂O. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο με 2 μ l vectashield και έγινε παρατήρηση τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

2.9 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ

Η συγκατακρήμνιση συνιστά μία μέθοδο, που επιτρέπει τη διερεύνηση της δυνατότητας πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δίνει μία πρώτη εκτίμηση για το πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση αυτή. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη δυνατότητα καθήλωσης διαφόρων πρωτεϊνών οι οποίες φέρουν ειδικούς επιτόπους (π.χ GST ή 6xHis) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων ρητινών χρωματογραφίας (GSH-Sepharose, Ni-NTA-Sepharose). Τα σφαιρίδια στη συνέχεια επωάζονται με ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα ώστε να γίνει δυνατή η σύνδεση των καθηλωμένων πρωτεϊνών με πρωτεΐνες με τις οποίες εμφανίζουν αγκιστεία. Η απομάκρυνση των σφαιριδίων από το εκχύλισμα γίνεται με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια τα σύμπλοκα των δεσμευμένων πρωτεϊνών εκλούνται από τα σφαιρίδια με τη βοήθεια SDS.

Στην παρούσα εργασία ως μέσο καθήλωσης χρησιμοποιήθηκε η στήλη GSH-Sepharose για τη δέσμευση του HIF-1 α ή τμημάτων του που είχαν εκφραστεί ως πρωτεΐνες σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Τα γενικά στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκαν σε κάθε περίπτωση ήταν τα παρακάτω: Αρχικά 25 μ l σφαιριδίων GSH-Sepharose εξισορροπήθηκαν με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4°C, σε διάλυμα λύσης (αναφέρεται στο 2.2.3.2). Η δέσμευση των διαφόρων GST-πρωτεϊνών (GST-HIF-1 α ή τμημάτων του) στα σφαιρίδια της ρητίνης έγινε παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4°C για 2 ώρες. Το αδέσμευτο κλάσμα απομακρύνθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 12000xg και τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα σύνδεσης (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM (CH₃COO)₂Mg, 3 mM DTT) στους 4°C. Στη συνέχεια 700 μ l υποτονικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa, ή 5 μ gr απομονωμένων ιμπορτινών τα οποία βρίσκονταν σε διάλυμα σύνδεσης προστέθηκαν στα σφαιρίδια και επωάστηκαν σε μικροστήλες Mobicol (Mobitec) για 3 ώρες στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12000xg και απομάκρυνση του υπερκειμένου, ακολούθησαν 3 πλύσεις των

σφαιριδίων με το διάλυμα σύνδεσης, στους 4°C. Τελικά, έγινε έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με προσθήκη 40 µl διαλύματος επιφόρτωσης SDS-PAGE χωρίς DTT. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστέθηκαν 25 mM DTT ακολούθησε θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ (ΛΜΚΑ) ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

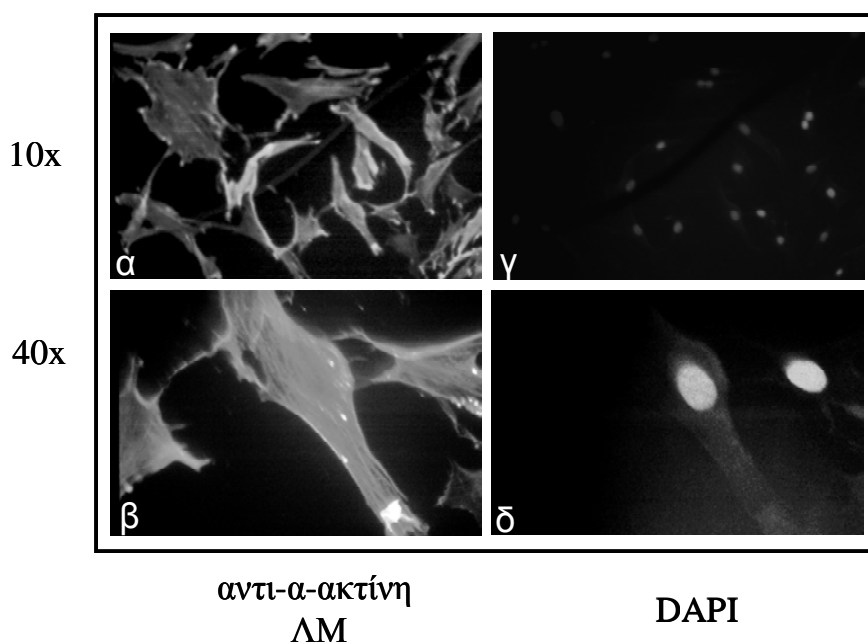
Ενώ ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α από την υποξία είναι γνωστός και συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού τελευταία βρέθηκε πως ο HIF-1α επάγεται και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου σε διάφορους τύπους κυττάρων (αναφέρεται στο 1.3.2). Οι μηχανισμοί της μη υποξικής επαγωγής δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως ενώ φαίνεται να εξαρτώνται άμεσα από τον τύπο των κυττάρων.

Για τη μελέτη της επαγωγής και του μηχανισμού ενεργοποίησης του HIF-1α σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου χρησιμοποιήθηκαν λεία μυϊκά κύτταρα του άνω αναπνευστικού που προήλθαν από τραχεία κουνελιού. Για τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές συνθήκες. Πρώτον κύτταρα που καλλιεργούνται συνεχώς παρουσία ορού εμβρύου βοός και τα οποία παρουσιάζουν τον συνθετικό φαινότυπο με κύρια χαρακτηριστικά το συνεχή πολλαπλασιασμό και δεύτερον ΛΜΚΑ που έχουν υποστεί στέρηση ορού και τα οποία εμφανίζουν αναστολή του πολλαπλασιασμού και χαρακτηρίζονται ως διαφοροποιημένα γιατί παρουσιάζουν συσταλτές ιδιότητες. Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η διερεύνηση της επαγωγής του HIF-1α σε ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου.

3.1.1 Επαγωγή του HIF-1α από CoCl_2

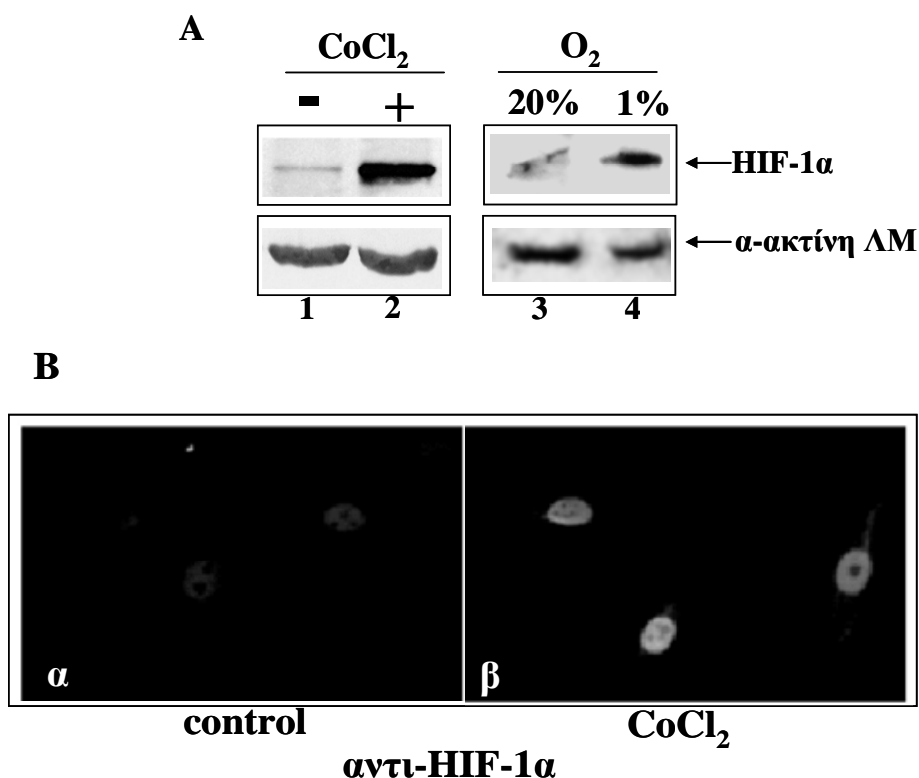
Η μελέτη ξεκίνησε με την καθιέρωση πρωτογενών καλλιεργειών ΛΜΚ του άνω αναπνευστικού. Για το σκοπό αυτό, ΛΜΚΑ απομονώθηκαν από τραχεία ενήλικου κουνελιού με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις Μεθόδους. Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν σε τρυβλία στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 και σε θρεπτικό υλικό DMEM-F12 που περιείχε ορό. Πριν το ξεκίνημα των πειραμάτων έγινε έλεγχος των καλλιεργειών που δημιουργήθηκαν για την πιστοποίηση του τύπου των κυττάρων. Με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα έναντι της α-ακτίνης των λείων μυών βρέθηκε πως >95% των κυττάρων στην καλλιέργεια εξέφραζαν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (*Εικ. 24*) και κατά συνέπεια ήταν λεία μυϊκά.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν είναι δυνατή η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α στα συγκεκριμένα κύτταρα με ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των ΛΜΚΑ με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Ο έλεγχος για το ισοφόρτωμα των δειγμάτων έγινε με ταυτόχρονη ανίχνευση της α -ακτίνης των λείων μυών.



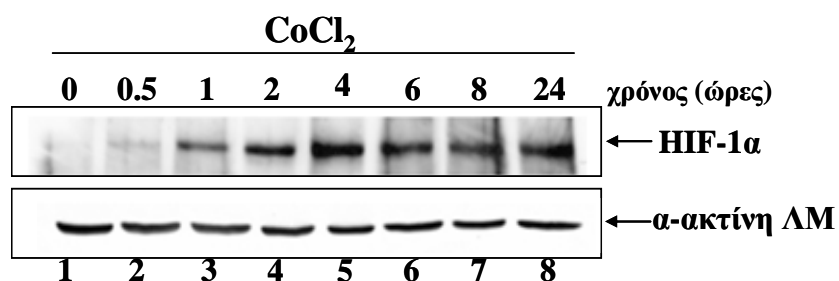
Εικόνα 24: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού ΛΜΚ τραχείας με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης α -ακτίνης των λείων μυών. Φαίνονται τα κύτταρα που εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε μεγέθυνση 10x (α) και 40x (β). Η θέση των πυρήνων απεικονίζεται μετά από κατεργασία με βαφή DAPI (γ, δ)

Σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου (20%) τα επίπεδα του HIF-1α ήταν ελάχιστα ανιχνεύσιμα (**Εικ. 25Α**, διαδρ. 1&3). Αντίθετα, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες με 100 μ M CoCl_2 , ο HIF-1α αυξήθηκε δραματικά (**Εικ. 25Α**, διαδρ. 2). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε υποξία (1% O_2) (**Εικ. 25Α**, διαδρ. 4). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 25Β** σε φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου ο HIF-1α είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμος. Αντίθετα, μετά την προσθήκη CoCl_2 για 4 ώρες τα επίπεδα του HIF-1α αυξήθηκαν σημαντικά. Και στις δυο περιπτώσεις ο HIF-1α εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 25: (Α) ΛΜΚΑ επωάστηκαν απουσία (διαδρομές 1, 3) ή παρουσία 100μΜ CoCl₂ (διαδρομή 2) ή υποξίας (1%O₂) (διαδρομή 4) για 4 ώρες. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης. (Β) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός του HIF-1α με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι του HIF-1α σε ΛΜΚΑ που επωάστηκαν απουσία (α) ή παρουσία (β) 100μΜ CoCl₂ για 4ώρες.

Για να διερευνηθεί η επαγωγή του HIF-1α από το CoCl₂, έγινε κινητική ανάλυση. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 26**, η επαγωγή του HIF-1α ήταν ταχύτατη και εμφανής από τα πρώτα 30 λεπτά της επίδρασης με CoCl₂. Η μέγιστη έκφραση του HIF-1α παρατηρήθηκε μετά από 4 ώρες επίδρασης με CoCl₂ και τα επίπεδα του έμειναν υψηλά μέχρι το τέλος της ανάλυσης στις 24 ώρες.

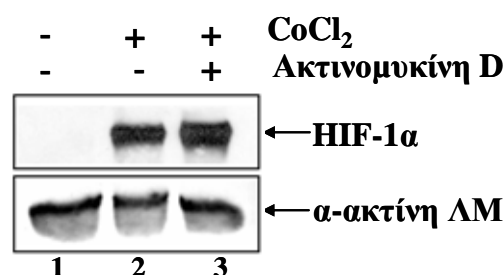


Εικόνα 26: ΛΜΚΑ επωάστηκαν με 100μΜ CoCl₂ για τους ενδεικνυόμενους χρόνους και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης.

3.1.2 Ο ρόλος της πρωτεϊνοσύνθεσης

Η επαγωγή του HIF-1α είναι πιθανόν να οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α, αύξηση του ρυθμού της μετάφρασης του mRNA του ή ακόμη και σε ένα μεταμεταφραστικό γεγονός όπως η αναστολή της αποικοδόμησης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η επαγωγή του HIF-1α από την υποξία προκαλείται από τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης μέσω αναστολής της πρωτεόλυσης της [27, 153]. Μολαταύτα, άλλοι επαγωγείς του HIF-1α εκτός της υποξίας δεν δρουν μέσω του παραπάνω μηχανισμού, αλλά επιδρούν στην μεταγραφή ή μετάφραση του HIF-1α [51, 53, 57, 154-157].

Για να διερευνηθεί αν η επαγωγή του HIF-1α από CoCl_2 οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α, χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας του μηχανισμού της μεταγραφής, η ακτινομυκίνη D. ΛΜΚΑ προεπώστηκαν για 15 λεπτά με ακτινομυκίνη D, ακολούθησε επίδραση με CoCl_2 για 4 ώρες και ανάλυση των εκχυλισμάτων των κυττάρων. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 27** η ακτινομυκίνη D δεν επηρέασε καθόλου την επαγωγή του HIF-1α, υποδεικνύοντας πως δεν απαιτείται η παραγωγή mRNA για την αύξηση των επιπέδων του HIF-1α από CoCl_2 .



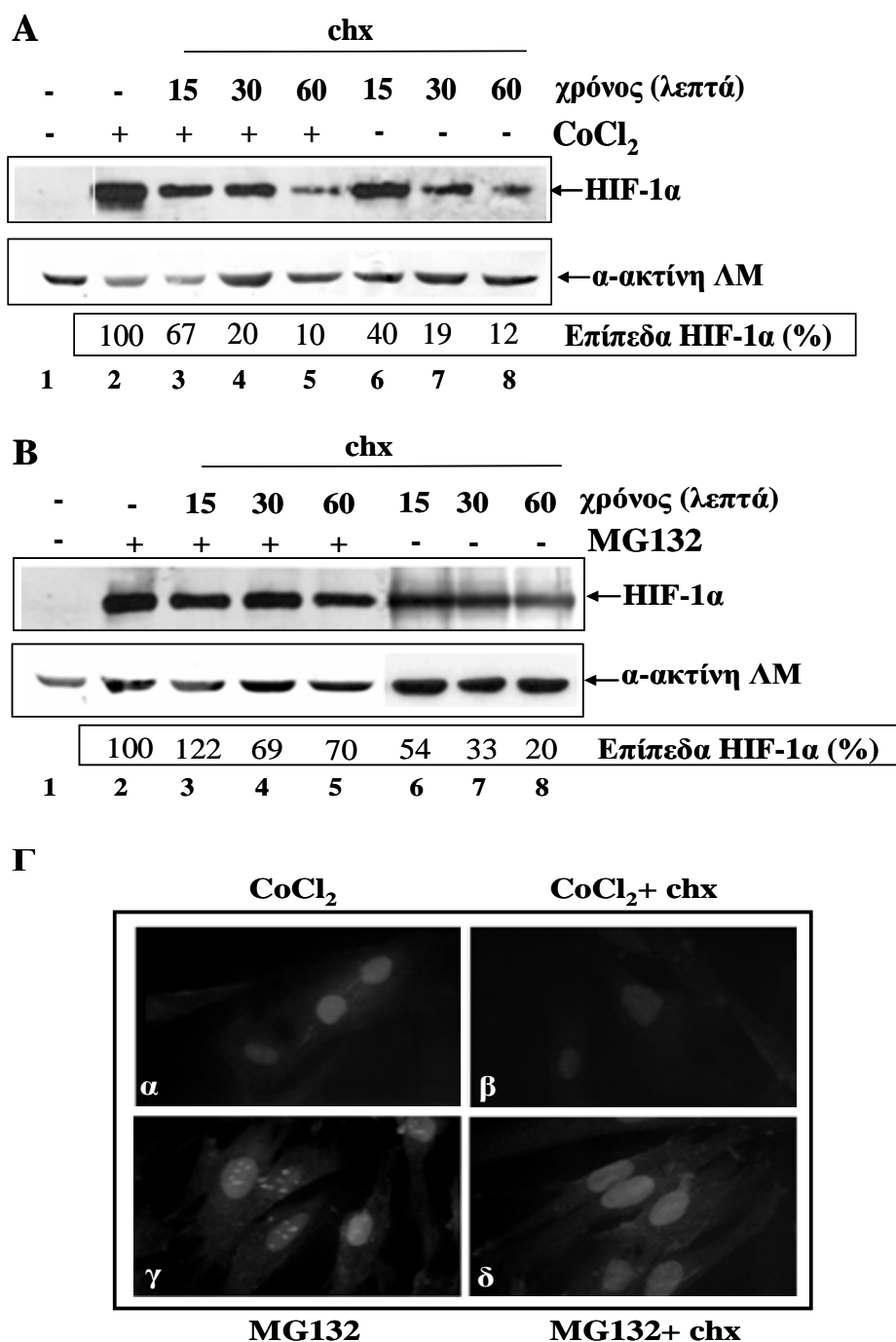
Εικόνα 27: ΛΜΚΑ προεπώστηκαν για 15 λεπτά χωρίς (διαδρομή 2) ή με 0,5 μg/ml ακτινομυκίνη (διαδρομή 3) και στη συνέχεια προστέθηκαν 100μM CoCl_2 (διαδρομές 2 και 3) για 4 ώρες. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης.

Αφού αποκλείστηκε το γεγονός ότι η επαγωγή του HIF-1α από CoCl_2 οφείλεται σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του, στη συνέχεια εξετάστηκε αν η πρωτεϊνική σύνθεση είναι απαραίτητη για την παρατηρούμενη επαγωγή, ελέγχοντας την επίδραση ενός αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, του κυκλοεξιμιδίου. ΛΜΚΑ επώστηκαν με CoCl_2 για 4 ώρες, στη συνέχεια προστέθηκε το κυκλοεξιμίδιο και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε για άλλα 15 έως 60 λεπτά

(**Εικ. 28Α**). Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των επιπέδων του HIF-1α κατά την επίδραση του κυκλοεξιμιδίου στα κύτταρα. Όταν το CoCl_2 αφαιρέθηκε από τα κύτταρα πριν την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου η μείωση του HIF-1α ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε παρουσία CoCl_2 (**Εικ. 28Α**, διαδρ. 3-5 και 6-8).

Το προηγούμενο πείραμα επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι το CoCl_2 αντικαταστήθηκε από τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132, ο οποίος σταθεροποιεί τον HIF-1α αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του. Επώαση των ΛΜΚΑ με MG132 για 4 ώρες οδήγησε σε αύξηση του HIF-1α (**Εικ. 28Β**, διαδρ. 2) η οποία ήταν παρόμοια με την αύξηση που παρατηρήθηκε από το CoCl_2 (**Εικ. 28Α**, διαδρ. 2). Μετά την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου τα επίπεδα του HIF-1α παρέμειναν υψηλά ακόμη και μετά από 60 λεπτά, (**Εικ. 28**, διαδρ. 5) δείχνοντας πως το MG132, σε αντίθεση με το CoCl_2 , σταθεροποιεί τον HIF-1α. Αντίθετα όταν το MG132 απομακρύνθηκε από τα κύτταρα πριν την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου τα επίπεδα του HIF-1α μειώθηκαν (**Εικ. 28Β**, διαδρ. 6-8) με ρυθμό περίπου παρόμοιο με αυτόν του αντίστοιχου πειράματος με το CoCl_2 . Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Ο HIF-1α που εμφανίστηκε στα κύτταρα μετά την επίδραση με CoCl_2 (**Εικ. 28Γ**, α), μειώθηκε σημαντικά μετά την επώαση με το κυκλοεξιμίδιο (**Εικ. 28Γ**, β). Αντίθετα, ο HIF-1α που εμφανίστηκε μετά την επίδραση με το MG132 (**Εικ. 28Γ**, γ) δεν επηρεάστηκε από το κυκλοεξιμίδιο και την αναστολή της πρωτεϊνολύσεως (**Εικ. 28Γ**, δ).

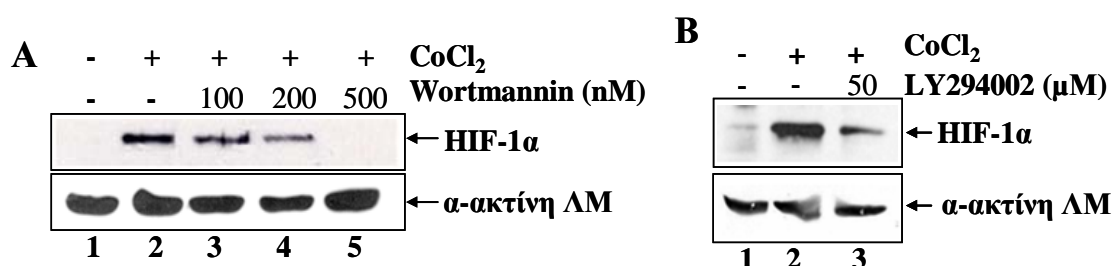
Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων υποδεικνύει πως το CoCl_2 δεν αναστέλλει την αποικοδόμηση του HIF-1α εφόσον η ημιζωή του δεν μεταβάλλεται σημαντικά παρουσία CoCl_2 . Συνολικά έχοντας αποκλείσει την μεταγραφή και τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης ως αιτίες της επαγωγής του HIF-1α από το CoCl_2 , η αύξηση των επιπέδων του HIF-1α είναι δυνατόν να προέρχεται από την αύξηση της μετάφρασης του mRNA του.



Εικόνα 28: ΑΜΚΑ επωάστηκαν με 100 μM CoCl₂ (Α) ή με 10 μM MG132 (Β) για 4 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο (10 $\mu\text{g/ml}$) και η επώαση συνεχίστηκε παρουσία (+, διαδρομές 3-5) ή απουσία (-, διαδρομές 6-8) των επαγωγέων. Ακολούθησε ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωματα για τον HIF-1α και την α-ακτίνη. Οι τιμές κάτω από τις διαδρομές παρουσιάζουν το λόγο του ποσού του HIF-1α προς το ποσό της ακτίνης, εκφρασμένο ως % ποσοστό σε σχέση με τη διαδρομή 2 (πριν την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου). (Γ) ΑΜΚΑ επωάστηκαν με 100 μM CoCl₂ (α) ή με 10 μM MG132 (γ) για 4 ώρες. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου και η επώαση συνεχίστηκε για άλλα 30 λεπτά παρουσία CoCl₂ (β) ή MG132 (δ). Ακολούθησε ανάλυση με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1α.

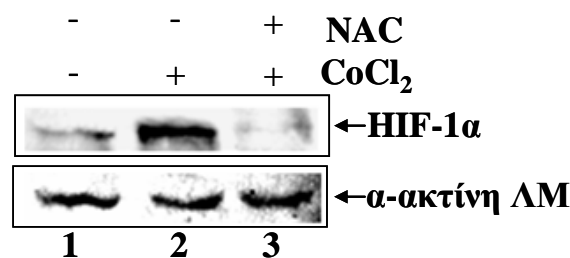
3.1.3 Ο ρόλος των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και του μονοπατιού της PI3K

Προηγούμενες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν πως η μετάφραση του mRNA του HIF-1α βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης-3 (PI-3K) [154-157]. Έχει επίσης προταθεί πως οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι δυνατόν μέσω του PI-3K μονοπατιού να οδηγούν στην επαγωγή του HIF-1α [66]. Για να διερευνηθεί εάν το μονοπάτι της PI-3K εμπλέκεται στην επαγωγή του HIF-1α από το CoCl₂ στα ΛΜΚΑ, χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες LY294002 και βορτμανίνη (wortmannin) οι οποίες είναι αναστολείς του συγκεκριμένου μονοπατιού. Κατεργασία των ΛΜΚΑ τόσο με βορτμανίνη (**Εικ. 29Α**) όσο και με LY294002 (**Εικ. 29Β**) μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα επαγωγής του HIF-1α από το CoCl₂. Ιδιαίτερα για τη βορτμανίνηδείχθηκε πως η μείωση των επαγόμενων επιπέδων του HIF-1α από το CoCl₂ ήταν εξαρτώμενη των δόσεων του αναστολέα (**Εικ. 29Α, διαδρ. 3-5**).



Εικόνα 29: ΛΜΚΑ προεπεωάστηκαν για 15 λεπτά με 100-500 nM Βορτμανίνης (Wortmannin) (Α) ή 50 μM LY294002 (Β) πριν την επίδραση με CoCl₂ για 4 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης.

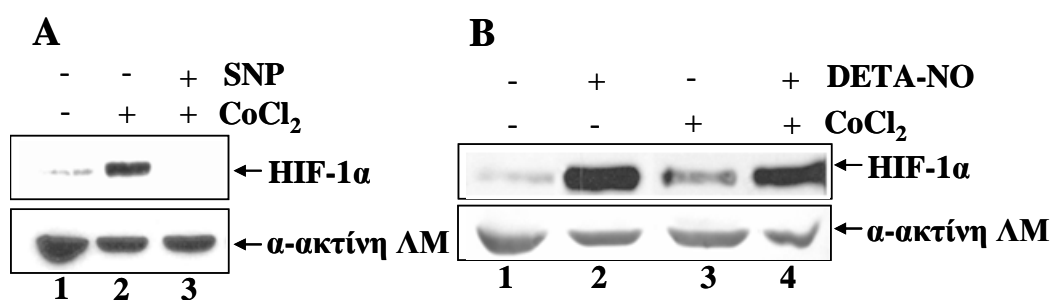
Επιπλέον, όταν προστέθηκε στα κύτταρα το αντιοξειδωτικό NAC (N-ακέτυλο-κυστεΐνη), προκλήθηκε αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από το CoCl₂ (**Εικ. 30, διαδρ. 3**), υποδεικνύοντας πως η παραγωγή ή η παρουσία ROS είναι απαραίτητη για την αύξηση της σύνθεσης του HIF-1α που προκαλείται από το CoCl₂.



Εικόνα 30: ΛΜΚΑ προεπώαστηκαν παρουσία (διαδρομή 3) ή απουσία (διαδρομή 2) 5 mM NAC για 2 ώρες πριν την προσθήκη 100 μ M CoCl₂ για 4 ώρες. Εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1 α και της α -ακτίνης των λείων μυών.

3.1.4 Ο ρόλος του NO

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν είναι ομόφωνα σχετικά με την επίδραση που έχει το NO στην επαγωγή του HIF-1 α και υπάρχουν αναφορές τόσο για αρνητική όσο και για θετική επίδραση του NO [158-160]. Για τον έλεγχο της δράσης του NO στην επαγωγή του HIF-1 α από το CoCl₂ στα ΛΜΚΑ, χρησιμοποιήθηκε αρχικά η ουσία SNP (Sodium Nitroprusside) ως δότης NO. Προσθήκη SNP στο θρεπτικό καλλιέργειας πριν την επίδραση του CoCl₂ ανέστειλε πλήρως την επαγωγή του HIF-1 α που προκλήθηκε από το CoCl₂ (**Εικ. 31A**, διαδρ. 3). Επειδή το SNP δημιουργεί υποπροϊόντα κατά την έκλυση του NO τα οποία πιθανόν να επιδρούν στην κυτταρική απόκριση στην υποξία [100] δοκιμάστηκε επιπλέον σαν δότης NO η ουσία DETA-NO. Σε αντίθεση με το SNP η προσθήκη DETA-NO μαζί με το CoCl₂ οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του HIF-1 α , μεγαλύτερη από αυτή που προκάλεσε το κοβάλτιο μόνο του (**Εικ. 31B**, διαδρ. 3 και 4). Επιπρόσθετα, το DETA-NO οδήγησε σε επαγωγή του HIF-1 α ακόμη και απουσία CoCl₂ (**Εικ. 31B**, διαδρ. 2). Άρα φαίνεται πως στη συγκεκριμένη περίπτωση το NO επιδρά θετικά στην επαγωγή του HIF-1 α .



Εικόνα 31: ΛΜΚΑ επώαστηκαν με 100 μ M SNP (A, διαδρ. 3) ή 1 mM DETA-NO (B, διαδρ. 2 και 4) για 1 ώρα και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 4 ώρες απουσία (B, διαδρ. 2) ή παρουσία 100 μ M

CoCl₂ (A, διαδρ. 2,3 και B, διαδρ. 3,4). Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης.

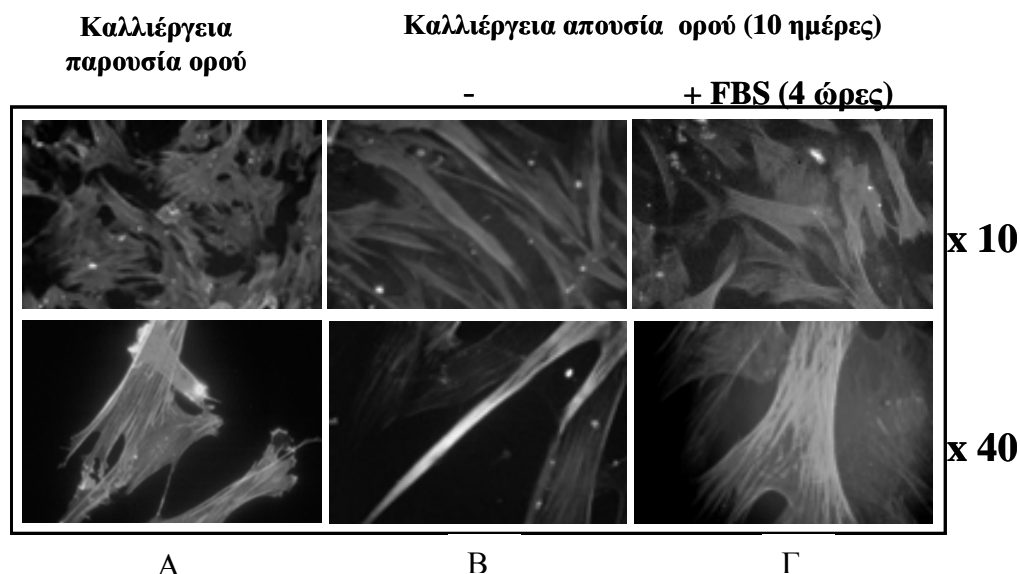
3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΛΜΚΑ

3.2.1 Επαγωγή του HIF-1α

Τα ΛΜΚ δεν είναι ομοιογενή αλλά παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους με ξεχωριστά μορφολογικά, βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Η πλαστικότητα αυτή στη μορφή και τη λειτουργία εντοπίζεται και σε πρωτογενείς καλλιέργειες ΛΜΚ και επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας και κυρίως από την παρουσία ή απουσία ορού από το μέσο καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η απουσία ορού οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και στην απόκτηση ενός φαινοτύπου με συστατικά χαρακτηριστικά γι'αυτό τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται σαν «διαφοροποιημένα» [126]. Η επαναπροσθήκη ορού σε αυτά τα κύτταρα οδηγεί σε μετάπτωσή τους στο συνθετικό φαινότυπο. Για αυτούς τους λόγους κρίθηκε σημαντικό να μελετηθεί η επαγωγή του HIF-1α όχι μόνο στα συνθετικά ΛΜΚΑ αλλά και στα διαφοροποιημένα προκειμένου να σχηματιστεί μια ολοκληρωμένη εικόνα της δράσης του HIF-1α στη φυσιολογία των ΛΜΚΑ.

Η επαγωγή της διαφοροποίησης έγινε ως εξής: ΛΜΚΑ καλλιεργήθηκαν παρουσία ορού και όταν κάλυψαν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου αντικαταστήθηκε το θρεπτικό τους υλικό με αντίστοιχο που δεν περιείχε ορό παρά μόνο τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση τους όπως ινσουλίνη, τρανσφερίνη και σελήνιο. Τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία ορού για 3 με 10 μέρες.

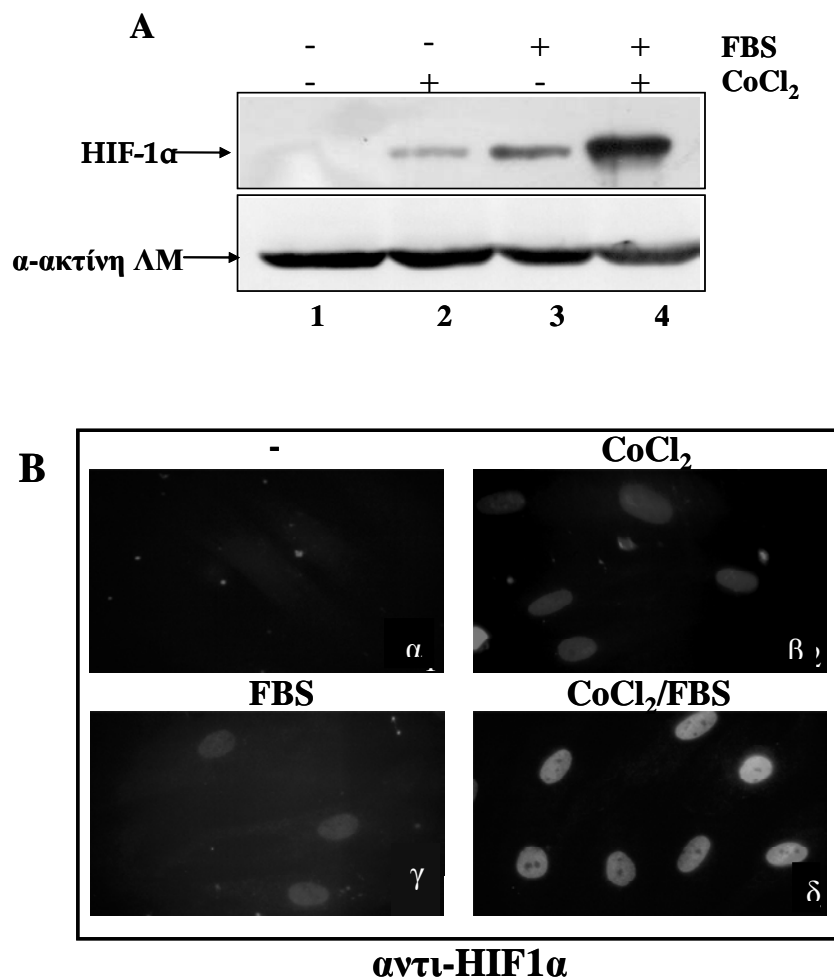
Με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν υπό στέρηση ορού για 10 μέρες (**Εικ. 32Α**) παρουσίασαν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα κύτταρα συνθετικού φαινοτύπου (**Εικ. 32Β**) με κύριο χαρακτηριστικό την επιμήκυνση των κυττάρων. Η αλλαγή αυτή ήταν ήδη εμφανής από τις 3 μέρες επώασης απουσία ορού. Επαναπροσθήκη ορού στο μέσο καλλιέργειας για 4 ώρες (**Εικ. 32Γ**) οδήγησε εκ νέου σε μορφολογική αλλαγή με τάση των κυττάρων για επανάκτηση της αρχικής τους μορφής.



Εικόνα 32: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού ΛΜΚΑ τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία 10% ορού εμβρύου βοός (1) ή απουσία ορού για 10 μέρες (2) με επακόλουθη προσθήκη ορού για 4 ώρες (3), χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης α -ακτίνης των λείων μυών. Οι τιμές δεξιά αντιστοιχούν στη μεγέθυνση που χρησιμοποιήθηκε.

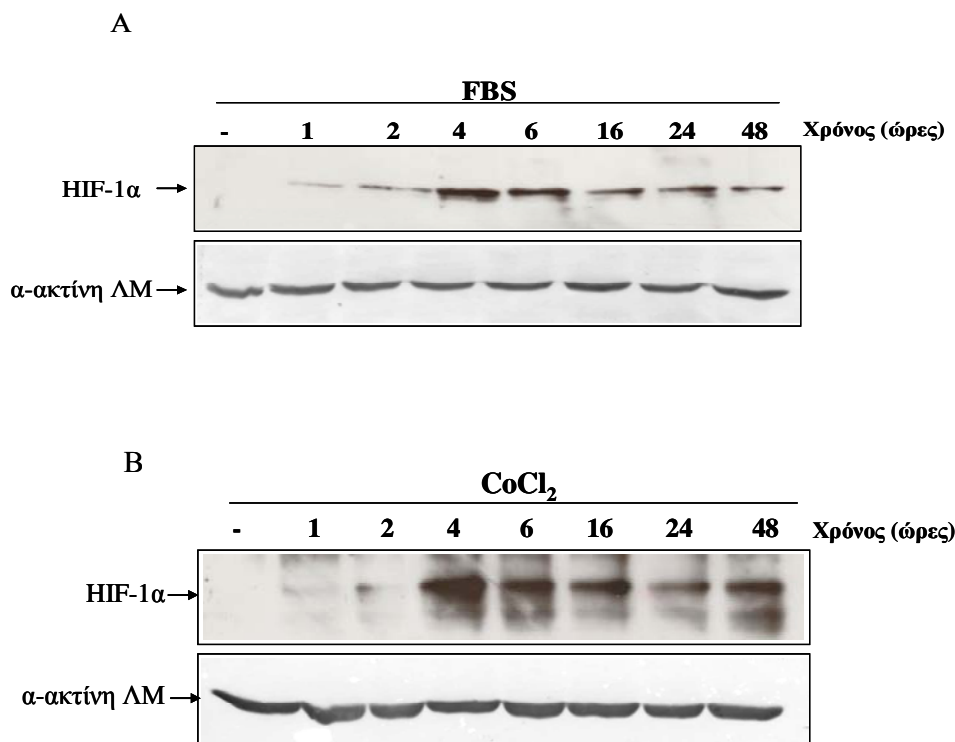
Επώαση των διαφοροποιημένων ΛΜΚΑ με 100 μ M CoCl_2 για 4 ώρες οδήγησε σε επαγωγή του HIF-1 α (**Εικ. 33Α**, διαδρ. 2). Όταν στην καλλιέργεια των διαφοροποιημένων κυττάρων επαναπροστέθηκε 10% ορός για το ίδιο χρονικό διάστημα ανιχνεύθηκε επίσης παρόμοια επαγωγή του HIF-1 α (**Εικ. 33Α**, διαδρ. 3). Η επαγωγή του HIF-1 α ενισχύθηκε σημαντικά όταν στην καλλιέργεια προστέθηκαν CoCl_2 και ορός ταυτόχρονα (**Εικ. 33Α**, διαδρ. 4).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ (**Εικ. 33Β**, α) η πρωτεΐνη ήταν μη ανιχνεύσιμη ενώ μετά την προσθήκη CoCl_2 (**Εικ. 33Β**, β) ή ορού (**Εικ. 33Β**, γ) για 4 ώρες ο HIF-1 α εμφανίστηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Όταν στα κύτταρα προστέθηκε για τον ίδιο χρόνο CoCl_2 και ορός ταυτόχρονα τα ενδοκυττάρια ποσά του HIF-1 α αυξήθηκαν περαιτέρω (**Εικ. 33Β**, δ) και ο HIF-1 α εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 33: Ανάλυση της έκφρασης του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ με ανοσοαποτύπωση (Α) και μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (Β) χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1α ή της α-ακτίνης πριν (Α, διαδρ. 1, Β, α) ή μετά την προσθήκη 100 μΜ CoCl₂ (Α, διαδρ. 2, Β, β) ή 10% ορού (Α, διαδρ. 3, Β, γ) ή και των δυο (Α, διαδρ. 4, Β, δ).

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επαγωγή του HIF-1α από το CoCl₂ και τον ορό έγινε κινητική ανάλυση. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 34**, η επαγωγή του HIF-1α ήταν εμφανής από την 1 ώρα επώασης με τον ορό ή το CoCl₂. Η μέγιστη έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις στις 4 ώρες επώασης ενώ σημαντικά επίπεδα του HIF-1α παρέμειναν μέχρι το τέλος της ανάλυσης, δηλαδή στις 48 ώρες επίδρασης με τους δύο επαγωγείς.

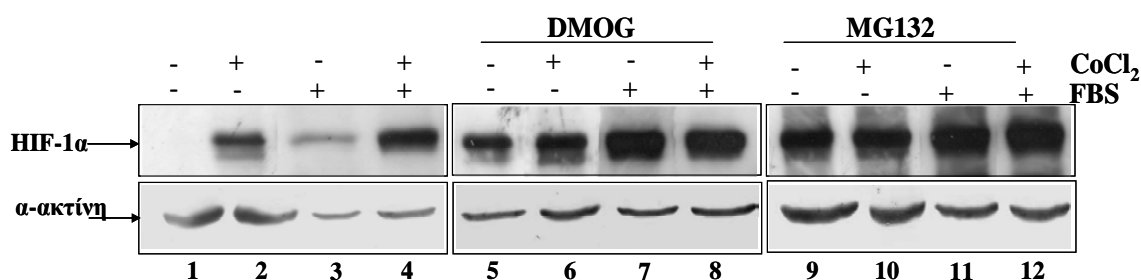


Εικόνα 34: Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επωάστηκαν με 10% ορό (A) ή 100μM CoCl₂ (B) για τους ενδεικνυόμενους χρόνους και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης.

3.2.2 Διερεύνηση του ρόλου της σταθεροποίησης

Για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α από κοβάλτιο ή ορό σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ χρησιμοποιήθηκαν ουσίες που προκαλούν σταθεροποίηση του HIF-1α όπως ο αναστολέας των πρόλυλο-υδροξυλασών DMOG και ο αναστολέας του πρωτεοσώματος MG132. Συγκεκριμένα, διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επωάστηκαν με ορό, CoCl₂ ή και τα δυο απουσία ή παρουσία των δύο αναστολέων (**Εικ. 35**). Τόσο το DMOG όσο και το MG132 (**Εικ. 35**, διαδρ. 5 και 9) προκάλεσαν αύξηση του HIF-1α. Όταν στα κύτταρα προστέθηκε CoCl₂ ταυτόχρονα με DMOG ή MG132 (**Εικ. 35**, διαδρ. 6 και 10) τα επίπεδα του HIF-1α δεν μεταβλήθηκαν σε σχέση με αυτά που παρατηρήθηκαν στην προηγούμενη περίπτωση. Αντίθετα, όταν προστέθηκε ορός ταυτόχρονα με DMOG ή MG132 (**Εικ. 35**, διαδρ. 7 και 11) η αύξηση των επιπέδων του HIF-1α ήταν μεγαλύτερη από αυτή που προκάλεσε μόνο του το DMOG ή το MG132 και δεν άλλαξε σημαντικά όταν εκτός από τον ορό και το DMOG ή το MG132 στα κύτταρα προστέθηκε και CoCl₂ (**Εικ. 35**,

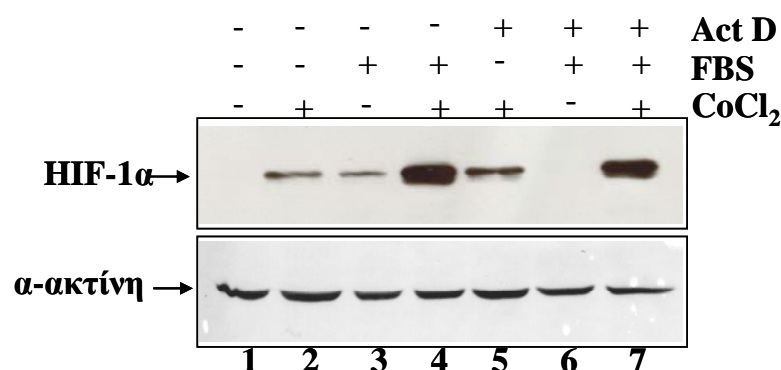
διαδρ. 8 και 12). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το CoCl_2 έχει παρόμοια δράση με αυτή των δύο αναστολέων της αποικοδόμησης. Αντίθετα ο ορός φαίνεται να δρα με ένα διαφορετικό μηχανισμό εφόσον αυξάνει την επαγωγή του HIF-1α που παρατηρείται εξαιτίας της σταθεροποίησης του από το DMOG ή το MG132.



Εικόνα 35: Επαγωγή του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ χρησιμοποιώντας (+) 100 μM CoCl_2 , 10% ορό ή και τα δυο, απουσία (διαδρομές 1-4) ή παρουσία 1 mM DMOG (διαδρομές 5-8) ή 10 μM MG132 (διαδρομές 9-12) για 4 ώρες. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α και της α-ακτίνης των λείων μυών.

3.2.3 Ο ρόλος της σύνθεσης του HIF-1α

Για να διερευνηθεί αν η επαγωγή του HIF-1α από CoCl_2 ή ορό στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α, χρησιμοποιήθηκε η ακτινομυκίνη D. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 36**, η ακτινομυκίνη D δεν επηρέασε την επαγωγή του HIF-1α από CoCl_2 (**Εικ. 36**, διαδρ. 5), ενώ αντίθετα ανέστειλλε πλήρως την επαγωγή του HIF-1α από τον ορό (**Εικ. 36**, διαδρ. 6). Στην περίπτωση που η επαγωγή του HIF-1α προκλήθηκε από την ταυτόχρονη προσθήκη CoCl_2 και ορού η αναστολή της μεταγραφής δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα του HIF-1α (**Εικ. 36**, διαδρ. 7). Φαίνεται από τα παραπάνω πως η επαγωγή του HIF-1α από τον ορό απαιτεί τη διαδικασία της μεταγραφής πιθανόν για την παραγωγή του mRNA του HIF-1α.

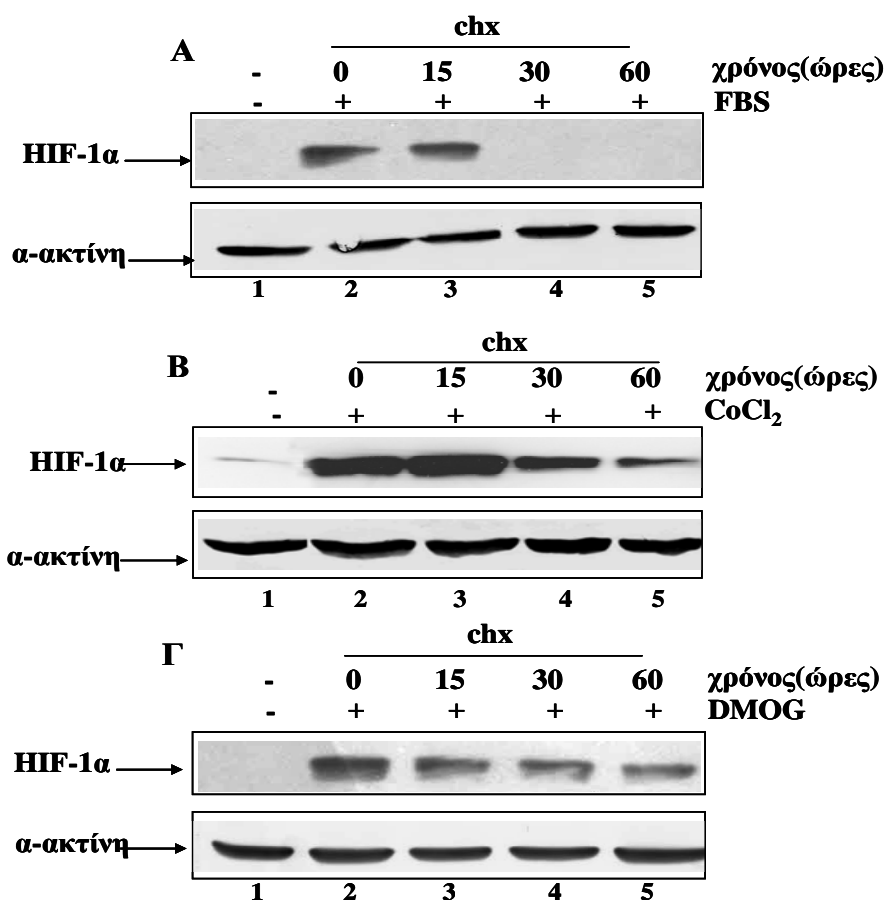


Εικόνα 36: Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επωάστηκαν, όπου υποδεικνύεται (+), για 15 min με ακτινομυκίνη D (0.5 µg/ml). Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 µM CoCl₂, ή 10% FBS ή CoCl₂ και FBS για 4 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του HIF-1α και της α-ακτίνης των λείων μυών.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η πρωτεϊνική σύνθεση είναι απαραίτητη για την επαγωγή του HIF-1α από το CoCl₂ ή τον ορό στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η επίδραση του κυκλοεξιμιδίου. Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επωάστηκαν με τους επαγωγείς για 4 ώρες, στη συνέχεια προστέθηκε το κυκλοεξιμίδιο και η επώαση των κυττάρων συνεχίστηκε για άλλα 15 έως 60 λεπτά (**Εικ. 37Α**). Στην περίπτωση που η επαγωγή του HIF-1α προκλήθηκε από τον ορό η προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου προκάλεσε σημαντική μείωση του HIF-1α (**Εικ. 37Α, διαδρ. 2-5**). Αντίθετα η επαγωγή του HIF-1α που προκλήθηκε από το CoCl₂ επηρεάστηκε λιγότερο από το κυκλοεξιμίδιο, όπως φαίνεται στην **Εικ. 37Β**.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως επαγωγέα το DMOG, το οποίο σταθεροποιεί τον HIF-1α αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του. Επώαση διαφοροποιημένων ΛΜΚΑ με DMOG για 4 ώρες οδήγησε σε αύξηση του HIF-1α (**Εικ. 37Γ, διαδρ. 2**) και μετά την προσθήκη του κυκλοεξιμιδίου παρατηρήθηκε μείωση του HIF-1α (**Εικ. 37Γ, διαδρ. 5**) παρόμοια με αυτή που εμφανίστηκε στην περίπτωση του CoCl₂.

Η σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων υποδεικνύει πως το CoCl₂ στα διαφοροποιημένα κύτταρα δρα με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του DMOG δηλαδή αναστέλλει την αποικοδόμηση του HIF-1α. Αντίθετα η επαγωγή του HIF-1α από τον ορό απαιτεί νέα σύνθεση του HIF-1α τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο.



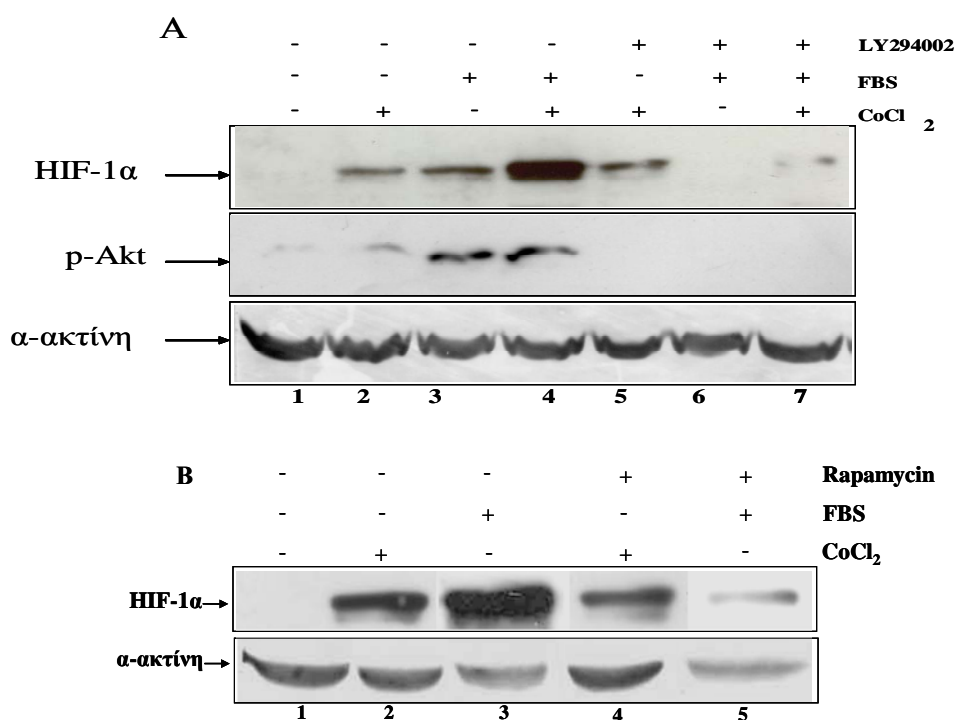
Εικόνα 37: Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επωάστηκαν με 10% ορό (Α), 100 μ M CoCl₂ (Β) ή 1 mM DMOG (Γ) για 4 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο (10 μ g/ml) και η επώαση συνεχίστηκε για 0, 15, 30 ή 60 λεπτά (διαδρομές 2-5). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1 α και της α -ακτίνης.

3.2.4 Ο ρόλος των μονοπατιών της PI-3K και των MAP κινασών

Για να διερευνηθεί εάν το μονοπάτι της PI-3K εμπλέκεται στην επαγωγή του HIF-1 α από το CoCl₂ και τον ορό στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της PI-3K LY294002. Κατά την προσθήκη ορού παρατηρήθηκε αύξηση της μορφής της Akt, υποδεικνύοντας ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI-3K (**Εικ. 38Α, διαδρ. 3 & 4**). Αντίστοιχη αύξηση δεν παρατηρήθηκε παρουσία CoCl₂. Και στις δύο περιπτώσεις η φωσφορυλιωμένη μορφή της Akt μειώθηκε σημαντικά μετά την προσθήκη LY294002 (**Εικ. 38Α, διαδρ. 5-7**). Επιπλέον παρατηρήθηκε πως το LY294002 ανέστειλε σημαντικά την επαγωγή του HIF-1 α από τον ορό (**Εικ. 38Α, διαδρ. 3 & 6**) ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην επαγωγή του HIF-1 α από το CoCl₂

(εικόνα 38-A διαδρομές 2 και 5). Το LY294002 μείωσε επίσης την επαγωγή του HIF-1α που προήλθε από την συνδυασμένη δράση του CoCl₂ και του ορού (*Εικ. 38A*, διαδρ. 4 & 7).

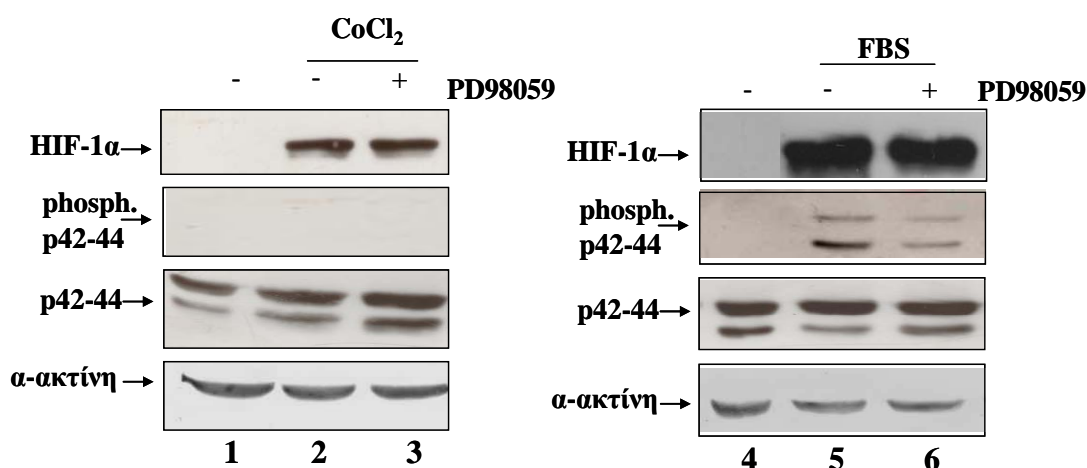
Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση ενός άλλου μορίου που συμμετέχει στην αναστολή του μονοπατιού της PI3K, της ραπαμυκίνης. Συγκεκριμένα η ραπαμυκίνη δεν είχε καμία δράση πάνω στην επαγωγή του HIF-1α από το CoCl₂ (*Εικ. 38B*, διαδρ. 2 & 4) ενώ ελάττωσε σε σημαντικό βαθμό την επαγωγή του HIF-1α από τον ορό (*Εικ. 38B*, διαδρ. 3 & 5).



Εικόνα 38: Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επώαστηκαν με τους αναστολείς του PI-3K μονοπατιού LY294002 (50 μM) για 15 λεπτά (A) και ραπαμυκίνη (50 nM) για 30 λεπτά (B). Η επώαση συνεχίστηκε για ακόμη 4 ώρες παρουσία CoCl₂ (100 μM) ή 10% ορού ή και των δυο. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α, της α-ακτίνης και της φωσφορυλιωμένης Akt.

Εκτός από το μονοπάτι της PI-3K έχει βρεθεί πως και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό των MAP κινασών εμπλέκονται στο μηχανισμό επαγωγής του HIF-1α δρώντας είτε στο ρυθμό σύνθεσης του ή στην ενεργοποίηση της μεταγραφικής του δράσης [56]. Για να εξακριβωθεί αν οι MAP κινάσες εμπλέκονται στην επαγωγή του HIF-1α στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ χρησιμοποιήθηκε το

PD98059 ως αναστολέας του συγκεκριμένου μονοπατιού. Οι φωσφορυλιωμένες p42-44 MAP κινάσες, οι οποίες μαρτυρούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού, ανιχνεύθηκαν μόνο μετά από την επίδραση του ορού και όχι από την επίδραση του CoCl_2 . Το PD98059 ανέστειλε σε μικρό βαθμό τη φωσφορυλίωση αυτή (*Εικ. 39, διαδρ. 6*) αλλά δεν επηρέασε σε ανιχνεύσιμο βαθμό την επαγωγή του HIF-1α από το CoCl_2 (*Εικ. 39, διαδρ. 2 & 3*) ή τον ορό (*Εικ. 39, διαδρ. 5 & 6*).

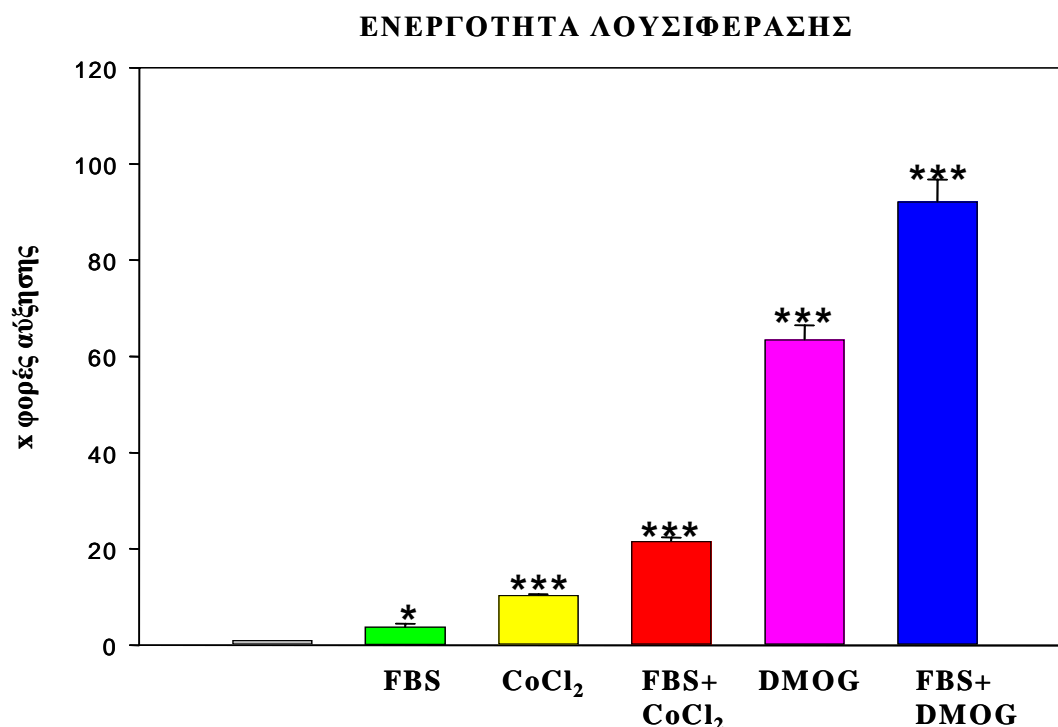


Εικόνα 39: Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επώαστηκαν με ή χωρίς τον αναστολέα PD98059 (50 μM) για 1 ώρα και η επώαση συνεχίστηκε για ακόμη 4 ώρες παρουσία 100 μM CoCl_2 (διαδρομές 2 και 3) ή 10% ορού (διαδρομές 5 και 6). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωματα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α, της φωσφορυλιωμένης και μη φωσφορυλιωμένης μορφής των p42-44 MAP κινασών και της α-ακτίνης.

3.2.5 Επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από ορό ή CoCl_2

Για να εξακριβωθεί αν ο HIF-1α που επάγεται στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ είναι λειτουργικός έγινε μέτρηση της μεταγραφικής του ενεργότητας χρησιμοποιώντας ένα πλασμίδιο αναφοράς με 5 HRE στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης. Διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς και ακολούθησε επώαση για 28 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν οι επαγωγείς του HIF-1α και μετά από 18 ώρες έγινε μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ορό η δράση λουσιφεράσης αυξήθηκε κατά 4 περίπου φορές (*Εικ. 40B*) σε σχέση με τη δράση που παρατηρήθηκε απουσία ορού. Όταν προστέθηκε CoCl_2 στα κύτταρα εμφανίστηκε ενεργότητα λουσιφεράσης 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των κυττάρων μαρτύρων. Η ενεργότητα αυξήθηκε περαιτέρω (22 φορές) όταν τα κύτταρα επώαστηκαν

ταυτόχρονα με CoCl_2 και ορό. Όταν σαν επαγωγέας χρησιμοποιήθηκε το DMOG η ενεργότητα λουσιφεράσης αυξήθηκε κατά 64 περίπου φορές. Όταν προστέθηκε ορός παράλληλα με το DMOG η αύξηση έφτασε τις 92 φορές. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τόσο ο ορός όσο και το CoCl_2 οδηγούν στην επαγωγή μεταγραφικά ενεργού HIF-1α. Επιπλέον η συνδυασμένη δράση ορού και CoCl_2 , ή ορού και DMOG φαίνεται να είναι συνεργιστική, υποδεικνύοντας δύο ανεξάρτητους μηχανισμούς επαγωγής του HIF-1α. Τέλος παρόλο που το DMOG και το CoCl_2 επάγουν τον HIF-1α μέσω αναστολής της αποικοδόμησής του, το DMOG φαίνεται να είναι πιο δραστικό από το CoCl_2 όσον αφορά στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, πιθανόν διότι το DMOG αποτελεί αποτελεσματικότερο αναστολέα τόσο των προλυλο-υδροξυλασών όσο και της FIH-1 από ό,τι το CoCl_2 .



Εικόνα 40: Δοκιμασία μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς. Διαφοροποιημένα ΑΜΚΑ επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pGL3-5HRE και pUC19/β-gal και μετά από 28 ώρες επώαστηκαν χωρίς ή με 10% ορό, 100 μM CoCl_2 , CoCl_2 και ορό ταυτόχρονα, 10 mM DMOG, DMOG και ορό μαζί για 18 ώρες. Κάθε τιμή είναι ο Μ.Ο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Οι τιμές φωταύγειας εξομαλύνθηκαν προς τις τιμές της β-γαλακτοσιδάσης και εκφράστηκαν ως φορές αύξησης σε σχέση με τις τιμές των κυττάρων μαρτύρων.

*** : $p < 0,001$, * : $p < 0,5$

3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-1α ΚΑΙ ARNT ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Για να μελετηθεί σε μοριακό επίπεδο ο μηχανισμός ενεργοποίησης και δράσης του HIF-1α είναι απαραίτητο να υπάρχει διαθέσιμος σε ικανοποιητικές ποσότητες καθαρός HIF-1α. Επειδή η παραγωγή και απομόνωση ανθρώπινου HIF-1α από κύτταρα θηλαστικών είναι μια πολύ δύσκολη και επίπονη διαδικασία έγινε προσπάθεια παραγωγής και απομόνωσης ανασυνδυασμένου ανθρώπινου HIF-1α από βακτήρια.

3.3.1 Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης και παραγωγή ανασυνδυασμένου HIF-1α

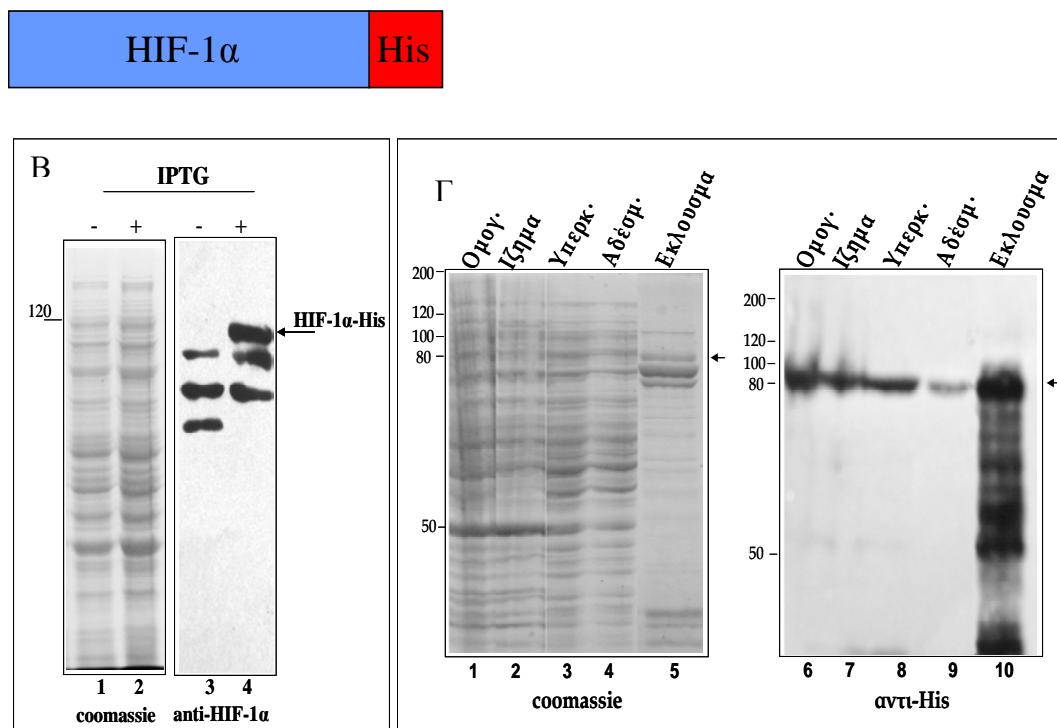
Η παραγωγή ανασυνδυασμένου HIF-1α πλήρους μεγέθους σε βακτήρια δεν είχε αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την έκφραση και τον καθαρισμό σταθερού και διαλυτού HIF-1α, χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής διάφορα συστήματα έκφρασης σε *E.coli*.

Από τον πλασμιδιακό φορέα pCR2.1-TOPO-TA, ο οποίος περιείχε κλωνοποιημένο το cDNA του HIF-1α, έγιναν υποκλωνοποιήσεις του HIF-1α στους φορείς έκφρασης pQE-60, zzpQE-60, pQE-80L και H10GFP. Οι φορείς αυτοί κωδικοποιούν για έναν επίτοπο ιστιδινών επιτρέποντας καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μετάλλων. Μετά το μετασχηματισμό των πλασμιδίων που έφεραν το cDNA του HIF-1α σε κατάλληλα *E.coli* στελέχη, έγινε επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης με IPTG. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα με τη βοήθεια σφαιριδίων Ni-NTA-Sepharose.

Στην περίπτωση του pQE60-HIF-1α κωδικοποιείται η χημική πρωτεΐνη HIF-1α-His (**Εικ. 41Α**). Παρατηρήθηκε πως η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν μικρή και ανιχνεύσιμη μόνο με ανοσοαποτύπωση και όχι με χρώση Coomassie (**Εικ. 41Β, διαδρ. 4**). Επίσης κατά τη διαδικασία απομόνωσής της μέσω ρητίνης Ni-NTA-Sepharose δεν ανακτήθηκε η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη αλλά μια μικρότερη μορφή της μεγέθους 85kDa (**Εικ. 41Γ**). Όπως φαίνεται στις διαδρ. 6-10 της **Εικ. 41Γ** η μορφή αυτή αναγνωρίζεται από το αντίσωμα αντι-His το οποίο αναγνωρίζει τον

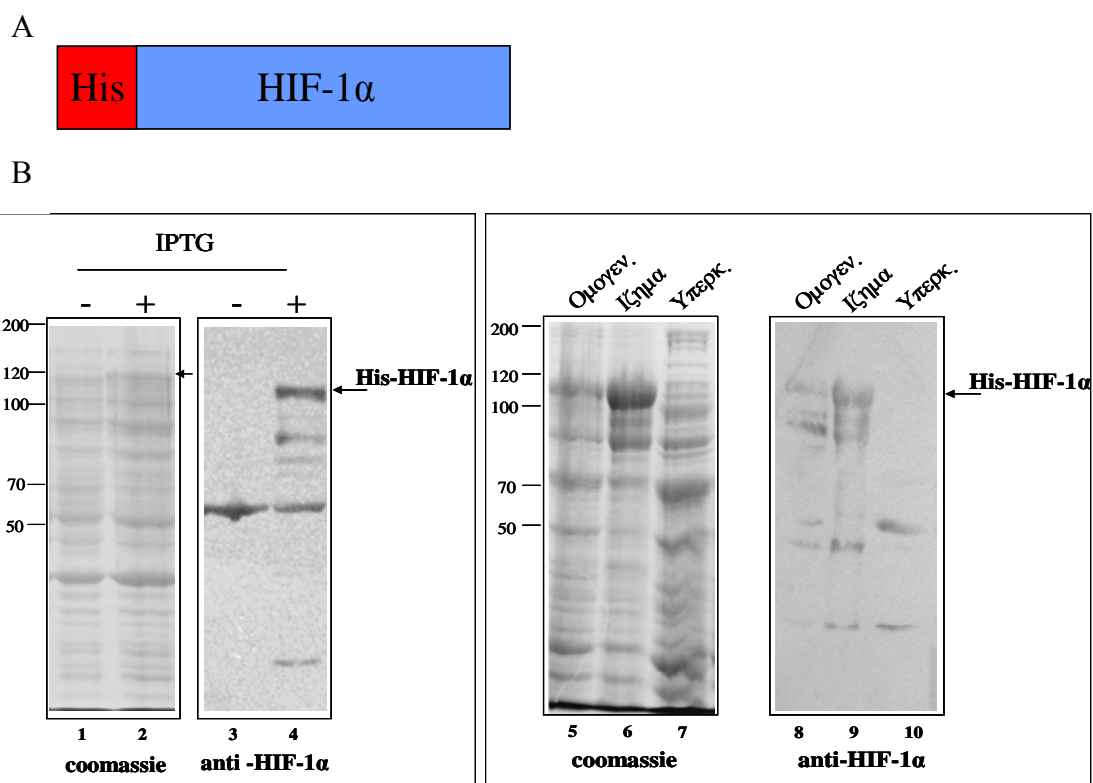
επίτοπο στο C-τελικό άκρο του HIF-1α, υποδεικνύοντας πως το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπέστη αποικοδόμηση.

A



Εικόνα 41: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της χημικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pQE60-HIF-1α. (Β) *E.coli* κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο pQE60-HIF-1α επωάστηκαν απουσία (-, διαδρ. 1 & 3) ή παρουσία IPTG (+, διαδρ. 2 & 4) και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση Coomassie ή ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α. Το βέλος δείχνει τη θέση της πρωτεΐνης HIF-1α-His. (Γ) Το ομογενοποίημα (διαδρ. 1 & 6), ίζημα (διαδρ. 2 & 7) και υπερκείμενο (διαδρ. 3 & 8) των κυττάρων που επωάστηκαν παρουσία IPTG καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα (διαδρ. 4 & 9) και το έκλουσμα της Ni-NTA-Sepharose (διαδρ. 5 & 10) αναλύθηκαν με SDS-PAGE, χρώση Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του His-επιτόπου. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της 85kDa πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

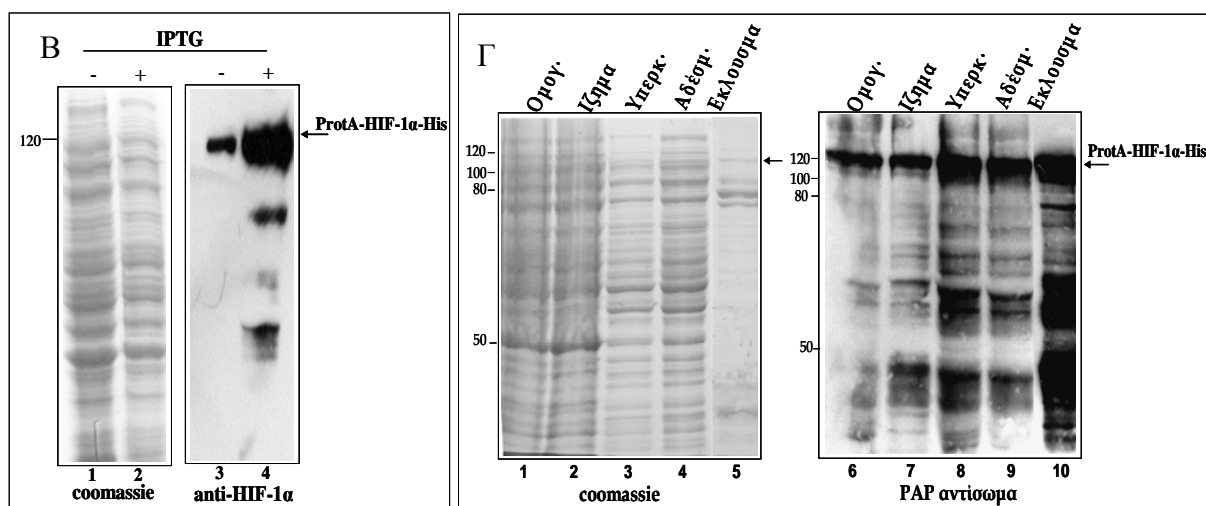
Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή pQE80-HIF-1α η οποία οδηγεί σε έκφραση πρωτεΐνης με επίτοπο ιστιδινών στο αμινοτελικό της άκρο (**Εικ. 42Α**). Στην περίπτωση αυτή αν και η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ήταν μεγαλύτερη, γιατί η πρωτεΐνη ήταν ανιχνεύσιμη με χρώση Coomassie (**Εικ. 42Β**, διαδρ. 2), διαπιστώθηκε μετά τη λύση των κυττάρων πως η πρωτεΐνη ήταν τελείως αδιάλυτη (**Εικ. 42Β**, διαδρ. 6 & 9).



Εικόνα 42: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της χιμαιρικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pQE80-HIF-1α. (Β) *E.coli* κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο pQE80-HIF-1α επωάστηκαν απουσία (-, διαδρ. 1 & 3) ή παρουσία IPTG (+, διαδρ. 2 & 4) και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE, χρώση Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων και το ομογενοποίημα (διαδρ. 5 & 8) το ίζημα (διαδρ. 6 & 9) και το διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 7 & 10) αναλύθηκαν με SDS-PAGE, χρώση Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Από την κατασκευή zzpQE60-HIF-1α κωδικοποιείται η πρωτεΐνη ProtA-HIF-1α-His (**Εικ. 43Α**). Όπως φαίνεται στην **Εικ. 43Β** η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε μικρά σχετικά επίπεδα (διαδρ. 4) και ήταν διαλυτή (**Εικ. 43Γ**, διαδρ. 8). Κατά την προσπάθεια απομόνωσής της όμως μέσω χρωματογραφίας Ni-NTA-Sepharose ανακτήθηκε μόνο ένα μικρό μέρος της, το οποίο ήταν ανιχνεύσιμο με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα που προσδένεται στην Protein A (**Εικ. 43Γ**, διαδρ. 10) και ελάχιστα με βαφή με Coomassie (**Εικ. 43Γ**, διαδρ. 5).

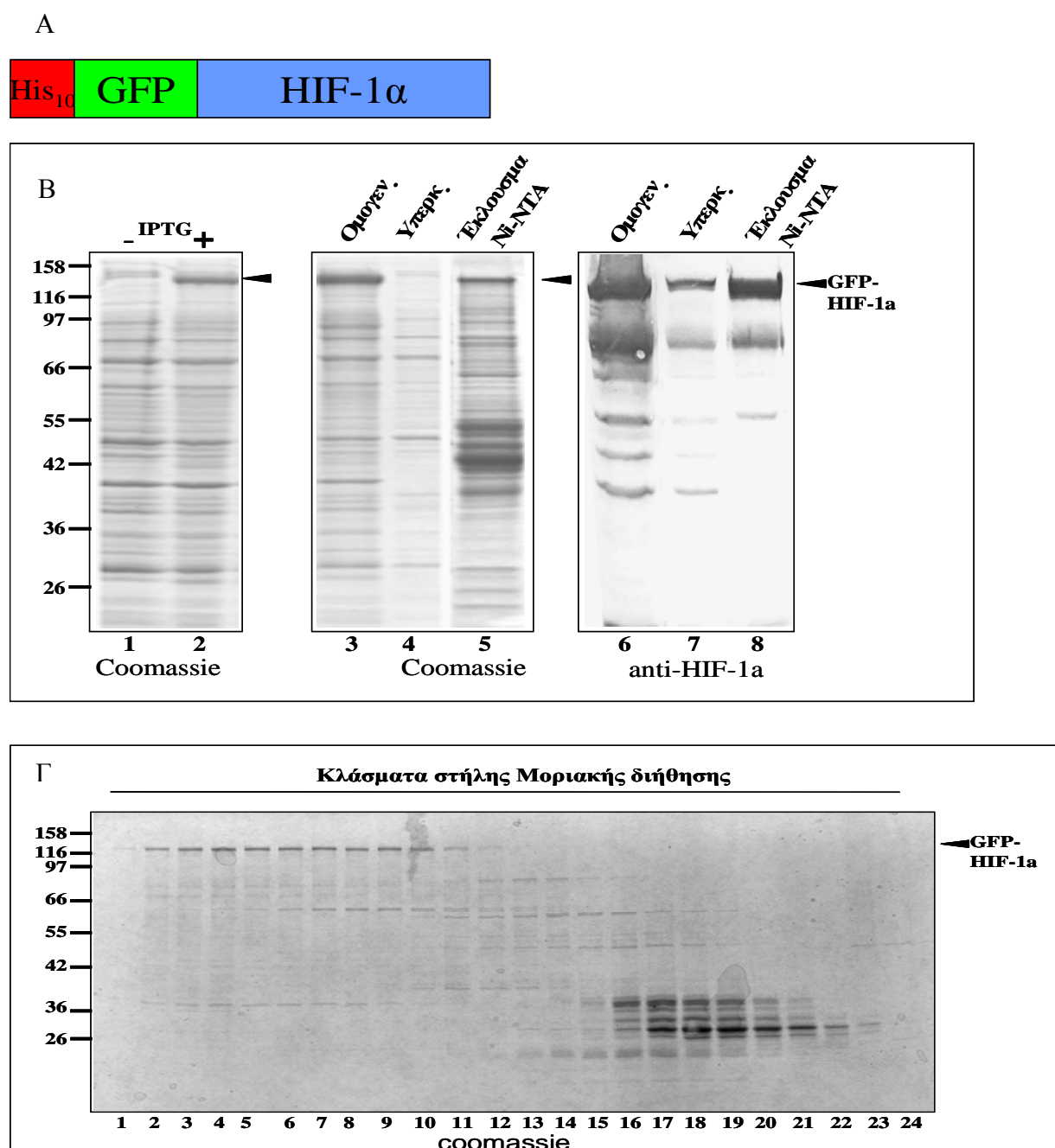
A



Εικόνα 43: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της χημικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλάσμιδιο *zprQE60-HIF-1α*. (Β) *E.coli* κύτταρα που περιείχαν το πλάσμιδιο *zprQE60-HIF-1α* επωάστηκαν απουσία (-, διαδρ. 1 & 3) ή παρουσία IPTG (+, διαδρ. 2 & 4) και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HIF-1α. (Γ) Το ομογενοποίημα (διαδρ. 1 & 6), ίζημα (διαδρ. 2 & 7) και το διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 3 & 8) των κυττάρων που εξέφραζαν την πρωτεΐνη καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα (διαδρ. 4 & 9) και το έκλουσμα της Ni-NTA-Sepharose (διαδρ. 5 & 10) αναλύθηκαν με SDS-PAGE, βαφή με Coomassie και ανοσοαποτύπωση με το PAP αντίσωμα. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Τα τρία παραπάνω συστήματα, εξαιτίας των προβλημάτων που παρουσίασαν, δεν χρησιμοποιήθηκαν για καθαρισμό του HIF-1α σε μεγάλη κλίμακα. Τελικά δοκιμάστηκε η κατασκευή pHis-GFP-HIF-1α. Η κατασκευή αυτή κωδικοποιεί για μια χημική πρωτεΐνη η οποία έχει έναν επίτοπο 10 ιστιδινών καθώς και την φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη στο αμινοτελικό της άκρο (**Εικ. 44Α**). Έτσι προστατεύεται το αμινοτελικό άκρο του HIF-1α από έναν ογκώδη επίτοπο όπως η GFP και είναι δυνατός ο καθαρισμός του HIF-1α μέσω του επιτόπου των ιστιδινών. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε ικανοποιητικά όπως φαίνεται στη διαδρ. 2 της **Εικ. 44Β**. Επιπλέον ένα σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης ήταν διαλυτό (διαδρ. 4 & 7) και

ανακτήθηκε από τη στήλη Ni-NTA-Sepharose (διαδρ. 5 & 8). Ωστόσο το κλάσμα που προέκυψε μετά την απομόνωση δεν ήταν τελείως καθαρό αφού περιείχε πολλές πρωτεΐνες του *E.coli*, οι οποίες δεσμεύτηκαν μη ειδικά στη στήλη Ni-NTA-Sepharose.



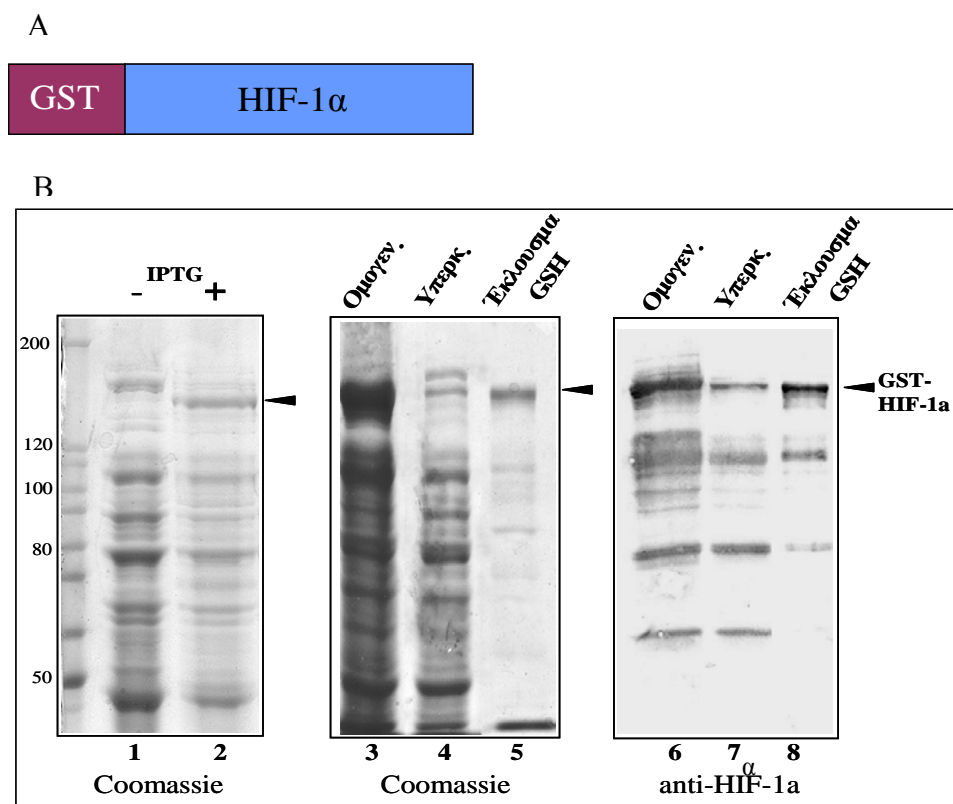
Εικόνα 44: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της χημικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pHis-GFP-HIF-1α. (Β) *E.coli* κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο pHis-GFP-HIF-1α επωάστηκαν απουσία (-, διαδρ. 1) ή παρουσία IPTG (+, διαδρ. 2) και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Το ομογενοποίημα (διαδρ. 3 & 6) και

το διαλυτό κλάσμα των κυττάρων (διαδρ. 4 & 7) καθώς και το έκλουσμα της Ni-NTA-Sepharose (διαδρ. 5 & 8) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α. (Γ) Στη συνέχεια το έκλουσμα μεταβιβάστηκε σε στήλη Superdex S-200 και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Προκειμένου να απομακρυνθούν αυτές οι πρωτεΐνες το έκλουσμα διαβιβάστηκε σε στήλη μοριακής διήθησης τύπου Sephacryl S-200 (Εικ. 44Γ). Τα κλάσματα της στήλης που αναλύθηκαν στις διαδρ. 2-10 και περιείχαν κυρίως μια πρωτεΐνη 145kDa η οποία αντιστοιχεί στο His₁₀-GFP-HIF-1α, συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν.

Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα με απόδοση 0,1 mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

Τέλος το cDNA του HIF-1α κλωνοποιήθηκε στον βακτηριακό φορέα pGEX4T-1 με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί τη χημική GST-HIF-1α (Εικ. 45Α).



Εικόνα 45: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της χημικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pGEX4T1-Tev-HIF-1α. (Β) *E.coli* κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο pGEX4T1-Tev-HIF-

1α επωάστηκαν απουσία (-, διαδρομή 1) ή παρουσία IPTG (+, διαδρομή 2) και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Το ομογενοποίημα (διαδρ. 3 & 6) και το διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 4 & 7) των κυττάρων καθώς και το έκλουσμα της στήλης GSH-Sepharose (διαδρ. 5 & 8) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Τα επίπεδα έκφρασης της GST-HIF-1α ήταν ανάλογα με αυτά της H₁₀-GFP-HIF-1α (**Εικ. 45B**, διαδρ. 2). Σημαντικό κλάσμα της πρωτεΐνης ήταν διαλυτό (διαδρ. 4 & 7) και ανακτήθηκε από τη στήλη GSH-Sepharose (**Εικ. 45B**, διαδρ. 5 & 8). Το έκλουσμα όπως φαίνεται με βαφή με Coomassie (**Εικ. 45B**, διαδρ. 5) περιείχε μια πρωτεΐνη μεγέθους 135kDa που αντιστοιχεί στο GST-HIF-1α. Με ανοσοαποτύπωση όμως (**Εικ. 45B**, διαδρ. 8) ανιχνεύθηκε η ύπαρξη προϊόντων πρωτεόλυσης του GST-HIF-1α.

Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα με απόδοση παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης His₁₀-GFP-HIF-1α, δηλαδή 0,1mg ανασυνδυασμένου HIF-1α πλήρους μεγέθους ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

3.3.2 Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης και παρασκευή ανασυνδυασμένου ARNT

Αντίθετα με τον HIF-1α, η παραγωγή ανασυνδυασμένου ARNT σε βακτήρια έχει αναφερθεί αρκετές φορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Για την έκφραση και απομόνωση του ARNT χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πλασμίδιο pARNT/GEX4T-3 το οποίο κωδικοποιεί για τη χμιαϊκή πρωτεΐνη GST-ARNT [132]. Σε προκαταρκτικά πειράματα έκφρασης και απομόνωσης του GST-ARNT παρατηρήθηκε πως η έκφραση της πρωτεΐνης σε βακτήρια ήταν μικρή και η ανάκτηση καθαρής GST-ARNT δεν ήταν δυνατή εξαιτίας της εκτεταμένης πρωτεόλυσης της κατά τη διαδικασία απομόνωσης.

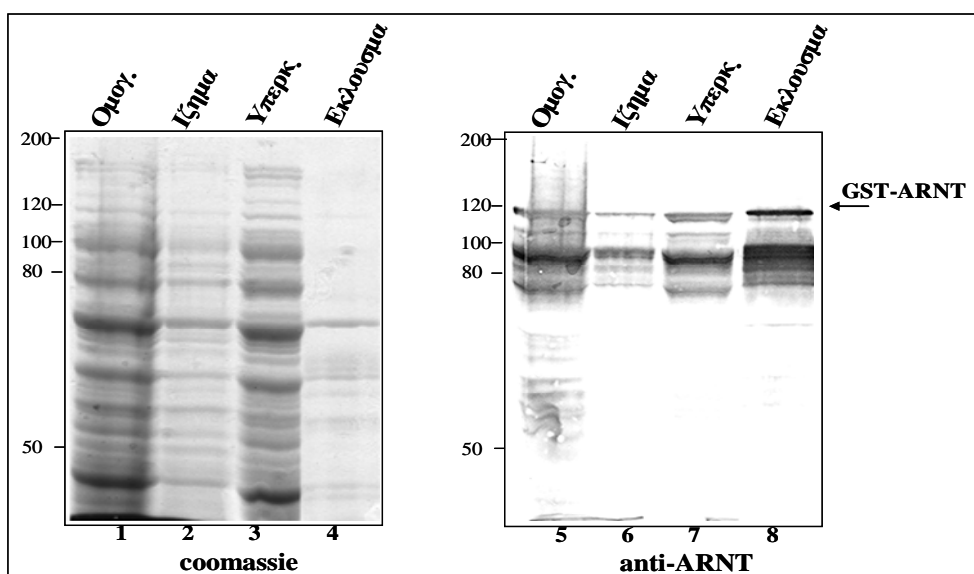
Για την εφαρμογή αποδοτικότερου συστήματος έκφρασης, το cDNA του ARNT κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pET24d-GST-Tev. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο κωδικοποιεί για τον επίτοπο της GST (**Εικ. 46A**) μέσω του οποίου είναι δυνατή η απομόνωση της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα η επαγωγή του κλωνοποιημένου γονιδίου βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή T7. Μολαταύτα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης που εκφράστηκαν και σε αυτήν την περίπτωση ήταν πολύ

μικρά (**Εικ. 46B**, διαδρ. 5) ενώ κατά την προσπάθεια απομόνωσης ανακτήθηκε GST-ARNT πλήρους μεγέθους (120 kDa) ανιχνεύσιμος μόνο με ανοσοαποτύπωση και όχι με βαφή με Coomassie (**Εικ. 46B**, διαδρ. 8). Και σε αυτή την περίπτωση η πρωτεόλυση του GST-ARNT ήταν εμφανής σε όλα τα στάδια του καθαρισμού (διαδρ. 5-8).

A



B



Εικόνα 46: (A) Σχηματική αναπαράσταση της χημειρικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο *pET24d-GST-ARNT*. (B) Κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο *pET24d-GST-ARNT* επωάστηκαν με IPTG, στη συνέχεια λύθηκαν και το ομογενοποίημα (διαδρ. 1 & 5) ίζημα (διαδρ. 2 & 6) και το διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 3 & 7) των κυττάρων καθώς και το έκλουσμα της GSH-Sepharose (διαδρ. 4 & 8) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του ARNT. Τα βέλη δείχνουν τη θέση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΜΕΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ HIF-1α ΚΑΙ ARNT ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΩΝ ΤΟΥΣ

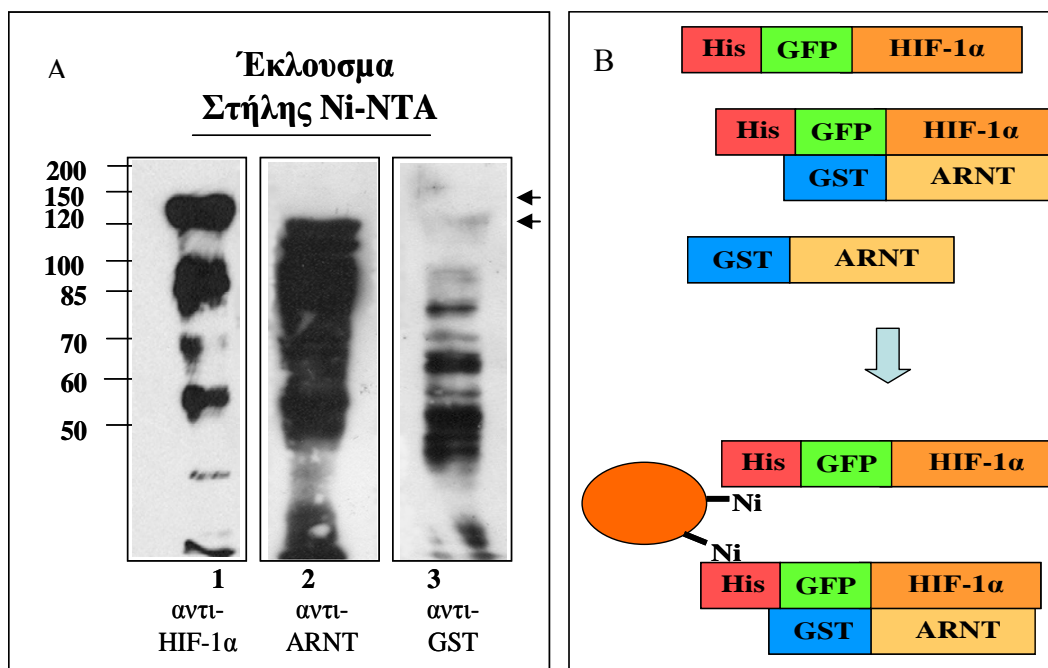
Αφού επιτεύχθηκε η παραγωγή και απομόνωση τόσο του ανασυνδυασμένου HIF-1α όσο και του ARNT στη συνέχεια ελέγχθηκε αν οι δύο πρωτεΐνες είναι λειτουργικές αρχικά όσον αφορά την ικανότητα που έχουν να διμερίζονται μεταξύ τους *in vitro*.

3.4.1 Ανίχνευση του διμερισμού του HIF-1α με τον ARNT μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας

Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν πως ο HIF-1α δεν συνδέεται αποτελεσματικά στον ARNT όταν επωαστούν μαζί *in vitro*. Για να επιτευχθεί παραγωγή του ετεροδιμερούς του HIF-1 δοκιμάστηκε η συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών σε βακτήρια. Σε κύτταρα που περιείχαν τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τον His₁₀-GFP-HIF-1α και τον GST-ARNT έγινε επαγωγή με IPTG και το διαλυτό κυτταρικό εκχύλισμα διαβιβάστηκε μέσω στήλης Ni-NTA-Sepharose. Ακολούθησε έκλουση των δεσμευμένων στη στήλη πρωτεϊνών με ιμιδαζόλιο και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 47Α** (διαδρ. 1) το κλάσμα της έκλουσης περιείχε τον His₁₀-GFP-HIF-1α, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο αφού ο HIF-1α περιέχει τον επίτοπο ιστιδινών.

Χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ARNT και της GST (διαδρ. 2 & 3) παρατηρήθηκε πως το ίδιο κλάσμα περιείχε και ARNT, τόσο πλήρους μεγέθους όσο και μικρότερες πρωτεολυμένες μορφές του. Πειράματα ελέγχου με κύτταρα στα οποία συνεκφράστηκε ο His₁₀-GFP-HIF-1α μαζί με τη GST έδειξαν πως η GST δεν δεσμεύεται στα σφαιρίδια Ni-NTA-Sepharose.

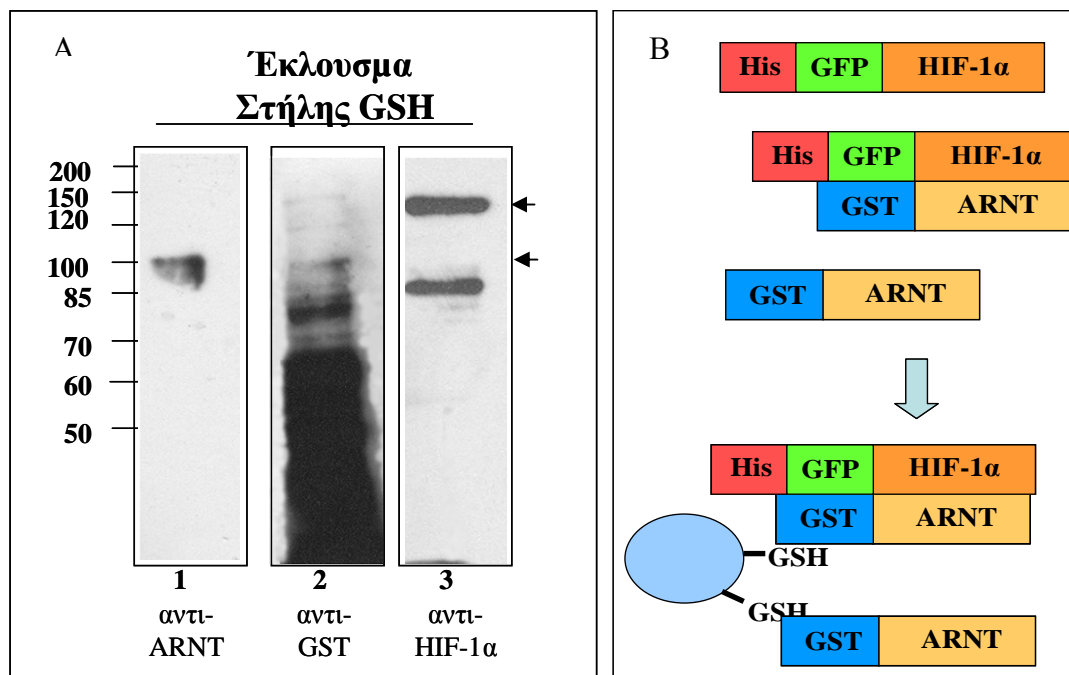
Συμπεραίνεται λοιπόν πως ο GST-ARNT συναπομονώνεται με τον His₁₀-GFP-HIF-1α σε στήλη Ni-NTA-Sepharose εξαιτίας δημιουργίας του συμπλόκου με τον HIF-1α (**Εικ. 47Β**). Κατά συνέπεια είναι δυνατός ο ετεροδιμερισμός των δύο πρωτεϊνών όταν αυτές εκφράζονται στα ίδια βακτηριακά κύτταρα.



Εικόνα 47: (Α) Διαλυτό εκχύλισμα κυττάρων που παράγουν His₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT διαβιβάστηκε σε σφαιρίδια Ni-NTA-Sepharose και το έκλουσμα αναλύθηκε με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του HIF-1α (1), του ARNT (2) και της GST (3). Τα βέλη δείχνουν τη θέση των His₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa). (Β) Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης του συμπλόκου His₁₀-GFP-HIF-1α/GST-ARNT από κύτταρα που εκφράζουν τις δύο πρωτεΐνες.

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω, εκχύλισμα των κυττάρων όπου εκφράστηκαν ταυτόχρονα His₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT διαβιβάστηκε σε στήλη GSH-Sepharose και το έκλουσμα της στήλης αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση (**Εικ. 48Α**). Όπως αναμενόταν το κλάσμα περιείχε GST-ARNT και πρωτεολυμένα τμήματα του (διαδρ. 1 & 2) που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια μέσω του GST επιτόπου τους. Το κλάσμα όμως επιπλέον περιείχε His₁₀-GFP-HIF-1α (διαδρ. 3) η παρουσία του οποίου είναι δυνατόν να εξηγηθεί μέσω της δέσμευσης του στο GST-ARNT (**Εικ. 48Β**).

Για να δοκιμαστεί αν είναι δυνατή η πλήρης απομόνωση του συμπλόκου His₁₀-GFP-HIF-1α/GST-ARNT από τα ελεύθερα συστατικά του έγινε το εξής πείραμα: Το διαλυτό εκχύλισμα κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν οι δυο πρωτεΐνες διαβιβάστηκε πρώτα σε στήλη Ni-NTA-Sepharose και στη συνέχεια το έκλουσμα της στήλης με ιμιδαζόλιο διαβιβάστηκε σε σφαιρίδια GSH-Sepharose και ακολούθησε νέα έκλουση με GSH.

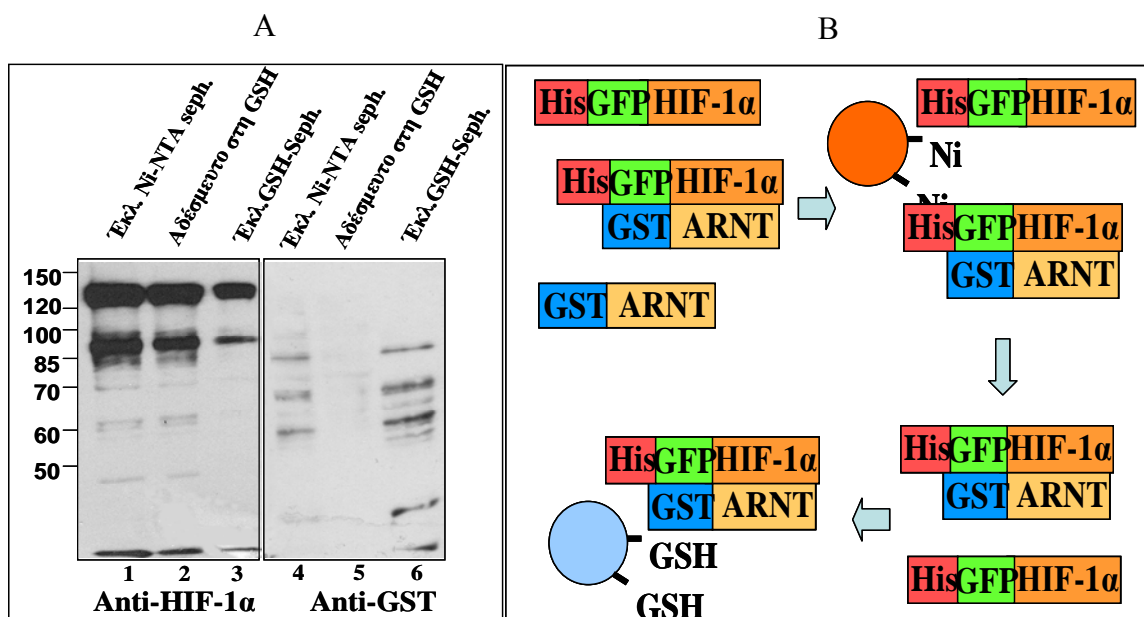


Εικόνα 48: (Α) Διαλυτό εκχύλισμα κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες His₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT διαβιβάστηκε σε στήλη GSH-Sepharose και το έκλουσμα της στήλης με GSH αναλύθηκε με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του ARNT (1), της GST (2) και του HIF-1α (3). Τα βέλη δείχνουν τη θέση των His₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa). (Β) Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης του συμπλόκου His₁₀-GFP-HIF-1α/ GST-ARNT μέσω σφαιριδίων GSH-Sepharose.

Όπως φαίνεται στην **Εικ. 49Α** το έκλουσμα της στήλης Ni-NTA-Sepharose περιείχε His₁₀-GFP-HIF-1α πλήρους μεγέθους (διαδρ. 1) καθώς και GST-ARNT ή πρωτεολυμένες μορφές του (διαδρ. 4). Το έκλουσμα της δεύτερης στήλης περιείχε τις ίδιες μορφές του GST-ARNT (διαδρ. 6) οι οποίες προσδέθηκαν μέσω των GST επιτόπων τους αλλά και His₁₀-GFP-HIF-1α που προφανώς ήταν συνδεδεμένος με τις μορφές αυτές (διαδρ. 3). Αντίστοιχα, το αδέσμευτο κλάσμα της στήλης GSH-Sepharose περιείχε τον ελεύθερο His₁₀-GFP-HIF-1α (διαδρ. 2). Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικ. 49Β**.

3.4.2 Απομόνωση του συμπλόκου HIF-1α/ARNT

Με τον παραπάνω τρόπο αποδείχθηκε ότι είναι δυνατός τόσο ο διμερισμός του HIF-1α με τον ARNT όταν οι δύο πρωτεΐνες συνεκφραστούν στα ίδια κύτταρα όσο και η ανάκτηση του συμπλόκου των πρωτεϊνών HIF-1α/ARNT. Στο τελικό όμως παρασκεύασμα υπήρχαν και μικρότερα σύμπλοκα εκτός από αυτό του πλήρους



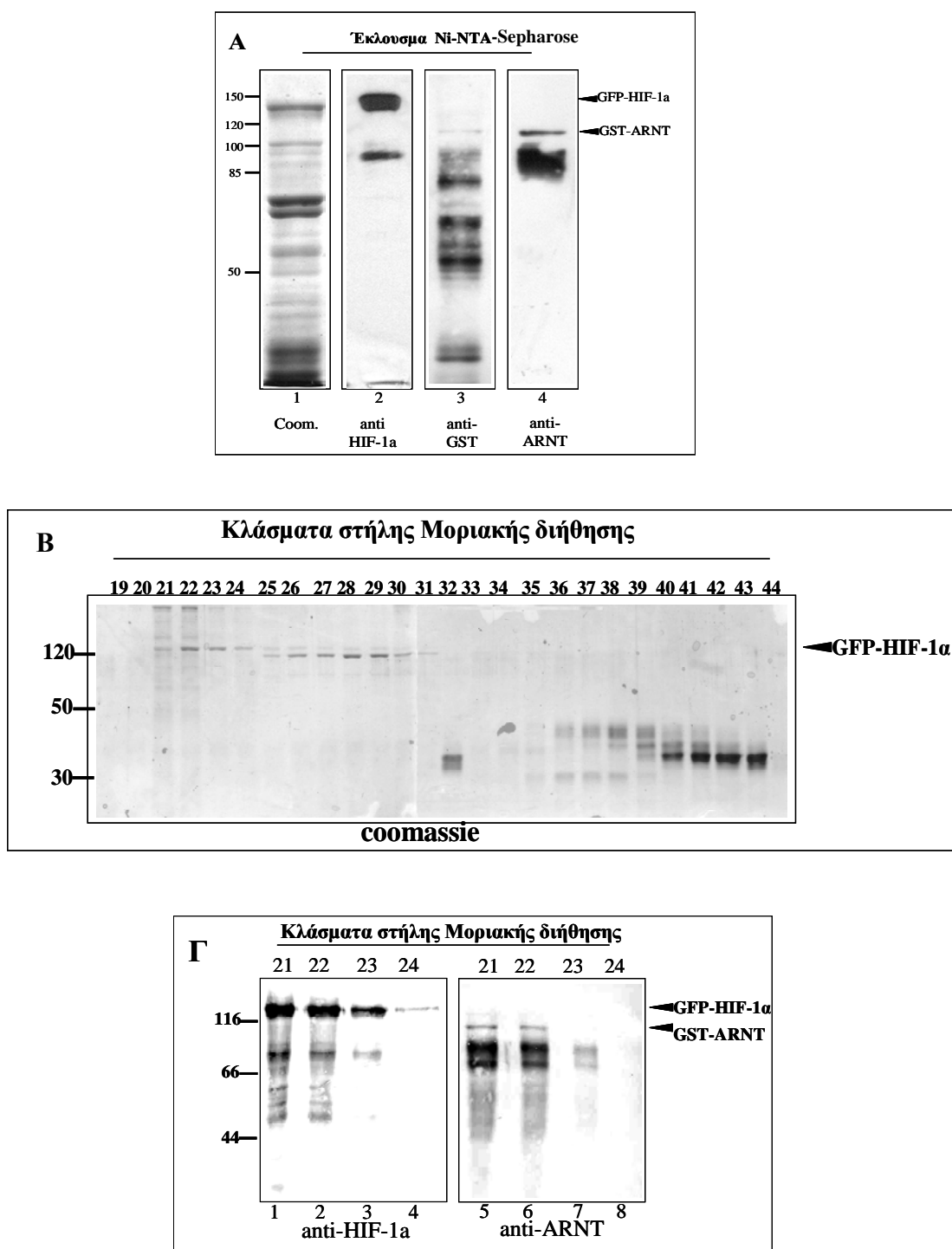
Εικόνα 49: (Α) Διαλυτό εκχύλισμα κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν οι *His*₁₀-GFP-HIF-1α και GST-ARNT διαβιβάστηκε σε στήλη Ni-NTA-Sepharose και στη συνέχεια το έκλουσμα με ιμιδαζόλιο διαβιβάστηκε σε στήλη GSH-Sepharose. Κλάσματα έκλουσης από τα δύο στάδια απομόνωσης καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα της στήλης GSH-Sepharose αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του HIF-1α (διαδρ. 1-3) και της GST (διαδρ. 4-6). (Β) Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης του συμπλόκου *His*₁₀-GFP-HIF-1α/ GST-ARNT μέσω διαδοχικών χρωματογραφιών αχιστείας.

μεγέθους εξαιτίας της εκτεταμένης πρωτεόλυσης κατά τη διαδικασία απομόνωσης των HIF-1α και ARNT. Για την ανάκτηση του συμπλόκου HIF-1α/ARNT το οποίο αποτελείται μόνο από πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη στήλη Ni-NTA-Sepharose μια στήλη μοριακής διήθησης η οποία επιτρέπει την απομόνωση του συμπλόκου που αντιστοιχεί στο ετεροδιμερές πλήρους μεγέθους.

Το διαλυτό κλάσμα του εκχυλίσματος κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν *His*₁₀-GFP-HIF-1α (ο οποίος για χάριν συντομίας θα αναφέρεται από τώρα και στο εξής ως GFP-HIF-1α) και GST-ARNT διαβιβάστηκε σε στήλη Ni-NTA αгарόζης. Το έκλουσμα της στήλης με ιμιδαζόλιο περιείχε GFP-HIF-1α (**Εικ. 50Α**, διαδρ. 1 & 2), GST-ARNT πλήρους μεγέθους και αρκετά προϊόντα πρωτεόλυσης του (διαδρ. 3 & 4).

Στη συνέχεια το κλάσμα αυτό διαβιβάστηκε σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S-200. Η ανάλυση των κλασμάτων της στήλης όπως φαίνεται στην **Εικ. 50Β** έδειξε την παρουσία του GFP-HIF-1α κυρίως στα κλάσματα #21-24. Ανάλυση αυτών των κλασμάτων με ανοσοαποτύπωση έδειξε πως ο τα κλάσματα #21 και #22 τα οποία αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος του ετεροδιμερούς (≈ 200 kDa, **Εικ. 50Γ**) περιέχουν και GST-ARNT. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα κλάσματα #21 και #22

περιέχουν σε μεγάλο βαθμό καθαρότητα το σύμπλοκο GFP-HIF-1α /GST-ARNT και χρησιμοποιήθηκαν στην παραπέρα μελέτη της λειτουργικότητας του HIF-1. Αντίθετα, τα κλάσματα #23 και #24 που αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος των 130kDa περιείχαν μόνο τον GFP-HIF-1α (*Εικ. 50Γ*).



Εικόνα 50: (Α) Το διαλυτό εκχύλισμα κυττάρων στα οποία εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες GFP-HIF-1α και GST-ARNT διαβίβαστηκε σε Ni-NTA-Sepharose. Το έκλουσμα με ιμιδαζόλιο αναλύθηκε με SDS-PAGE, και βαφή με Coomassie (διαδρ. 1) ή ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α (διαδρ. 2), της

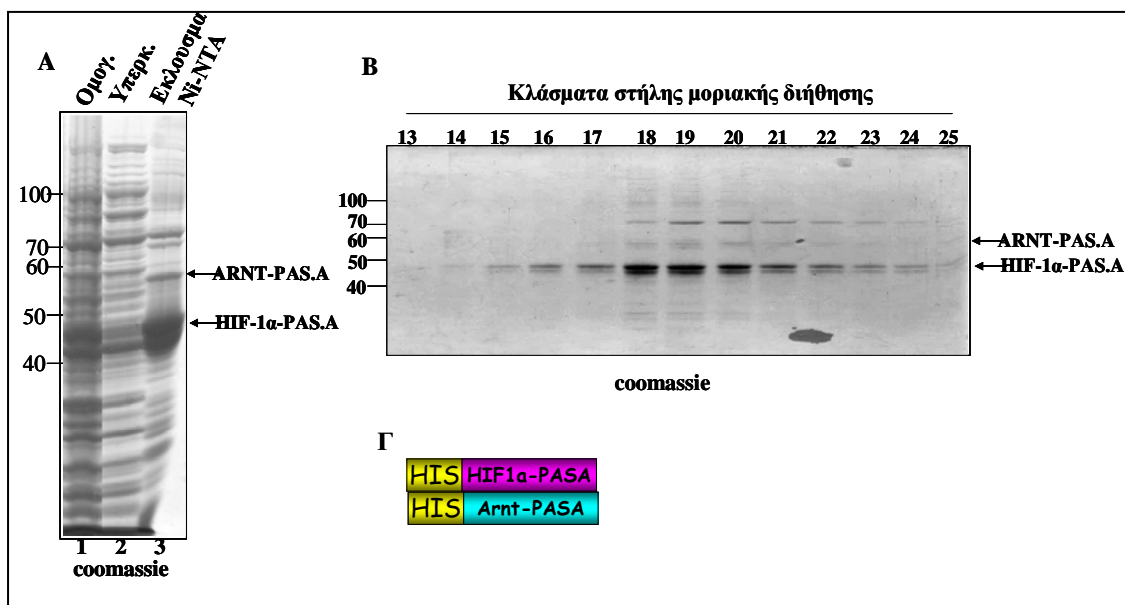
GST (διαδρ. 3) ή του *ARNT* (διαδρ. 4). (B) Το έκλουσμα της στήλης *Ni-NTA-Sepharose* στη συνέχεια διαβιβάστηκε σε στήλη *Superdex S-200* και τα κλάσματα αναλύθηκαν με *SDS-PAGE* και βαφή *Coomassie*. (Γ) Τα κλάσματα 21-24 τα οποία αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη 195 και 110 kDa αντίστοιχα, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του *HIF-1α* (διαδρ. 1-4), και του *ARNT* (διαδρ. 5-8). Τα βέλη δείχνουν τη θέση των πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

3.4.3 Απομόνωση των συμπλόκων *HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A*, *GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A* και *GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A*

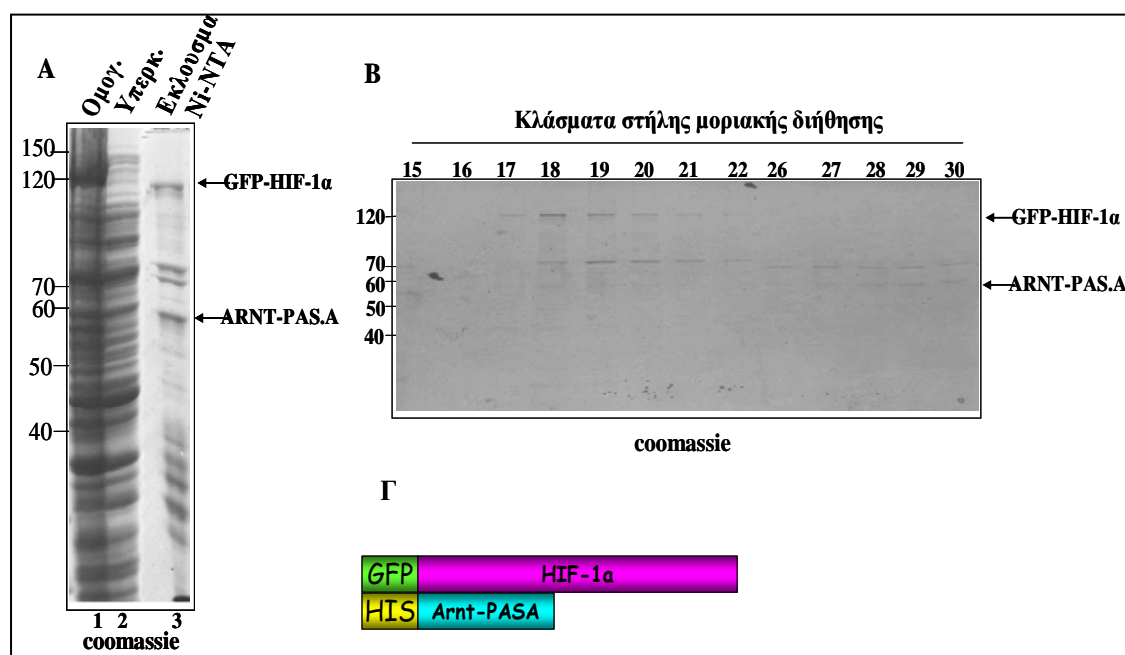
Για να μελετηθεί η συμμετοχή των διαφόρων επικρατειών των πρωτεϊνών *HIF-1α* και *ARNT* στον διμερισμό τους και στην αλληλεπίδραση τους με το DNA χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές *pAC28-ARNT-PAS_A*, *pAC28-ARNT-PAS_{AB}* και *pET32a-HIF-1α.PAS_A* (χορηγήθηκαν από την Dr.Chapman-Smith) που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *ARNT-PAS_A* ή *ARNT-PAS_{AB}* και *HIF-1α-PAS_A* αντίστοιχα, οι οποίες φέρουν *His*-επιτόπους. Ακολούθησε έκφραση των μεμονωμένων πρωτεϊνών και συνέκφραση των πρωτεϊνών *ARNT-PAS_A* και *HIF-1α-PAS_A* μέσω στήλης *Ni-NTA-Sepharose* σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο [32]. Κατά την απομόνωση των συνεκφρασμένων πρωτεϊνών το έκλουσμα της στήλης περιείχε μια πρωτεΐνη 45 kDa και μια πρωτεΐνη 55 kDa οι οποίες αντιστοιχούν στις *HIF-1α-PAS_A* και στον *ARNT-PAS_A* (**Εικ. 51A**, διαδρ. 3). Για τον περαιτέρω καθαρισμό και απομόνωση του ετεροδιμερούς *HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A* το έκλουσμα διαβιβάστηκε μέσω στήλης μοριακής διήθησης *Sephacryl S-200*. Ανάλυση των κλασμάτων έδειξε πως τα κλάσματα #18 έως #21 περιείχαν το ετεροδιμερές συμπλόκο.

Κατά τον ίδιο τρόπο έγινε συνέκφραση των *GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A* και *GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A* πρωτεϊνών και απομόνωση τους μέσω στήλης *Ni-NTA-Sepharose* (**Εικ. 52A**, διαδρ. 3). Στην πρώτη περίπτωση η ανάλυση του εκλούσματος έδειξε πως αυτό περιείχε τόσο τη *GFP-HIF-1α* όσο και την *ARNT-PAS_A* (**Εικ. 52A**, διαδρ. 3) οι οποίες δεσμεύτηκαν μέσω των *His* επιτόπων τους. Στη δεύτερη περίπτωση ανιχνεύτηκε *GST-HIF-1α* στο έκλουσμα, ο οποίος προφανώς απομονώθηκε μέσω της σύνδεσης του με τον *ARNT-PAS_A* (**Εικ. 53A**, διαδρ. 3) γι' αυτό και είναι γενικά λιγότερος σε σχέση με την πρώτη περίπτωση. Στη συνέχεια τα εκλούσματα διαβιβάστηκαν μέσω στήλης μοριακής διήθησης και ακολούθησε συλλογή και ανάλυση των κλασμάτων. Ο *GFP-HIF-1α* εντοπίζεται στα κλάσματα #18-21 (**Εικ. 52B**) ενώ το ετεροδιμερές (*GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A*) κρίνοντας από την παρουσία

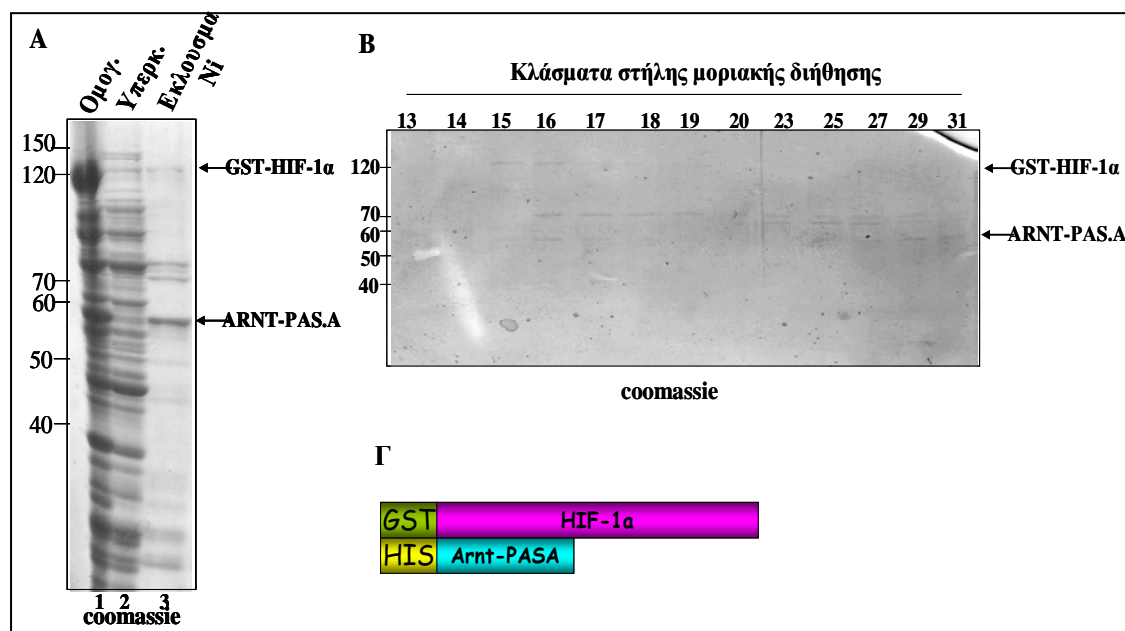
του ARNT-PAS_A εντοπίζεται μόνο στα κλάσματα #18 και 19. Στα επόμενα κλάσματα που αντιστοιχούν σε μικρότερο μοριακό βάρος (#27-30) εντοπίζεται μόνο ο ελεύθερος ARNT-PAS_A.



Εικόνα 51: (Α) Κύτταρα στα οποία εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες HIF-1α-PAS_A και ARNT-PAS_A λύθηκαν και το ομογενοποίηση (διαδρ. 1) το διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 2) καθώς και το έκλουσμα της Ni-NTA-Sephrose (διαδρ. 3) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. (Β) Το έκλουσμα στη συνέχεια διαβιβάστηκε σε στήλη Superdex S-200 και τα κλάσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa). (Γ) Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A



Εικόνα 52: (Α) Κύτταρα στα οποία εκφράστηκαν οι *GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A* πρωτεΐνες λύθηκαν και το ομογενοποίημα (διαδρ. 1) διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 2) των κυττάρων και το έκλουσμα της Ni-NTA Sepharose (διαδρ. 3) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. (Β) Το έκλουσμα στη συνέχεια μεταβιβάστηκε σε μια στήλη Superdex S-200 και τα κλάσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).).(Γ) Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου *GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A*



Εικόνα 53: (Α) Κύτταρα στα οποία εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες *GST-HIF-1α* και *ARNT-PAS_A* λύθηκαν και το ομογενοποίημα (διαδρ. 1) διαλυτό κλάσμα (διαδρ. 2) των κυττάρων και το έκλουσμα της Ni-NTA Sepharose (διαδρ. 3) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. (Β) Το έκλουσμα στη συνέχεια μεταβιβάστηκε σε μια στήλη Superdex S-200 και τα κλάσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή Coomassie. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).).(Γ) Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου *GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A*

Αντίστοιχα στην περίπτωση του ετεροδιμερούς *GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A* οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται με χρώση Coomassie να εντοπίζονται μαζί μόνο στο κλάσμα #16 ενώ ο αδέσμευτος *ARNT-PAS_A* εντοπίζεται σε επόμενα κλάσματα που αντιστοιχούν σε μικρότερο μοριακό βάρος (**Εικ. 53B**, #25-31). Τα κλάσματα που περιείχαν τα ετεροδιμερή αποθηκεύτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στη δοκιμασία αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας.

3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

HIF-1 α /ARNT ΜΕ ΤΟ DNA

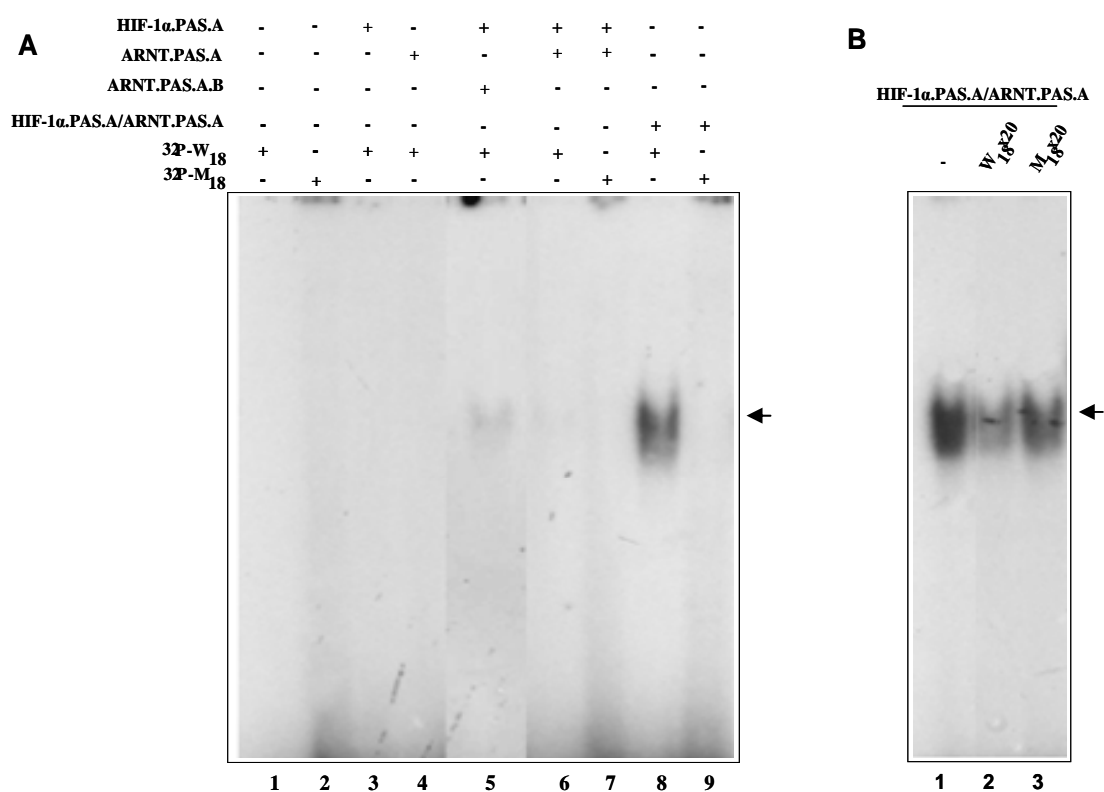
Όπως ήδη έχει αναφερθεί, για να είναι λειτουργικός ο HIF-1 α πρέπει όχι μόνο να διμεριστεί με τον συμπαράγοντα του ARNT αλλά και να προσδεθεί στο DNA των γονιδίων στόχων του. Ενώ είναι γνωστό πως για τη σύνδεση στο DNA απαιτούνται οι bHLH-PAS περιοχές των δύο πρωτεϊνών δεν έχει ερευνηθεί αν και πώς η σύνδεση αυτή επηρεάζεται από τις υπόλοιπες περιοχές του HIF-1 α και του ARNT. Για τους λόγους αυτούς στη συνέχεια ελέγχθηκε τόσο η σύνδεση των συμπλόκων του HIF-1 που απομονώθηκαν παραπάνω στο DNA, όσο και ο ρόλος των διαφόρων επικρατειών των υπομονάδων του στη σύνδεση αυτή.

Για να προσδιοριστεί η ικανότητα σύνδεσης των απομονωμένων πρωτεϊνών και των συμπλόκων τους στο DNA εφαρμόστηκε η δοκιμασία αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA), στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης ένα ραδιοσημασμένο δίκλωνο 18μερές ολιγονουκλεοτίδιο (W18) το οποίο περιείχε το HRE από τον ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Σαν αρνητικός μάρτυρας για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή του, το M18, στο οποίο είναι γνωστό πως δεν δεσμεύεται ο HIF-1 [14].

Επώαση των απομονωμένων πρωτεϊνών με το DNA και ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και αυτοραδιογραφία έδειξαν πως ο HIF-1 α -PAS_A ή ο ARNT-PAS_A δεν μπορούν να δεσμευτούν στο DNA μόνοι τους (**Εικ. 54A**, διαδρ. 3 & 4). Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός πως όταν ο HIF-1 α -PAS_A επώαστηκε με τον ARNT-PAS_{AB} παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός συμπλόκου με το DNA το οποίο ήταν μεν ασθενικό αλλά ανιχνεύσιμο (**Εικ. 54A**, διαδρ. 5). Όταν όμως χρησιμοποιήθηκαν οι HIF-1 α -PAS_A και ARNT-PAS_A, η σύνδεση με το DNA μειώθηκε αισθητά (**Εικ. 54A**, διαδρ. 6), υποδεικνύοντας πως η παρουσία της περιοχής B της PAS επικράτειας ενισχύει τον *in vitro* ετεροδιμερισμό. Όταν όμως στη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε το προσχηματισμένο σύμπλοκο των HIF-1 α -PAS_A/ARNT-PAS_A, που απομονώθηκε από βακτήρια στα οποία συνεκφράστηκαν οι δύο πρωτεΐνες (**Εικ. 51B**, κλάσμα #19), δημιουργήθηκε ένα ισχυρό σύμπλοκο πρωτεϊνών-DNA, που απέδειξε την ικανότητα σύνδεσης του ετεροδιμερούς HIF-1 α -PAS_A/ARNT-PAS_A στο HRE (**Εικ. 54A**, διαδρ. 8). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε

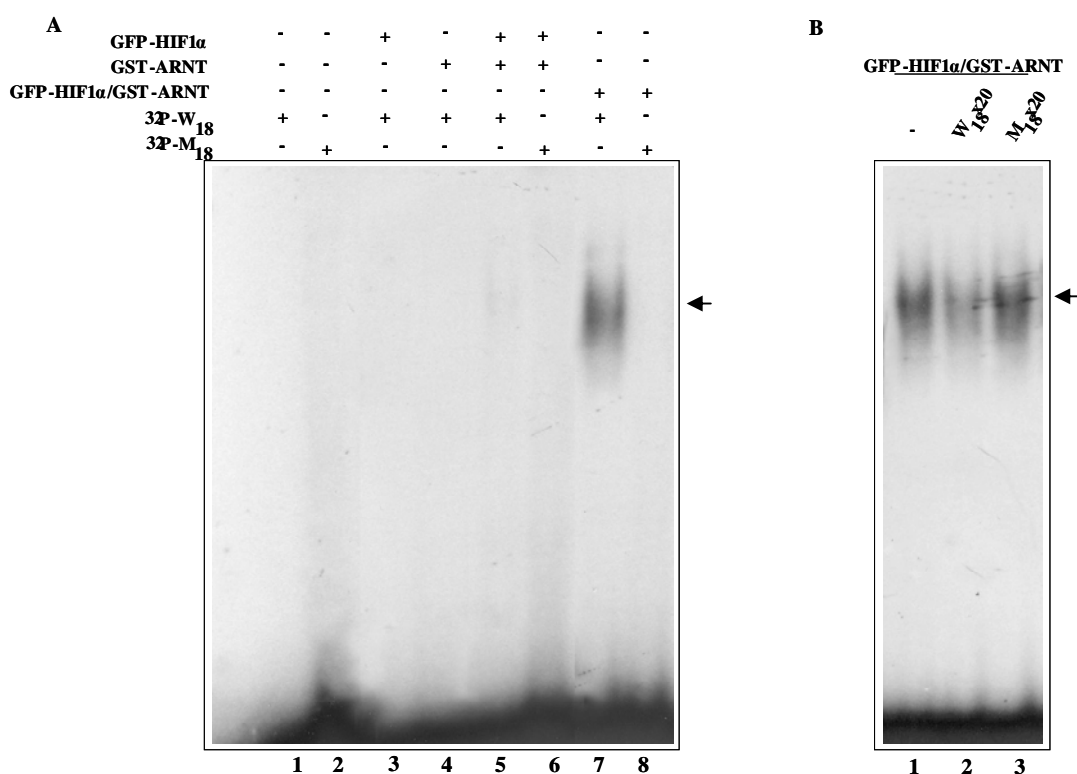
τις προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [32] και χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας της σύνδεσης στο DNA.

Για τον έλεγχο της ειδικότητας της σύνδεσης του στο DNA, το σύμπλοκο HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A επωάστηκε με το μεταλλαγμένο ιχνηθέτη M18. Στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε σύνδεση του ετεροδιμερούς με το DNA (**Εικ. 54A**, διαδρ. 9). Επιπλέον το σήμα του HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A/DNA συμπλόκου (**Εικ. 54B**, διαδρ. 1) εξασθένησε όταν προστέθηκε στην αντίδραση μη ραδιενεργό W18 σε περίσσεια μετά την προσθήκη του ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου W18 (διαδρ. 2), ενώ η προσθήκη του μη ραδιενεργού M18 δεν είχε επίδραση (διαδρ. 3).



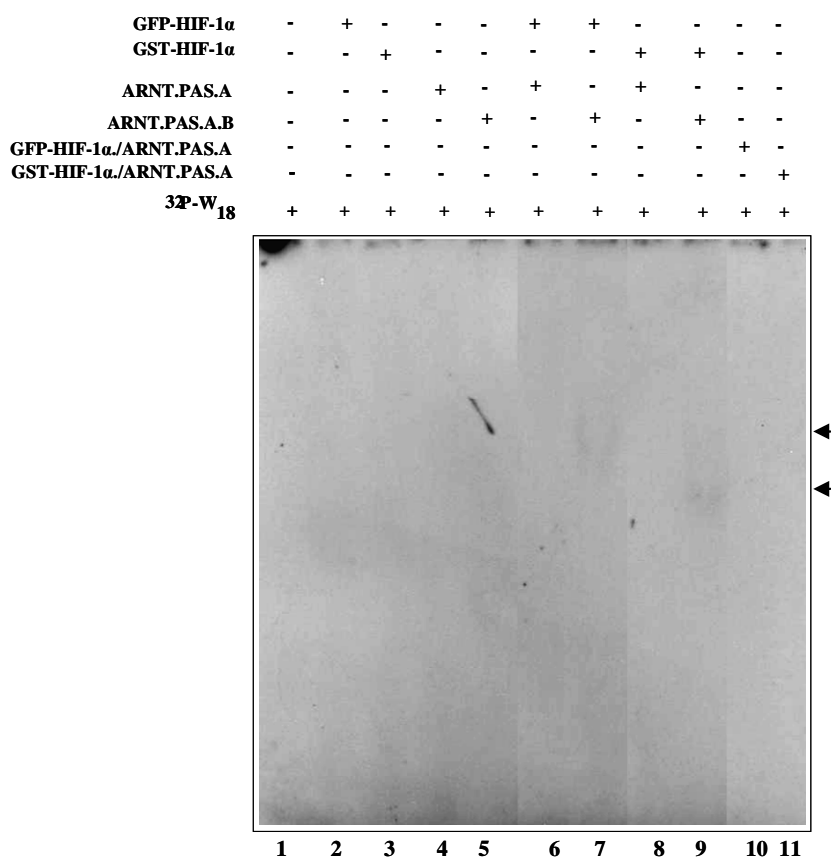
Εικόνα 54: (A). Ανάλυση με EMSA της σύνδεσης στο DNA των HIF-1α-PAS A (διαδρ. 3), ARNT-PASA (διαδρ. 4), μίγματος HIF-1α-PAS A και ARNT-PASAB (διαδρ. 5) μίγματος HIF-1α-PAS A και ARNT-PASA (διαδρ. 6-7) και του προσχηματισμένου συμπλόκου HIF-1α-PAS A/ARNT-PASA (διαδρ. 8-9) που επωάστηκαν με W18 (διαδρ. 1, 3-6 & 8) ή με M18 (διαδρομές 2,7 & 9) ιχνηθέτες σημασμένους με ³²P. (B) Το προσχηματισμένο ετεροδιμερές HIF-1α-PAS A/ARNT-PASA επωάστηκε μόνο με W18 ιχνηθέτη σημασμένο με ³²P (διαδρ. 1) ή με ραδιενεργό W18 παρουσία περίσσειας (x20) μη ραδιενεργού W18 (διαδρ. 2) ή με ραδιενεργό W18 και περίσσεια μη ραδιενεργού M18 (διαδρ. 3) και ακολούθησε ανάλυση EMSA.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα σύνδεσης στο DNA των HIF-1α και ARNT πλήρους μεγέθους καθώς και του προσχηματισμένου σε βακτήρια συμπλόκου του GFP-HIF-1α/GST-ARNT. Επώαση των απομονωμένων πρωτεϊνών με το DNA έδειξε πως ο GFP-HIF-1α ή ο GST-ARNT δεν μπορούν να δεσμευτούν στο DNA μόνοι τους (*Εικ. 55A, διαδρ. 3 & 4*). Όταν χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα των ελεύθερων GFP-HIF-1α και GST-ARNT πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε μια αδύναμη και ελάχιστα ανιχνεύσιμη σύνδεση στο DNA (*Εικ. 55A, διαδρ. 5*), υποδεικνύοντας πως υπάρχει ασθενική αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο πρωτεϊνών *in vitro*. Αντιθέτως, το απομονωμένο από βακτήρια προσχηματισμένο σύμπλοκο των GFP-HIF-1α/GST-ARNT (*Εικ. 50, κλάσμα #21*), παρουσίασε ικανοποιητική σύνδεση στο DNA (*Εικ. 55A, διαδρ. 7*).



Εικόνα 55: (A). Ανάλυση με EMSA της σύνδεσης στο DNA των GFP-HIF-1α. (διαδρ. 3), GST-ARNT (διαδρ. 4), μίγματος (διαδρομές 5-6) και του προσχηματισμένου συμπλόκου GFP-HIF-1α/GST-ARNT (διαδρ. 7-8) που επωάστηκαν με W18 (διαδρ. 1, 3-5 & 7) ή με M18 (διαδρ. 2, 6 & 8) ιχνηθέτες σημασμένους με ³²P. (B) Το προσχηματισμένο ετεροδιμερές GFP-HIF-1α/GST-ARNT επωάστηκε μόνο με W18 ιχνηθέτη σημασμένο με ³²P (διαδρ. 1) ή με ραδιενεργό W18 παρουσία περίσσειας (x20) μη ραδιενεργού W18 (διαδρ. 2) ή με ραδιενεργό W18 και περίσσεια μη ραδιενεργού M18 (διαδρ. 3) και ακολούθησε ανάλυση EMSA.

Ο σχηματισμός των συμπλόκων πρωτεϊνών με το HRE ήταν ειδικός αφού όταν χρησιμοποιήθηκε ο ραδιενεργός M18 ιχνηθέτης αντί του W18 δεν παρατηρήθηκε σύνδεση στο DNA (**Εικ. 55A**, διαδρ. 6 & 8). Επιπλέον, το σήμα του GFP-HIF-1α/GST-ARNT/DNA συμπλόκου (**Εικ. 55B**, διαδρ. 1) εξασθένησε όταν προστέθηκε στην αντίδραση μη ραδιενεργός W18, σε περίσσεια μετά την προσθήκη του ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου W18 (διαδρ. 2), ενώ η αντίστοιχη προσθήκη του μη ραδιενεργού M18 δεν είχε καμία επίδραση (διαδρ. 3). Φαίνεται λοιπόν πως το ετεροδιμερές του HIF-1 το οποίο απομονώθηκε από βακτήρια και αποτελείται από πλήρους μεγέθους GFP-HIF-1α και GST-ARNT είναι λειτουργικό ως προς τη σύνδεση του στο DNA υποδεικνύοντας και τη λειτουργικότητα των υπομονάδων του.



Εικόνα 56: Ανάλυση με EMSA της σύνδεσης στο DNA. των GFP-HIF-1α (διαδρ. 2), GST-HIF-1α (διαδρ.3), ARNT-PASA (διαδρ. 4), ARNT-PASA.B. (διαδρομή 5), μίγματος GFP-HIF-1α και ARNT-PASA (διαδρ. 6), μίγματος GFP-HIF-1α και ARNT-PASA.B (διαδρ. 7), μίγματος GST-HIF-1α και ARNT-PASA (διαδρ. 8), μίγματος GST-HIF-1α και ARNT.PAS.A.B (διαδρ. 9) και των προσχηματισμένων συμπλόκων GFP-HIF-1α/ ARNT-PASA (διαδρ. 10) ή GST-HIF-1α/ ARNT-PASA (διαδρ. 11) που επωάστηκαν με W18 ιχνηθέτη σημασμένο με ³²P.

Κατά την ανάλυση των προσχηματισμένων συμπλόκων των GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A (**Εικ. 52B**, κλάσμα #18) και GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A (**Εικ. 53B**, κλάσμα #16) όσο και του μίγματος των πρωτεϊνών GFP-HIF-1α και ARNT-PAS_A ή GST-HIF-1α και ARNT-PAS_A δεν παρατηρήθηκε σύνδεση με το DNA (**Εικ. 56**). Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός πως μόνο στις περιπτώσεις που δοκιμάστηκε μίγμα των πρωτεϊνών GFP-HIF-1α και ARNT-PAS_{AB} (διαδρ. 7) ή των πρωτεϊνών GST-HIF-1α και ARNT-PAS_{AB} (διαδρ. 9) παρατηρήθηκε σύμπλοκο με το DNA το οποίο όμως ήταν μόλις ανιχνεύσιμο.

Όλα παραπάνω αποτελέσματα των EMSA πειραμάτων συνοψίζονται στον **Πιν. 7** (4.2) που παρουσιάζεται στα πλαίσια της συζήτησης.

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΗΝ P42 MAPK

Παρότι είναι γνωστό πως ο HIF-1α αποτελεί υπόστρωμα των MAP κινασών δεν είναι εξακριβωμένο ποιες είναι οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης ούτε ποιος είναι ο βασικός ρόλος της τροποποίησης αυτής στη λειτουργία του HIF-1α. Έχοντας διαθέσιμο βακτηριακά εκφρασμένο HIF-1α ο οποίος δε φέρει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μελετήθηκε η φωσφορυλίωσή του από την p42 MAPK προκειμένου να αναγνωριστούν οι θέσεις των αμινοξικών καταλοίπων του HIF-1α που υπόκεινται σε τροποποίηση.

Αρχικά ελέγχθηκε αν ο ανασυνδυασμένος GST-HIF-1α αποτελεί υπόστρωμα της p42 MAP κινάσης *in vitro*. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 57** επώαση της GST-HIF-1α με τη p42 MAPK παρουσία γ -P³²-ATP οδήγησε σε ισχυρή σήμανση του HIF-1α με ραδιενεργό φώσφορο (διαδρ. 6). Επιπρόσθετα, με βαφή με Coomassie και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α (διαδρ. 1-2 και 3-4 αντίστοιχα) φαίνεται, πρώτον, πως η φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α είχε μικρότερη ηλεκτροφορετική κινητικότητα σε σχέση με τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή και, δεύτερον, πως ο ανασυνδυασμένος HIF-1α φωσφορυλιώνεται ποσοτικά από την p42 MAPK καθώς η φωσφορυλιωμένη μορφή αποτελεί τουλάχιστον το 50% του συνολικού ποσού του HIF-1α που επώαστηκε με την p42 MAPK. (**Εικ. 57**, διαδρ. 6). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν ως υπόστρωμα της p42 MAPK χρησιμοποιήθηκε η GFP-HIF-1α.

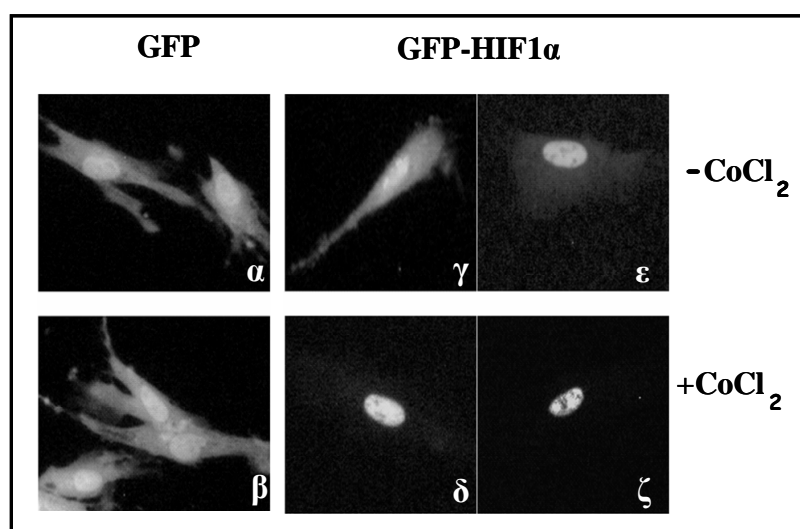
Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε αρκετές φορές και τα δείγματα που περιείχαν φωσφορυλιωμένη GST-HIF-1α χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Δρ. Παναγιώτου στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Α.Φλεμινγκ» για την ταυτοποίηση των φωσφορυλιωμένων αμινοξικών καταλοίπων με τη χρήση φασματοσκοπίας μαζών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως οι δυο σερίνες που βρίσκονται στις θέσεις 641 και 643 της αλληλουχίας αμινοξέων του HIF-1α είναι υποψήφιοι στόχοι προς φωσφορυλίωση από τη συγκεκριμένη κινάση (**Εικ. 58**).

3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

Ο HIF-1α πρέπει να εισαχθεί στον πυρήνα προκειμένου να συνδεθεί με τον συμπαράγοντα του ARNT και να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους. Αν και έχουν χαρακτηριστεί δύο πιθανές NLS αλληλουχίες στον HIF-1α δεν έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς του στον πυρήνα. Επιπλέον υπάρχουν συγκρουόμενες απόψεις σχετικά με το αν η μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα είναι ρυθμιζόμενη από εξωτερικά ερεθίσματα. Με τη βοήθεια του ανασυνδυασμένου HIF-1α μελετήθηκε λεπτομερώς τόσο ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός του όσο και ο μηχανισμός εισόδου του στον πυρήνα *in vitro*.

3.7.1 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός του GFP-HIF-1α σε ΛΜΚΑ

Ο κυτταρικός εντοπισμός του HIF-1α μελετήθηκε μετά από επιμόλυνση κυττάρων με το πλασμίδιο pEGFP-HIF-1α και υπερέκφρασή του σε ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου. Παρατηρήθηκε πώς ο GFP-HIF-1α εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (**Εικ. 59ε**) αλλά και στο κυτταρόπλασμα (**Εικ. 59γ**) των κυττάρων, ενώ μετά από προσθήκη CoCl_2 στο μέσο καλλιέργειας ο HIF-1α εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα (**Εικ. 59δ & ζ**). Σαν μάρτυρες για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν επιμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο pEGFP. Η GFP πρωτεΐνη εντοπίστηκε σε όλο το κύτταρο παρουσία ή απουσία CoCl_2 (**Εικ. 59α & β**).



Εικόνα 59: ΛΜΚΑ επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP (α, β) και pEGFP-HIF-1α (γ, δ, ε, ζ). 24 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία (α, γ, ε) ή παρουσία 100 μM CoCl_2 (β, δ, ζ)

για 4 ώρες. Ο κυτταρικός εντοπισμός του GFP-HIF-1α και της GFP έγινε με παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

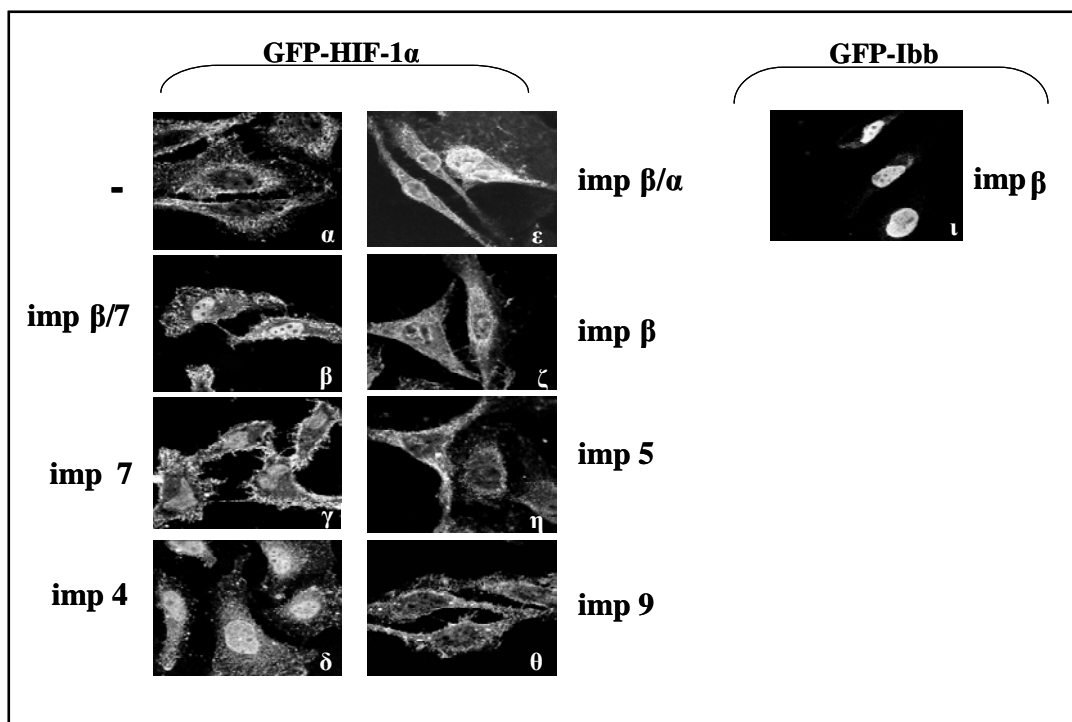
Φαίνεται λοιπόν πως το κοβάλτιο οδηγεί σε αποτελεσματική συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα. Συμπεραίνεται λοιπόν πως πιθανά λειτουργεί κάποιος μηχανισμός ρύθμισης της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα.

3.7.2 In vitro μελέτη της εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα σε διαπερατά κύτταρα HeLa

Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα και συγκεκριμένα για να αναγνωριστεί η υπεύθυνη για τη μεταφορά του ιμπορτίνη χρησιμοποιήθηκε ένα in vitro σύστημα κυττάρων HeLa, τα οποία κατεργάστηκαν με χαμηλή συγκέντρωση διγλιτονίνης που μετατρέπει σε διαπερατή την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη ενώ αφήνει ανέπαφη την πυρηνική. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκαν ανασυνδυασμένος GFP-HIF-1α, τα απαραίτητα συστατικά για την ανασύσταση του συστήματος εισόδου και ανασυνδυασμένες ιμπορτίνες. Άμεση παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε πως απουσία ιμπορτινών (**Εικ. 60α**) ο GFP-HIF-1α παρέμεινε στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων HeLa. Όταν στην αντίδραση προστέθηκε η ιμπορτίνη 7 ή το σύμπλοκο των ιμπορτινών β και 7 (**Εικ. 60γ & β**) ο HIF-1α εντοπίστηκε και στον πυρήνα. Μετακίνηση του HIF-1α στον πυρήνα παρατηρήθηκε επίσης παρουσία της ιμπορτίνης 4. Αντίθετα οι ιμπορτίνες 5, 9 και β δεν μετέφεραν τον HIF-1α στον πυρήνα (**Εικ. 60η, θ, ζ**).

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως όταν στο σύστημα προστέθηκε το σύμπλοκο των ιμπορτινών α και β, ο HIF-1α δεν εισήχθη στον πυρήνα αλλά ένα ισχυρό σήμα φθορισμού εντοπίστηκε γύρω από τον πυρήνα (**Εικ. 60ε**) υποδεικνύοντας πως πιθανά ο HIF-1α εγκλωβίζεται στους πόρους της πυρηνικής μεμβράνης μη μπορώντας να ολοκληρώσει επιτυχώς την είσοδο του.

Σαν θετικός μάρτυρας της λειτουργίας του συστήματος μεταφοράς χρησιμοποιήθηκε η Ibb-GFP πρωτεΐνη (Ibb: περιοχή της ιμπορτίνης α η οποία προσδένεται στην ιμπορτίνη β), η οποία μεταφέρθηκε στον πυρήνα από την ανασυνδυασμένη ιμπορτίνη β (**Εικ. 60ι**).



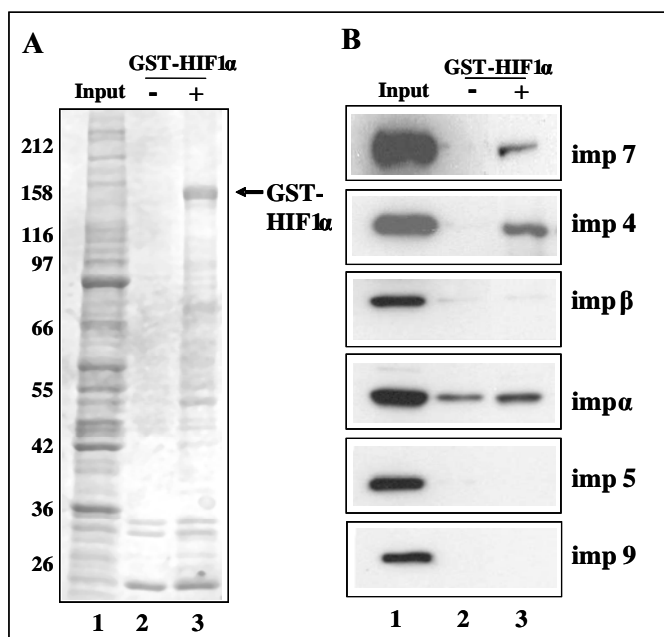
Εικόνα 60: Διαπερατά με διγτονίνη κύτταρα HeLa επωάστηκαν με 2 μM GFP-HIF-1 α χωρίς (α) ή με 2 μM των ιμφορτίνων β και 7 (β), της ιμφορτίνης 7 (γ), της ιμφορτίνης 4 (δ), των ιμφορτίνων β και α (ε), της ιμφορτίνης β (ζ), της ιμφορτίνης 5 (η) και της ιμφορτίνης 9 (θ). Η είσοδος της Ibb-GFP (0.5 μM) από την ιμφορτίνη β (2 μM) χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (ι).

3.7.3 Αλληλεπίδραση ιμφορτίνων με τον ανασυνδυασμένο HIF-1 α

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα του in vitro συστήματος εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα, ελέγχθηκε εάν οι παραπάνω ιμφορτίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον HIF-1 α in vitro. Για το σκοπό αυτό σφαιρίδια GSH-Sepharose που έφεραν ακινητοποιημένο GST-HIF-1 α (**Εικ. 61A**, διαδρ. 2 & 3) επωάστηκαν με κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (**Εικ. 61A**, διαδρ.1). Με ανοσοαποτύπωση (**Εικ. 61B**) δείχθηκε πως οι ενδογενείς ιμφορτίνες 7 και 4 του εκχυλίσματος των κυττάρων HeLa δεσμεύτηκαν σε σφαιρίδια που είχαν ακινητοποιημένο τον HIF-1 α (**Εικ. 61B**, διαδρ. 3) ενώ δεν ανιχνεύτηκαν στα σφαιρίδια χωρίς HIF-1 α (**Εικ. 61B**, διαδρ.2), μαρτυρώντας την ειδική αλληλεπίδραση των ιμφορτίνων αυτών με τον HIF-1 α . Όσον αφορά στις ιμφορτίνες β, 5 και 9 δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση με τον GST-HIF-1 α ενώ η ιμφορτίνη α δεσμεύτηκε μη ειδικά στη GSH-Sepharose.

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες ιμφορτίνες αντί για εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Για τη διεξαγωγή του πειράματος

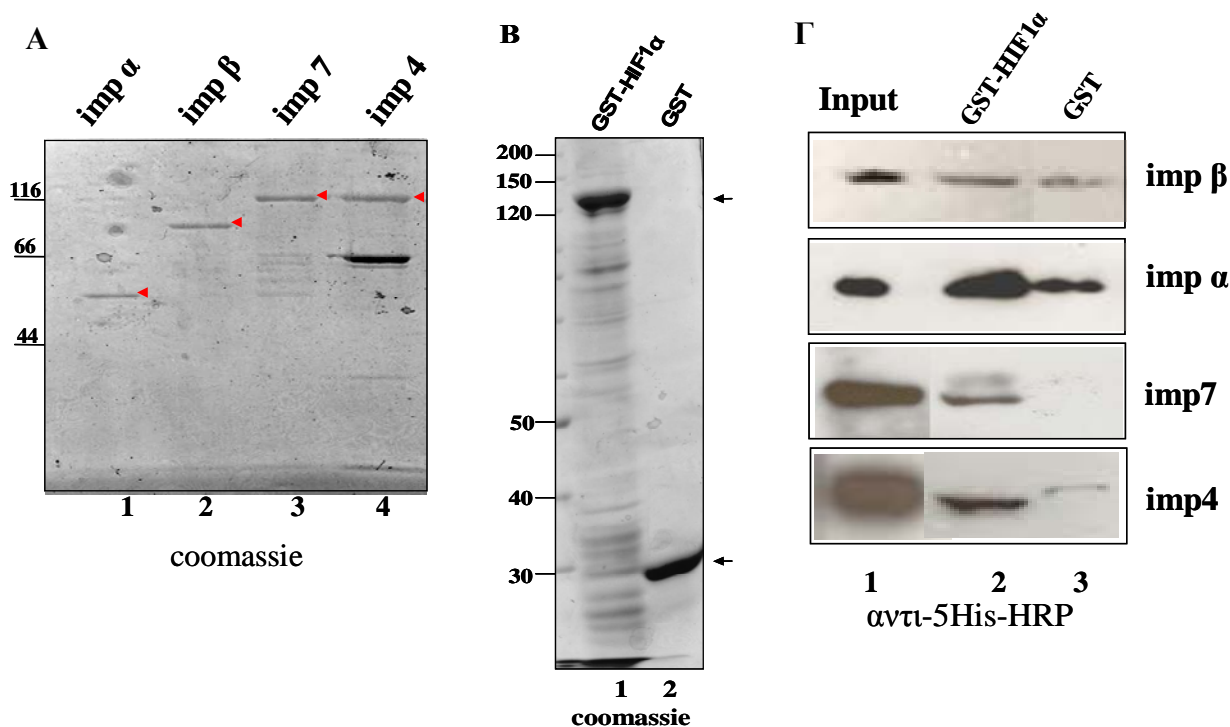
έγινε παραγωγή των ανασυνδυασμένων ιμπορτινών α , β , 4 και 7 χρησιμοποιώντας πλασμίδια με κλωνοποιημένα γονίδια των αντίστοιχων ιμπορτινών που παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του Dr.Görlich. Η απομόνωση έγινε μέσω των επιτόπων ιστιδινών που περιέχουν οι συγκεκριμένες ιμπορτίνες με τη βοήθεια στήλης Ni-NTA-Sepharose και στήλης μοριακής διήθησης σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα [103, 161-163] και οι ιμπορτίνες που παρήχθησαν με αυτή τη διαδικασία φαίνονται στην **Εικ. 62A**.



Εικόνα 61: Κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa επωάστηκε με σφαιρίδια GSH-Sepharose ή με σφαιρίδια GSH-Sepharose στα οποία είχε ακινητοποιηθεί ο GST-HIF1 α . Δείγμα (1/10) του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε (input) και οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια αναλύθηκαν με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie (A) ή ανοσοαποτύπωση (B) χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των ιμπορτινών 7, 4, β , α , 5, και 9.

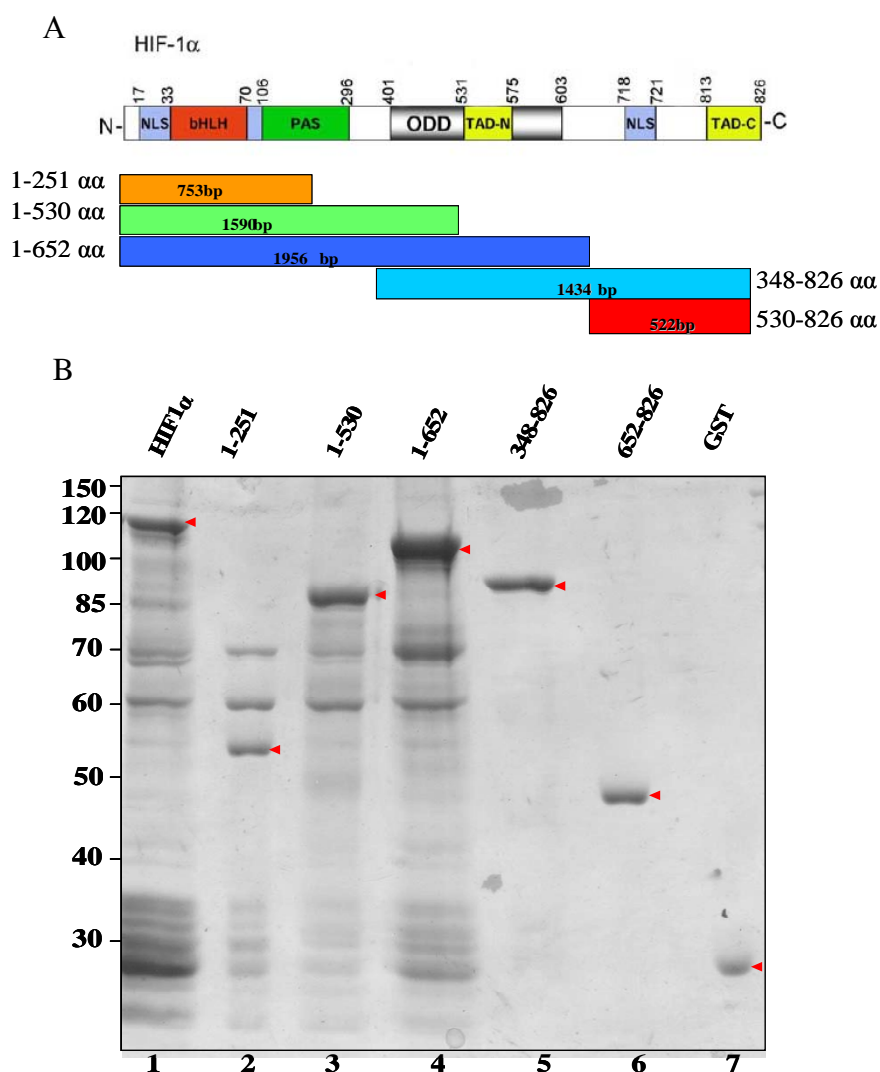
Ανασυνδυασμένη ιμπορτίνη 4 ή ιμπορτίνη 7 ή μίγμα των ανασυνδυασμένων ιμπορτινών α και β επωάστηκαν με σφαιρίδια GSH-Sepharose στα οποία είχε ακινητοποιηθεί ο GST-HIF-1 α (**Εικ. 62B**, διαδρ. 1) ή ίση ποσότητα GST (**Εικ. 62B** διαδρ. 2). Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών έδειξε πως οι ανασυνδυασμένες ιμπορτίνες α και β δεσμεύονται μη ειδικά στη GST ή στη GSH-Sepharose. Αντίθετα οι ιμπορτίνες 4 και 7 αλληλεπιδρούν ειδικά με τον GST-HIF-1 α αφού ανιχνεύονται μόνο στα σφαιρίδια που περιέχουν HIF-1 α (**Εικ.**

62Γ, διαδρ. 2 & 3). Η ιμπορτίνη 4 φαίνεται να δεσμεύεται και μη ειδικά αλλά σε περιορισμένο βαθμό.



Εικόνα 62: Ανάλυση των ανασυνδυασμένων ιμπορτινών (1 μ g) με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie (A). 5 μ g ανασυνδυασμένων ιμπορτινών επώαστηκαν με σφαιρίδια GST-Sephadex στα οποία είχε ακινητοποιηθεί GST-HIF-1α ή GST. Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie (B) ή ανοσοαποτύπωση (Γ) χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του His επιτόπου των ιμπορτινών. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

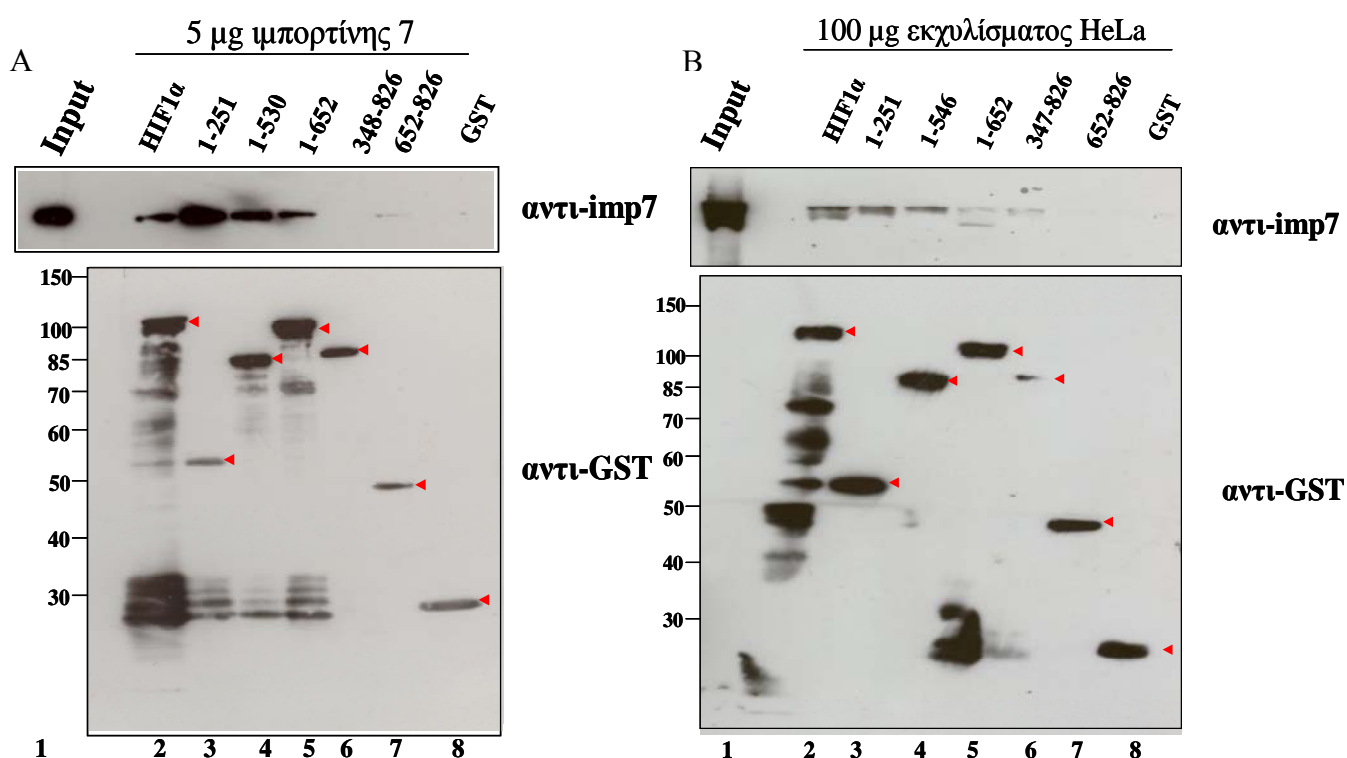
Προκειμένου να αναγνωριστεί η περιοχή του HIF-1α η οποία αλληλεπιδρά με τις ιμπορτίνες το παραπάνω πείραμα *in vitro* σύνδεσης επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας τμήματα του HIF-1α. Για την παραγωγή των αμινοτελικών τμημάτων έγινε κλωνοποίηση των αντίστοιχων περιοχών του cDNA του HIF-1α, από τους πλασμιδιακούς φορείς pBlueScript στους οποίους βρισκόταν, σε φορείς έκφρασης pGEX-4T1-Ten. Οι περιοχές του HIF-1α που εκφράστηκαν φαίνονται στην **Εικ. 63A**. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση των τμημάτων του HIF-1α μέσω στήλης GSH-Sephadex (**Εικ. 63B**). Τα τμήματα 348-826 και 652-826 κλωνοποιήθηκαν σε pGEX-4T1-Ten και απομονώθηκαν από τον Δρ. Η. Μυλωνή στο εργαστήριο Βιοχημείας.



Εικόνα 63: (Α) Σχηματική αναπαράσταση των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τμημάτων του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με τον HIF-1α πλήρους μεγέθους. (Β) Ανάλυση του απομονωμένου GST-HIF-1α (διαδρ. 1), των αμινοτελικών τμημάτων 1-251 (διαδρ. 2), 1-530 (διαδρ. 3), 1-652 (διαδρ. 4), των καρβοξυτελικών τμημάτων 348-826 (διαδρ. 5), 652-826 (διαδρ. 6) και της GST (διαδρ. 7) με SDS-PAGE και βαφή με Coomassie. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν στις θέσεις των μαρτύρων μοριακών βαρών (σε kDa).

Ανασυνδυασμένη ιμπορτίνη 7 (**Εικ. 64Α**) ή κυτταροπλασματικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa (**Εικ. 64Β**) επώαστηκαν με σφαιρίδια GSH-Sepharose στα οποία είχε ακινητοποιηθεί ο GST-HIF-1α (διαδρ. 2), τα τμήματα του HIF-1α (διαδρ. 3-7) ή GST πρωτεΐνη (διαδρ. 8) σε περίπου ισομοριακές ποσότητες. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών έδειξε πως τόσο η ανασυνδυασμένη όσο και η ενδογενής ιμπορτίνη 7 αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α (**Εικ. 64Α & Β**, διαδρ. 2) και με τα αμινοτελικά τμήματα του HIF-1α, ιδιαίτερα με τα

τμήματα 1-251 και 1-530 (**Εικ. 64A & B**, διαδρ. 3 & 4) και λιγότερο με το τμήμα 1-652 τουλάχιστον για την ενδογενή ιμπορτίνη 7 (**Εικ. 64B** διαδρ. 5). Αντίθετα η ιμπορτίνη 7 φαίνεται να μη συνδέεται στα καρβοξυτελικά τμήματα του HIF-1α ή στη GST (**Εικ. 64A & B**, διαδρ. 6-8). Συμπεραίνεται λοιπόν πως πιθανά στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α υπάρχει ένα NLS ειδικό για την ιμπορτίνη 7.



Εικόνα 64: 5 μg ανασυνδυασμένης ιμπορτίνης 7 (A) ή 100 μg κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος HeLa (B) επώαστηκαν με σφαιρίδια GSH-Sepharose στα οποία είχαν ακινητοποιηθεί ο GST-HIF-1α, τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα του και η GST σε ισομοριακές ποσότητες. Δείγμα (1/5) της ιμπορτίνης (A, διαδρ.1) και του εκχυλίσματος (B, διαδρ.1) που χρησιμοποιήθηκε καθώς και το κλάσμα των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών (διαδρ. 2-8) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της ιμπορτίνης 7 ή της GST.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έλλειψη οξυγόνου (υποξία) έχει σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργία των κυττάρων και θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση τους, κυρίως λόγω της αδυναμίας παραγωγής ATP. Κατά την υποξία τα κύτταρα αποκρίνονται αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες οδηγούν σε αύξηση της παροχής οξυγόνου στους ιστούς (π.χ. ερυθροποιητίνη, VEGF) ή στην ενίσχυση του αναερόβιου μεταβολισμού (π.χ. γλυκολυτικά ένζυμα), βοηθώντας έτσι το κύτταρο να διατηρήσει τη ομοιοστασία του [20, 68, 164]. Ο κυριότερος παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στην επαγωγή των γονιδίων που ρυθμίζονται από την υποξία είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες, τον ARNT και τον HIF-1α που είναι και η ρυθμιζόμενη από την υποξία πρωτεΐνη του συμπλόκου. Ο HIF-1α όμως επάγεται και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου υπό την επίδραση βαρέων μετάλλων, αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών κ.α (βλέπε αναφορές στη παράγραφο 1.3.2).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Αρχικά μελετήθηκε ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών (ΛΜΚΑ) σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Επίσης παρασκευάστηκε ανασυνδυασμένος HIF-1α πλήρους μεγέθους σε βακτήρια ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των μοριακών ιδιοτήτων του HIF-1α *in vitro*. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα διμερισμού του HIF-1α με τον ARNT και η ικανότητα σύνδεσης του συμπλόκου τους στο DNA. Τέλος, χρησιμοποιώντας τον ανασυνδυασμένο HIF-1α μελετήθηκε η φωσφορυλίωσή του από την p42-MAP κινάση καθώς και ο μηχανισμός πυρηνικής μεταφοράς του.

4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΕ ΛΜΚΑ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Τα ΛΜΚΑ επιλέχθηκαν για τη μελέτη του HIF-1α γιατί προέρχονται από το άνω αναπνευστικό που φυσιολογικά εκτίθεται άμεσα σε διακυμάνσεις της συγκέντρωσης οξυγόνου αλλά και σε τυχόν τοξικούς παράγοντες που πιθανόν βρίσκονται στον εισπνεόμενο αέρα. Το άνω αναπνευστικό αποτελεί σημείο ρύθμισης της ποσότητας του οξυγόνου που φτάνει στους πνεύμονες. Για την επίτευξη αυτής

της λειτουργίας το συγκεκριμένο σύστημα έχει αναπτύξει φυσιολογικούς μηχανισμούς για την απόκριση στην υποξία και σε άλλους στρεσογόνους παράγοντες. Ειδικότερα είναι γνωστό πως ήπια υποξία αποτελεί ερέθισμα επαγωγής του πολλαπλασιασμού των ΛΜΚΑ ενώ έντονη υποξία φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους [125].

Το μονοπάτι επαγωγής του HIF-1α έχει μελετηθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων. Είναι γνωστό πως ο HIF-1α επάγεται σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων αορτής από την υποξία ενώ φαίνεται πως σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας εκφράζεται και σε μη υποξικές συνθήκες [121]. Υπάρχουν επίσης αρκετές αναφορές για μη υποξική επαγωγή του HIF-1α από αγγειοτενσίνη, θρομβίνη, FGF2 και PDGF σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [51, 57, 165]. Παρόμοιες όμως μελέτες δεν έχουν διεξαχθεί σε ΛΜΚ του άνω αναπνευστικού.

Η εργασία αυτή ξεκίνησε με την καθιέρωση πρωτογενών καλλιιεργειών ΛΜΚΑ που απομονώθηκαν από τραχεία ενήλικου κουνελιού. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν δύο μορφολογικούς τύπους ανάλογα με τη σύσταση του μέσου καλλιέργειας. Συγκεκριμένα παρουσία ορού στο θρεπτικό μέσο τα κύτταρα παρουσιάζουν έναν «συνθετικό» φαινότυπο με κύρια χαρακτηριστικά την ικανότητα πολλαπλασιασμού, την απώλεια των συσταλτών ιδιοτήτων και της οργάνωση των ινιδίων του κυτταροσκελετού και το μη επίμηκες σχήμα των κυττάρων. Ο συνθετικός αυτός φαινότυπος των κυττάρων μπορεί να συγκριθεί με τον φαινότυπο που εμφανίζουν τα ΛΜΚΑ σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. άσθμα κ.λ.π.) [126]. Αφαιρώντας από τις καλλιέργειες τον ορό παρατηρείται αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων. Η αλλαγή αυτή είναι εμφανής σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων από την 2η μέρα απουσίας του ορού ενώ το ποσοστό των κυττάρων που υφίστανται διαφοροποίηση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου της στέρησης ορού (μέχρι και 10 μέρες). Τα διαφοροποιημένα κύτταρα είναι πιο επιμήκη ενώ χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν συσταλτές ικανότητες όμοιες με αυτές των ΛΜΚ ενός φυσιολογικού ιστού και αυξημένα ποσά συσταλτών πρωτεϊνών όπως η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (MHC), η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), η SM-B κ.α. [128]. Η προσθήκη ορού στις καλλιέργειες διαφοροποιημένων ΛΜΚΑ φαίνεται να προκαλεί την άμεση επαναφορά των κυττάρων στο συνθετικό φαινότυπο.

Αρχικά παρατηρήθηκε πως οι πρωτογενείς καλλιέργειες των ΛΜΚΑ αποκρίνονται σε υποξία (1% O₂) επάγοντας τον HIF-1α. Επιπλέον τα κύτταρα τόσο

του συνθετικού όσο και του διαφοροποιημένου φαινοτύπου εμφάνισαν υψηλά επίπεδα HIF-1α μετά από επώαση τους με κοβάλτιο. Η επαγωγή που προκλήθηκε από το κοβάλτιο στους δύο τύπους ΛΚΜΑ ήταν ταχύτατη εμφανίζοντας μέγιστο στις 4 ώρες.

Η βασική θεωρία που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με την επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο είναι πως το κοβάλτιο ως δισθενές μέταλλο προκαλεί παρεμπόδιση της δράσης των πρόλυλο-υδροξυλασών λόγω του ανταγωνισμού του με το Fe^{+2} για τις θέσεις πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο των συγκεκριμένων ενζύμων [6, 166]. Για το λόγο αυτό το κοβάλτιο χαρακτηρίζεται και ως μιμητής της υποξίας αφού θεωρείται πως προκαλεί την αναστολή της αποικοδόμησης του HIF-1α [27, 153]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως το κοβάλτιο πιθανόν να έχει και άλλους ρόλους εκτός της αναστολής των πρόλυλο-υδροξυλασών. Έχει δειχθεί πως το κοβάλτιο αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α. Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει τη σύνδεση του HIF-1α με τον VHL οδηγώντας έτσι στη σταθεροποίηση του [49]. Ο ακριβής λοιπόν ρόλος του στην επαγωγή του HIF-1α δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Επειδή το κοβάλτιο παίζει ρόλο στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος αφού ενέχεται σε ασθένειες όπως το άσθμα σε εργασιακούς χώρους [167], μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο το κοβάλτιο επάγει τον HIF-1α στο σύστημα των ΛΜΚΑ.

Τα αποτελέσματα στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ δείχνουν πως το κοβάλτιο δεν έχει κάποια ξεχωριστή δράση από αυτή του DMOG (αναστολέας των πρόλυλο-υδροξυλασών) ή του MG132 (αναστολέας του πρωτεοσώματος). Αυτό σημαίνει πως το κοβάλτιο δεν ενισχύει την επαγωγή του HIF-1α που προκαλείται από τους δυο γνωστούς σταθεροποιητές του. Επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεί και το γεγονός πως το πρότυπο αποικοδόμησης του HIF-1α παρουσία κοβαλτίου είναι παρόμοιο με αυτό που προκαλεί το DMOG. Παρόλο που τόσο το κοβάλτιο όσο και το DMOG φαίνεται να δρουν στη σταθεροποίηση του HIF-1α πειράματα μέτρησης δράσης λουσιφεράσης δείχνουν πως το DMOG αυξάνει τη δράση του HIF-1α 6 φορές περισσότερο από ότι το κοβάλτιο. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση πως το DMOG γενικά οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του HIF-1α, διότι πιθανά δρα αποτελεσματικότερα ως αναστολέας των πρόλυλο-υδροξυλασών αλλά και της υδροξυλάσης της ασπαραγίνης (FIH1) που ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

Αντίθετα, στα ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου παρατηρήθηκε πως το κοβάλτιο δεν προκαλεί αλλαγή του ρυθμού αποικοδόμησης του HIF-1α υποδηλώνοντας πως το κοβάλτιο παρουσία ορού πιθανόν δρα με διαφορετικό μηχανισμό από αυτόν της σταθεροποίησης της πρωτεΐνης που παρατηρήθηκε στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός πιθανόν εμπλέκει την ενεργοποίηση της σύνθεσης του HIF-1α.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η υπόθεση χρησιμοποιήθηκε η ακτινομυκίνη η οποία αναστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων. Βρέθηκε πως η ακτινομυκίνη δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα επαγωγής του HIF-1α που προκαλούνται από το κοβάλτιο τόσο στα διαφοροποιημένα όσο και στα συνθετικού φαινοτύπου κύτταρα υποδεικνύοντας πως για την επαγωγή του HIF-1α από κοβάλτιο στο συγκεκριμένο σύστημα κυττάρων δεν απαιτείται η σύνθεση νέου mRNA του.

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας αναστολείς του μονοπατιού της PI-3K όπως η βορταμανίνη, η ραπαμυκίνη και το LY294002 δείχθηκε πως το συγκεκριμένο μονοπάτι εμπλέκεται στην επαγωγή του HIF-1α από κοβάλτιο στα κύτταρα συνθετικού φαινοτύπου ή σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ στα οποία επαναπροστέθηκε μαζί με το κοβάλτιο και ορός. Επειδή το μονοπάτι της PI-3K είναι γνωστό πως ρυθμίζει τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α [168] θεωρήθηκε πως η παρατηρούμενη επαγωγή του HIF-1α από το κοβάλτιο στις παραπάνω περιπτώσεις οφείλεται σε αύξηση της μετάφρασής του. Συγκεκριμένα η PI-3K δρα δίνοντας ένα σήμα για την ενεργοποίηση της μετάφρασης. Το σήμα αυτό είναι η φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης 4E-BP1, οι οποίες εν συνεχεία προκαλούν τη αύξηση του ρυθμού μετάφρασης [170]. Μια τέτοια υπόθεση περί επαγωγής του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας μέσω αύξησης της μετάφρασης του mRNA του έχει προταθεί από άλλους ερευνητές για διάφορους βιολογικούς παράγοντες όπως η αγγειοτενσίνη II στα αγγειακά λεία μυϊκά [57] ή η οξειδωμένη LDL (Low Density Lipoprotein) στα μακροφάγα [169]. Στην επαγωγή του HIF-1α από κοβάλτιο φαίνεται να εμπλέκονται και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) αφού κατεργασία ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου με το αντιοξειδωτικό NAC οδηγεί σε αναστολή της αύξησης των επιπέδων του HIF-1α από το CoCl_2 . Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από πρόσφατες μελέτες που δείχνουν πως δέσμευση των ROS από το NAC αναστέλλει την επαγωγή του HIF-1α [169, 171]. Υπάρχουν επιπλέον αναφορές οι οποίες συνδέουν την επαγωγή του HIF-1α με τα ROS και το μονοπάτι της PI-3K [66, 172]. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό η ύπαρξη ενεργών ριζών οξυγόνου ή η

παραγωγή τους από το κοβάλτιο να είναι απαραίτητη για τη δράση του μονοπατιού της PI-3K και την επικείμενη επαγωγή του HIF-1α από κοβάλτιο στα ΛΜΚΑ με συνθετικό φαινότυπο.

Εκτός από τα ROS, στα κύτταρα συνθετικού φαινοτύπου βρέθηκε πως στην επαγωγή του HIF-1α εμπλέκεται και το NO. Πιο συγκεκριμέναδείχθηκε πως το SNP προκαλεί αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από το κοβάλτιο. Ο συγκεκριμένος δότης NO θεωρείται πως κατά την έκλυση NO παράγει παραπροϊόντα όπως κυάνιο, τα οποία μπορεί να είναι τοξικά για το κύτταρο και την παραγωγή HIF-1α ειδικότερα [100]. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ένας δεύτερος δότης NO, το DETA-NO το οποίο δεν εμφανίζει τα παραπάνω παραπροϊόντα. Το DETA-NO οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του HIF-1α η οποία όμως ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία του κοβαλτίου. Τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα συναντώνται και σε άλλες μελέτες σχετικά με το ρόλο του NO στην παραγωγή του HIF-1α. Κάποιες μελέτες δείχνουν πως δότες NO εμποδίζουν την επαγωγή του HIF-1α [158, 159] ενώ άλλες [160, 173, 174] υποστηρίζουν πως η επαγωγή του HIF-1α υποβοηθείται από το NO. Σε δυο πρόσφατες δημοσιεύσειςδείχθηκε πως χαμηλές συγκεντρώσεις NO προκαλούν αποικοδόμηση του επαγόμενου από την υποξία HIF-1α, εξαιτίας της αναστολής της μιτοχονδριακής αναπνοής και της ανακατανομής του O₂ στο κυτταρόπλασμα [100, 175]. Αντίθετα υψηλές συγκεντρώσεις NO σταθεροποιούν τον HIF-1α τόσο σε νορμοξία όσο και σε υποξία με διαφορετικό όμως μηχανισμό που φαίνεται να μην εμπλέκει το μηχανισμό της μιτοχονδριακής αναπνοής [100]. Φαίνεται λοιπόν πως η δράση του NO στα κύτταρα πιθανόν ενέχει διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς και εξαρτάται τόσο από το είδος του δότη όσο και από τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης του μηχανισμού επαγωγής στο σύστημα των ΛΜΚΑ παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικ. 65**. Το κοβάλτιο στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ φαίνεται να προκαλεί σταθεροποίηση του HIF-1α πιθανόν μέσω της αναστολής της δράσης των προλυλο-υδροξυλασών του. Αντίθετα στα συνθετικά ΛΜΚΑ το κοβάλτιο φαίνεται να δρα κυρίως επάγοντας τη μετάφραση του HIF-1α μέσω του PI-3K μονοπατιού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ένα νέο πιθανό μηχανισμό του κοβαλτίου στην επαγωγή του HIF-1α, τουλάχιστον στην περίπτωση των ΛΜΚΑ, ο οποίος εμπλέκει την σύνθεση του HIF-1α. Η δράση αυτού του μηχανισμού φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία ορού στο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας και κατά συνέπεια από την κατάσταση διαφοροποίησης των

κυττάρων. Όμοιος φαίνεται να είναι και ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ από τη συνδυασμένη δράση κοβαλτίου και ορού. Συνεπώς κάποια συστατικά του ορού οδηγούν στην ενεργοποίηση παραγόντων ή μονοπατιών του κυττάρου που επιτρέπουν στο κοβάλτιο να χρησιμοποιήσει το δρόμο της PI-3K και να αυξήσει μέσω αυτού τα επίπεδα του HIF-1α. Όσον αφορά στο ίδιο το μονοπάτι της PI-3K, δείχθηκε πως είναι ως ένα βαθμό ενεργό στα κύτταρα κατά τη στέρηση ορού. Κατά την προσθήκη όμως του ορού στο μέσο καλλιέργειας το μονοπάτι ενεργοποιείται περαιτέρω. Είναι λοιπόν πιθανόν ο βαθμός ενεργοποίησης του PI-3K μονοπατιού να καθορίζει και τον κύριο τρόπο δράσης του κοβαλτίου.

Όταν σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων ΛΜΚΑ επαναπροσθεθεί ο ορός, τα κύτταρα μεταπίπτουν μορφολογικά στο συνθετικό φαινότυπο. Εκτός αυτούδείχθηκε πως η προσθήκη ορού έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α. Η επαγωγή του HIF-1α από ορό έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα [51, 57]. Με πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότηταςδείχθηκε πως ο HIF-1α που επάγεται από τον ορό είναι λιγότερο μεταγραφικά ενεργός σε σχέση με αυτόν που επάγεται από το κοβάλτιο ή το DMOG. Αυτό πιθανά συμβαίνει διότι αν και τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται από τον ορό η FIH-1 συνεχίζει να είναι ενεργή οδηγώντας έτσι σε αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας.

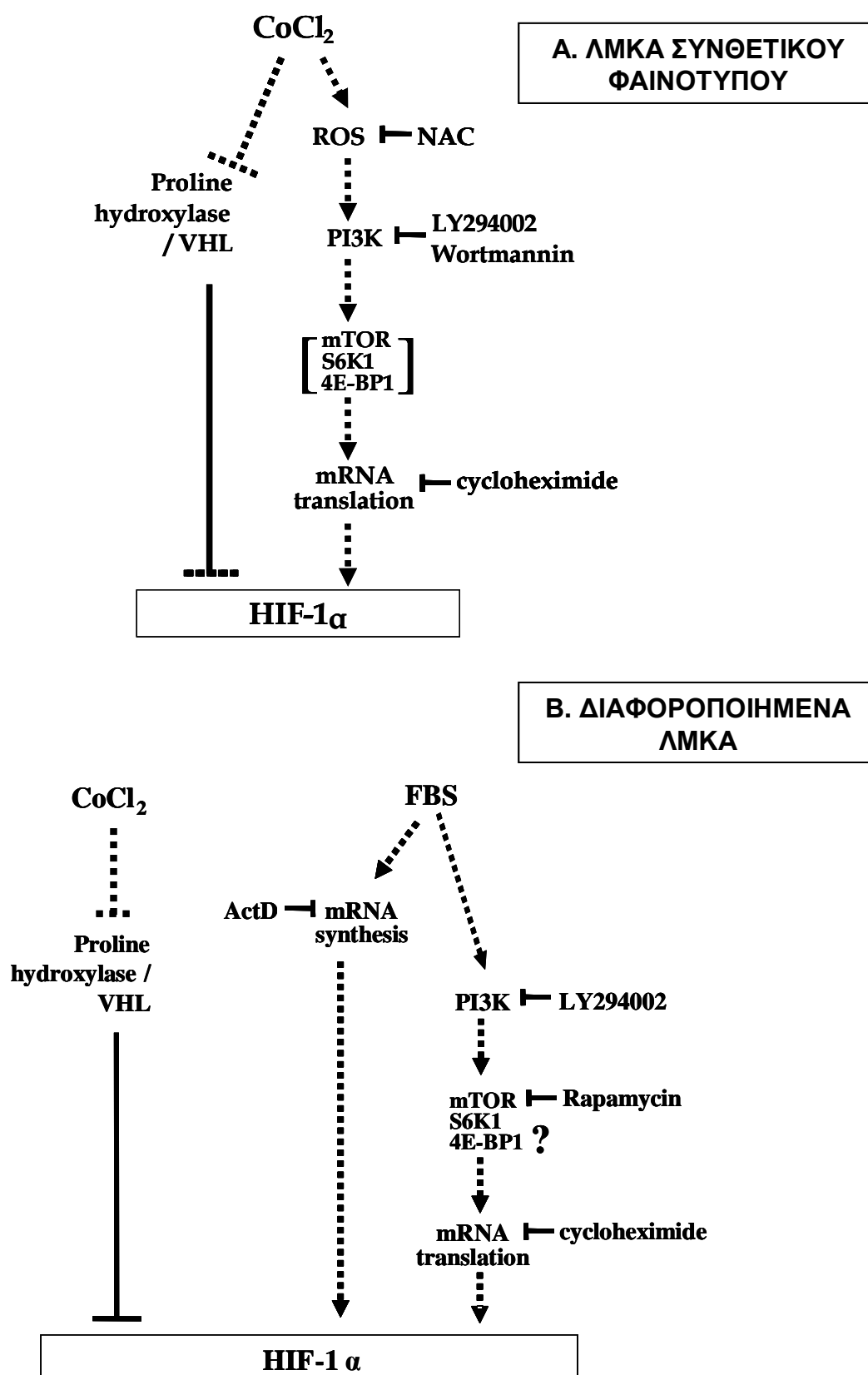
Μελετώντας το πρότυπο επαγωγής του HIF-1α βρέθηκε πως όταν ο ορός προσθεθεί σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ παράλληλα με το DMOG, το MG132 ή το κοβάλτιο ενισχύει την επαγωγή του HIF-1α υποδεικνύοντας πως ο ρόλος του στην επαγωγή του HIF-1α είναι ξεχωριστός από αυτόν των παραπάνω παραγόντων. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και με πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας όπου φαίνεται πως η προσθήκη ορού δρά συνεργιστικά και όχι αθροιστικά οδηγώντας σε περαιτέρω αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από αυτή που εμφανίζεται παρουσία του κοβαλτίου ή του DMOG. Επιπλέον με αναστολή της παραγωγής νέων πρωτεϊνών από το κυκλοεξιμίδιο βρέθηκε πως η παρουσία ορού δεν επιδρά στο ρυθμό αποικοδόμησης του HIF-1α, συνεπώς δεν προκαλεί τη σταθεροποίηση του σε αντίθεση με το DMOG ή το κοβάλτιο.

Η αναστολή της επαγωγής του HIF-1α από τον ορό παρουσία LY294002 και ραπαμυκίνης υποδεικνύουν την άμεση εμπλοκή του μονοπατιού της PI-3K στην αύξηση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α. Πιθανόν η προσθήκη ορού στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ οδηγεί σε αύξηση της μετάφρασης του mRNA η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση του HIF-1α.

Μελέτες που αφορούν την επαγωγή του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες αλλά και από τον ορό έχουν δείξει την εμπλοκή του μονοπατιού των MAP κινασών στην επαγωγή αυτή [61]. Όμως αντίθετα με ότι ήταν αναμενόμενο, η χρήση του αναστολέα PD98059 σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ δεν είχε καμία επίδραση στην επαγωγή του HIF-1α από τον ορό. Παρόλα αυτά επειδή η αναστολή της ενεργοποίησης των MAPK δεν ήταν πλήρης, τα πειράματα με το PD98059 δεν μπορούν να οδηγήσουν σε τελικά συμπεράσματα. Είναι επίσης πιθανό το μονοπάτι των MAPK να επιδρά στον HIF-1α με κάποιον άλλο μηχανισμό όπως για παράδειγμα μέσω αύξησης της μεταγραφικής του ενεργότητας κάτι το οποίο έχει αναφερθεί στο παρελθόν από πολλούς ερευνητές [56, 84, 176].

Έχοντας ισχυρές ενδείξεις για την αύξηση της σύνθεσης του HIF-1α από τον ορό ελέγχθηκε αν για την επαγωγή του HIF-1α απαιτείται η ενεργή μεταγραφή. Η χρήση της ακτινομυκίνης στα διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ εμποδίζει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α από τον ορό. Πιθανά λοιπόν ο ορός δρα στη σύνθεση του HIF-1α όχι μόνο ενεργοποιώντας τη μετάφραση του mRNA του μέσω της PI-3K αλλά και αυξάνοντας την μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α.

Συνοψίζοντας ο ορός επιδρά στο ρυθμό μεταγραφής και μετάφρασης του HIF-1α ενεργοποιώντας μονοπάτια όπως αυτό της PI-3K (**Εικ. 65B**). Άρα η δράση του ορού είναι εν μέρει παρόμοια με αυτή του κοβαλτίου όταν το κοβάλτιο επιδρά σε ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου. Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι ποια είναι τα συστατικά του ορού τα οποία προκαλούν την παρατηρούμενη επαγωγή του HIF-1α. Ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στον ορό όπως η αγγειοτενσίνη, η ινσουλίνη, η ιντερλευκίνη-1, η θρομβίνη, ο FGF-2 και ο PDGF επάγουν τον HIF-1α σε ΛΜΚ αγγείων [51, 57, 154, 155, 177]. Ένας μελλοντικός ίσως στόχος έρευνας είναι η διερεύνηση της ύπαρξης συσχετισμού μεταξύ του επαγόμενου από τον ορό HIF-1α με το μηχανισμό διαφοροποίησης που χρησιμοποιούν τα ΛΜΚΑ είτε αυτός αναφέρεται σε αλλαγή της οργάνωσης του κυτταροσκελετού ή στη διαφορική έκφραση γονιδίων. Ήδη υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τον HIF-1α με παράγοντες που ενέχονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού όπως η cdc42, η Rac1 και η RhoA [178, 179]. Εκτός αυτού η περαιτέρω ανάλυση των παραγόντων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην επαγωγή του HIF-1α από τον ορό είναι πολύ πιθανό να αποκαλύψει τα μεμονωμένα συστατικά του ορού που ευθύνονται για την επαγωγή του HIF1α στο σύστημα των ΛΜΚΑ.



Εικόνα 65: Σχηματικά μοντέλα των πιθανών μηχανισμών της επαγωγής του HIF-1α από CoCl_2 και ορό σε συνθετικά (A) και διαφοροποιημένα (B) ΛΜΚ.

4.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIF-1α

Ο HIF-1α υπόκειται σε μια σειρά μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων οι οποίες περιλαμβάνουν υδροξυλίωση, ακετυλίωση, σουμυλίωση, φωσφορυλίωση και S-νιτροζυλίωση. Οι τροποποιήσεις αυτές συμβαίνουν στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α όπου εδράζονται η ODD περιοχή και οι δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD and C-TAD) [74]. Οι μέχρι τώρα μελέτες για την ανάλυση της δομής και λειτουργίας του HIF-1α έχουν γίνει χρησιμοποιώντας κυρίως ανασυνδυασμένα ή *in vitro* συντιθέμενα τμήματα του HIF-1α ή χίμαιρες τους με γονίδια αναφοράς και όχι με ολόκληρο HIF-1α. Έτσι δεν ήταν γνωστό, για παράδειγμα, αν η ODD και οι περιοχές ενεργοποίησης ή οι τροποποιήσεις τους επιδρούν στη λειτουργία του αμινοτελικού τμήματος του HIF-1α το οποίο περιέχει τις περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA. Δεν είναι δηλαδή γνωστό κατά πόσο τα διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης της δράσης του HIF-1α, όπως οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, η μεταφορά του στον πυρήνα, ο ετεροδιμερισμός του με τον ARNT και η σύνδεση με το DNA και τους συμπαράγοντες μεταγραφής συνδέονται μεταξύ τους ή αλληλοεξαρτώνται.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την μελέτη των παραπάνω αποτελεί η διαθεσιμότητα πλήρους μεγέθους HIF-1α. Για αυτό το λόγο η μελέτη αυτή ουσιαστικά ξεκίνησε με την προσπάθεια παραγωγής ανθρώπινου HIF-1α από βακτήρια. Η παραγωγή HIF-1α από βακτήρια προσφέρει ένα επιπλέον πλεονέκτημα γιατί η απουσία των ευκαρυωτικών ενζύμων στα βακτήρια επιτρέπει τη δημιουργία μη τροποποιημένου HIF-1α, κατάλληλου για την *in vitro* μελέτη της επίδρασης των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στη λειτουργία του.

Πρέπει να σημειωθεί πως είναι η πρώτη φορά που επιχειρήθηκε η παραγωγή ανασυνδυασμένου πλήρους HIF-1α σε βακτήρια. Το cDNA του HIF-1α κλωνοποιήθηκε σε μια σειρά πλασμιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για διαφορετικούς επιτόπους, επιτρέποντας την απομόνωση των χμιαϊκών πρωτεϊνών μέσω χρωματογραφίας αχιστείας. Κάποιες από τις πλασμιδιακές κατασκευές εμφάνισαν προβλήματα στην προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης. Τα προβλήματα που εντοπίστηκαν ήταν η έκφραση μικρών και μη ικανοποιητικών ποσοτήτων του HIF-1α, η δημιουργία αδιάλυτης πρωτεΐνης κατά την έκφραση καθώς και η εμφάνιση έντονης αποικοδόμησης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Οι δυσκολίες















στην έκφραση αποδίδονται στο μεγάλο μοριακό βάρος του ανασυνδυασμένου HIF-1α (περίπου 91 kDa). Είναι επίσης γνωστό πως η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε *E.coli* μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία εγκλειστών (inclusion bodies) στα κύτταρα στα οποία περιέχεται η αδιάλυτη πρωτεΐνη. Η έντονη πρωτεόλυση οφείλεται πιθανόν στην αναγνώριση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του HIF-1α από ενδογενείς πρωτεάσες των βακτηρίων. Κατά τις προσπάθειες έκφρασης παρατηρήθηκε πως το αμινοτελικό κυρίως άκρο του HIF-1α είναι ευαίσθητο στην αποικοδόμηση. Ικανοποιητικές ποσότητες HIF-1α εκφράστηκαν και απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας τις κατασκευές GST-HIF-1α και H₁₀-GFP-HIF-1α στις οποίες η ύπαρξη ενός ογκώδους επιτόπου όπως η GST ή η GFP στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α φαίνεται πως προστατεύει την πρωτεΐνη από πρωτεόλυση και αυξάνει την διαλυτότητα της.









Εκτός από τον HIF-1α επιτεύχθηκε και η παραγωγή ανασυνδυασμένου πλήρους ARNT καθώς και τμημάτων των δυο πρωτεϊνών που περιείχαν μόνο τις περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA (bHLH-PAS_A ή bHLH-PAS_{AB}). Στην περίπτωση του ARNT και πάλι η πρωτεόλυση ήταν έντονη με αποτέλεσμα την ανάκτηση τελικά ενός μικρού ποσού ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πλήρους μεγέθους. Παρά τα προβλήματα, οι μικρές ποσότητες διαλυτών πρωτεϊνών που εκφράστηκαν στα βακτήρια ήταν ικανές για την απομόνωση των πρωτεϊνών σε κλίμακα μικρογραμμαρίων, μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας και σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Αυτό έδωσε τη δυνατότητα να εξεταστεί καταρχάς αν αυτές οι βακτηριακής προέλευσης πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και με το DNA.

Με πειράματα αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA) βρέθηκε πως ο ανασυνδυασμένος HIF-1α ή ο ARNT από μόνοι τους δεν μπορούν να συνδεθούν στο HRE, γεγονός αναμενόμενο αφού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο HIF-1α για να είναι λειτουργικός και ικανός για σύνδεση στο DNA πρέπει να ετεροδιμεριστεί πρώτα με τον ARNT [180]. Για να διαπιστωθεί εάν η μη τροποποιημένη μορφή του HIF-1α που παράγεται σε βακτήρια μπορεί να ανασυσταθεί σε ένα λειτουργικό HIF-1 σύμπλοκο *in vitro* ελέγχθηκε η ικανότητα διμερισμού του με τον ARNT. Προκαταρκτικά πειράματα στα οποία έγινε *in vitro* επώαση των δυο πρωτεϊνών και ανοσοκατακρήμνιση του HIF-1α έδειξαν πως δεν δημιουργείται σταθερό σύμπλοκο μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Παράλληλα, πειράματα EMSA έδειξαν τη δημιουργία ελάχιστου και σχεδόν μη ανιχνεύσιμου

συμπλόκου με το DNA παρουσία των δύο υπομονάδων πλήρους μεγέθους. Όταν στα ίδια πειράματα επώαστηκαν *in vitro* τα τμήματα των HIF-1α και ARNT που περιέχουν μόνο τις bHLH-PAS_A περιοχές, πάλι η δημιουργία συμπλόκου με το DNA ήταν πολύ ασθενής, γεγονός που πρόσφατα αναφέρθηκε και στη βιβλιογραφία [32]. Τέλος για να βρεθεί αν το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α παίζει κάποιο ρόλο στο διμερισμό και τη σύνδεση στο DNA δοκιμάστηκε στην ίδια σειρά πειραμάτων *in vitro* επώαση ολόκληρου του HIF-1α με την PAS_A περιοχή του ARNT και δεν εμφανίστηκε σύνδεση στο DNA. Μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα και το τμήμα του ARNT που περιλαμβάνει τη bHLH-PAS_{AB} περιοχή εμφανίστηκε μια ασθενική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το DNA. Αυτό δείχνει πως η PAS_B περιοχή του ARNT πιθανόν ενισχύει σε κάποιο βαθμό τον *in vitro* διμερισμό με τον HIF-1α και τη σύνδεση στο DNA. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται συνοπτικά στον **Πιν. 7**. Το γεγονός πως ο HIF-1α, ο οποίος εκφράστηκε στα βακτήρια δεν ήταν ικανός για ικανοποιητική *in vitro* σύνδεση με τον ARNT και το DNA έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν πως υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ του ARNT και του HIF-1α πλήρους μεγέθους οι οποίοι παρήχθησαν με *in vitro* μετάφραση σε εκχυλίσματα δικτυοκυττάρων [28-30]. Εδώ όμως πρέπει να σημειωθεί πως ο HIF-1α ο οποίος συντίθεται *de novo* σε εκχυλίσματα δικτυοκυττάρων συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη-συνοδό Hsp90 και η σύνδεση αυτή είναι κρίσιμη για τον διμερισμό του με τον ARNT και τη δημιουργία ενός συμπλόκου HIF-1α-ARNT με το DNA [29, 181]. Είναι λοιπόν πιθανό ο HIF-1α που παράγεται σε βακτήρια, απουσία της ομόλογης Hsp90, να αναδιπλώνεται λανθασμένα σε μια τελική διαμόρφωση η οποία δεν είναι ευνοϊκή για διμερισμό ή σύνδεση στο DNA.

Η δημιουργία της μη ευνοϊκής αναδίπλωσης του HIF-1α αποφεύχθηκε με την ταυτόχρονη έκφραση του ARNT στο ίδιο κύτταρο. Όπως αποδείχθηκε, οι ανασυνδυασμένες αυτές πρωτεΐνες μπορούν να ετεροδιμεριστούν κατά τη σύνθεση τους μέσα στο βακτηριακό κύτταρο σχηματίζοντας σταθερά συμπλόκα. Με πειράματα EMSAδείχθηκε πως το σύμπλοκο HIF-1α/ARNT πλήρους μεγέθους καθώς και το σύμπλοκο των bHLH-PAS_A περιοχών (HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A) έχει την ικανότητα να δεσμεύεται ειδικά στο DNA (**Πιν. 7**). Ενδεχομένως η ταυτόχρονη σύνθεση του HIF-1α και του ARNT στο ίδιο κύτταρο επιτρέπει στις δύο αρτιγενείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, αποκτώντας έτσι στερεοδιαμόρφωση που επιτρέπει τη δημιουργία συμπλόκου με κατάλληλη δομή

ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟ DNA
 + 	-/+
 + 	+
 + 	-
 + 	-/+
 + 	-
 + 	-/+
 + 	-/+

ΣΥΜΠΛΟΚΑ	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟ DNA
 	+++
 	-
 	-
 	+++

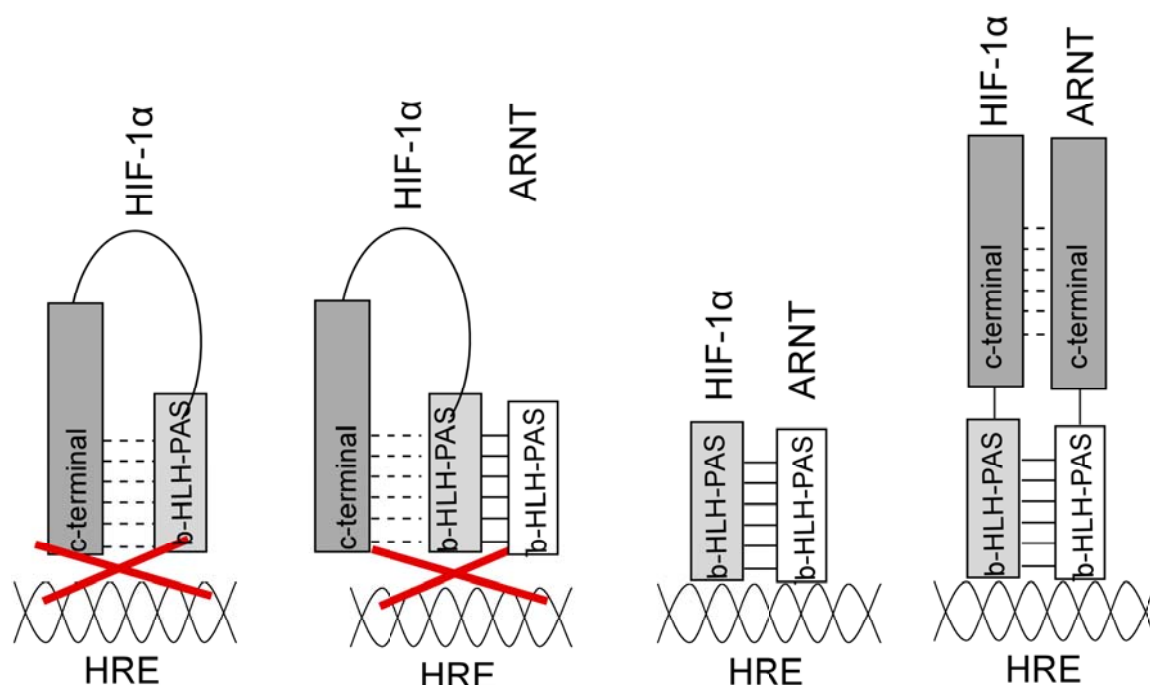
Πίνακας 7: Απεικονίζονται τα μίγματα των μεμονωμένων πρωτεϊνών ή τα απομονωμένα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία αλλαγής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA) και ο βαθμός αλληλεπίδρασης τους με το DNA (HRE του γονιδίου της EPO). - καθόλου δράση, + ασθενική αλληλεπίδραση, +++ δυνατή αλληλεπίδραση

για σύνδεση στο DNA. Ο ARNT έχει όντως δειχθεί πως επάγει αλλαγές διαμόρφωσης στον HIF-1α [29]. Επίσης η σύζευξη της αναδίπλωσης με τη σύνδεση στο DNA έχει δειχθεί για πολλές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το DNA [182] αλλά και για τις ODD και CAD περιοχές του HIF-1α [183]. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν πως υπομονάδες μεταγραφικών παραγόντων όπως ο ARNT, ο AhR (aryl-hydrocarbon receptor) και ο AhRR (AhR repressor), οι οποίοι περιέχουν bHLH-PAS περιοχές, ετεροδιμερίζονται δημιουργώντας σύμπλοκο ικανό να συνδέεται στο DNA μόνο όταν συνεκφράζονται στα ίδια κύτταρα *E.coli* [32, 184].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως σε αντίστοιχα EMSA πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα σύμπλοκα μεταξύ πλήρους HIF-1α και των PAS_A επικρατειών του ARNT (GST-HIF-1α/ARNT-PAS_A και GFP-HIF-1α/ARNT-PAS_A) δεν παρατηρήθηκε σύνδεση στο DNA. Το γεγονός αυτό ήταν αρκετά περίεργο διότι οι δυο πρωτεΐνες HIF-1α και ARNT-PAS_A (αμινοξέα 1-362) μπορούν να ετεροδιμεριστούν μεταξύ τους και να απομονωθούν ως σύμπλοκο μετά από συνέκφραση σε βακτήρια. Υπάρχει όμως μια βιβλιογραφική αναφορά που επισημαίνει πως αν και μικρότερα αμινοτελικά κομμάτια του ARNT (αμινοξέα 1-140 και 1-407) μπορούν να ετεροδιμεριστούν με τον πλήρους μεγέθους HIF-1α, που παρασκευάστηκε με *in vitro* μετάφραση, δεν είναι ικανά να προκαλέσουν αλλαγή διαμόρφωσης στο μόριο του HIF-1α. Έτσι δεν δημιουργείται σύμπλοκο ικανό για σύνδεση στο DNA, υποδεικνύοντας πως ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρβοξυτελικών περιοχών των δυο υπομονάδων πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην τελική στερεοδιαμόρφωση του HIF-1α όσο και στην ικανότητα σύνδεσης του HIF-1 στο DNA [29]. Στην περίπτωση όμως που απουσιάζουν οι καρβοξυτελικές περιοχές και των δύο υπομονάδων, όπως στο σύμπλοκο HIF-1α-PAS_A/ARNT-PAS_A, η δέσμευση στο DNA δεν επηρεάζεται. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει πως η καρβοξυτελική περιοχή του HIF-1α επηρεάζει αρνητικά τη δέσμευση στο DNA, εφόσον απουσιάζει η αντίστοιχη καρβοξυτελική περιοχή του ARNT. Η υπόθεση αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικ. 66** και είναι δυνατόν να αποτελεί ένα μηχανισμό που αποτρέπει την κατάληψη των HRE από μη πλήρως λειτουργικές μορφές του HIF-1 ή των υπομονάδων του.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα από τα πειράματα συνέκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια και σύνδεσης στο DNA αποδεικνύεται πως είναι δυνατός ο σχηματισμός ικανού να συνδεθεί στο DNA HIF-1 πλήρους μεγέθους από την συνέκφραση των υπομονάδων του (HIF-1α/ARNT) σε βακτήρια. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α, που συμβαίνουν στα ανθρώπινα κύτταρα δεν είναι απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT, ούτε για τη σύνδεση του στο DNA. Πιθανόν οι τροποποιήσεις αυτές να απαιτούνται για τον έλεγχο της ενεργότητας του HIF-1 ή για τη ρύθμιση άλλων διεργασιών στο μονοπάτι του HIF-1 όπως η αλληλεπίδραση του με το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό ή άλλους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Η διαθεσιμότητα λειτουργικού HIF-1 συμπλόκου από βακτήρια κρίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη για την περαιτέρω ανάλυση των μοριακών μηχανισμών δράσης του HIF-1α,

αφού επιτρέπει την *in vitro* μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στη σύνδεση του HIF-1 στο DNA.




Εικόνα 66: Προτεινόμενο μοντέλο της επίδρασης των καρβοξυτελικών επικρατειών του HIF-1α και του ARNT στη σύνδεση στο HRE των γονιδίων στόχων τους. Απεικονίζονται με συνεχείς γραμμές οι επιβεβαιωμένες και με στικτές γραμμές οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των επικρατειών των δύο πρωτεϊνών. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις δείχνεται σχηματικά η αναστολή της σύνδεσης στο DNA.

Παρότι ο καθαρός ανασυνδυασμένος και βακτηριακής προέλευσης HIF-1α δεν έχει την ικανότητα να συνδεθεί σταθερά με τον ARNT, το γεγονός ότι δε φέρει καμία ευκαρυωτικού τύπου μεταμεταφραστική τροποποίηση, τον κάνει ιδανικό για τη χρήση του ως υπόστρωμα στη μελέτη αυτών των τροποποιήσεων. Είναι γνωστό πως ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται άμεσα από τις p42/44 MAP κινάσες [84] τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [65]. Οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης όμως δεν έχουν αναγνωριστεί.

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον παραγόμενο από βακτήρια GST-HIF-1α επιβεβαιώθηκε ότι φωσφορυλιώνεται *in vitro* από την ανασυνδυασμένη p42 MAPK (γνωστή και σαν ERK-2). Επίσης η φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α εμφάνισε μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σχέση με τη μη φωσφορυλιωμένη

μορφή σε SDS-PAGE, γεγονός που είχε παρατηρηθεί και για τον *in vivo* φωσφορυλιωμένο HIF-1α [84].

Μια πρόβλεψη (μέσω της ιστοσελίδας www.elm.eu.org) των αμινοξικών αλληλουχιών του HIF-1α που μπορούν να φωσφορυλιωθούν από MAP κινάσες φαίνεται στην **Εικ. 67**. Όλες οι αλληλουχίες βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 435-690. Με ανάλυση φασματομετρίας μαζών του φωσφορυλιωμένου GST-HIF-1α προέκυψε πως τα δύο κατάλοιπα σερινών που βρίσκονται στις θέσεις 641 και 643 της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-1α είναι πιθανόν στόχοι της MAP κινάσης. Τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται στην αλληλουχία ILIASPSP, που είναι μια από τις προβλεπόμενες αλληλουχίες της **Εικ. 67**. Περαιτέρω μελέτη, εκτός των ορίων της παρούσας διατριβής, έδειξε ότι μετάλλαξη των συγκεκριμένων αμινοξέων σε αλανίνη εμπόδισε τη φωσφορυλίωση από MAPK αποδεικνύοντας πως τα συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης τροποποιούνται στον HIF-1α [185].

 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΔΟΜΩΝ (www.elm.eu.org)					
	αμινοξέα	θέση	Είδος κινάσης	εντοπισμός	μοτίβο
MOD ProDkin 1	MLFSPNE	435-441	Proline-Directed Kinase (e.g. MAPK) phosphorylation site in higher eukaryotes.	nucleus, cytoplasm	...((ST)P..
	LAMEPLP	448-454			
	TAETPKP	455-461			
	QDOTPSP	495-501			
	QTFSPSD	497-503			
	RQSSPEP	507-513			
	EPNSPSE	512-518			
	DQLSPLE	578-584			
	GSASPEG	506-592			
	ESASPGS	591-597			
	LIASPSP	638-644			
	ASPSPTH	640-646			
	ATSPPYR	654-660			
	RTASPNR	665-671			
	HPRSPNV	684-690			

Εικόνα 67: Πρόβλεψη αμινοξικών δομών στην αλληλουχία του HIF-1α που είναι πιθανό να φωσφορυλιώνονται από τις MAP κινάσες σε ένα μοτίβο (S,T)P αμινοξέων

Ο ρόλος της συγκεκριμένης τροποποίησης στη δράση του HIF-1α δεν είναι απολύτως γνωστός. Η φωσφορυλίωση από τις MAP κινάσες πιθανόν δεν επιδρά στη σταθεροποίηση του HIF-1α αλλά αυξάνει τη μεταγραφική του ικανότητα [84]. Μολαταύτα, έχει προταθεί και η άποψη πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAP κινάσες δεν επηρεάζει άμεσα την μεταγραφική του ενεργοποίηση αλλά η αύξηση της ενεργοποίησης των γονιδίων στόχων του HIF-1α οφείλεται στη

φωσφορυλίωση της p300 από την MAP κινάση γεγονός που αυξάνει τη σύνδεση της p300 στο C-TAD του HIF-1α [85]. Μια πιθανή δράση της φωσφορυλίωσης μπορεί επίσης να είναι η ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα, γεγονός αρκετά σύνηθες σε πυρηνικές πρωτεΐνες και ιδιαίτερα σε μεταγραφικούς παράγοντες. Ο μηχανισμός όμως της πυρηνικής εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστός.

Σε μια πρώτη προσπάθεια μελέτης της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα προσδιορίστηκε ο κυτταρικός εντοπισμός τόσο του ενδογενούς HIF-1α σε διαφοροποιημένα ΛΜΚΑ όσο και εξωγενούς GFP-HIF-1α σε ΛΜΚΑ συνθετικού φαινοτύπου, σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από επίδραση με κοβάλτιο. Ο HIF-1α εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα γεγονός που δείχνει πως η μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα γίνεται τουλάχιστον ως ένα βαθμό χωρίς την ύπαρξη κάποιου ερεθίσματος. Το κοβάλτιο σε συνδυασμό με την παρουσία ορού στα ΛΜΚΑ αύξησε τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, υποδεικνύοντας πως πιθανά η μεταφορά του HIF-1α γίνεται αποτελεσματικότερα παρουσία του κοβαλτίου. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν πως η υποξία ανεξάρτητα από τη σταθεροποίηση του HIF-1α προκαλεί επίσης την ενεργή μεταφορά του στον πυρήνα σε COS-7 κύτταρα [18]. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί και η άποψη πως η μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα είναι συνεχής και ανεξάρτητη από υποξικά ερεθίσματα [108].

Στο παρελθόν, χαρακτηρίστηκαν δυο NLS στο εσωτερικό του HIF-1α, ένα στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 17-33) το οποίο είναι δομικά όμοιο με αυτό της νουκλεοπλασμίνης και ένα στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 719-723) το οποίο είναι ανάλογο με αυτό του SV40. Από τα δύο όμως αυτά NLS θεωρείται πως μόνο το ένα είναι λειτουργικό αφού το αμινοτελικό NLS θεωρείται ότι καταστέλλεται από την PAS B περιοχή του HIF-1α [18]. Επιπλέον, οι Luo et al [109] υποστηρίζουν πως το καρβοξυτελικό NLS αποτελείται από δύο περιοχές βασικών αμινοξέων (719-723 και 754-757) και όχι από μία [18] χαρακτηρίζοντας έτσι το συγκεκριμένο NLS ως μη τυπικό NLS. Παρόλα αυτά οι ιμπορτίνες που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση στο NLS και την επακόλουθη μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα δεν έχουν χαρακτηριστεί.

Χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* σύστημα εισόδου του ανασυνδυασμένου GFP-HIF-1α στον πυρήνα διαπερατών κυττάρων HeLa, στο οποίο ελέγχθηκε η δράση 6 ιμπορτινών, παρατηρήθηκε πως μόνο οι ιμπορτίνες 4 και 7 εισάγουν ικανοποιητικά

τον HIF-1α στον πυρήνα και όχι το σύμπλοκο των ιμπορτίνων α/β ή οι ιμπορτίνες β, 5 και 9. Με πειράματα συγκατακρήμνισης δείχθηκε πως ο ανασυνδυασμένος GST-HIF-1α αλληλεπιδρά τόσο με ενδογενείς ιμπορτίνες 4 και 7 από εκχύλισμα κυττάρων HeLa όσο και με ανασυνδυασμένες καθαρές ιμπορτίνες 4 και 7 επιβεβαιώνοντας έτσι το παραπάνω αποτέλεσμα. Η σύνδεση όμως των δύο ιμπορτινών με τον HIF-1α δεν είναι στοιχειομετρική και έτσι δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποιος άλλος πρωτεϊνικός παράγοντας, ή κάποια μεταμεταφραστική τροποποίηση να είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότερη και λειτουργικότερη αλληλεπίδραση των ιμπορτινών με τον HIF-1α.

Για να χαρτογραφηθεί η περιοχή σύνδεσης του HIF-1α με τις ιμπορτίνες 4 και 7, έγιναν πειράματα συγκατακρήμνισης στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αμινοτελικά ή καρβοξυτελικά τμήματα του HIF-1α και ενδογενείς ή ανασυνδυασμένες ιμπορτίνες. Η μικρή διαλυτότητα της ανασυνδυασμένης ιμπορτίνης 4 κατά την έκφραση και απομόνωση της από βακτήρια ήταν περιοριστική για την διεξαγωγή του παραπάνω πειράματος. Όσον αφορά στην ιμπορτίνη 7, αυτή συνδέθηκε στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α και κυρίως στην περιοχή ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA (bHLH-PAS_A, αμινοξέα 1-251). Το αποτέλεσμα αυτό μαρτυρά την ύπαρξη ενός NLS ειδικού για την ιμπορτίνη 7 σε αυτή την περιοχή. Θα περίμενε, όμως, κανείς την σύνδεση της ιμπορτίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α αφού εκεί βρίσκεται ένα NLS απουσία του οποίου δεν παρατηρείται είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα [18, 109]. Άρα, υπάρχει το ενδεχόμενο ο HIF-1α να περιέχει περισσότερα από ένα NLS. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα NLS που αναγνωρίζουν η ιμπορτίνη 4 ή η ιμπορτίνη 7 δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω η μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα δεν είναι μια απλή διαδικασία. Η συμμετοχή δυο διαφορετικών ιμπορτινών στην είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα αποτελεί ένδειξη διαφορετικών μονοπατιών εισόδου που ίσως επιτρέπουν στο κύτταρο τόσο συνεχή όσο και ρυθμιζόμενη μεταφορά του HIF-1α. Πιθανά έτσι εξασφαλίζεται η αποτελεσματικότερη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα όταν δοθεί ένα κατάλληλο ερέθισμα όπως π.χ. η υποξία ή η παρουσία κοβαλτίου.

Συμπερασματικά λοιπόν, στην παρούσα διδακτορική διατριβή αποσαφηνίστηκαν άγνωστες πτυχές του μηχανισμού δράσης του HIF-1α όσον αφορά στη διαδικασία επαγωγής του σε ΛΜΚΑ, στην ικανότητα αλληλεπίδρασης του με τον ARNT και το DNA, στη φωσφορυλίωση και στη μεταφορά του στον πυρήνα. Η

διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο διάφορα κύτταρα αποκρίνονται σε ερεθίσματα, όπως η υποξία, τα βαρέα μέταλλα ή οι αυξητικοί παράγοντες, αλλά και η κατανόηση των πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του HIF-1 είναι θεμελιώδους σημασίας όχι μόνο για την παραγωγή νέας γνώσης για βασικές κυτταρικές λειτουργίες αλλά και για την κατανόηση και την αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων και ανθρωπίνων ασθενειών. Συγκεκριμένα, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή του HIF-1α, οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη δράση του αλλά και ο μηχανισμός ενδοκυτταρικής μεταφοράς του θεωρητικά μπορούν να αποτελέσουν στόχους φαρμακευτικής παρέμβασης, ιδιαίτερα σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος, στις οποίες η επαγωγή και δράση του HIF-1α αποτελεί παθογενετική αιτία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης και ενεργοποίησης του παράγοντα που επάγεται από την υποξία HIF-1α. Αρχικά διερευνήθηκε ο μηχανισμός επαγωγής του HIF-1α σε λεία μυϊκά κύτταρα αεραγωγών (ΛΜΚΑ). Η χρήση αναστολέων κυτταρικών μονοπατιών αποκάλυψε πως η επαγωγή του HIF-1α σε ΛΜΚΑ που καλλιεργούνται απουσία ορού και παρουσιάζουν τον επιμήκη «διαφοροποιημένο» φαινότυπο μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο τουλάχιστον μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός που ενεργοποιείται από το κοβάλτιο οδηγεί στη σταθεροποίηση του HIF-1α πιθανά μέσω αναστολής των πρόλυλο-υδροξυλασών ενώ ο δεύτερος που ενεργοποιείται από τον ορό ενέχει την αύξηση της σύνθεσης του μέσω μεταγραφής και μετάφρασης ενώ φαίνεται να εμπλέκει και το μονοπάτι της PI-3K. Αντίθετα σε «συνθετικά» ΛΜΚΑ που καλλιεργούνται συνεχώς παρουσία ορού το κοβάλτιο επάγει τον HIF-1α κυρίως μέσω αύξησης της μετάφρασης του mRNA του χρησιμοποιώντας το μονοπάτι της PI-3K που είναι ήδη ενεργοποιημένο από τον ορό. Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός ενεργοποίησης του HIF-1α *in vitro* χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένος HIF-1α πλήρους μεγέθους που παράχθηκε για πρώτη φορά, σε βακτήρια. Δείχθηκε πως ο ανασυνδυασμένος HIF-1α έχει τη δυνατότητα να συνδέεται σταθερά με τον συμπαράγοντα του ARNT μόνο όταν οι δυο πρωτεΐνες συνεκφραστούν στα ίδια *E.coli* κύτταρα. Επιπλέον, το σύμπλοκο που προκύπτει είναι ικανό για ειδική σύνδεση σε αλληλουχία του DNA που περιέχει τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE). Η σύνδεση γίνεται μέσω των αμινοτελικών άκρων των δύο υπομονάδων αλλά επηρεάζεται και από τα καρβοξυτελικά άκρα τους. Ο μη τροποποιημένος ανασυνδυασμένος HIF-1α χρησιμοποιήθηκε επίσης στη μελέτη της φωσφορυλίωσης του από την p42 MAP κινάση. Με αυτόν τον τρόπο αποκαλύφθηκαν για πρώτη φορά οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης του από τη συγκεκριμένη κινάση. Τέλος μελετήθηκε ο άγνωστος μέχρι στιγμής μηχανισμός μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα και δείχθηκε ότι οι ιμφορτίνες 4 και 7 είναι υπεύθυνες για την είσοδο του στον πυρήνα υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη δύο διαφορετικών μονοπατιών εισόδου.

SUMMARY

The present study deals with the investigation of the molecular mechanisms involved in the regulation and activation of the hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α). At first, we examined the induction mechanisms of HIF-1 α in primary cultures of airway smooth muscle (ASM) cells. The use of specific inhibitors revealed that HIF-1 α , in ASM cells that are cultured in the absence of fetal bovine serum and thus obtain their “differentiated” contractile apparatus, is induced by two distinct mechanisms. The first mechanism that is induced by cobalt is the stabilization of the protein due to a possible inhibition of prolyl-hydroxylases and the second one that is induced by serum, involves enhanced synthesis of HIF-1 α through transcription, translation and involvement of the PI-3K pathway. On the contrary, cobalt induces HIF-1 α mainly through his protein synthesis, in “synthetic” ASM cells, that are cultured in the presence of serum, by using the activated PI-3K pathway. In order to further study the molecular properties of HIF-1 α in vitro we used recombinant full length HIF-1 α that was produced for the first time in bacteria. This unmodified form of HIF-1 α was able to form a stable heterodimer with the second subunit of HIF-1 (ARNT) when both proteins were co-expressed in *E. coli*. The reconstituted heterodimer exhibited specific DNA binding activity. The amino-terminal regions of the two subunits were bound to DNA but this activity was affected by the carboxy-terminal regions of the two proteins. Furthermore, during the study of interaction of recombinant HIF-1 α with p42-MAPK, the exact phosphorylation positions of HIF-1 α were revealed. Finally, we studied the unknown nuclear transport mechanism of HIF-1 α and we showed that importins 4 and 7 are responsible for HIF-1 α import and thus define two distinct import pathways for the protein.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ATP	:Αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ
BSA	:Αλβουμίνη ορού βοδιού
CIP	: Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού
cDNA	:Συμπληρωματικό DNA
CMV	: Cytomegalovirus
cpm	:Κρούσεις ανά λεπτό
DAG	: Διάκυλο-γλυκερόλη
DAPI	:4', 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο
DMSO	: διμεθυλσουλφοξείδιο
DMOG	: διμεθυλοξαλική γλυκίνη
DNA	:Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
DTT	:Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	:Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EMSA	: electrophoretic mobility shift assay
FBS	: ορός εμβρύου βοός
FITC	: ισοθιοκυανική φλουοροσκεΐνη
GFP	: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GST	:Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HBS	: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης HEPES
HEPES	:N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
HIF-1α	: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α
HRP	: Υπεροξειδάση του αγριοραδικιού
IPTG	:Ισοπροπυλ-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο
LB	: Luria Broth
MAPK	:Κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα
MCS	: Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης
mTOR	: Στόχος της ραπαμυκίνης
NAC	: N-ακετυλο L-κυστεΐνη
ONPG	: ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης
PBS	: Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PMSF	: φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος

RNA	:Ριβονουκλεϊνικό οξύ
SDS	:Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
SNP	: sodium nitroprusside
SV40	: Simian Virus 40
TAE	: Tris-οξικό οξύ-EDTA
TEMED	:N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη
Tris	:Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bunn HF and Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 1996, 76(3): p. 839-85.
2. D'Angio CT and Finkelstein JN. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab.* 2000, 71(1-2): p. 371-80.
3. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res.* 2001, 49(5): p. 614-7.
4. Guillemin K and Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell.* 1997, 89(1): p. 9-12.
5. Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, and Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol.* 1998, 201(Pt 8): p. 1153-62.
6. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999, 15: p. 551-78.
7. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 2000, 203(Pt 8): p. 1253-63.
8. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3(10): p. 721-32.
9. Zagorska A and Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 2004, 51(3): p. 563-85.
10. Park JW, Chun YS, and Kim MS. Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools. *J Pharmacol Sci.* 2004, 94(3): p. 221-32.
11. Beck I, Ramirez S, Weinmann R, and Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem.* 1991, 266(24): p. 15563-6.
12. Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, and Bunn HF. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol.* 1992, 12(12): p. 5373-85.
13. Pugh CW, Tan CC, Jones RW, and Ratcliffe PJ. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88(23): p. 10553-7.

14. Semenza GL and Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992, 12(12): p. 5447-54.
15. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. 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.
16. Ruas JL, Poellinger L, and Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci.* 2005, 118(Pt 2): p. 301-11.
17. Dery MA, Michaud MD, and Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, 37(3): p. 535-40.
18. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *Embo J.* 1998, 17(22): p. 6573-86.
19. Tian H, McKnight SL, and Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997, 11(1): p. 72-82.
20. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, and Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004, 36(1): p. 1-12.
21. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, and Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem.* 2002, 277(36): p. 32405-8.
22. Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, and Pouyssegur J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem.* 2000, 275(10): p. 6922-7.
23. Chun YS, Choi E, Yeo EJ, Lee JH, Kim MS, and Park JW. A new HIF-1 α variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J Cell Sci.* 2001, 114(Pt 22): p. 4051-61.

24. Chun YS, Choi E, Kim TY, Kim MS, and Park JW. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1 α gene. *Biochem J.* 2002, 362: p. 71-9.
25. Chun YS, Hyun JY, Kwak YG, Kim IS, Kim CH, Choi E, et al. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J.* 2003, 370(Pt 1): p. 149-57.
26. Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem.* 2001, 276(3): p. 2292-8.
27. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002, 16(10): p. 1151-62.
28. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, and Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996, 271(30): p. 17771-8.
29. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, and Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(11): p. 5667-72.
30. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Whitelaw ML, Toftgard R, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1996, 16(10): p. 5221-31.
31. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 1997, 272(13): p. 8581-93.
32. Chapman-Smith A, Lutwyche JK, and Whitelaw ML. Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J Biol Chem.* 2004, 279(7): p. 5353-62.
33. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 2000, 14(16): p. 1983-91.

34. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, and Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999, 274(10): p. 6519-25.
35. Bonicalzi ME, Groulx I, de Paulsen N, and Lee S. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 2001, 276(2): p. 1407-16.
36. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science.* 2001, 292(5516): p. 464-8.
37. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999, 399(6733): p. 271-5.
38. Bruick RK and McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001, 294(5545): p. 1337-40.
39. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, 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.
40. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al., *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001, 107(1): p. 43-54.
41. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.* 2003, 116(Pt 7): p. 1319-26.
42. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, and Pouyssegur J. 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.
43. Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, et al. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 296(2): p. 343-9.
44. Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J.* 2004, 381(Pt 3): p. 761-7.

45. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, and Bruick RK. *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev.* 2002, 16(12): p. 1466-71.
46. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML. *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science.* 2002, 295(5556): p. 858-61.
47. Mahon PC, Hirota K, and Semenza GL. *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes Dev.* 2001, 15(20): p. 2675-86.
48. McNeill LA, Hewitson KS, Gleadle JM, Horsfall LE, Oldham NJ, Maxwell PH, et al. *The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). Bioorg Med Chem Lett.* 2002, 12(12): p. 1547-50.
49. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, and Millhorn DE. *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. J Biol Chem.* 2003, 278(18): p. 15911-6.
50. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, and Semenza GL. *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer Res.* 1999, 59(16): p. 3915-8.
51. Richard DE, Berra E, and Pouyssegur J. *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem.* 2000, 275(35): p. 26765-71.
52. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, and Jelkmann W. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. Blood.* 1999, 94(5): p. 1561-7.
53. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, et al. *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. Circ Res.* 2001, 89(1): p. 47-54.
54. Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, Kim KR, Yu DY, Murakami S, et al. *Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. Faseb J.* 2004, 18(2): p. 382-4.

55. Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Murono S, Furukawa M, and Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(12): p. 5223-34.
56. Bilton RL and Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. *Eur J Biochem*. 2003, 270(5): p. 791-8.
57. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, and Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*. 2002, 277(50): p. 48403-9.
58. Blouin CC, Page EL, Soucy GM, and Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*. 2004, 103(3): p. 1124-30.
59. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*. 2000, 14(4): p. 391-6.
60. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, and Semenza GL. Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Colon Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2002, 277(41): p. 38205-11.
61. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*. 2000, 468(1): p. 53-8.
62. Haystead CM, Gregory P, Shirazi A, Fadden P, Mosse C, Dent P, et al. Insulin activates a novel adipocyte mitogen-activated protein kinase kinase that shows rapid phasic kinetics and is distinct from c-Raf. *J Biol Chem*. 1994, 269(17): p. 12804-8.
63. Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, and Millhorn DE. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem*. 1999, 274(47): p. 33709-13.
64. Agani F and Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol*. 1998, 54(5): p. 749-54.
65. Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates

- vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* 2000, 60(17): p. 4873-80.
66. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* 2000, 275(33): p. 25130-8.
 67. Michiels C, Minet E, Mottet D, and Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med.* 2002, 33(9): p. 1231-42.
 68. Bardos JJ and Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1755(2): p. 107-20.
 69. Bel Aiba RS and Gorlach A. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 by reactive oxygen species in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol.* 2003, 536: p. 171-8.
 70. Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, and Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 2003, 63(8): p. 1764-8.
 71. Kietzmann T and Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol.* 2005.
 72. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000, 14(1): p. 34-44.
 73. Berta M, Brahimi-Horn C, and Pouyssegur J. [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.
 74. Brahimi-Horn C, Mazure N, and Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal.* 2005, 17(1): p. 1-9.
 75. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002, 111(5): p. 709-20.

76. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, and Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J*. 2000, 19(16): p. 4298-309.
77. Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, et al. Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem*. 2005, 280(35): p. 31132-40.
78. Fisher TS, Etages SD, Hayes L, Crimin K, and Li B. Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference. *J Biol Chem*. 2005, 280(18): p. 17749-57.
79. Yasinska IM and Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett*. 2003, 549(1-3): p. 105-9.
80. Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, and Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci*. 2002, 27(12): p. 619-27.
81. Wang GL and Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993, 268(29): p. 21513-8.
82. Wang GL, Jiang BH, and Semenza GL. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995, 216(2): p. 669-75.
83. Salceda S, Beck I, Srinivas V, and Caro J. Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int*. 1997, 51(2): p. 556-9.
84. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, and Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 1999, 274(46): p. 32631-7.
85. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, and Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem*. 2003, 278(16): p. 14013-9.

86. Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, and Sogawa K. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*. 2002, 277(26): p. 23508-14.
87. Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol*. 2004, 68(6): p. 971-80.
88. Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, and Livingston DM. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev*. 1999, 13(1): p. 64-75.
89. Braganca J, Swingler T, Marques FI, Jones T, Eloranta JJ, Hurst HC, et al. Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J Biol Chem*. 2002, 277(10): p. 8559-65.
90. Ashcroft M, Taya Y, and Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol*. 2000, 20(9): p. 3224-33.
91. Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, et al. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*. 2001, 21(4): p. 1297-310.
92. Schmid T, Zhou J, Kohl R, and Brune B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J*. 2004, 380(Pt 1): p. 289-95.
93. Nieminen AL, Qanungo S, Schneider EA, Jiang BH, and Agani FH. Mdm2 and HIF-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia. *J Cell Physiol*. 2005, 204(2): p. 364-9.
94. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, and Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2002, 62(17): p. 5089-95.
95. Roth U, Curth K, Unterman TG, and Kietzmann T. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated

- glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J Biol Chem.* 2004, 279(4): p. 2623-31.
96. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett.* 1999, 460(2): p. 251-6.
 97. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, and Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem.* 2002, 277(33): p. 29936-44.
 98. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, and Wenger RH. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem.* 2004, 14(4-6): p. 351-60.
 99. Brune B, von Knethen A, and Sandau KB. Transcription factors p53 and HIF-1alpha as targets of nitric oxide. *Cell Signal.* 2001, 13(8): p. 525-33.
 100. Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernandez C, and Moncada S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J.* 2003, 376(2): p. 537-44.
 101. Fried H and Kutay U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci.* 2003, 60(8): p. 1659-88.
 102. Muhlhauser P, Muller EC, Otto A, and Kutay U. Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.* 2001, 2(8): p. 690-6.
 103. Jakel S and Gorlich D. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J.* 1998, 17(15): p. 4491-502.
 104. Jakel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E, and Gorlich D. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *Embo J.* 2002, 21(3): p. 377-86.
 105. Gasiorowski JZ and Dean DA. Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003, 55(6): p. 703-16.
 106. Komeili A and O'Shea EK. Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 2000, 12(3): p. 355-60.
 107. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, and Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of

- transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem.* 1997, 272(31): p. 19253-60.
108. Groulx I and Lee S. Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.* 2002, 22(15): p. 5319-36.
 109. Luo JC and Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene.* 2001, 20(12): p. 1435-44.
 110. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 1992, 3(2): p. 65-71.
 111. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002, 8(4 Suppl): p. S62-7.
 112. Park JH, Kim TY, Jong HS, Chun YS, Park JW, Lee CT, et al. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003, 9(1): p. 433-40.
 113. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, and Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer.* 2000, 88(11): p. 2606-18.
 114. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001, 61(7): p. 2911-6.
 115. Volm M and Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000, 20(3A): p. 1527-33.
 116. Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell.* 2003, 3(4): p. 363-75.
 117. Giaccia A, Siim BG, and Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003, 2(10): p. 803-11.

118. *Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, Wiesener MS, Horstrup JH, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. J Am Soc Nephrol. 2002, 13(7): p. 1721-32.*
119. *Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, and Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. Eur J Neurosci. 1999, 11(12): p. 4159-70.*
120. *Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, and Kim MS. Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. Circ Res. 2002, 90(2): p. E25-33.*
121. *Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, and Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. Am J Physiol. 1998, 275(4 Pt 1): p. L818-26.*
122. *Leach RM and Treacher DF. Clinical aspects of hypoxic pulmonary vasoconstriction. Exp Physiol. 1995, 80(5): p. 865-75.*
123. *Leach RM, Hill HS, Snetkov VA, and Ward JP. Hypoxia, energy state and pulmonary vasomotor tone. Respir Physiol Neurobiol. 2002, 132(1): p. 55-67.*
124. *Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. J Appl Physiol. 2004, 96(3): p. 1173-7; discussion 1170-2.*
125. *Cogo A, Napolitano G, Michoud MC, Barbon DR, Ward M, and Martin JG. Effects of hypoxia on rat airway smooth muscle cell proliferation. J Appl Physiol. 2003, 94(4): p. 1403-9.*
126. *Halayko AJ and Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. J Appl Physiol. 2001, 90(1): p. 358-68.*
127. *Gunst SJ and Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. Eur Respir J. 2000, 15(3): p. 600-16.*
128. *Ma X, Wang Y, and Stephens NL. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. Am J Physiol. 1998, 274(5 Pt 1): p. C1206-14.*
129. *Sambrook Ja, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning. 2nd ed, ed. N. Ford, Nolan, C., Ferguson, M. and Ockler, M. 1989, 1.53-1.73, : Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

130. Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, et al. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol.* 1999, 145(2): p. 255-64.
131. Lutzmann M, Kunze R, Buerer A, Aebl U, and Hurt E. Modular self-assembly of a Y-shaped multiprotein complex from seven nucleoporins. *Embo J.* 2002, 21(3): p. 387-97.
132. Lando D, Pongratz I, Poellinger L, and Whitelaw ML. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor. *J Biol Chem.* 2000, 275(7): p. 4618-27.
133. Ausubel Fa, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology.* 3,1 ed. 1999: Wiley Press.
134. Sambrook Jb, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning.* 2nd ed, ed. N. Ford, Nolan, C., Ferguson, M. and Ockler, M. 1989, 6.3-6.21: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
135. Sambrook Jc, Fritsch, EF and Maniatis, T. *Molecular Cloning.* 2nd ed, ed. N. Ford, Nolan, C., Ferguson, M. and Ockler, M. 1989, 1.74-1.84: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
136. Sambrook Jd, Fritsch, EF and Maniatis, T. *Molecular Cloning.* 2nd ed, ed. N. Ford, Nolan, C., Ferguson, M. and Ockler, M. 1989, 1.33-1.39: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
137. Ausubel Fb, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1999, 16.1: Wiley Press.
138. *Affinity Chromatography* PM. 1979: Pharmacia Fine Chemicals.
139. Ausubel Fc, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1999, 10.11B: Wiley Press.
140. Qiagen, *The QiaExpressionist.* 1999.
141. Ausubel Fd, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1999, 16.7: Wiley Press.
142. Ausubel Fe, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1999, 10.9: Wiley Press.
143. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: p. 248-54.

144. Bearden JC, Jr. Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim Biophys Acta*. 1978, 533(2): p. 525-9.
145. Andrews AT. *Electrophoresis: Theory, Thechniques and Biochemical Applications*. 1968: Clarendon Press, Oxford.
146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259): p. 680-5.
147. Ausubel Ff, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidian, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocolls in Molecular Biology*. 1999, 10.8: Wiley Press.
148. Ausubel Fg, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidian, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocolls in Molecular Biology*. 1999, 12.2: Wiley Press.
149. Ausubel Fh, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidian, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocolls in Molecular Biology*. 1999, 14.6.1: Wiley Press.
150. Ausubel Fi, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidian, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocolls in Molecular Biology*. 1999, 9.4: Wiley Press.
151. Ausubel Fj, Brent, R., Kingston, R., Moore, R., Seidian, J., Smith, J., Struhl, K. *Current Protocolls in Molecular Biology*. 1999, 9.6.1: Wiley Press.
152. MacGregor GR and Caskey CT. Construction of plasmids that express *E. coli* beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1989, 17(6): p. 2365.
153. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(1): p. 38-47.
154. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, and Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002, 277(31): p. 27975-81.
155. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, and Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*. 2002, 512(1-3): p. 157-62.
156. Kietzmann T, Samoylenko A, Roth U, and Jungermann K. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood*. 2003, 101(3): p. 907-14.

157. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, and Semenza GL. *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol.* 2001, 21(12): p. 3995-4004.
158. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, and Fujii-Kuriyama Y. *Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(13): p. 7368-73.
159. Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, and Bunn HF. *Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. J Biol Chem.* 1999, 274(13): p. 9038-44.
160. Palmer LA, Gaston B, and Johns RA. *Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. Mol Pharmacol.* 2000, 58(6): p. 1197-203.
161. Kutay U, Izaurralde E, Bischoff FR, Mattaj IW, and Gorlich D. *Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. Embo J.* 1997, 16(6): p. 1153-63.
162. Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, et al. *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. Curr Biol.* 1995, 5(4): p. 383-92.
163. Gorlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, Kutay U, Bork P, Hartmann E, et al. *A novel class of RanGTP binding proteins. J Cell Biol.* 1997, 138(1): p. 65-80.
164. Semenza GL. *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13(2): p. 167-71.
165. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, et al. *p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol.* 2003, 120(3): p. 390-9.
166. Wang GL, Jiang BH, and Semenza GL. *Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 212(2): p. 550-6.
167. Barceloux DG. *Cobalt. J Toxicol Clin Toxicol.* 1999, 37(2): p. 201-6.

168. Bjornsti MA and Houghton PJ. Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell*. 2004, 5(6): p. 519-23.
169. Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J, and Brune B. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood*. 2003, 101(12): p. 4847-9.
170. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*. 1999, 13(11): p. 1422-37.
171. Kim HH, Lee SE, Chung WJ, Choi Y, Kwack K, Kim SW, et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in the hypoxic stimuli-induced expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Cytokine*. 2002, 17(1): p. 14-27.
172. Gao N, Ding M, Zheng JZ, Zhang Z, Leonard SS, Liu KJ, et al. Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2002, 277(35): p. 31963-71.
173. Sandau KB, Faus HG, and Brune B. Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 278(1): p. 263-7.
174. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, and Brune B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*. 2003, 14(8): p. 3470-81.
175. Hagen T, Taylor CT, Lam F, and Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*. 2003, 302(5652): p. 1975-8.
176. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002, 64(5-6): p. 993-8.
177. Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, and Mochan E. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J*. 2000, 350 Pt 1: p. 307-12.
178. Hirota K and Semenza GL. Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 2001, 276(24): p. 21166-72.

179. Turcotte S, Desrosiers RR, and Beliveau R. HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci.* 2003, 116(Pt 11): p. 2247-60.
180. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, and Ratcliffe PJ. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem.* 1996, 271(25): p. 15117-23.
181. Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ, et al. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol.* 2002, 62(5): p. 975-82.
182. Dyson HJ and Wright PE. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2002, 12(1): p. 54-60.
183. Dyson HJ and Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6(3): p. 197-208.
184. Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, et al. Heterodimers of bHLH-PAS protein fragments derived from AhR, AhRR, and Arnt prepared by co-expression in *Escherichia coli*: characterization of their DNA binding activity and preparation of a DNA complex. *J Biochem (Tokyo).* 2003, 134(1): p. 83-90.
185. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou M, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of p42 mapk phosphorylation sites on human hypoxia inducible factor HIF-1 α and their role in its activity and nuclear import. Submitted, 2006.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο : Χαχάμη
Όνομα : Γεωργία
Όνομα πατρός: Φώτιος
Ημερομηνία γέννησης: 28-02-1979
Τόπος γέννησης: Κρέφελντ, Γερμανίας

Διεύθυνση κατοικίας: Δεληγιώργη 10, Λάρισα
Τηλέφωνο κατοικίας : 6944 947706
Email: ghah@med.uth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1996: Αποφοίτηση από το 1ο Γενικό Λύκειο Λάρισας
- 1997-2001: Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 2000-2001: Εκπόνηση πτυχιακής ερευνητικής εργασίας στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με θέμα «Κλωνοποίηση του γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης από τα στάδια της λευκής και ώριμης νύμφης του εντόμου *Ceratitis capitata*. *In vitro* έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών», υπό την επίβλεψη της Επίκουρης καθηγήτριας Δ. Βασιλακοπούλου
- 7-11-2001: Απόκτηση πτυχίου Βιολογίας από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών με «Λείαν Καλώς» (7,21)
- 2002- : Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης του παράγοντα που επάγεται από την υποξία HIF-1α *in vitro* και σε πρωτογενείς καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων αεραγωγών», υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γ. Σίμου
- Ιούλ.-Αύγ. 2004: Εκπόνηση έρευνας στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής στην ερευνητική ομάδα του Dr. Görlich, στο Ινστιτούτο ZMBH του Πανεπιστημίου Χαϊδελβέργης. Πρακτική εξάσκηση πάνω σε μεθόδους *in vitro* μεταφοράς πρωτεϊνών στον πυρήνα.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 2001- : Παράδοση ερευνητικών και βιβλιογραφικών σεμιναρίων στα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας.
- 2003-2004: Συμμετοχή στην επίβλεψη εκπόνησης διπλωματικής εργασίας από φοιτητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας.
- 2004-2005: Συμμετοχή στην οργάνωση των εργαστηρίων του μαθήματος «Κυτταρική Σηματοδότηση και Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης» του μεταπτυχιακού Προγράμματος του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας με τίτλο «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» και επίβλεψη των μεταπτυχιακών φοιτητών στο αντίστοιχο εργαστήριο.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Chachami G**, Paraskeva E, Georgatsou E, Bonanou S, and Simos G, *Bacterially produced human HIF-1alpha is competent for heterodimerization and specific DNA-binding*. Biochem Biophys Res Commun. 2005, 331(2): p. 464-70.
2. **Chachami G**, Simos G, Hatziefthimiou A, Bonanou S, Molyvdas PA, and Paraskeva E, *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004, 31(5): p. 544-51.
3. M. Papagianni, A. Hatziefthimiou, **G. Chachami**, K. Gourgoulisanis, P.A. Molyvdas and E. Paraskeva, *Insulin causes a transient induction of proliferation via activation of the PI3- kinase pathway in Airway Smooth Muscle cells*. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 2006, accepted.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΥΠΟ ΚΡΙΣΗ

1. I. Mylonis, **G. Chachami**, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou and G. Simos, *Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of Hypoxia Inducible Factor 1α* 2006, submitted.
2. A. Triantafyllou, P. Liakos, A. Tsakalof, **G. Chachami**, E. Paraskeva, P.A. Molyvdas, E. Georgatsou, G. Simos and S. Bonanou, *Quercetin induces HIF-1α and inhibits cell proliferation by depleting iron* 2006, submitted.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1 **G. Chachami**, G. Simos, A.Hatziefthimiou, P.Liakos, S. Bonanou, P. A. Molyvdas and E. Paraskeva (2006) Mechanisms of Hypoxia Inducible Factor-1 alpha (HIF-1α) induction in airway smooth muscle cells. *Cell Signaling World 2006, Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Proceedings and Program*,515.

- 2 I. Mylonis, **G. Chachami**, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, E. Georgatsou, S. Bonanou and G. Simos (2006) Phosphorylation by p42/44 MAPK regulates the activity and localization of human hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cell Signaling World 2006, Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Proceedings and Program*, 224.
- 3 A.Triantafyllou, P. Liakos, A. Tsakalof, **G. Chachami**, E. Paraskeva, I. Athanasiadis, P. A. Molyvdas, E. Georgatsou, G. Simos and S. Bonanou (2006) Ferric citrate abolishes the induction of the hypoxia inducible factor HIF-1alpha expression and restores the inhibition of cell proliferation produced by the flavonoid quercetin. *Cell Signaling World 2006, Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Proceedings and Program*, 574.
4. I. Mylonis, **G. Chachami**, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, E. Georgatsou, S. Bonanou, G. Simos (2005) Characterization of the human Hypoxia Inducible Factor HIF-1α phosphorylation. *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 57th meeting*, 52, 142.
- 5 **Γ. Χαχάμη**, Γ. Σίμος, Α. Χατζηευθυμίου, Π. Λιάκος, Σ. Μπονάνου, Π. Α. Μολυβδάς, Ε. Παρασκευά (2005) Μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 σε λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών. *1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, «Από την Εργαστηριακή Εξέταση στην Κλινική Εφαρμογή και Πράξη» Πρακτικά σελ.100*
- 6 Α. Λυμπεροπούλου, Γ. Γκαντάρας, Ε. Βενιέρης, **Γ. Χαχάμη**, Γ. Σίμος, Σ. Μπονάνου και Ε. Γεωργάτσου (2005) Ανίχνευση νέων μοριακών αλληλεπιδράσεων του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor 1α). *1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, «Από την Εργαστηριακή Εξέταση στην Κλινική Εφαρμογή και Πράξη» Πρακτικά σελ.103*
- 7 **G. Chachami**, G.Simos, S. Bonanou, P. A. Molyvdas and E. Paraskeva (2005) Regulation of HIF-1α activity in airway smooth muscle cells: the role of cobalt and serum. *30th FEBS Congress & 9th IUBMB Conference, The Protein World, The FEBS Journal*, 272, Supplement 1, Abstracts, 296.
- 8 Α. Lyberopoulou, G. Gadaras, E. Venieris, **G. Chachami**, G. Simos, S. Bonanou and E. Georgatsou (2005) Detection of new molecular partners of hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α). *30th FEBS Congress & 9th IUBMB Conference, The Protein World, The FEBS Journal*, 272, Supplement 1, Abstracts, 12.
- 9 **G. Chachami**, E. Paraskeva, J.-M. Mingot, S. Bonanou, P-A Molyvdas, D. Görlich and G. Simos (2004) Characterization of the nuclear import pathway for the human hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 56th meeting*, 51, 26.
- 10 **G. Chachami**, E. Paraskeva, P. Mina, K Kaloeidas, S. Bonanou, and G. Simos (2003) Recombinant human hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) can bind to DNA and is an in vitro substrate for p42 MAP kinase. *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 55th meeting*, 50, 84.
- 11 **G. Chachami**, G. Simos, A. Hatziefthimiou, S. Bonanou, P-A Molyvdas and E. Paraskeva (2003) Airway smooth muscle cells respond to cobalt exposure

by enhanced HIF-1 α protein levels. *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 55th meeting*, 50, 90.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 2005: Παρακολούθηση Σεμιναρίου Νέων Ερευνητών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του προγράμματος «ΠΕΝΕΔ 2001» με θέμα «Μεθοδολογία και πρακτική για τη διαχείριση έρευνας, τεχνολογίας και καινοτομίας», συνολικής διάρκειας 107 ωρών (Βόλος, Δεκέμβριος-Ιανουάριος 2005).
- 2005: Παρακολούθηση Σεμιναρίου (πρακτικό και θεωρητικό μέρος) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με θέμα «Modern Methods of Light Microscopy and Applications in Biomedical Research and Diagnosis.» (Αθήνα 18-22 Απριλίου 2005).

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 2005: Βραβείο καλύτερης γραπτής ανακοίνωσης για την επιστημονική εργασία με τίτλο: Characterization of the human Hypoxia Inducible Factor HIF-1 α phosphorylation. I. Mylonis, **G. Chachami**, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, E. Georgatsou, S. Bonanou, G. Simos (2005) *Hellenic society of biochemistry & molecular biology, Book of Abstracts of the 57th meeting*, 52, 142.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Άριστη γνώση Αγγλικών
- Καλή γνώση Η/Υ

ΛΟΙΠΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας