



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Κατασκευή και χαρακτηρισμός πλασμιδιακών φορέων έκφρασης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και μεταλλαγμάτων του στη θέση φωσφορυλίωσής του από την κινάση CK1δ

Ζωή Μπαρού

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευφροσύνη Παρασκευά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ. (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.
- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φυσιολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**TITLE: Construction and characterization of mammalian
expression vectors of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α wild type
and casein kinase (CK)-1 δ phosphorylation site mutants**

By
Zoe Barou

Examining Committee:

- Efrosyni Paraskeva, Associate Professor of Cellular Physiology,
Faculty of Medicine, University of Thessaly (supervisor)
- Anastasios Germenis, Professor of Immunology & Histocompatibility,
Faculty of Medicine, University of Thessaly
- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry,
Faculty of Medicine, University of Thessaly

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly
in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Physiology

Larissa , October, 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινικές Εφαρμογές στη Μοριακή Ιατρική», με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευφροσύνη Παρασκευά, την οποία οφείλω να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Την ευχαριστώ ειλικρινά για την επιστημονική καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια στη διεξαγωγή των πειραμάτων, τις εποικοδομητικές και καλοπροαίρετες υποδείξεις της, αλλά και για το χρόνο που αφιέρωσε για τις διορθώσεις της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής και επιστημονικό υπεύθυνο του ΠΜΣ για το χρόνο αξιολόγησης της παρούσας εργασίας και για την εύρυθμη λειτουργία του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ακόμη ευχαριστώ ιδιαίτερος τον κ. Ηλία Μυλωνή, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής για την άψογη συνεργασία, τις χρήσιμες συμβουλές και την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδάσκοντες του μεταπτυχιακού προγράμματος στα εργαστήρια Φυσιολογίας και Βιοχημείας για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των μαθημάτων, αλλά και όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές των δύο εργαστηρίων για τη συμπαράσταση και το φιλικό περιβάλλον συνύπαρξης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ HIF	9
1.2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1	10
1.3. ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1	12
1.4. HIF-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	14
1.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1 α	14
1.6. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΙΝΑΣΩΝ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1 (CK1)	22
1.7. Η ΚΙΝΑΣΗ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1 δ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1.....	23
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ	25
3.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	32
3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	35
3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΩΣ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (LUCIFERASE ASSAY).....	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
4.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ HIF-1 α -SA ₂₄₇ ΚΑΙ HIF-1 α -SD ₂₄₇ ΣΤΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ pCMV2-Flag ΚΑΙ pcDNA3.1-Flag.....	43
4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1 α	49
4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1 α	52
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor	
AKT	protein kinase B	
ARD1	ARrest Defective 1	
ARNT	Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator	
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	
ATP	Adenosine Triphosphate	τριφωσφορική αδενοσίνη
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix	βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας
BSA	Bovine Serum Albumin	αλβουμίνη ορού βοδιού
CBP	CREB-Binding Protein	
CIP	Calf Intestinal alkaline Phosphatase	αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχариού
CK1-2	Casein Kinases 1-2	κινάση καζεΐνης 1-2
CMV	Cytomegalovirus	Κυτταρομεγαλοϊός
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4', 6-διαμιδινο-2-φενυλινδόλιο
DMSO	Dimethyl sulfoxide	διμεθυλσουλφοξίδιο
DNA	Desoxyribonucleic Acid	δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
DTT	Dithiothreitol	διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EPO	Erythropoietin	ερυθροποιητίνη
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase	
FBS	Fetal Bovine Serum	ορός εμβρύου βοός
FIH	Factor Inhibiting Hypoxia-inducible factor	
FITC	Fluorescein isothiocyanate	ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη
GFP	Green Fluorescent Protein	πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
HIF	Hypoxia-Inducible transcription Factor	επαγόμενος από την υποξία παράγοντας
HRE	Hypoxia Response Element	στοιχείο απόκρισης στην υποξία
HRP	Horseradish peroxidase	υπεροξειδάση του αγριοραδικιού
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα
MCS	Multiple Cloning Site	περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin	στόχος της ραπαμυκίνης

NES	Nuclear Export Signal	σήμα πυρηνικής εξαγωγής
NF-κB	Nuclear Factor-κB	
NLS	Nuclear Localization Signal	σήμα πυρηνικού εντοπισμού
NO	Nitrogen Monoxide	μονοξείδιο του αζώτου
ODD	Oxygen Dependent Degradation Domain	
PAS	Per-Arnt-Sim	
PBS	Phosphate Buffered Saline	διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PHD	Prolyl-Hydroxylase	πρόλυλο-υδροξυλάση
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	
ROS	Reactive Oxygen Species	ενεργές ρίζες οξυγόνου
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier	
TAD	Transactivation Domain	περιοχή ενεργοποίησης
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA	
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	τρис-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων
pVHL	Von Hippel-Lindau Protein	πρωτεΐνη Von Hippel-Lindau

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) ρυθμίζει μέσω της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων την ομοιόσταση του οξυγόνου και εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος και οι ισχαιμικές ασθένειες. Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από την ιδιοστατικά εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β και την επαγόμενη υπομονάδα HIF-1α. Πέρα από τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης του HIF-1α που εξαρτάται από το οξυγόνο και την υδροξυλίωση του από τις προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs), ο HIF-1α υπόκειται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (*Semenza 2009*). Ανάμεσα σε αυτές, σημαντική θέση φαίνεται να έχει η φωσφορυλίωση στη σερίνη 247 από την κινάση καζεΐνης CK1δ. Πειράματα μεταλλαξιγένεσης της σερίνης 247 σε αλανίνη, ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται, και σε ασπαρτικό, το οποίο μιμείται το φορτίο της φωσφοσερίνης, σε συνδυασμό με χρήση αναστολέων της CK1, έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 247 μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον HIF-1β (*Kalousi et al. 2010*).

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση αυτής της φωσφορυλίωσης στη δράση του HIF-1, είναι απαραίτητη η δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων θηλαστικών που θα εκφράζουν τον αγρίου τύπου HIF-1α και τις μεταλλαγμένες του μορφές στη σερίνη 247, θέση φωσφορυλίωσης από την CK1. Με αυτό το σκοπό, στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των γονιδίων HIF1α, HIF1α-SA₂₄₇ και HIF1α-SD₂₄₇ σε πλασμιδιακούς φορείς κατάλληλους για σταθερή διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών. Οι φορείς αυτοί φέρουν τον επίτοπο Flag, ο οποίος κωδικοποιεί για ένα οκταπεπτίδιο που επηρεάζει ελάχιστα τη δομή και λειτουργία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η μεταγραφική ενεργότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Flag-HIF1α, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ σε κύτταρα θηλαστικών, μέσω πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης, έμμεσου ανοσοφθορισμού και δοκιμασίας λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του HIF-1α και των μεταλλαγμένων του μορφών σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών, εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων και είναι μεταγραφικά ενεργές.

ABSTRACT

The hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1) regulates oxygen homeostasis by activating the transcription of many genes and is involved in pathological conditions such as cancer and ischemic diseases. HIF-1 is a heterodimeric protein consisting of the constitutively expressed subunit HIF-1 β and the inducible subunit HIF-1 α . HIF-1 α protein stability is mainly regulated by oxygen levels and hydroxylation. In general, post-translational modifications of HIF-1 α fine tune HIF-1 α activity (*Semenza 2009*). Among them, phosphorylation by the casein kinase CK1 δ at serine 247 seems to have an important role in the regulation of HIF-1 α . Use of CK1 inhibitors as well as mutagenesis experiments of serine 247 to alanine, a residue that cannot be phosphorylated, or aspartate, which mimics the charge of phosphoserine, demonstrated that phosphorylation by CK1 δ reduces the HIF-1 transcriptional activity by preventing the interaction between HIF-1 α and HIF-1 β (*Kalousi et al. 2010*).

In order to further study the effect of this phosphorylation in HIF-1 activity, it is necessary to generate stably transfected mammalian cells expressing the wild-type HIF-1 α and the CK1 δ phosphorylation mutant forms. For this purpose, in the present study, genes HIF-1 α , HIF-1 α SA₂₄₇ and HIF-1 α SD₂₄₇ were subcloned in expression vectors suitable for stable transfection. These vectors mediate expression of HIF1 α wild type and mutants in fusion with the epitope Flag at the N-terminus. Flag encodes an octapeptide barely affecting the properties of the tagged recombinant proteins. Following subcloning, the expression, subcellular localization and the transcriptional activity of the recombinant Flag-HIF1 α , Flag-HIF1 α SA₂₄₇, Flag-HIF1 α SD₂₄₇ proteins were verified in transiently transfected mammalian cells by western blotting, indirect immunofluorescence and luciferase assays, respectively.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πολυπλοκότητα των μεταξωικών οργανισμών υφίσταται χάρη στην ενέργεια που παράγεται μέσω του οξειδωτικού μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Το οξυγόνο είναι κεντρικής σημασίας στη βιολογία επειδή αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ταυτόχρονα, δημιουργεί ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), που αντιδρούν με κυτταρικά μακρομόρια και μεταβάλλουν βιοχημικές και φυσικές τους ιδιότητες, με αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία ή θάνατο. Ως συνέπεια, οι μεταξωικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου.

Η κατανόηση των μηχανισμών, με τους οποίους τα κύτταρα και οι οργανισμοί αντιλαμβάνονται την έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, δηλαδή την υποξία, έχει εξελιχθεί ραγδαία κυρίως μέσα από την ανακάλυψη των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων HIF και την αποσαφήνιση του ρόλου τους στη ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου (*Semenza 2009*).

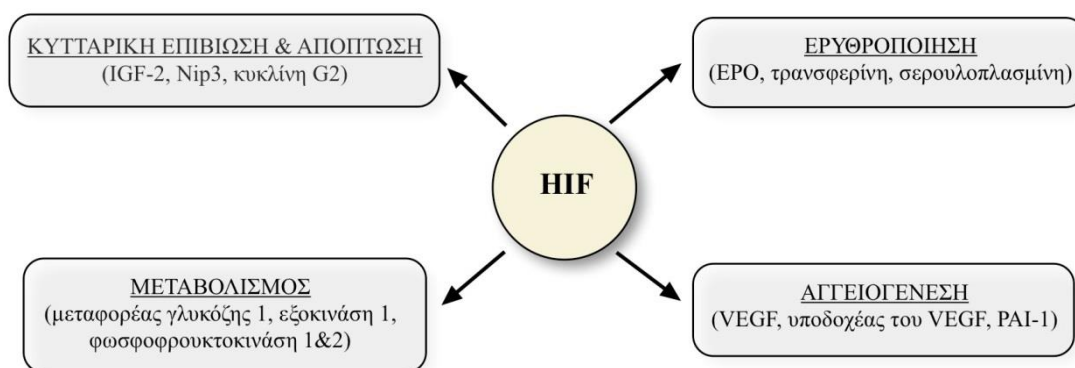
1.1. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ HIF

Οι HIFs αποτελούν μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που αποκρίνονται στην υποξία επάγοντας την μεταγραφή μιας πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, ο μεταβολισμός, η κυτταρική ανάπτυξη, η αγγειογένεση, η επιβίωση και η απόπτωση (Εικόνα 1). Οι HIFs είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο υπομονάδες, την α και την β. Η β υπομονάδα, HIF-1β ή αλλιώς ARNT, είναι κοινή ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των HIF και εκφράζεται συνεχώς. Η α υπομονάδα συναντάται σε τρεις ισομορφές, τον HIF-1α, τον HIF-2α και τον HIF-3α, οι οποίοι όταν ετεροδιμερίζονται με τον HIF-1β σχηματίζουν τους παράγοντες HIF-1, HIF-2 και HIF-3 αντίστοιχα.

Οι HIFs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε μια ειδική αλληλουχία DNA (5'-RCGTG-3'). Η αλληλουχία αυτή ονομάστηκε στοιχείο απόκρισης στην υποξία (HRE, Hypoxia Response Element), καθώς οι HIFs μέσω της πρόσδεσης σε αυτή, ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που βοηθούν τα κύτταρα να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν σε συνθήκες υποξίας (*Dengler et al. 2014*).

Ο HIF-2α παρουσιάζει 48% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία του με τον HIF-1α και έχει κοινές δομικές και βιοχημικές ιδιότητες, όπως ο ετεροδιμερισμός με τον ARNT και η πρόσδεση στα HREs. Η έκφραση όμως του HIF-2α είναι ιστοειδική σε αντίθεση με τον HIF-1α που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς. Ο HIF-2α εκφράζεται κυρίως στους νεφρούς, την καρδιά, τους πνεύμονες, το ενδοθήλιο και το λεπτό έντερο (*Dery et al. 2005*). Ο HIF-3α ανακαλύφθηκε μεταγενέστερα των HIF-1α και HIF-2α, εκφράζεται σε μια ποικιλία

ιστών, διμερίζεται με τον ARNT και προσδένεται στα HREs. Ο ρόλος του όμως είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος, αν και συνήθως θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής των HIF-1α και HIF-2α. Το γονίδιο του HIF-3α υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα, οδηγώντας σε τουλάχιστον επτά παραλλαγές, των οποίων ο ρόλος διερευνάται.



Εικόνα 1: Κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκεται ο HIF και αντίστοιχα ενδεικτικά γονίδια στόχοι του.

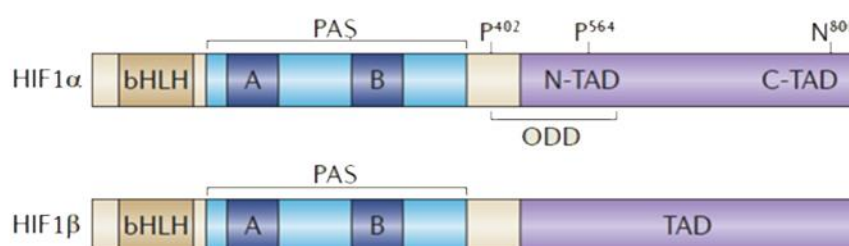
1.2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1

1.2.1. HIF-1α

Το ανθρώπινο γονίδιο του HIF-1α βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων. Η αλληλουχία του είναι αρκετά συντηρημένη, καθώς εμφανίζει πάνω από 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο.

Ο HIF-1α ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-PAS (PER-ARNT-SIM). Έτσι, ο HIF-1α στην αμινοτελική του περιοχή περιέχει τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για το διμερισμό του με τον ARNT και την πρόσδεσή του στα HREs. Πιο αναλυτικά, η περιοχή του HIF-1α που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 17-30 αποτελείται από βασικά αμινοξέα, τα αμινοξέα 31-71 αποτελούν την περιοχή HLH και τα αμινοξέα 99-343 την περιοχή PAS, η οποία διακρίνεται σε A (99-209) και B (242-343) υποπεριοχές (Scheuermann *et al.* 2007). Ο HIF-1α εκφράζεται διαρκώς στο κύτταρο και αποικοδομείται ταχύτατα σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης. Όντας μια ιδιαίτερα ασταθής πρωτεΐνη σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂), η ειδική αποικοδόμηση του HIF-1α ενεργοποιείται μέσω της περιοχής ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain). Η περιοχή αυτή βρίσκεται ανάμεσα στα κατάλοιπα 401-603. Σε συνθήκες υποξίας, δηλαδή σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (<6% O₂), ο HIF-1α σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, μια διαδικασία που γίνεται με τη βοήθεια ειδικών αλληλουχιών που ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) και αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην μεταφορά διαμέσου των πυρηνικών πόρων. Ο HIF-1α περιέχει δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού, το αμινοτελικό N-NLS (17-74) που αναγνωρίζεται από τις ιμφορτίνες 4

και 7 (Chachami *et al.* 2009) και το καρβοξυτελικό C-NLS (718-756) που αναγνωρίζεται από την ιμφορτίνη α. Ο HIF-1α διαθέτει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domain, TAD), οι οποίες εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τμήμα της επικράτειας του HIF-1α. Μία καρβοξυτελική, την C-TAD (831-826) και την αμινοτελική N-TAD (531-575), η οποία αλληλοεπικαλύπτεται με την περιοχή ODD. Η C-TAD περιοχή έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως ο CBP (CREB Binding Protein) και ο p300. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων περιλαμβάνει διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και πρόσδεση στα HREs, τα οποία βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών (Keith *et al.* 2012) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α και HIF-1β. Διακρίνονται οι περιοχές bHLH, PAS-A, PAS-B στις υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β και οι περιοχές ODD, N-TAD και C-TAD στον HIF-1α (Keith *et al.* 2012).

1.2.2. HIF-1β ή ARNT

Ο ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) αρχικά χαρακτηρίστηκε σαν υπομονάδα του ετεροδιμερούς με τον ενεργοποιημένο από ξενοβιοτικά ειδικό υποδοχέα AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Είναι και αυτός μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών bHLH-PAS και σημαντικός ρυθμιστής της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες προσαρμογής στην υποξία σε ξενοβιοτικά, αλλά και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η οργανογένεση και η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Beischlag *et al.* 2008).

Η έκφραση του γονιδίου του ARNT θεωρείται ιδιοστατική, αν και πρόσφατες μελέτες εξετάζουν την πιθανότητα επαγωγής από την υποξία (Wolff *et al.* 2013). Αποτελείται από 789 αμινοξέα και εκτός των περιοχών bHLH και PAS που ευθύνονται για την πρόσδεση στο DNA και τον ετεροδιμερισμό με άλλες πρωτεΐνες bHLH-PAS. Στο αμινοτελικό του άκρο έχει ένα NLS που ευθύνεται για τον πυρηνικό εντοπισμό του. Στο καρβοξυτελικό του άκρο, υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, η οποία δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην μεταγραφική ενεργότητα των ετεροδιμερών που σχηματίζει (Εικόνα 2).

1.3. ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1

Ο HIF-1 προάγει την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του οξυγόνου σε κυτταρικό, ιστικό και συστηματικό επίπεδο. Η ερυθροποίηση αντιπροσωπεύει την προσαρμοστική απόκριση στην συστηματική υποξία. Σε αντίθεση, η αγγειογένεση αντιπροσωπεύει μια τοπική ιστική απόκριση στην μειωμένη οξυγόνωση. Τα κύτταρα μεμονωμένα πρέπει να προσαρμοστούν σε μείωση του οξυγόνου, αναπρογραμματίζοντας το μεταβολισμό τους.

Ερυθροποίηση

Ο ρόλος των ερυθροκυττάρων είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες προς κάθε κύτταρο στο σώμα. Η μείωση της περιεκτικότητας σε οξυγόνο στο αίμα και η επακόλουθη υποξία των ιστών επάγει τη δράση του HIF-1 σε κύτταρα σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένων των εξειδικευμένων κυττάρων στο νεφρό που παράγουν ερυθροποιητίνη (EPO). Η EPO είναι μια ορμόνη που δεσμεύεται από το σχετικό υποδοχέα στα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα και έτσι διεγείρει την επιβίωση και διαφοροποίησή τους. Ανάλυση των αλληλουχιών που ρυθμίζουν την επαγόμενη από την υποξία μεταγραφή του γονιδίου της EPO, οδήγησε στην ανακάλυψη του HIF-1. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι ο HIF-1 συντονίζει την ερυθροποίηση, ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου και συγκεκριμένα στην απορρόφηση του από τον εντερικό αυλό, την ανακύκλωση του σιδήρου των ιστών, την παράδοση του σιδήρου στο μυελό των οστών για χρήση στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Σε αυτά τα γονίδια περιλαμβάνονται το γονίδιο της τρανσφερρίνης, του υποδοχέα της τρανσφερρίνης, της σερουλοπλασμίνης, της εψιδίνης. Επιπλέον, ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου του υποδοχέα της EPO (Semenza 2009).

Αγγειογένεση

Ο HIF-1 ενεργοποιεί συντονισμένα τη μεταγραφή πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν αγγειογόνους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), ο παράγοντας προερχόμενος από στρωματικά κύτταρα 1 (stromal-derived factor 1, SDF-1), ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (placental growth factor, PLGF), η αγγειοποιητίνη 1 και 2, καθώς και ο παράγοντας ανάπτυξης προερχόμενος από αιμοπετάλια Β (platelet-derived growth factor Β), οι οποίοι προσδένονται στους υποδοχείς τους στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, σε κύτταρα λείου μυός, σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και σε άλλα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Επιπλέον, ο HIF-1 ρυθμίζει την έκφραση του

CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) (Stellar et al. 2003), υποδοχέα του SDF-1, και την έκφραση του VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) (Okuyama et al. 2006), υποδοχέα του VEGF και PLGF. Έτσι, ο HIF-1 λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής για τον έλεγχο της αγγειογένεσης σε πολλαπλά επίπεδα. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου αποτυγχάνει σε έμβρυα με απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α (HIF-1α^{-/-}), ενώ ενήλικα ετερόζυγα ζώα (HIF-1α^{+/-}) παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου και αρτηριακή απόφραξη.

Ενώ η επαγόμενη από την υποξία έκφραση του HIF-1 παρέχει ένα μηχανισμό για να εξασφαλίσει ότι κάθε κύτταρο λαμβάνει επαρκή αιμάτωση σε νεαρά και υγιή ζώα, η γήρανση και ο διαβήτης εμποδίζουν την αγγειογένεση αναστέλλοντας την επαγωγή του HIF-1 (Semenza 2009).

Μεταβολισμός

Η ρύθμιση του μεταβολισμού είναι μια κύρια και πρωταρχική λειτουργία του HIF-1. Σε υποξικές συνθήκες, ο HIF-1 διαμεσολαβεί μια μετάβαση από οξειδωτικό σε γλυκολυτικό μεταβολισμό, μέσω της ρύθμισης των εξής γονιδίων (Semenza 2012):

- PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), κωδικοποιεί την κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού 1, η οποία φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase, PDH), αναστέλλοντας έτσι τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA, άρα και την έναρξη του κύκλου του Krebs
- LDHA (lactate dehydrogenase A), κωδικοποιεί την γαλακτική αφυδρογονάση A, η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό
- BNIP3 και BNIP3L, τα οποία μεσολαβούν στην επιλεκτική μιτοχονδριακή αυτοφαγία.

Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα στρέφονται στη γλυκόλυση, όταν το οξυγόνο είναι περιορισμένο για μιτοχονδριακή παραγωγή ATP. Ακόμα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι ινοβλάστες εμβρύων ποντικού με απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α, στους οποίους δεν ρυθμίζεται αρνητικά η αναπνευστική αλυσίδα κατά την υποξία, έχουν υψηλότερα επίπεδα ATP σε 1% O₂ από τα αγρίου τύπου κύτταρα σε 20% O₂, αποδεικνύοντας ότι υπό αυτές τις συνθήκες, το οξυγόνο δεν είναι περιοριστικό για την παραγωγή ATP.

Ωστόσο, τα κύτταρα με απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α, πεθαίνουν σε παρατεταμένες συνθήκες υποξίας λόγω της τοξικότητας των ROS. Αυτές οι μελέτες έχουν οδηγήσει σε μια παραδειγματική στροφή σε σχέση με την αντίληψή μας για την ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού: Ο σκοπός αυτής της αλλαγής είναι να αποτραπεί η υπερβολική μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, που διαφορετικά θα προέκυπταν λόγω της μειωμένης αποδοτικότητας της

μεταφοράς ηλεκτρονίων στην υποξία. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε βλαστικά κύτταρα, στα οποία η αποφυγή της βλάβης του DNA είναι κρίσιμη (Semenza 2012).

1.4. HIF-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι συμπαγείς όγκοι συχνά αντιμετωπίζουν υποξικό στρες. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως, ξεπερνώντας την ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του όγκου. Το υποξικό στρες μπορεί επίσης να προκληθεί από ελαττωματική αιμάτωση ως αποτέλεσμα ανώμαλης δομής και λειτουργίας των αιμοφόρων αγγείων του όγκου. Δεν αποτελεί έκπληξη, επομένως, ότι σε συμπαγείς όγκους συχνά ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα έκφρασης του HIF-1α. Πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα, αυξάνεται επίσης μέσω ανεξάρτητων από την υποξία μηχανισμών. Γενετικές αλλοιώσεις όπως η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL σε καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων, μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης σε καρκίνο του παχέως εντέρου και άλλες ογκογόνες περιπτώσεις, έχουν αναφερθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Συγκεντρωτικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η έκφραση του HIF-1α και η ακόλουθη ενεργοποίηση της απόκρισης στην υποξία είναι ευρέως διαδεδομένες σε πολλούς καρκίνους. Οι αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από τον HIF-1 παίζουν βασικό ρόλο σε διάφορες πτυχές της ανάπτυξης του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης, της απόπτωσης/αυτοφαγίας, του μεταβολισμού, της απόκρισης σε βλάβη του DNA, της μετανάστευσης των κυττάρων, της διήθησης του καρκίνου. Για παράδειγμα, ο HIF-1 προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα επιβίωσης αλλάζοντας το μεταβολισμό τους. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1 επάγει την έκφραση μεταφορέων της γλυκόζης και σχεδόν όλων των γλυκολυτικών ενζύμων οδηγώντας στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης, ενός χαρακτηριστικού των καρκινικών κυττάρων που περιγράφηκε πριν από πολλά χρόνια και ονομάστηκε φαινόμενο Warburg. Παράλληλα, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.3, ο HIF-1 επηρεάζει και την μιτοχονδριακή λειτουργία σταματώντας τον κύκλο του Krebs, και μειώνει την παραγωγή ROS. Η σημασία της δράσης του HIF-1 στον καρκίνο αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση του HIF-1α συσχετίζεται με κακή κλινική πρόγνωση σε πολλούς τύπους καρκίνου (Majmundar et al. 2010, Ratcliffe 2013).

1.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

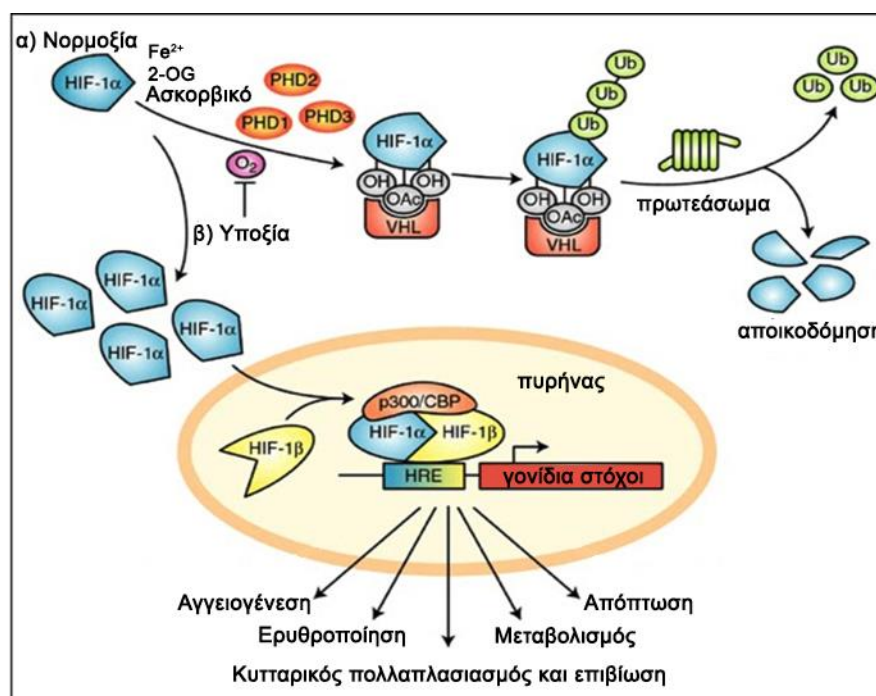
Το ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών που εμπλέκεται ο HIF-1α, είτε σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης, είτε σε υποξικές, απαιτεί πολύπλοκη ρύθμιση της μεταγραφικής του δράσης. Έτσι, η μεταγραφή του γονιδίου του, η σύνθεση και η σταθεροποίησή του, η μεταφορά

του στον πυρήνα, ο διμερισμός του με τον ARNT, η πρόσδεση στο DNA και η αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της μεταγραφής υπόκεινται σε ρύθμιση.

1.5.1. Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση - Υδροξυλίωση του HIF-1α

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης, ο HIF-1α συνεχώς μεταγράφεται και μεταφράζεται. Το οξυγόνο όμως οδηγεί στην αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες νορμοξίας, μια οικογένεια προλυλ-υδροξυλασών (PHD1-4, Prolyl-hydroxylases), και ιδιαίτερα η PHD2, υδροξυλιώνουν την α υπομονάδα του HIF1. Οι PHDs απαιτούν για τη δράση τους σίδηρο, α-κετογλουταρικό, ασκορβικό και μοριακό οξυγόνο για την τροποποίηση συντηρημένων καταλοίπων προλίνης (Pro402 και Pro564). Οι PHDs, όπως και άλλες οξυγενάσες που εξαρτώνται από το α-κετογλουταρικό, διαθέτουν μια τριάδα από δύο ιστιδίνες και μία καρβοξυλική ομάδα, ώστε να συντονίσουν το Fe(II) στο καταλυτικό τους κέντρο, αφήνοντας δύο θέσεις δέσμευσης για το α-κετογλουταρικό και μία για το μοριακό οξυγόνο. Κατά την κατάλυση, η διάσπαση του μοριακού οξυγόνου είναι συζευγμένη με την υδροξυλίωση του HIF-1α και την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρικό και διοξείδιο του άνθρακα. Το ασκορβικό απαιτείται για την πλήρη ενζυμική δραστηριότητα των PHDs. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η καταλυτική δράση των PHDs αναστέλλεται από ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του Krebs, όπως το κιτρικό, το ισοκιτρικό, το ηλεκτρικό, το φουμαρικό, το μηλικό, το οξαλοξικό και το πυροσταφυλικό (*Kaelin et al. 2008*). Τα κατάλοιπα προλίνης που υδροξυλιώνουν οι PHDs βρίσκονται στην περιοχή ODD του HIF-1α. Η υδροξυλίωσή τους επιτρέπει την σύνδεση της πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau, pVHL). Η pVHL αποτελεί μέρος του συμπλέγματος E3 λιγάσης της ουβικιτίνης, το οποίο πολυ-ουβικιτινιώνει τον HIF-1α προκαλώντας την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα (*Dengler et al. 2014*) (Εικόνα 3).

Σε συνθήκες υποξικού στρες, η δραστηριότητα των PHDs είναι μειωμένη με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α και την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Λόγω της εξάρτησής τους από το μοριακό οξυγόνο που αποτελεί άμεσο υπόστρωμα, οι PHDs έχουν προταθεί ως οι «αισθητήρες οξυγόνου» που συνδέουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου με τις μοριακές αποκρίσεις των HIFs. Η συγκέντρωση του οξυγόνου, όχι μόνο καθορίζει την ενεργότητα των PHDs, αλλά και την έκφρασή τους. Η έκφραση των PHD2 και PHD3 (εκτός της PHD1) αυξάνεται κατά την υποξία, καθώς τα γονίδιά τους είναι στόχοι της μεταγραφικής δράσης του HIF1 (*Majmundar et al. 2010*). Αυτή η ρύθμιση εξασφαλίζει τη γρήγορη παρέμβαση των PHDs όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 3: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α. Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες 402 και 564 του HIF-1α από τις PHDs και τότε μπορεί να προσδεθεί η πρωτεΐνη pVHL ώστε να ουβικιτινωθεί ο HIF-1α και να αποικοδομηθεί στο πρωτεάσωμα. Κατά την υποξία, οι PHDs είναι ανενεργές και ο HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με συνενεργοποιητές και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (προσαρμογή από Carroll et al. 2005).

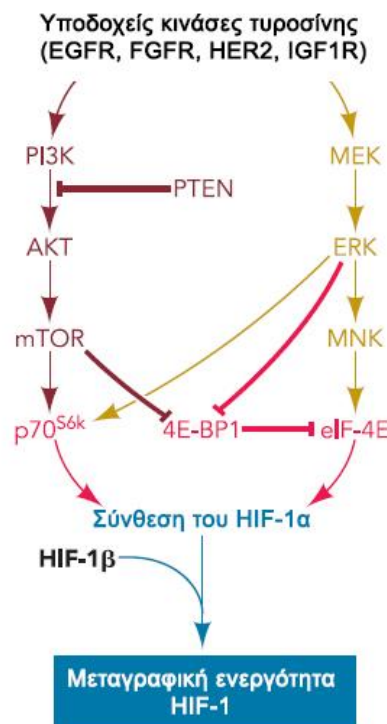
Η συγκέντρωση του οξυγόνου εκτός από τα επίπεδα του HIF-1α, ρυθμίζει και τη μεταγραφική του ενεργότητα. Ο HIF-1α υπόκειται σε μια επιπλέον ρυθμιστική υδροξυλίωση. Ο παράγοντας αναστολής του HIF-1 (Factor Inhibiting HIF, FIH-1), υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη (Asn803) εντός της περιοχής C-TAD του HIF-1α, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της μεταγραφής. Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η υδροξυλίωση αναστέλλει την δράση του HIF-1, φαίνεται να έγκειται στην διαταραχή της πρόσδεσης των συνενεργοποιητών p300/CBP στην περιοχή C-TAD. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι περιοχές N-TAD και C-TAD του HIF-1α είναι υπεύθυνες για την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων. Συνεπώς, ο FIH αναστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του C-TAD, αλλά αφήνοντας ανεπηρέαστο το N-TAD, οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης μόνο μιας ομάδας γονιδίων στόχων. Επίσης, η K_M του FIH, ο οποίος λειτουργεί ως διμερές, είναι μικρότερη από αυτές των PHDs, επιτρέποντας θεωρητικά στον FIH να ρυθμίζει την μεταγραφική δραστηριότητα των μορίων HIF-1α που ξεφεύγουν από την αποικοδόμηση. Έτσι, η υδροξυλίωση του HIF-1α αποτελεί διπλό ελεγκτικό μηχανισμό. Κατά τη νορμοξία ο HIF-1α αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα μέσω της δράσης των ενεργών PHDs και καθίσταται μεταγραφικά ανενεργός χάρη στη δράση του FIH (Webb et al. 2009).

1.5.2. Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση

1.5.2.1. Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η επαγωγή του HIF-1α μέσω διαφόρων αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και αγγειακών ορμονών επιτυγχάνεται με αύξηση της μετάφρασης του mRNA του, σε αντίθεση με την υποξία που στοχεύει στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του.

Αρκετές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) και των MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases) να μεσολαβούν στην αυξημένη μετάφραση του HIF-1α (*Dery et al. 2005*). Συγκεκριμένα, αυξητικοί παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) και ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας (insulin-like growth factor 1, IGF-1) ενεργοποιούν τους αντίστοιχους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την PI3K και τις MAPK. Η μεταγωγή σήματος μέσω αυτών των μονοπατιών (PI3K, MAPK) διεγείρει την κυτταρική επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Μια αναπόφευκτη συνέπεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου. Για αυτόν το λόγο, δεν προκαλεί έκπληξη ότι τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια επάγουν τη δράση του HIF-1α μέσω της πρωτεϊνοσύνθεσής του. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (γνωστή και ως κινάση πρωτεϊνών B, PKB) και αυτή την κινάση mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Η ενεργός mTOR φωσφορυλιώνει δύο βασικούς ρυθμιστές της μετάφρασης, την κινάση p70S6 και την προσδεδεμένη στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E, πρωτεΐνη 1 (4E-BP1). Η p70S6 με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6, ενώ η φωσφορυλίωση της 4E-BP1 αναστέλλει την ικανότητά της να αλληλεπιδρά και να αναστέλλει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF-4E), έναν σημαντικό ρυθμιστή της μετάφρασης. Αυτή η δράση της mTOR αυξάνει το ρυθμό μετάφρασης μιας ομάδας mRNA, στην οποία περιλαμβάνεται και το mRNA του HIF-1α. Στο μονοπάτι των MAPK, η ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) αφού έχει ενεργοποιηθεί από την MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase), ενεργοποιεί με τη σειρά της την MNK (MAPK-interacting kinase), η οποία φωσφορυλιώνει τον eIF-4E και διεγείρει τη δράση του απευθείας. Η ERK ομοίως με την mTOR αυξάνει το ρυθμό μετάφρασης των mRNAs με 5' κάλυμμα μέσω της p70S6 και της 4E-BP1 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του HIF-1α. Η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων σε υποδοχείς κινάσες τυροσίνης ενεργοποιεί τη μεταγωγή σήματος μέσω των PI3K και MAPK. Τα μονοπάτια της mTOR και των MAPK επάγουν τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α (προσαρμογή από Semenza 2009).

1.5.2.2. Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Παρά την κεντρική σημασία της οξυγονο-εξαρτώμενης ρύθμισης της δράσης του HIF-1α, ενδιαφέρον έχει και η ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου του. Μελέτες δείχνουν πως υπάρχει σύνδεση μεταξύ του μονοπατιού της φλεγμονής και του μονοπατιού της υποξίας, μέσω της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) στην μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, διέγερση με θρομβίνη, TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) ή H₂O₂, αλλά και βραχυπρόθεσμη υποξία, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του HIF-1α. Φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB (Inhibitory κB) οδηγεί στην ενεργοποίηση των υπομονάδων p50 και p65 του NF-κB, οι οποίες προκαλούν την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α (Görlach *et al.* 2008, Tsapournioti *et al.* 2013). Επίσης, πρόσφατη μελέτη σε προλιποκύτταρα έδειξε ότι η ινσουλίνη φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου του HIF-1α μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (Specificity protein 1) (Biswas *et al.* 2013). Συγκεκριμένα, προτάθηκε ότι η παραγωγή ROS από την οξειδάση του NADPH σε απόκριση στην ινσουλίνη, είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και την σύνδεσή του σε πλούσια σε GC περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α. Αντίθετα, η έκφραση του

HIF-1α αναστέλλεται από την κατασταλτική δράση της PKR (Protein Kinase R), μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Stat3 (Papadakis *et al.* 2010).

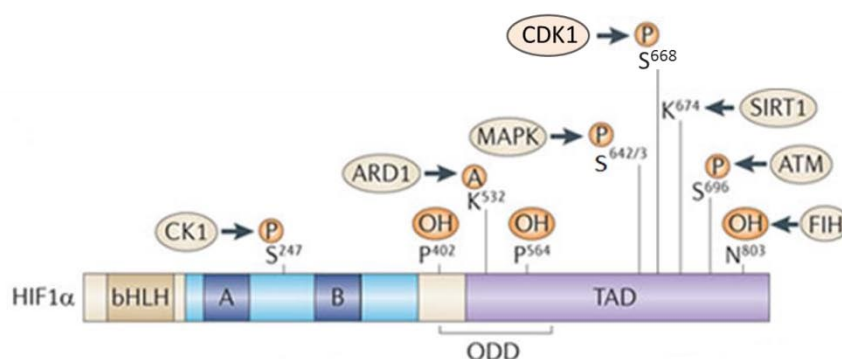
1.5.3. Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση της σταθερότητας

Εκτός της ρύθμισης της σταθερότητας του HIF-1α που εξαρτάται από τα επίπεδα οξυγόνου, τις PHDs και την pVHL, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) μπορεί και προσδένεται στον HIF-1α και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Elongin C, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με δράση λιγάσης ουβικιτίνης E3. Το σύμπλοκο αυτό ουβικιτινώνει τον HIF-1α και τον οδηγεί σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του οξυγόνου.

Επίσης, η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp90 (heat shock protein 90), μια πρωτεΐνη μοριακή συνοδός, προσδένεται στον HIF-1α. Η αναστολή της Hsp90 επάγει την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα και αυξάνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την RACK1. Γεγονός που υποδεικνύει ότι η Hsp90 παίζει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην αποικοδόμηση του HIF-1α από την πρωτεΐνη RACK1 (Semenza 2009).

1.5.3.1. Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Μια σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τη δράση του HIF-1α. Συγκεκριμένα, ο HIF-1α υπόκειται σε ακετυλίωση, S-νιτροσυλίωση, σουμoyλίωση και φωσφορυλίωση, εκτός από την υδροξυλίωση που ρυθμίζει τη σταθερότητά του (Εικόνα 5). Ο ρόλος των τροποποιήσεων αυτών στη ρύθμιση της δράσης του HIF-1α παρουσιάζεται στη συνέχεια.



Εικόνα 5: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α. Διακρίνονται οι θέσεις υδροξυλίωσης από τις PHDs και τον FIH, η θέση ακετυλίωσης από την ARD1 και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από την p44/42 MAPK και την CK1 (Keith *et al.* 2012).

Ακετυλίωση

Η ακετυλοτρανσφεράση ARD1 (ARrest Defective 1) ακετυλιώνει τον HIF-1α στην λυσίνη 532 που εντοπίζεται στην περιοχή ODD. Η ακετυλίωση της λυσίνης 532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίησή του. Μετάλλαξη της λυσίνης 532 σε αργινίνη είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη σταθερότητα του HIF-1α (Jeong *et al.* 2002). Εφόσον η δράση των ακετυλοτρανσφερασών δεν επηρεάζεται από το οξυγόνο, η ARD1 είναι δραστική και ακετυλιώνει τον HIF-1α ανεξάρτητα των συνθηκών οξυγόνου που επικρατούν. Ωστόσο, βρέθηκε ότι τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της ARD1 μειώνονται κατά την υποξία κρατώντας τα επίπεδα ακετυλίωσης του HIF-1α χαμηλά, υποδεικνύοντας την αρνητική ρύθμιση του γονιδίου της ARD1 από τον HIF-1α. Σε αντίθεση, άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση της έκφρασης της ARD1 με siRNA δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα του HIF-1α αλλά και ότι τόσο το mRNA όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ARD1 δεν ρυθμίζονται από την υποξία (Brahimi-Horn *et al.* 2005).

S-Νιτροσυλίωση

Η κυστεΐνη στη θέση 800 του HIF-1α έχει χαρακτηριστεί ως στόχος S-νιτροσυλίωσης από το μονοξειδίο του αζώτου (NO) που προέρχεται από την συνθάση του NO (nitric oxide synthase, NOS). Η συγκεκριμένη S-νιτροσυλίωση έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α, καθώς η ομάδα θειόλης στη θέση 800 θεωρείται σημαντική για την πρόσδεση του συνενεργοποιητή p300, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Yasinska *et al.* 2003).

Σουμοϋλίωση

Ο HIF-1α τροποποιείται από την RanBP2 E3 λιγάση, η οποία προκαλεί σύζευξη της πρωτεΐνης SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) κοντά και μέσα στην περιοχή ODD, στις λυσίνες 391, 477 και 532 (Brahimi-Horn *et al.* 2005). Η επίδραση της σουμοϋλίωσης του HIF-1α στην μεταγραφική του δράση είναι διφορούμενη. Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η σουμοϋλίωση μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Berta *et al.* 2007), επάγοντας την ουβικιτινίωσή του μέσω του pVHL (Lisy *et al.* 2008). Ενώ υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η σουμοϋλίωση του HIF-1α αυξάνει την μεταγραφική του ενεργότητα (Bae *et al.* 2004).

Φωσφορυλίωση

Άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες και φαίνεται να συμβαίνει είτε σε συνθήκες νορμοξίας είτε υποξίας και επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα

του HIF-1 με διάφορους μηχανισμούς. Στις κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α συγκαταλέγονται η p44/42 MAPK, η κινάση ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) και οι κινάσες καζεΐνης 1 και 2 (Casein Kinase 1, Casein Kinase 2).

- MAPK

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από την p44/42 MAPK στις σερίνες 641 και 643 (*Mylonis et al. 2006*). Ο βιολογικός ρόλος αυτής της φωσφορυλίωσης είναι να «καλύπτει» ένα σήμα πυρηνικής εξόδου (NES, Nuclear Export Signal) που βρίσκεται στην περιοχή MTD (MAPK Target Domain) (616-658), αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CRM1 που αποτελεί τον κύριο υποδοχέα πυρηνικής εξαγωγής στα θηλαστικά (*Mylonis et al. 2008*). Έτσι ο φωσφορυλιωμένος από την p44/42 HIF-1α παραμένει στον πυρήνα και μπορεί πλέον να προσδεθεί με τον ARNT για να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Μετάλλαξη των σερινών 641 και 643 σε αλανίνες κατήργησε τη φωσφορυλίωση από την p44/42 και ταυτόχρονα οδήγησε σε εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα, εντοπισμό του στο κυτταρόπλασμα και απενεργοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

- ATM

Η κινάση ATM φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην σερίνη 696. Σε συνθήκες υποξίας, η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την ATM έχει προταθεί ότι συμβάλλει στη σταθερότητα της πρωτεΐνης του HIF-1α με αποτέλεσμα να επάγει την μεταγραφή του REDD1. Η πρωτεΐνη REDD1 ενεργοποιεί το σύμπλοκο TSC (Tuberous Sclerosis Complex), με αποτέλεσμα την αναστολή του συμπλόκου mTORC1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTORC1 είναι κρίσιμο για την εξασφάλιση φυσιολογικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού και συντονίζει τα διεγερτικά σήματα από θρεπτικές ουσίες και αυξητικούς παράγοντες, αλλά και τα ανασταλτικά σήματα που προκύπτουν από ενδοκυττάριο στρες. Η απορρύθμιση του μονοπατιού του mTORC1 μέσω επαγωγής του HIF-1α συνδέεται με την ανάπτυξη συμπαγών όγκων (*Cam et al. 2010*).

- GSK3

Η κινάση GSK3 φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στις σερίνες 551, 589 και στην θρεονίνη 555. Αυτός ο συνδυασμός φωσφορυλίσεων από την GSK3 έχει βρεθεί ότι οδηγεί τον HIF-1α σε ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, δίχως να εμπλέκεται η pVHL (*Flügel et al. 2007*).

- CK2

Ενδείξεις υπάρχουν για φωσφορυλίωση του HIF-1α στην θρεονίνη 796 από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) με επακόλουθη αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η σταθερότητά του ή η πρόσδεσή του στο DNA. Έχει προταθεί ότι η αυξημένη

μεταγραφική δραστικότητα του HIF-1 πιθανώς οφείλεται στην επιλεκτική πρόσδεση του ARNT στον φωσφορυλιωμένο HIF-1α (*Brahimi-Horn et al. 2005*).

- CK1

Ενώ αντίθετα, μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και *in vitro* δέσμευσης, ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α στην σερίνη 247 από την κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ) καταστρέφει τη σύνδεσή του με τον ARNT, με αποτέλεσμα μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Πρόταση που επιβεβαιώθηκε και από τη μοντελοποίηση της δομής του συμπλόκου μεταξύ HIF-1α και ARNT (*Kalousi et al., 2010*).

1.6. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΙΝΑΣΩΝ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1 (CK1)

Τα μέλη της οικογένειας κινασών καζεΐνης 1 (CK1) είναι μεταξύ των πρώτων κινασών που περιγράφηκαν στην βιβλιογραφία. Οι κινάσες CK1 προτιμούν για υπόστρωμα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης που αμινοτελικά τους πλαισιώνονται από ήδη φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα ή όξινα αμινοξέα (συναινετική αλληλουχία: pSer/Thr-X-X-(X)-Ser/Thr). Έχουν χαρακτηριστεί επτά διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τις ισομορφές α, β, γ1, γ2, γ3, δ και ε (εκτός της CK1β, όλες οι ισομορφές εκφράζονται στον άνθρωπο). Όλες οι ισομορφές της CK1 είναι υψηλά συντηρημένες στην καταλυτική περιοχή κινάσης (51-98% ομολογία), ενώ οι ισομορφές δ και ε εμφανίζουν την υψηλότερη ομολογία. Ωστόσο, τα μέλη της οικογένειας CK1 διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος και πρωτοταγή δομή των ρυθμιστικών μη καταλυτικών καρβοξυτελικών περιοχών τους, με αποτέλεσμα τα μοριακά τους βάρη να κυμαίνονται από 32kDa (CK1α) έως 52,2kDa (CK1γ3). Καθώς τα μοτίβα αναγνώρισης για την CK1 απαντώνται στις περισσότερες κυτταρικές πρωτεΐνες, πάνω από 140 *in vitro* και *in vivo* υποστρώματα έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η ρύθμιση της δραστικότητας και της έκφρασης της CK1. Στους γνωστούς μηχανισμούς ρύθμισης της CK1 περιλαμβάνονται: (i) η ανασταλτική αυτοφωσφορυλίωση, (ii) η φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες πρωτεϊνών, (iii) η αλληλεπίδραση με κυτταρικές πρωτεΐνες και (iv) η ρύθμιση του υποκυτταρικού της εντοπισμού.

Με βάση το ευρύ φάσμα πρωτεϊνών στόχων, τα μέλη της οικογένειας CK1 εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή, διαδικασίες που σχετίζονται με τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου, η μεταγωγή σήματος ύστερα από βλάβες του DNA, οι κερκαδικοί ρυθμοί και η απόπτωση. Κατά συνέπεια, η απορρύθμιση ή δυσλειτουργία της CK1 σε σηματοδοτικά μονοπάτια υπεύθυνα για τη ρύθμιση της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ογκογένεση ή νευρολογικές ασθένειες. Για αυτό το λόγο, το ενδιαφέρον που έχουν οι ισομορφές της CK1 ως νέοι στόχοι φαρμάκων, έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών ειδικών αναστολέων (*Knippschild et al., 2014*).

1.7. Η ΚΙΝΑΣΗ ΚΑΖΕΪΝΗΣ 1δ ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF-1

Η ισομορφή δ της κινάσης καζεΐνης 1 (CK1δ) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην περιοχή PAS-B, η οποία είναι υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT. Συγκεκριμένα αναγνωρίστηκε και επιβεβαιώθηκε ως θέση φωσφορυλίωσης η σερίνη 247, η οποία είναι μέρος μοτίβου αναγνώρισης από τη CK1.

Πειράματα μεταλλαξιγένεσης, όπου η σερίνη 247 αντικαταστάθηκε με αλανίνη (ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται) ή με ασπαρτικό (φωσφομιμητική μετάλλαξη) έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α στη σερίνη 247 δεν επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α, ούτε τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 όμως παρουσιάστηκε ενισχυμένη από την μετάλλαξη S247A στην υπομονάδα του HIF-1α και μειωμένη από την φωσφομιμητική μετάλλαξη S247D.

Επιπρόσθετα, για τον αποκλεισμό της πιθανότητας η επίδραση της CK1δ να μην σχετίζεται ή να συνδέεται μερικώς με την φωσφορυλίωση της σερίνης 247, ο αγρίου τύπου HIF-1α, τα μεταλλάγματά του S247A και S247D εκφράστηκαν σε κύτταρα θηλαστικών και μετρήθηκε η ενεργότητα του HIF-1 παρουσία αναστολέων της CK1 και σε συνθήκες υπερέκφρασής της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρύθμιση του HIF-1α από την CK1δ *in vivo* αφορά αποκλειστικά ή κατά κύριο λόγο τη σερίνη 247, καθώς η μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμάτων HIF-1α-S247A και HIF-1α-S247D δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την αναστολή ή υπερέκφραση της CK1.

Συγκεντρωτικά, επειδή στα παραπάνω πειράματα φάνηκε ότι η ενίσχυση της δραστηριότητας του HIF-1α, όταν η φωσφορυλίωση της σερίνης 247 διαταράσσεται, δεν μπορεί να αποδοθεί στην μεταβολή στην έκφρασή του, στη σταθερότητά του ή στον πυρηνικό εντοπισμό του, προτάθηκε ότι η φωσφορυλίωση αυτή επηρεάζει τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT. Η πρόταση αυτή, η οποία υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι η θέση της σερίνης 247 βρίσκεται στην περιοχή PAS που ευθύνεται για τον ετεροδιμερισμό, εξετάστηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και συγκατακρήμνισης. Η παραπάνω πρόταση ενισχύθηκε επίσης από την κατασκευή ενός δομικού μοντέλου των περιοχών PAS-B του συμπλόκου HIF-1α/ARNT (Kalousi *et al.* 2010).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ρυθμίζει μέσω της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων την ομοιοστάση του οξυγόνου σε κυτταρικό, ιστικό και συστηματικό επίπεδο. Επιπλέον, ο HIF-1 παίζει σημαντικό ρόλο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος και οι ισχαιμικές ασθένειες. Το ευρύ φάσμα φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών καταστάσεων που εμπλέκεται ο HIF-1, είτε σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης είτε σε υποξία, απαιτεί ρύθμιση της μεταγραφικής του δράσης. Ένας από τους μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-1 είναι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από σημαντικό αριθμό κινασών. Ανάμεσα σε αυτές, έχει βρεθεί ότι η κινάση CK1δ φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη σερίνη 247. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον HIF-1β και κατά συνέπεια μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του ετεροδιμερούς HIF-1 (*Kalousi et al. 2010*). Αυτές οι παρατηρήσεις έγιναν με τη χρήση αναστολέων της κινάσης CK1δ και πλασμιδιακών κατασκευών με μεταλλαγμένα γονίδια του HIF-1α στη σερίνη 247 (HIF1α-SA₂₄₇, μετάλλαξη της σερίνης σε αλανίνη, ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται, HIF1α-SD₂₄₇, μετάλλαξη της σερίνης σε ασπαρτικό, το οποίο μιμείται το φορτίο της φωσφοσερίνης).

Για την περαιτέρω μελέτη της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ, είναι απαραίτητη η δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών με πλασμίδια που να εκφράζουν τον HIF-1α αγρίου τύπου, καθώς και τις μεταλλαγμένες του μορφές, HIF1α-SA₂₄₇ και HIF1α-SD₂₄₇. Για το σκοπό αυτό, τα γονίδια του HIF-1α και των μεταλλαγμάτων του κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν πλασμιδιακοί φορείς που κωδικοποιούν για την έκφραση του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, και επιπλέον είναι κατάλληλοι για τη σταθερή διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών. Ο επίτοπος Flag κωδικοποιεί το οκταπεπτίδιο DYKDDDDK. Τα πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου επίτοπου είναι το μικρό μέγεθος (1kDa) και η υδροφιλικότητά του, που ελαχιστοποιούν την επίδρασή του στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης με την οποία βρίσκεται σε σύντηξη. Επιπλέον, υπάρχει διαθέσιμο αντίσωμα για την ανίχνευση του επιτόπου Flag. Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος της έκφρασης και της λειτουργικότητας των υβριδικών μορφών Flag-HIF1α, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ από τα παραπάνω πλασμίδια ύστερα από παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα θηλαστικών, καθώς και μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των εκφραζόμενων πρωτεϊνών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

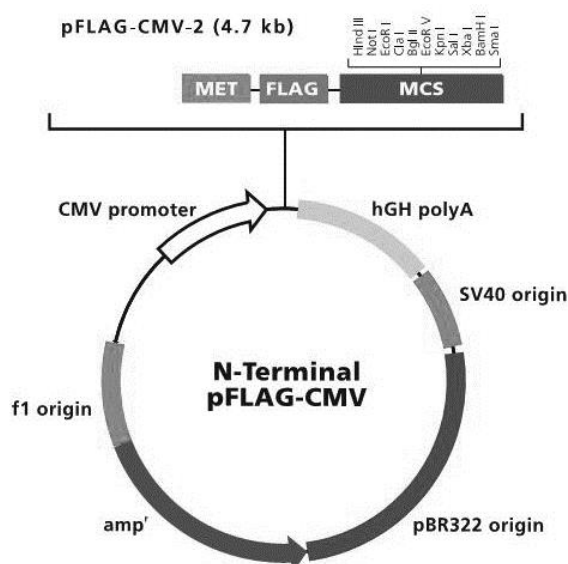
3.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

3.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς

Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς:

- pCMV2-Flag

Το πλασμίδιο pCMV2-Flag περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης του επίτοπου Flag στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS). Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α στη θέση αναγνώρισης του ένζυμου περιορισμού BamHI, η οποία βρίσκεται στην περιοχή MCS και μετά την αλληλουχία του επίτοπου Flag. Ο πλασμιδιακός φορέας pCMV2-Flag έχει μέγεθος 4,7kb και δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (Εικόνα 6).

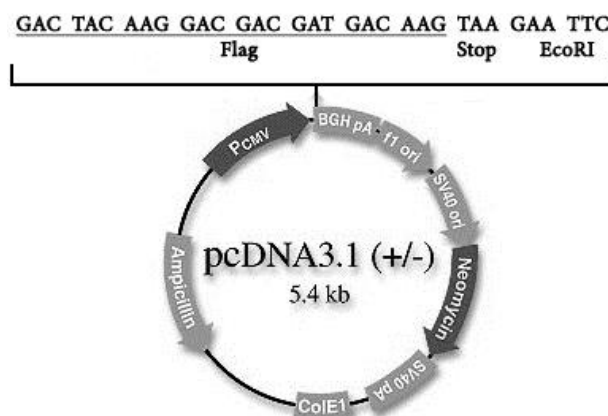


Εικόνα 6: Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pCMV2-Flag.

- pcDNA3.1-FlagC

Το πλασμίδιο pcDNA3.1-FlagC περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης του επίτοπου Flag στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS). Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α στη θέση αναγνώρισης του ένζυμου περιορισμού BamHI, η οποία βρίσκεται στην περιοχή MCS και μετά την αλληλουχία του επίτοπου Flag. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-FlagC έχει μέγεθος 5,4kb και δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει το γονίδιο

ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη, ένα αντιβιοτικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επιλογή κυττάρων θηλαστικών κατά την διαδικασία σταθερής διαμόλυνση τους. Επιπλέον, περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, ένα αντιβιοτικό επιλογής για βακτήρια (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pcDNA3.1-Flag.

- pEGFP-C1-HIF1 α , pEGFP-C1-HIF1 α -SA₂₄₇, pEGFP-C1-HIF1 α -SD₂₄₇

Οι πλασμιδιακές κατασκευές pEGFP-C1-HIF1 α , pEGFP-C1-HIF1 α -SA₂₄₇, pEGFP-C1-HIF1 α -SD₂₄₇ περιέχουν τα γονίδια του αγρίου τύπου HIF-1 α και των μεταλλαγμένων του μορφών HIF1 α -SA₂₄₇ και HIF1 α -SD₂₄₇ σε σύντηξη με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Η κλωνοποίηση έχει γίνει σε θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BamHI στην περιοχή MCS. Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 περιέχει τον ευκαρυωτικό υποκινητή CMV και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Kalousi *et al.* 2010).

- pGL3-VEGF-5HRE και pCI-Renilla

Το πλασμίδιο pGL3-VEGF-5HRE χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει 5 επαναλήψεις HREs του γονιδίου VEGF στον υποκινητή SV-40, ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (Mazure *et al.* 1996). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI-Renilla (Promega), όταν εισάγεται στα κύτταρα οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της *Renilla reniformis*.

3.1.2. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με θερμικό σοκ

3.1.2.1. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* Top10 [F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻, Invitrogen]. Ο μετασχηματισμός βακτηρίων είναι η διαδικασία με την οποία πλασμίδια εισάγονται στα

βακτήρια και είναι σημαντική όχι μόνο για μελέτες σε βακτήρια, αλλά και επειδή τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ως μέσο για αποθήκευση και αντιγραφή των πλασμιδίων.

Προκειμένου να γίνει αποτελεσματικότερη η εισαγωγή πλασμιδιακού DNA, βακτήρια *Escherichia coli* υποβλήθηκαν σε κατεργασία που τα καθιστά «δεκτικά» (competent cells) στο μετασχηματισμό. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος.

Εμβολιάστηκαν 5 ml θρεπτικού μέσου TYM_{str} (2% bactotryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,1M NaCl, 10mM MgSO₄, 0,1mg/ml στρεπτομυκίνη) με 5 μl από stock γλυκερόλης *E.coli* Top10 και επώστηκαν ολονύχτια στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε αραίωση 1:100 και επώση στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD_{600nm}) της καλλιέργειας να φτάσει στην τιμή 0,350-0,400 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων. Τότε η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm για 5 λεπτά στους 4°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml διαλύματος TFB-I (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH=7.0) και επώστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2ml διαλύματος TFB-II (10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH=7,0). Έγινε επώση στον πάγο για μια ώρα και τέλος τα δεκτικά κύτταρα μοιράστηκαν σε σωληνάρια τύπου erppendorf ανά 100μl και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.1.2.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Για τον μετασχηματισμό με θερμικό σοκ, σε 100μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* Top10 έγινε προσθήκη 0,5μg πλασμιδίου ή 10μl από διάλυμα αντίδρασης λιγάσης, υπό άσηπτες συνθήκες. Τα κύτταρα επώστηκαν 30 λεπτά στον πάγο και αμέσως μετά στους 42°C για 1 λεπτό. Ακολούθησε προσθήκη 500μl υγρού θρεπτικού μέσου LB (1% bactotryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl), επώση στους 37°C για 45 λεπτά και φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 1 λεπτό. Αφαιρέθηκαν 500μl υπερκείμενου θρεπτικού, το ίζημα επαναιωρήθηκε στο υπόλοιπο υπερκείμενο και επιστρώθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB Agar, το οποίο περιείχε αμπικιλίνη (LB_{amp}: 1% bactotryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar, 0,1mg/ml ampicillin). Τα τρυβλία επώστηκαν ολονύχτια στους 37°C, προκειμένου να αναπτυχθούν αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων.

3.1.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (miniprep) (miniprep)

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες εμβολιάστηκαν αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Top10 σε 3ml θρεπτικού υλικού LB_{amp} και επώστηκαν ολονύχτια στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 170rpm. Την επόμενη μέρα συλλέχθηκε 1,5ml

καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκε στις 13500rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50μl διαλύματος P1 (διάλυμα επαναιώρησης: 50M Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0.1ng/ml RNase) και ακολούθησε προσθήκη 100μl διαλύματος P2 (διάλυμα λύσης: 0.2M NaOH, 1% SDS) για τη λύση των βακτηρίων. Το διάλυμα επώσθηκε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 100μl διαλύματος CH₃COONa 3M pH 5,2 για εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης, το οποίο προκάλεσε σχηματισμό ιζήματος από μετουσιωμένες πρωτεΐνες και χρωμοσωμικό DNA. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια, όπου προστέθηκαν 2,7 όγκοι υπερκείμενου ($V_{\text{υπερκείμενο}}$) (π.χ. $2,7 \times 200\mu\text{l} = 540\mu\text{l}$) κρύα αιθανόλη 100% για την κατακρήμνιση του DNA. Τα σωληνάρια επώσθηκαν για 20 λεπτά στους -20°C, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 14000rpm στους 4°C και στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα του πλασμιδιακού DNA διαλυτοποιήθηκε σε 30μl νερό και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

3.1.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midipreparation)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας έγινε με χρήση των αντιδραστηρίων NucleoBond® Xtra Midi της εταιρίας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε 50ml LB_{amp} ενοφθαλμίστηκαν 10μl από υγρή καλλιέργεια *E.coli* όγκου 3ml, η οποία παρασκευάστηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.1.3. Η καλλιέργεια επώσθηκε στη συνέχεια ολονύχτια στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση στις 170rpm και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 4000rpm στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 8ml διαλύματος επαναιώρησης RES (resuspension buffer), έγινε προσθήκη 8ml διαλύματος λύσης LYS (lysis buffer) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα λύματα εξουδετερώθηκαν με 8ml διαλύματος εξουδετέρωσης NEU (neutralization buffer) και αναδεύτηκαν. Έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 30 λεπτά και το υπερκείμενο φορτώθηκε σε στήλες που έχουν εξισορροπηθεί με 12ml διαλύματος εξισορρόπησης EQU (equilibration buffer). Οι στήλες πλύθηκαν με 10ml διαλύματος EQU και απορρίφθηκε το έκλουσμα. Ακολούθησε δεύτερη πλύση της στήλης με 12ml διαλύματος πλύσης WAS (wash buffer) και απορρίφθηκε το έκλουσμα. Το DNA εκλούστηκε από τη στήλη με 5ml διαλύματος έκλυσης ELU (elution buffer). Η κατακρήμνιση του DNA έγινε με προσθήκη 5ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρωση στις 10.000rpm για 30 λεπτά στους 4°C σε φυγόκεντρο τύπου Sorvall. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, στο ίζημα προστέθηκαν 2ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 2 λεπτά, για την αφαίρεση της υπολοιπούμενης

αιθανόλης. Η επαναιώρηση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με 100μl νερό. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου erppendorf και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

3.1.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φωτομέτρηση

Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία και σύμφωνα με το νόμο των Lambert-Beer, η οπτική απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του απορροφούντος μορίου. Σε μήκος κύματος 260nm, ο μέσος συντελεστής απόσβεσης για δίκλωνο DNA είναι $0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Έτσι, η οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ δίκλωνου DNA, εφόσον η κυψελίδα έχει πάχος 1cm ($\text{OD}_{260\text{nm}}1 = 50 \mu\text{g/ml}$).

Για την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων στα 260nm, 2μl πλασμιδιακού DNA αραιώθηκαν σε 100μl νερό. Για τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 100μl νερό και επιπλέον, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm, όπου απορροφούν κυρίως οι πρωτεΐνες. Μέσω του λόγου $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ελέγχθηκε η καθαρότητα του δείγματος. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες από υλικό διαπερατό σε ακτινοβολία του οπτικού και υπεριώδους φάσματος, στην περιοχή 200-1600nm (Eppendorf® UVette®).

3.1.6. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού – Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης

Η πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιείται στη διαδικασία υποκλωνοποίησης ενός τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Ο φορέας τυπικά περιέχει μια περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS), όπου βρίσκονται πολλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων. Το ξένο τμήμα DNA μπορεί να εισαχθεί στον φορέα, αφού υποστούν πέψη ο φορέας και το τμήμα με το ίδιο ένζυμο και ακολουθήσει αντίδραση λιγάσης για την ένωσή τους. Η πέψη χρησιμοποιείται επίσης για τον έλεγχο της υποκλωνοποίησης όσον αφορά την εισαγωγή του ενθέματος αλλά και τον σωστό προσανατολισμό του.

Οι αντιδράσεις πέψης περιείχαν τα εξής:

- 5 μg πλασμιδιακό DNA
- 5 units ενζύμου περιορισμού
- 1x buffer (ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για κάθε ένζυμο περιορισμού, το οποίο παρέχεται μαζί με το ένζυμο)
- H_2O σε τελικό όγκο 20 μl

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37°C για 2 ώρες.

Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης:

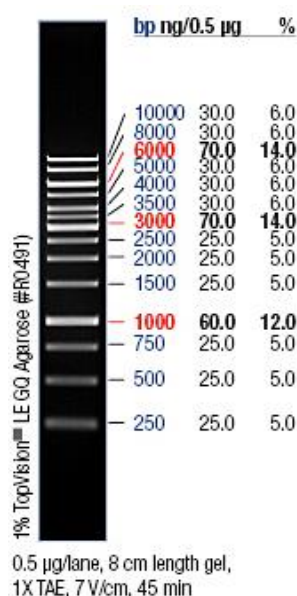
Οι πλασμιδιακοί φορείς επώαστηκαν με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Calf-intestinal alkaline phosphatase, CIP) για την απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο, ώστε να αποφευχθεί η επανένωση των άκρων του πλασμιδιακού DNA. Στις αντιδράσεις πέψης του κάθε πλασμιδιακού φορέα προστέθηκαν 10 units CIP και η επώαση συνεχίστηκε για άλλη μία ώρα. Στο τέλος το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75°C για δέκα λεπτά.

3.1.7. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού αυτών των μορίων σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης ως υλικό ηλεκτροφόρησης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανόμενων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά τη δημιουργία της πηκτής. Αγαρόζη που διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 100°C, πολυμερίζεται, δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία κάτω των 45°C. Το μέγεθος των πόρων και η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο διάλυμα. Η πηκτή τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό ηλεκτρικού ρεύματος. Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο κινούνται προς την άνοδο (+) της συσκευής ή την κάθοδο (-), στο ηλεκτρικό πεδίο που σχηματίζεται, ανάλογα με το φορτίο που διαθέτουν. Τα μόρια DNA φέρουν αρνητικό φορτίο, οπότε κινούνται προς την άνοδο της συσκευής. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA εξαρτάται εκτός από το μέγεθός τους και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοχημική διαμόρφωση των μορίων DNA, το δυναμικό που εφαρμόζεται και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0,04M Tris-οξικό, 0,001M EDTA pH 8). Η ανίχνευση των τμημάτων DNA έγινε με τη μη τοξική χρωστική νουκλεϊκών οξέων GelRed™ (Biotium), η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και την επανεκπέμπει στο ερυθρό ορατό φάσμα. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή της πηκτής 1,6g αγαρόζης διαλύθηκαν σε 160ml διαλύματος TAE και πριν πήξει το διάλυμα προστέθηκαν 16μl GelRed™ (10.000x). Για την προετοιμασία των δειγμάτων DNA, σε 20μl δείγματος προστέθηκαν 4μl διαλύματος φόρτωσης 6x (5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,42% κυανού του ξυλενίου). Η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα TAE στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στα ειδικά φρεάτια της πηκτής φορτώθηκαν τα δείγματα. Εφαρμόστηκε πεδίο τάσης 100V για μια ώρα. Παράλληλα με τα δείγματα έγινε ηλεκτροφόρηση μάρτυρα DNA

γνωστού μεγέθους (1kb ladder, GeneRuler, ThermoScientific) (Εικόνα 8). Η παρατήρηση του DNA έγινε σε λυχνία UV(364nm) με τη βοήθεια της χρωστικής GelRed™. Η πηκτή φωτογραφήθηκε σε συσκευή απεικόνισης (UVItec Imager).



Εικόνα 8: Μάρτυρας DNA 1kb. Διακρίνονται οι ζώνες DNA γνωστού μοριακού βάρους (Thermoscientific Web Page).

3.1.8. Ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η ανάκτηση των ενθεμάτων και των φορέων από πηκτή αγαρόζης έγινε με χρήση του QIAquick® Gel Extraction Kit της QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, μετά την πέψη των πλασμιδίων για την ανάκτηση των ενθεμάτων (HIF-1α και μεταλλάγματα) και των πλασμιδιακών φορέων, ηλεκτροφορήθηκαν οι συνολικοί όγκοι των αντιδράσεων (25µl) σε πηκτή αγαρόζης 1%. Με τη βοήθεια λυχνίας UV (364nm) εντοπίστηκαν και κόπηκαν οι επιθυμητές ζώνες. Ακολούθησε ζύγιση των τμημάτων και προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος QG για κάθε όγκο πηκτής (για κάθε 100µg πηκτής προστέθηκαν 300µl διάλυμα QG). Τα μείγματα επώαστηκαν στους 50°C για 10 λεπτά και αναδεύτηκαν ανά διαστήματα μέχρι να λιώσει η πηκτή. Προστέθηκε ένας όγκος ισοπροπανόλης και αναδεύτηκαν. Για τη δέσμευση του DNA, τα δείγματα φορτώθηκαν σε στήλες με μεμβράνη πυριτίου που τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου erppendorf. Το DNA προσροφάται στη μεμβράνη υπό τις συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Απορρίφθηκε το έκλουσμα και επανατοποθετήθηκε η στήλη στο σωληνάριο. Έγινε πλύση της στήλης με 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Απορρίφθηκε το έκλουσμα και επανατοποθετήθηκε η στήλη στο ίδιο σωληνάριο. Για την απομάκρυνση του υπολειπόμενου ρυθμιστικού διαλύματος έγινε φυγοκέντρωση για 1 λεπτό. Η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο

σωληνάριο και προστέθηκαν 30μl νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 1 λεπτό για την έκλουση του DNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%, με τη βοήθεια μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης.

3.1.9. Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Για τη σύνδεση των ενθεμάτων και των ανοιχτών πλασμιδιακών φορέων, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση περιείχε:

- πλασμιδιακό φορέα και ένθεμα σε αναλογία 1:3 (~60ng πλασμιδιακό φορέα και ~95ng ένθεμα)
- λιγάση T4 (20 units)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης
- H₂O σε τελικό όγκο 20μl

Τα μείγματα των αντιδράσεων επώαστηκαν ολονύχτια στους 16°C. Ως αρνητικός μάρτυρας πραγματοποιήθηκε και μια αντίδραση ελέγχου που περιείχε μόνο απομονωμένο και αποφωσφορυλιωμένο φορέα με λιγάση, χωρίς ένθεμα. Με αυτή την αντίδραση ελέγχεται η αποφωσφορυλίωση και εκτιμάται το ποσοστό επιτυχίας της αντίδρασης της λιγάσης.

3.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.2.1. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές:

- Huh7, κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος
- HEK293T, κύτταρα νεφρού από έμβρυο ανθρώπου

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO), το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη (Invitrogen). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε υγραινόμενο κλίβανο επώασης στους 37° C και σε 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί της καλλιέργειας έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εκμηδενίζεται ο κίνδυνος των επιμολύνσεων. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε 48-72 ώρες.

Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80-100% της επιφάνειας του τρυβλίου αποκολλούνταν από το υπόστρωμα και μεταφέρονταν σε νέα επιφάνεια καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα πλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer saline, PBS -137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄).

Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα 0.25% θρυψίνης - 0.53 mM EDTA και οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά στον κλίβανο επώασης, έως ότου τα κύτταρα αποκολληθούν από το υπόστρωμα.

Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν, ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα, και μοιράστηκαν σε τρυβλία. Σε κάθε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm προστέθηκε θρεπτικό υλικό έως τα 8ml.

3.2.2. Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών

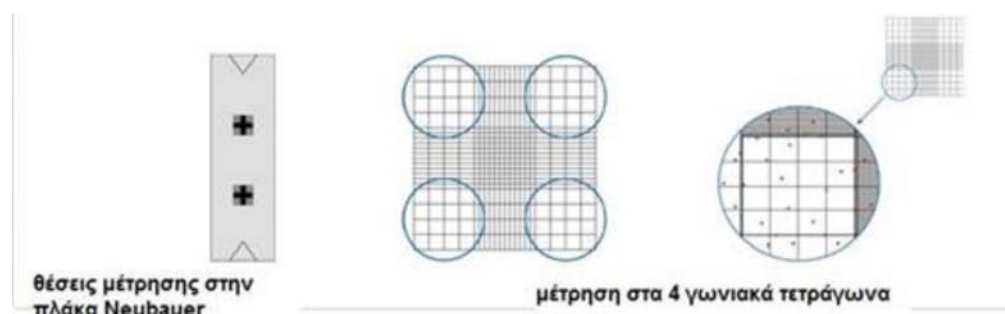
Για το πάγωμα των κυττάρων από μια καλλιέργεια, αρχικά έγινε πλύση των προσκολλημένων κυττάρων με διάλυμα PBS, προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 37°C για να αποκολληθούν. Προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (10% FBS) και επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο falcon και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Αναρροφήθηκε με προσοχή το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και έγινε επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό ψύξης (10% DMSO, διμεθυλοσουλφοξείδιο και 90% FBS). Τα κύτταρα μοιράστηκαν σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και καταψύχθηκαν σταδιακά, πρώτα για 2 ώρες στους -20°C και στη συνέχεια στους -80°C.

Η επανέναρξη καλλιιεργειών από τα κατεψυγμένα κύτταρα ξεκινά με την απόψυξη των κυττάρων που βρίσκονται στα cryotubes με επώαση στους 37°C στο υδατόλουτρο. Αφού προστέθηκε μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού στα κύτταρα στα cryotubes, τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε σωλήνα falcon, όπου προστέθηκαν 10ml DMEM, επαναιωρήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο 10cm. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε 5% CO₂.

3.2.3. Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue

Για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Trypan Blue (Sigma). Αρχικά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια καλλιιεργειας και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια, 100μl κυττάρων αραιώθηκαν σε 300μl PBS, προστέθηκαν 100μl Trypan Blue και τοποθετήθηκαν σε μια πλάκα-αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 9). Με τη χρήση μικροσκοπίου μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε καθένα από τα 4 γωνιακά τετράγωνα όγκου 0,1 mm³ και ο συνολικός αριθμός τους υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο :

$$\text{Αριθμός κυττάρων / ml} = \text{μέσος όρος κυττάρων στα 4 γωνιακά τετράγωνα} * \text{αραίωση}(5) * 10^4$$



Εικόνα 9: Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με Trypan Blue (προσαρμογή από Invitrogen Web Page).

3.2.4. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων θηλαστικών

Διαμόλυνση είναι η διαδικασία κατά την οποία εισάγεται ξένο DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά αντιδραστήρια διαμόλυνσης, όλα μη λιποσωμικά κατιοντικά πολυμερή. Τα κατιοντικά πολυμερή δημιουργούν θετικά φορτισμένα σύμπλοκα με το πλασμιδιακό DNA, τα οποία είναι συμπαγή και σταθερά. Αυτά τα σύμπλοκα προστατεύουν το DNA από αποικοδόμηση και το διευκολύνουν να εισέλθει εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα θετικά φορτισμένα σωματίδια (πολυμερές – DNA) δεσμεύονται σε ανιοντικά κατάλοιπα της κυτταρικής επιφάνειας και μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου με ενδοκυττάρωση.

- Αντιδραστήριο πολυαιθυλενιμίνης (Polyethylenimine, PEI)

Τα κύτταρα επιστρώνονται ώστε να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας προσκόλλησης πριν τη διαμόλυνση. Για αντιδράσεις σε τρυβλία επιφάνειας 35mm (6well plate), αναμίχθηκαν 270μl θρεπτικού υλικού χωρίς FBS και αντιβιοτικά με 3μg πλασμιδιακό DNA και 6μl αντιδραστηρίου PEI (1mg/ml), και επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στο μίγμα προστέθηκαν 810μl θρεπτικού υλικού με 5% FBS. Το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα, αφού αφαιρέθηκε το υπάρχον πλήρες θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επώστηκαν στους 37°C και 5% CO₂ για 2 ώρες και στη συνέχεια αντικαταστάθηκε το μίγμα διαμόλυνσης με πλήρες θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε επώαση στις ίδιες συνθήκες.

- jetPRIME[®] (Polyplus)

Τα κύτταρα επιστρώνονται ώστε να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας προσκόλλησης πριν τη διαμόλυνση. Για αντιδράσεις σε τρυβλία επιφάνειας 35mm (6well plate), αναμίχθηκαν 2μg DNA με 200μl ρυθμιστικού διαλύματος jetPRIME[®] και αναδεύτηκαν για 10 δευτερόλεπτα. Προστέθηκαν 4μl του αντιδραστηρίου jetPRIME[®] αναδεύτηκαν για δέκα δευτερόλεπτα και επώστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία περιείχαν 2ml πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (10% FBS). Μετά από 4 ώρες επώασης στους 37°C και 5% CO₂ αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό και συνεχίστηκε η επώαση.

- TurboFect (ThermoScientific)

Τα κύτταρα επιστρώνονται ώστε να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας προσκόλλησης πριν τη διαμόλυνση. Για αντιδράσεις σε τρυβλία επιφάνειας 35mm (6well plate), αναμίχθηκαν 2μg DNA με 200μl θρεπτικού υλικού χωρίς FBS και αντιβιοτικά, και 4μl αντιδραστήριο TurboFect. Το μίγμα αναδεύτηκε και επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα που καλύπτονταν με 800μl θρεπτικό υλικό που περιέχει 5% FBS. Μετά από 4 ώρες επώασης στους 37°C και 5% CO₂ αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό με πλήρες και συνεχίστηκε η επώαση.

Την επόμενη μέρα της διαμόλυνσης έγινε κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων, ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθούσε.

3.2.5. Συλλογή και λύση κυττάρων, παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος

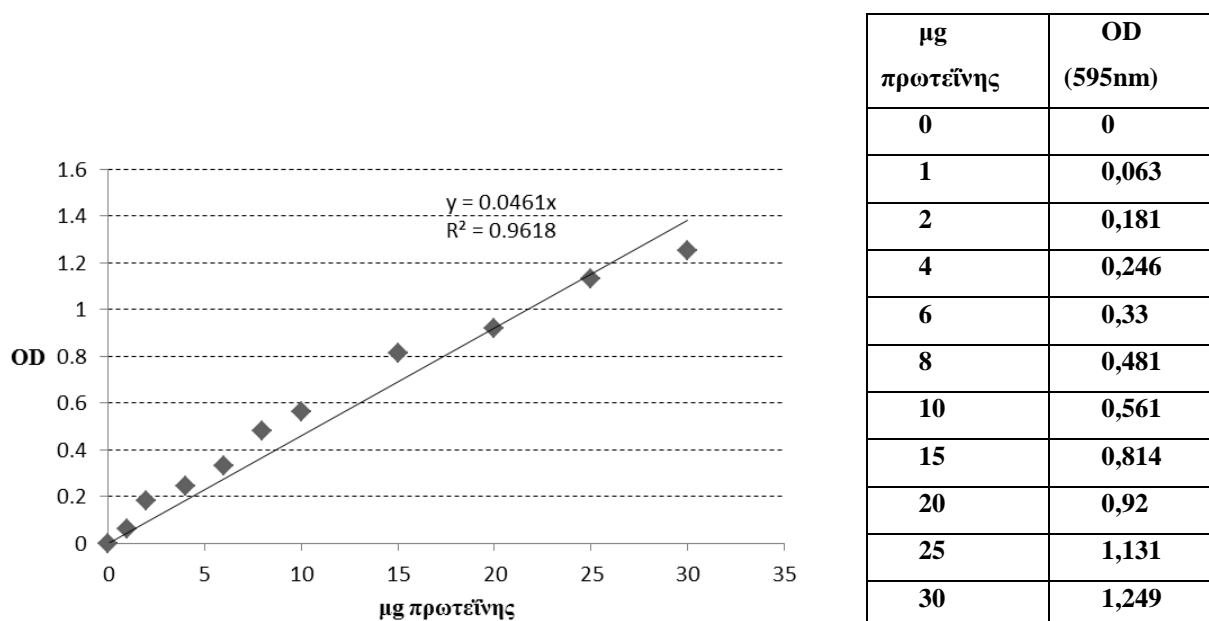
Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης, αρχικά έγινε πλύση των κυττάρων με PBS. Μετά την απομάκρυνση του PBS, στα κύτταρα προστέθηκε διάλυμα λύσης (120μl για επιφάνεια 35mm, 6well plate) (lysis buffer: 25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0,5mM DTT, 0,2mM PMSF) και έγινε αποκόλληση των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια, επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000rpm για 30 λεπτά στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο. Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρειάστηκαν 5μl από το υπερκείμενο, το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση.

3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.3.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford. Το αντιδραστήριο Biorad που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Σε όξινο περιβάλλον, η χρωστική προσδένεται στις πρωτεΐνες μέσω των βασικών αμινοξέων τους και ο αριθμός των προσδετών σε κάθε πρωτεΐνη είναι περίπου ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων που υπάρχουν στην πρωτεΐνη. Η πρόσδεση με την πρωτεΐνη προκαλεί αλλαγή του χρώματος της χρωστικής από καφέ σε μπλε, στα 595nm. Στα 5μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης από το εκχύλισμα κυττάρων προστέθηκαν 795μl νερό και 200μl από το αντιδραστήριο Biorad. Η απορρόφηση του δείγματος τελικού όγκου 1ml μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 595nm. Οι τιμές της απορρόφησης μετατράπηκαν σε

συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).

3.3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

Ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (Bis ακρυλαμίδη -MBA). Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδη.

Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής. Επιτελείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer: 0,25M Tris base, 1,92M γλυκίνη, 0,5% SDS) (pH 8,3) και σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel), στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel), το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το

πήκτωμα επιστοιβάξης. Στο πήκτωμα επιστοιβάξης, με τη βοήθεια του διαλύματος ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται, ενώ στο πήκτωμα διαχωρισμού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Τα δύο πήκτωμα διαφέρουν ως προς τη σύσταση και το pH τους:

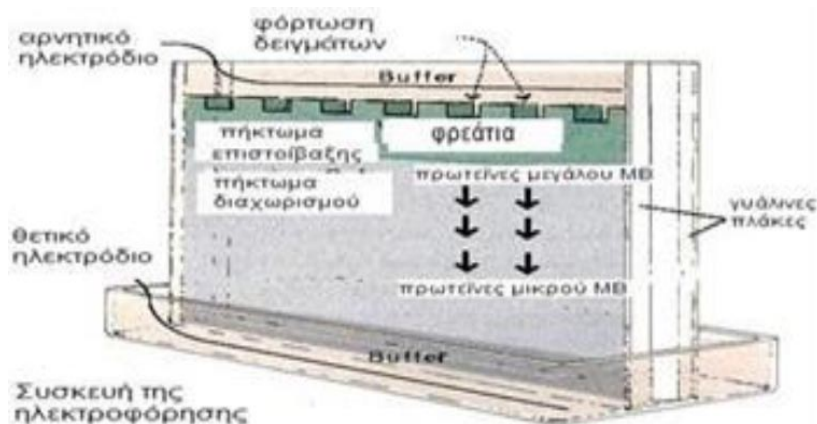
- Πήκτωμα διαχωρισμού 8%: 1,35ml 30% ακρυλαμίδιο/ 0.8% Bis ακρυλαμίδιο, 1,25ml 4x διάλυμα διαχωρισμού (0,375M Tris-HCl pH 8,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS), 4,2ml H₂O, 20μl 10% APS, 10μl TEMED
- Πήκτωμα επιστοιβάξης 4,5%: 0,3ml 30% ακρυλαμίδιο/ 0.8% Bis ακρυλαμίδιο, 0,5ml 4x διάλυμα επιστοιβάξης (0,125M Tris-HCl pH 6,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS), 1,17ml H₂O, 12,5μl 10% APS, 12,5μl TEMED

Το πήκτωμα επιστοιβάξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Επιπλέον, το ρυθμιστικό διάλυμα στο πήκτωμα επιστοιβάξης έχει pH 6,8 και έτσι το δείγμα «παγιδεύεται» ανάμεσα σε ιόντα Cl⁻, τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή ζώνη. Αυτό συμβαίνει διότι η τιμή pK_a της γλυκίνης είναι αρκετά υψηλότερη από το pH του πηκτώματος, και έτσι η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή. Τα ιόντα χλωρίου έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται, αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν, καθώς αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού κρατώντας τα σε κοντινή απόσταση. Έτσι σχηματίζεται μια «ζώνη» μέσα στην οποία βρίσκεται «παγιδευμένο» το δείγμα. Με λίγα λόγια, οι κινητικότητες των μορίων εξαρτώνται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο και όχι από το μέγεθος τους, διότι οι πόροι της πηκτής είναι αρκετά μεγάλοι. Όταν η «ζώνη» αυτή εισέλθει στο πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό (σταθερό pH και δυναμικό) ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος.

Σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα προστίθεται διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης. Για το σκοπό αυτό, προστέθηκε σε αναλογία 1:3, διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (250mM Tris-HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0,2% μπλε της βρωμοφαινόλης, 100mM DTT) και τα δείγματα

θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά. Τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις της πηκτής με σύριγγα τύπου Hamilton. Αναλύθηκαν 30 µg πρωτεΐνης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος.

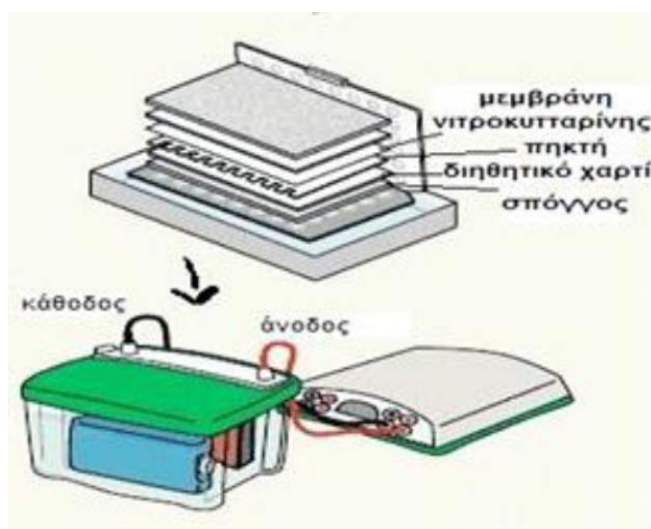
Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό μηχάνημα και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V, 40mA, για 1 ώρα (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (προσαρμογή από *Cellular Physiology Web Page*).

3.3.3. Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν με την ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου, σε υγρό περιβάλλον διαλύματος μεταφοράς. Σε ειδική διάταξη τοποθετήθηκαν διαδοχικά ένας σπόγγος, ένα διηθητικό χαρτί στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα ακόμη χαρτί και ένας σπόγγος. Όλα αυτά τα υλικά είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer: 39mM γλυκίνη, 48mM Tris base, 0,037% SDS, 20% μεθανόλη). Η διάταξη τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς και προστέθηκε 1 λίτρο διαλύματος μεταφοράς (Εικόνα 12). Οι πρωτεΐνες



Εικόνα 12: Διάταξη ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (προσαρμογή από *BIO-RAD Web Page*).

μεταφέρθηκαν σε συνθήκες 100V, 350mA για 1 ώρα. Στο διάλυμα γινόταν ανάδευση με μαγνήτη και υπήρχε πάγος για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau, προκειμένου να ελεγχθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών. Η χρώση με Ponceau είναι εύκολα αντιστρεπτή με πλύσεις με νερό και δεν επηρεάζει τις πρωτεΐνες που είναι προσκολλημένες στη μεμβράνη. Επίσης, σημειώθηκαν και οι ζώνες των μαρτύρων γνωστού μοριακού βάρους. Η μεμβράνη έπειτα πλύθηκε με απεσταγμένο νερό και με διάλυμα 1 X PBS-0,1% Tween 20.

3.3.4. Ανοσοαποτύπωση

Οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με την ηλεκτροφόρηση βρίσκονται πλέον προσκολλημένες σε ένα στερεό υπόστρωμα που είναι η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρωτεΐνη-στόχος αναγνωρίζεται με τη χρήση ενός αντισώματος, που αντιδρά ειδικά με αντιγονικούς επίτοπους, οι οποίοι εκτίθενται από την πρωτεΐνη-στόχο πάνω στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, για να ανιχνευτεί η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη IgG του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη, όπως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθεί η προσθήκη εξωγενούς υποστρώματος του ενζύμου δείκτη για την ανίχνευση της δεύτερης αυτής σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος.

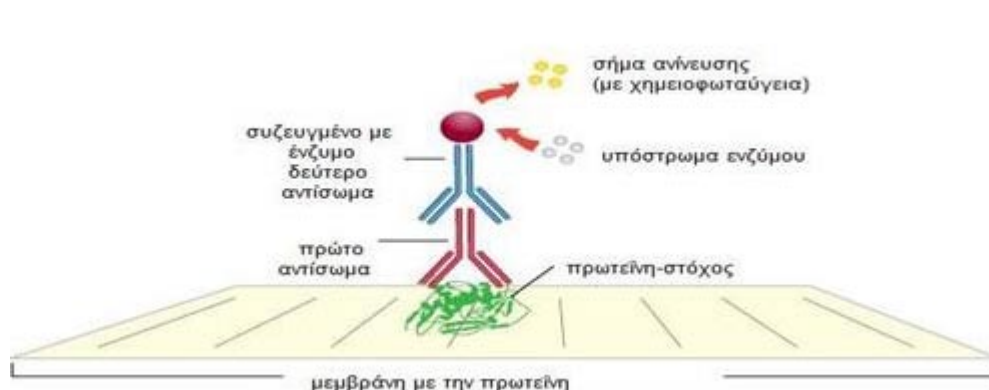
Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αρχικά επώαστηκε με ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού 1 X PBS-0,1% Tween 20 με 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, με σκοπό να κορεσθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Η μεμβράνη επώαστηκε ολονύχτια στους 4°C με το πρώτο αντίσωμα και έγιναν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα 1X PBS-0,1% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Έπειτα, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν και πάλι πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του αδέσμευτου αντισώματος.

Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν:

1 ^ο αντίσωμα	αραίωση	2 ^ο αντίσωμα	Αραίωση
anti-HIF1α (Rabbit)	1:1000	Anti-rabbit IgG (HRP conj.)	1:3000
anti-Flag (Mouse)	1:15000	Anti-mouse IgG (HRP conj.)	1:3000
anti-beta actin (Mouse)	1:5000	Anti-mouse IgG (HRP conj.)	1:3000

3.3.5. Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Στη χημειοφωταύγεια εκλύεται φως ως αποτέλεσμα της χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η υπεροξειδάση καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H_2O_2 με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα λουμινόλης (1,25mM σε Tris-Cl 8,5), με κουμαρικό οξύ (6,8mM σε DMSO) και 3% H_2O_2 για 1 λεπτό. Το σήμα ανιχνεύτηκε σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (UVItec chemiluminescence Imager) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών (προσαρμογή από Leinco Web Page).

3.3.6. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ενδοκυττάρια ανίχνευση πρωτεϊνών. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αναγνωριστούν λειτουργώντας ως αντιγόνα για αντίστοιχα αντισώματα. Τα αντισώματα μπορούν να αναγνωριστούν από δεύτερα αντισώματα συζευγμένα με μια φθορίζουσα χρωστική. Όταν στα κύτταρα επιδρά φως κατάλληλου μήκους κύματος επιτυγχάνεται φθορισμός.

Συγκεκριμένα, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτο 24 θέσεων (24 well plate), στις οποίες είχαν τοποθετηθεί αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm. Τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στις καλυπτρίδες και όταν κάλυψαν το 60-80% της επιφάνειας διαμολύνθηκαν με το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και έγινε πλύση με 1x PBS. Στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 1xPBS-3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι εσωτερικές δομές του κυττάρου, όπου βρίσκονται οι υπό μελέτη πρωτεΐνες. Ακολούθησε πλύση με 1xPBS δύο φορές για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεΰδη, και επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 1xPBS-1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C, ώστε οι κυτταρικές μεμβράνες να γίνουν διαπερατές στα αντισώματα. Ύστερα από 2 πλύσεις με 1xPBS-0.1% Tween 20, έγινε επώαση σε διάλυμα κορεσμού 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% BSA για 1 ώρα σε

θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό να κορεσθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Στα κύτταρα προστέθηκαν διαδοχικά τα αντισώματα: anti-HIF-1α rabbit (1:1000), με το οποίο επώαστηκαν ολονύχτια στους 4°C, και anti-Flag mouse (1:15000), με το οποίο επώαστηκαν για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Και τα δύο αντισώματα αραιώθηκαν σε 1xPBS- 0.1% Tween 20-1% BSA. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με τρεις πλύσεις με 1xPBS- 0.1% Tween 20. Ακολούθησε επώαση με τα δεύτερα αντισώματα [anti-rabbit CY3 (1:500), anti-mouse FITC (1:500)] για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Τα δεύτερα αντισώματα απομακρύνθηκαν και αυτά με τρεις διαδοχικές πλύσεις με 1xPBS-0.1% Tween 20. Ακολούθησε μια τελευταία πλύση με 1x PBS και στιγμιαία εμβάπτιση των καλυπτρίδων σε νερό. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, πάνω σε 4μl διαλύματος επιστοίβαξης Mowiol με τη φθορίζουσα χρωστική 49,6-diamidino-2-phenylindole- DAPI (20 μg/ml), για χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες αποθηκεύτηκαν για 20-30min στο σκοτάδι μέχρι να στεγνώσει το διάλυμα επιστοίβαξης. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA) και ειδική ψηφιακή φωτογραφική κάμερα (Leica DFC 480, Leica cameras, Solms, Germany).

3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΩΣ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (LUCIFERASE ASSAY)

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{2+} . Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ειδικού οργάνου (λουμινόμετρο). Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF-5HRE το οποίο περιέχει 5 HREs του γονιδίου του VEGF στην 5' περιοχή του υποκινητή (SV40) του γονιδίου της λουσιφεράσης και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο της λουσιφεράσης από τον οργανισμό *Renilla reniformis*. Η συν-διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με το αντιδραστήριο PEI σε πιάτα 12 θέσεων (12well plate). Η μέτρηση της δράσης λουσιφεράσης έγινε με το αντιδραστήριο Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα λύθηκαν με προσθήκη 150μl διαλύματος λύσης (PLB, passive lysis buffer) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια το λύμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια. Αναμίχθηκαν 20μl από το λύμα των κυττάρων με 20μl από το αντιδραστήριο LAR (Luciferase Assay Reagent) και το φως που παρήχθη

μετρήθηκε στο λουμινόμετρο (TD-20/20, Luminometer, TURNER DESIGNS). Για τη μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα (λουσιφεράση της *Renilla reniformis*), προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάριο 20μl από το διάλυμα Stop & Glo[®] Reagent και το φως που παρήχθη μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο. Το διάλυμα Stop & Glo[®] Reagent σταματάει την αντίδραση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* και ταυτόχρονα ενεργοποιεί την λουσιφεράση της *Renilla reniformis*.

Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το σήμα από τη λουσιφεράση *Renilla reniformis*. Η έκφραση των τιμών αυτών έγινε ως προς την τιμή για τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς ένθεμα HIF-1α.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

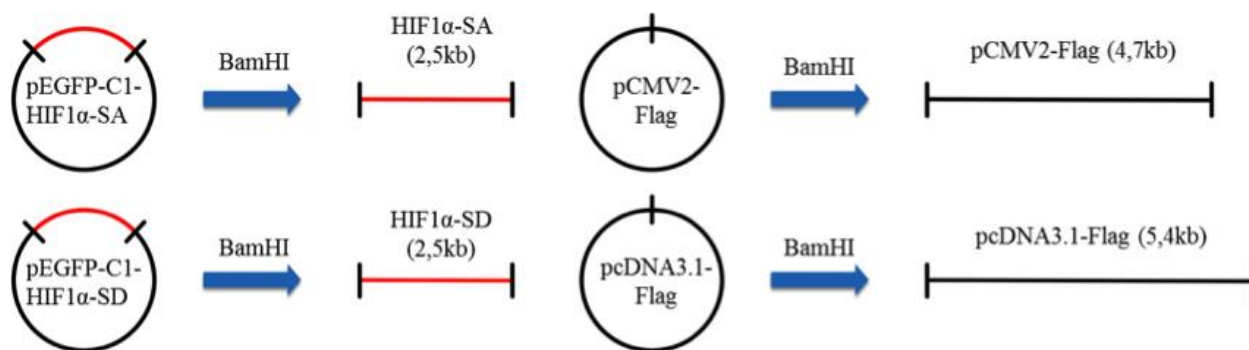
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την CK1δ, είναι απαραίτητη η δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών με πλασμίδια που να εκφράζουν τον αγρίου τύπου HIF-1α και τις μεταλλαγμένες του μορφές για τη θέση φωσφορυλίωσης, HIF1α-SA₂₄₇ και HIF1α-SD₂₄₇. Για το σκοπό αυτό, τα γονίδια αυτά κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τον επίτοπο Flag, ένα οκταπεπτίδιο που έχει ελάχιστη επίδραση στη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών, και είναι κατάλληλοι για την σταθερή διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών. Στη συνέχεια, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Flag-HIF1α, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη μεταγραφική τους ενεργότητα, ύστερα από παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα θηλαστικών με τα αντίστοιχα πλασμίδια.

4.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ HIF-1α-SA₂₄₇ ΚΑΙ HIF-1α-SD₂₄₇ ΣΤΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ pCMV2-Flag ΚΑΙ pcDNA3.1-Flag

Για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α, HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ καθώς και του αγρίου τύπου HIF-1α, σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pCMV2-Flag και pcDNA3.1-Flag. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-Flag φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων θηλαστικών, ενώ για τη χρήση του pCMV2-Flag πρέπει να γίνει συνδιαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει κατάλληλο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την επιλογή κυττάρων θηλαστικών. Ως πηγή των ενθεμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές pEGFP-C1-HIF-1α-SA₂₄₇ και pEGFP-C1-HIF-1α-SD₂₄₇ (Kalousi *et al.* 2010). Σε αυτές τις πλασμιδιακές κατασκευές, τα μεταλλάγματα του HIF-1α ήταν κλωνοποιημένα στην θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BamHI στην περιοχή MCS του πλασμιδιακού φορέα. Έτσι, για την απομόνωση των ενθεμάτων πραγματοποιήθηκε πέψη των αρχικών κατασκευών με BamHI. Συγκεκριμένα, 5μg πλασμιδιακό DNA υποβλήθηκαν σε πέψη με 20 units BamHI παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος σε τελικό όγκο 25μl.

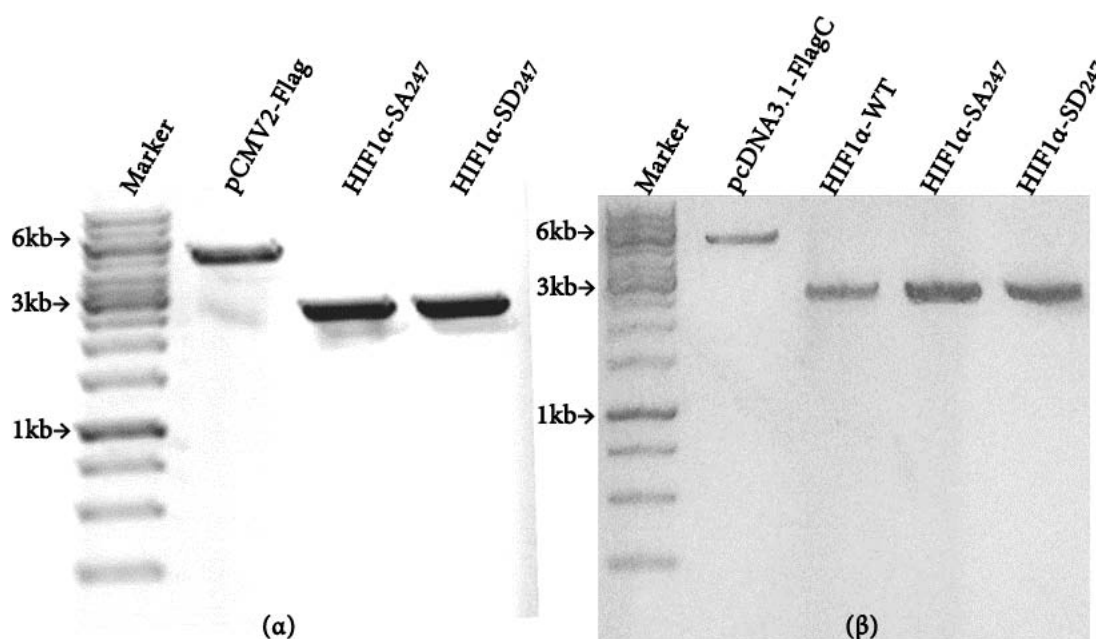
Με το ίδιο ένζυμο περιορισμού έγινε πέψη και των δύο πλασμιδιακών φορέων που επιλέχθηκαν και φέρουν την αλληλουχία του επίτοπου Flag. Όμοια με την πέψη για την απομόνωση των ενθεμάτων, 5μg DNA πλασμιδιακού φορέα υποβλήθηκαν σε πέψη με 20 units BamHI παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και σε τελικό όγκο 25μl.

Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% ώστε να διαχωριστούν τα προϊόντα της πέψης. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των επιθυμητών ζωνών που αντιστοιχούν στα ενθέματα και στους γραμμικούς πλασμιδιακούς φορείς (Εικόνα 14) και έγινε ανάκτηση του DNA από την πηκτή (gel extraction).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων πέψης με BamHI για απομόνωση των ενθεμάτων και των πλασμιδιακών φορέων.

Τα απομονωμένα τμήματα του DNA των πλασμιδιακών φορέων και των ενθεμάτων αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητά τους σύμφωνα με το μέγεθός τους και να γίνει ποσοτικοποίησή τους με τη βοήθεια του μάρτυρα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Ανάλυση των απομονωμένων ενθεμάτων και των πλασμιδιακών φορέων, μετά από πέψη με BamHI και ανάκτηση DNA από πηκτή αгарόζης. (α) Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού φορέα pCMV2-Flag και των ενθεμάτων HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ σε πηκτή αгарόζης 1%. (β) Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1-Flag και των ενθεμάτων HIF-1α-WT, HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ σε πηκτή αгарόζης 1%.

Για την εισαγωγή των ενθεμάτων στους ανοιχτούς πλασμιδιακούς φορείς πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης με αναλογία πλασμιδιακού φορέα προς το ένθεμα, 1:3. Εκτός των αντιδράσεων λιγάσης για την εισαγωγή κάθε ενθέματος στους δυο πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκε και μια αντίδραση λιγάσης χωρίς ένθεμα για τον κάθε αποφωσφορυλιωμένο

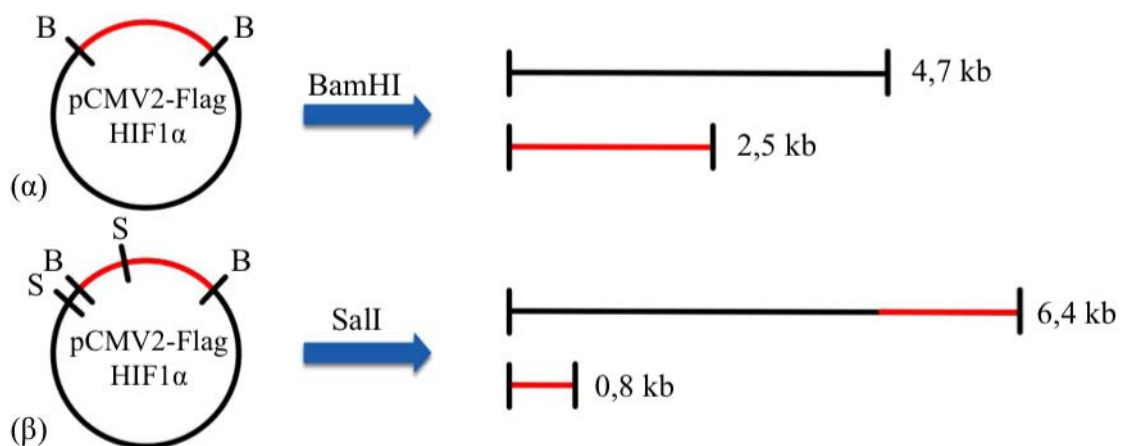
πλασμιδιακό φορέα, ως αρνητικός μάρτυρας, για να ελεγχθεί η μη επανακυκλοποίηση των φορέων.

Οι αντιδράσεις λιγάσης εισήχθηκαν σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* Top10 με τη διαδικασία του μετασχηματισμού με θερμικό σοκ. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB Agar με αμπικιλίνη, το αντιβιοτικό επιλογής των πλασμιδιακών φορέων, και επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C.

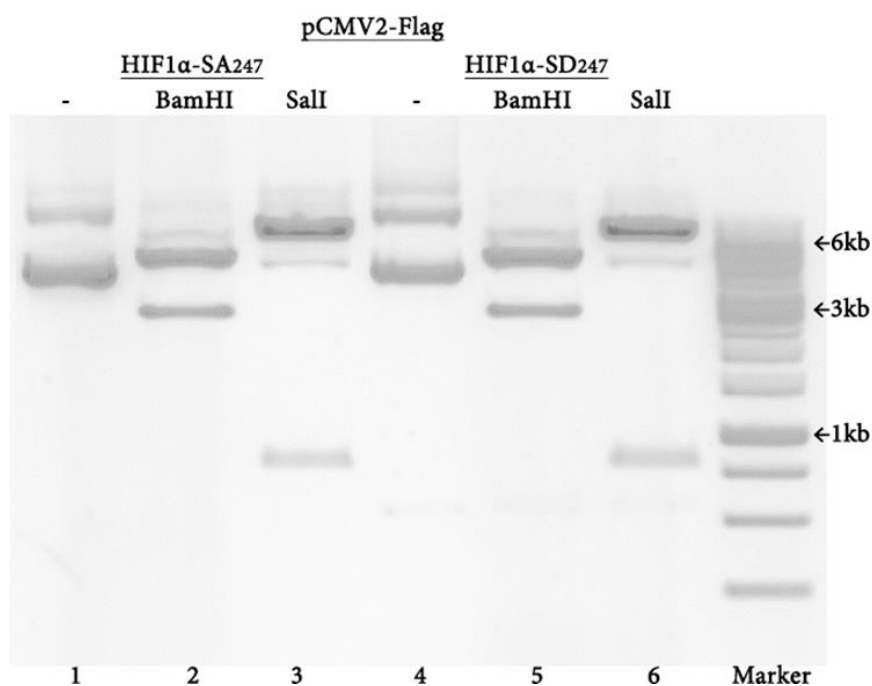
Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν, επιλέχθηκαν κλώνοι προς απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA σε μικρή και στη συνέχεια σε μεσαία κλίμακα, για να ελεγχθεί η παρουσία των πλασμιδίων pCMV2-Flag και pcDNA3.1-Flag που περιέχουν τα ενθέματα.

Το πλασμιδιακό DNA των κατασκευών pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ που απομονώθηκε υποβλήθηκε σε αντίδραση πέψης με το ένζυμο BamHI, αρχικά, για τον έλεγχο εισαγωγής των ενθεμάτων. Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% και οι προβλεπόμενες ζώνες στην πηκτή είναι 4,7kb και 2,5kb που αντιστοιχούν στα μεγέθη του φορέα και των ενθεμάτων (Εικόνα 16α). Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA των κατασκευών που περιείχαν το ένθεμα, υπέστη πέψη με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες για να ελεγχθεί αν τα ενθέματα εισήχθησαν με τον σωστό προσανατολισμό, δηλαδή αν τα απομονωμένα με BamHI ενθέματα ενώθηκαν με το 5' άκρο της αντι-νοηματικής αλυσίδας τους με το 3' άκρο των γραμμικών φορέων μετά την αλληλουχία του εκκινητή, ώστε να μπορεί να εκφραστεί η πρωτεΐνη. Ο έλεγχος προσανατολισμού των ενθεμάτων για τις πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ έγινε με την ενδονουκλεάση περιορισμού SalI και τα προβλεπόμενα τμήματα DNA είναι 6,4kb και 0,8kb για το σωστό προσανατολισμό (Εικόνα 16β) και 5,5kb και 1,7kb για το λάθος προσανατολισμό των ενθεμάτων.

Η ανάλυση των πλασμιδιακών κατασκευών pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και SalI παρουσιάζεται στην Εικόνα 17.

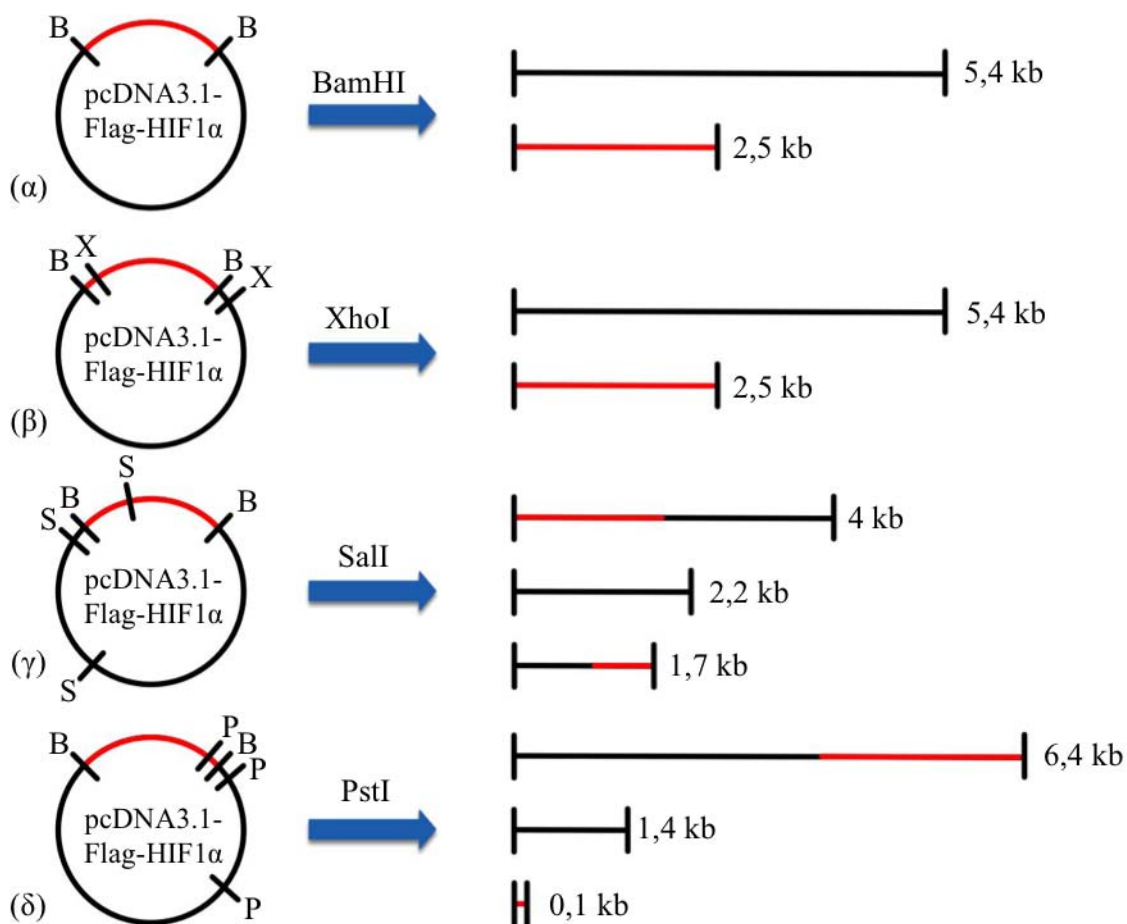


Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων πέψης α) με BamHI για τον έλεγχο παρουσίας ενθέματος στις πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag-HIF1α και β) με SalI για τον έλεγχο προσανατολισμού του ενθέματος.

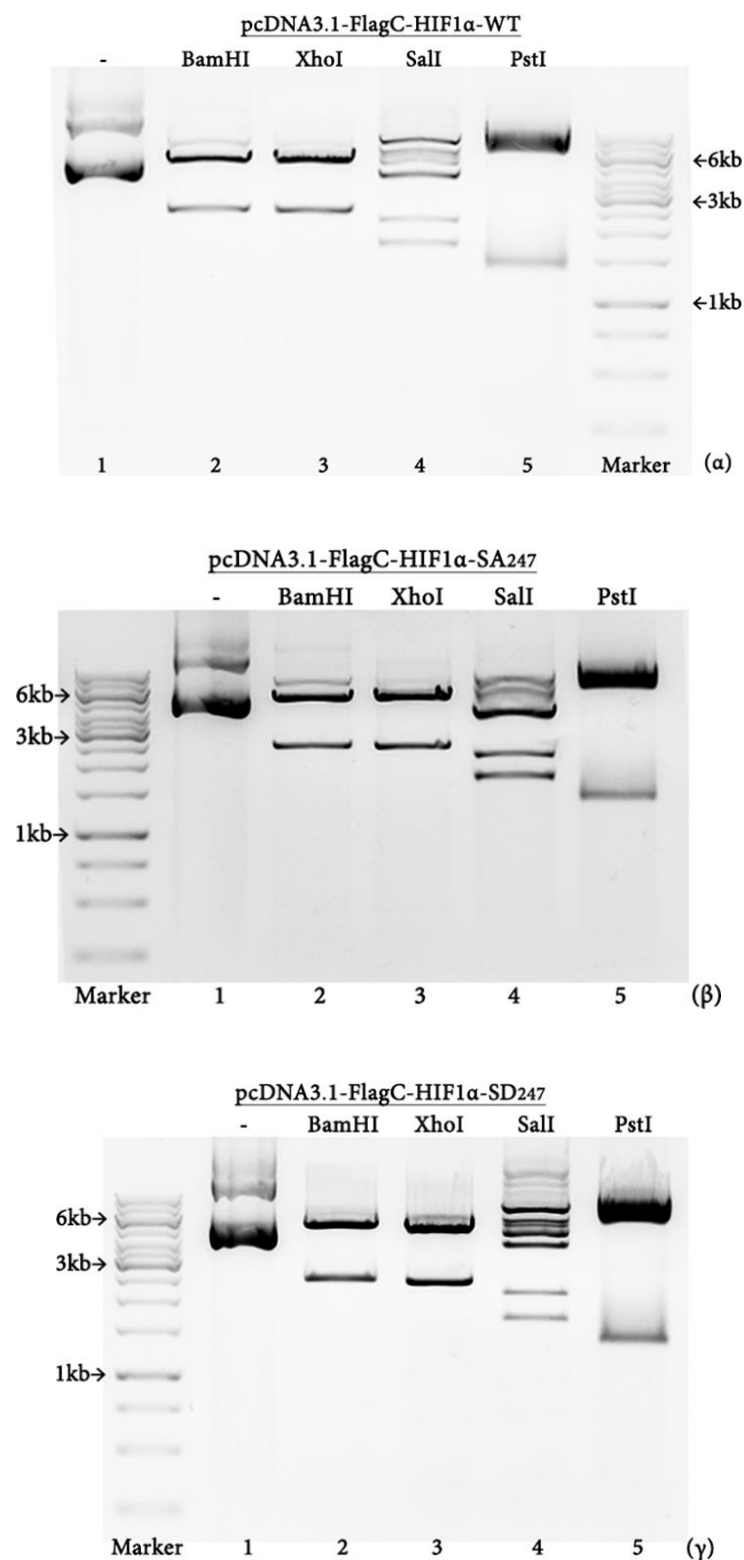


Εικόνα 17: Ανάλυση των πλασμιδιακών κατασκευών pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% των άκοπων πλασμιδιακών κατασκευών και των προϊόντων πέψης με BamHI (αναμενόμενα τμήματα 4,7kb και 2,5kb) και SalI (αναμενόμενα τμήματα 6,4kb και 0,8kb).

Ενώ το πλασμιδιακό DNA των κατασκευών pcDNA3.1-Flag-HIF1α-WT, pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ που απομονώθηκε υποβλήθηκε σε αντίδραση πέψης με το ένζυμο BamHI, αρχικά, για τον έλεγχο εισαγωγής των ενθεμάτων. Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% και οι προβλεπόμενες ζώνες στην πηκτή είναι 5,4kb και 2,5kb που αντιστοιχούν στα μεγέθη του φορέα και των ενθεμάτων (Εικόνα 18α). Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA των κατασκευών που περιείχαν το ένθεμα, υπέστη πέψη με τις ενδονουκλεάσες XhoI, SalI και PstI για να ελεγχθεί αν τα ενθέματα εισήχθησαν με τον σωστό προσανατολισμό. Τα προβλεπόμενα τμήματα DNA με το ένζυμο XhoI είναι 5,4kb και 2,5kb για το σωστό προσανατολισμό (Εικόνα 18β) και 7,8kb και 0,1kb για το λάθος προσανατολισμό των ενθεμάτων, με το ένζυμο SalI είναι 4kb, 2,2kb και 1,7kb για το σωστό προσανατολισμό (Εικόνα 18γ) και 3kb, 2,7kb και 2,2kb για το λάθος προσανατολισμό, και με το ένζυμο PstI είναι 6,4kb, 1,4kb και 0,1kb για το σωστό προσανατολισμό (Εικόνα 18δ) και 4,1kb, 2,4kb και 1,4kb για το λάθος προσανατολισμό. Η ανάλυση των πλασμιδιακών κατασκευών pcDNA3.1-Flag-HIF1α-WT, pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με τα ένζυμα περιορισμού BamHI, XhoI, SalI και PstI παρουσιάζεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων πέψης α) με BamHI για τον έλεγχο παρουσίας ενθέματος στις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-Flag-HIF1α, β) με XhoI, γ) με SalI και δ) με PstI για τον έλεγχο προσανατολισμού του ενθέματος.



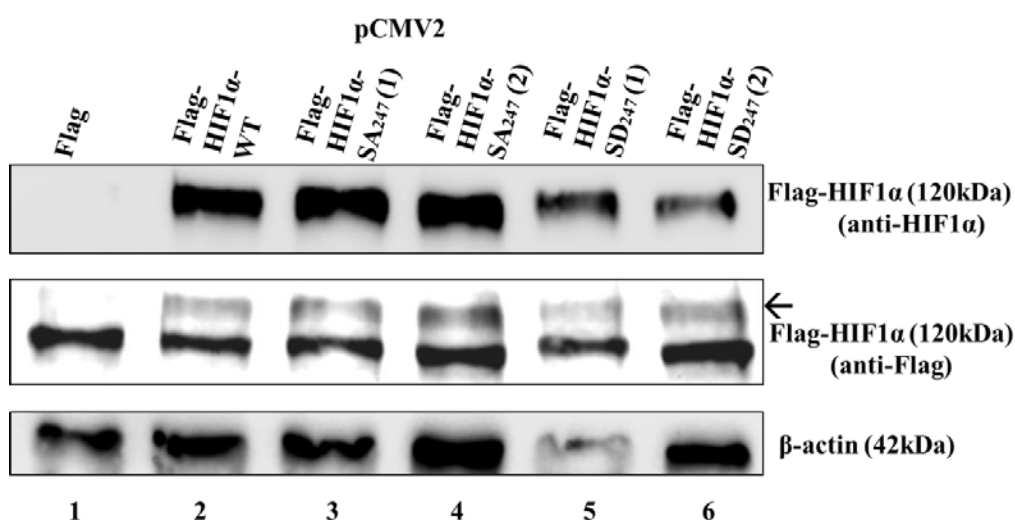
Εικόνα 19: Ανάλυση των πλασμιδιακών κατασκευών (α) pcDNA3.1-Flag-HIF1 α -WT, (β) pcDNA3.1-Flag-HIF1 α -SA₂₄₇, (γ) pcDNA3.1-Flag-HIF1 α -SD₂₄₇. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% των άκοπων πλασμιδιακών κατασκευών και των προϊόντων πέψης με BamHI (5,4kb και 2,5kb), XhoI (5,4kb και 2,5kb), SalI (4kb, 2,2kb και 1,7kb), PstI (6,4kb, 1,4kb και 0,8kb). Στα προϊόντα πέψης με SalI εμφανίζονται επιπλέον τμήματα εκτός των αναμενόμενων, πιθανότατα λόγω ατελούς ή μερικής πέψης των πλασμιδιακών κατασκευών.

4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1α

Μετά την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του γονιδίου του HIF-1α αλλά και των μεταλλαγμάτων του, HIF1α-SA₂₄₇ και HIF1α-SD₂₄₇, στους πλασμιδιακούς φορείς με τον επίτοπο Flag, ακολούθησε η μελέτη της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τους σε κύτταρα θηλαστικών.

4.2.1. Μελέτη της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α με ανοσοαποτύπωση

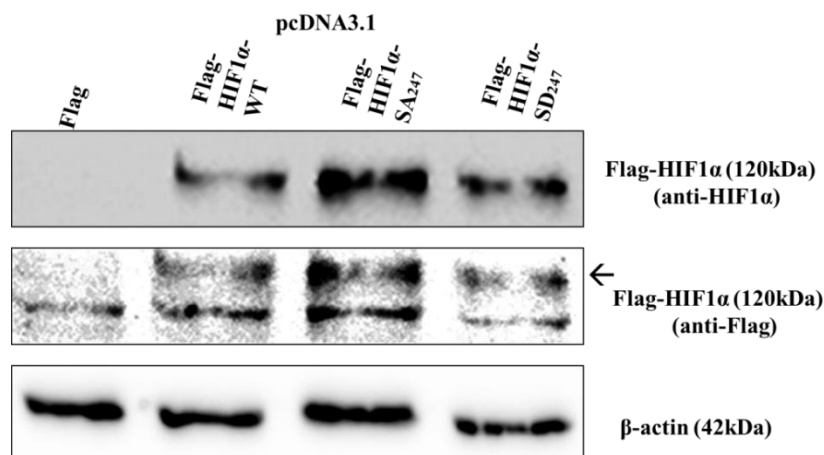
Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag από τις αντίστοιχες πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag, διαμολύνθηκαν με αυτές κύτταρα Huh7 με τη χρήση του αντιδραστηρίου jetPRIME® (Polyplus). Μετά από 24 ώρες επώασης, παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Παρατηρήθηκε ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HIF-1α-WT, HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, εκφράζονται στα κύτταρα καθώς ανιχνεύτηκαν με αντίσωμα για τον HIF-1α και με αντίσωμα για τον επίτοπο Flag (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανάλυση της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα anti-HIF-1α και με αντίσωμα anti-Flag. Η διαμόλυνση έγινε σε κύτταρα Huh7, με το αντιδραστήριο jetPRIME® (Polyplus) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Το πείραμα για τα δύο μεταλλάγματα έγινε εις διπλούν. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag από τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-Flag, διαμολύνθηκαν με αυτές κύτταρα Huh7 με τη χρήση του αντιδραστηρίου TurboFect (ThermoScientific) και 24 ώρες μετά την διαμόλυνση παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών και αναλύθηκαν με

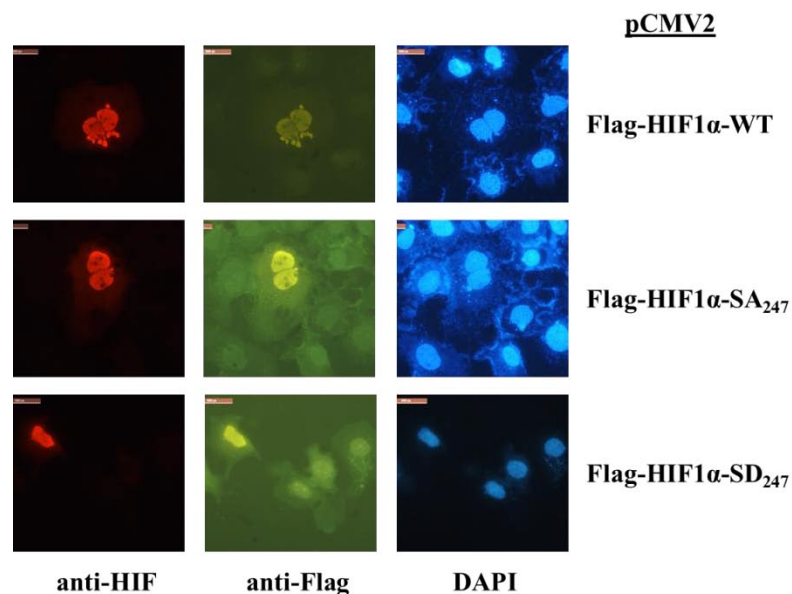
ανοσοαποτύπωση κατά Western. Παρατηρήθηκε ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HIF-1α-WT, HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, εκφράζονται στα κύτταρα καθώς ανιχνεύτηκαν με αντίσωμα για τον HIF-1α και με αντίσωμα για τον επίτοπο Flag (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ανάλυση της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα anti-HIF-1α και με αντίσωμα anti-Flag. Η διαμόλυνση έγινε σε κύτταρα Huh7, με το αντιδραστήριο TurboFect (ThermoScientific) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

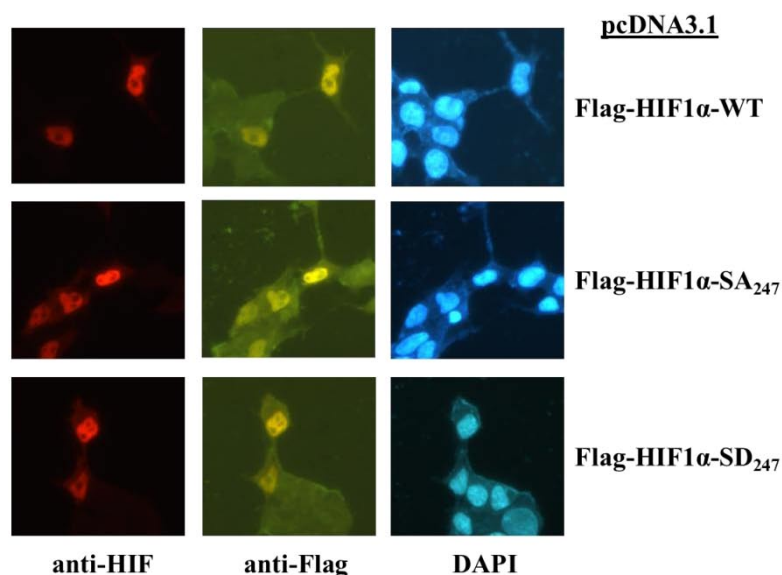
4.2.2. Μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των υβριδικών πρωτεϊνών Flag-HIF-1α, Flag-HIF-1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF-1α-SD₂₄₇, μελετήθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Κύτταρα Huh7 αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν κάνοντας χρήση του αντιδραστηρίου jetPRIME® (Polyplus) με τις πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag-HIF1α-WT, pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επώαστηκαν με αντισώματα για τον HIF-1α, τον επίτοπο Flag και τα ανάλογα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές δευτέρα αντισώματα. Κατά την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού, επιβεβαιώθηκε η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του HIF-1α, όπως αναμενόταν και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση. Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό, παρατηρήθηκε ότι ο αγρίου τύπου HIF-1α και οι μεταλλαγμένες μορφές του σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι του HIF-1α και με αντίσωμα έναντι του επίτοπου Flag σε κύτταρα Huh7. Η διαμόλυνση έγινε με το αντιδραστήριο jetPRIME® (Polyplus) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες πριν την επώαση με τα αντισώματα. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

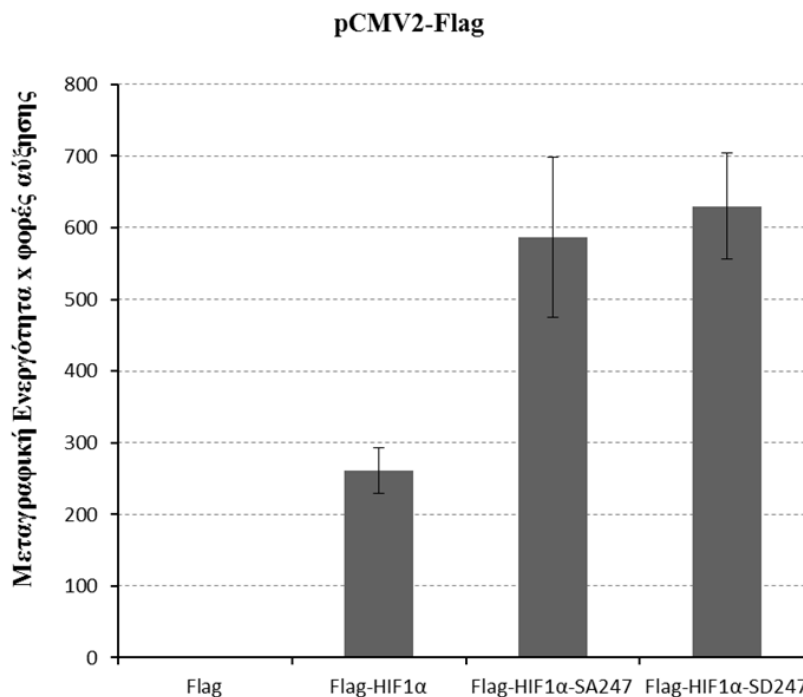
Για τον έλεγχο του υποκυτταρικού εντοπισμού των υβριδικών πρωτεϊνών Flag-HIF-1α, Flag-HIF-1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF-1α-SD₂₄₇, κύτταρα HEK293T αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και διαμολύνθηκαν κάνοντας χρήση του αντιδραστηρίου TurboFect (ThermoScientific) με τις κατασκευές pcDNA3.1-Flag-HIF1α-WT, pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επώαστηκαν με αντισώματα για τον HIF-1α, τον επίτοπο Flag και τα ανάλογα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές δεύτερα αντισώματα. Κατά την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού, επιβεβαιώθηκε η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του HIF-1α όπως αναμενόταν και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση. Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό, παρατηρήθηκε ότι ο αγρίου τύπου HIF-1α και οι μεταλλαγμένες μορφές του σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι του HIF-1α και με αντίσωμα έναντι του επίτοπου Flag σε κύτταρα HEK293T. Η διαμόλυνση έγινε με το αντιδραστήριο TurboFect (ThermoScientific) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες πριν την επώαση με τα αντισώματα. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

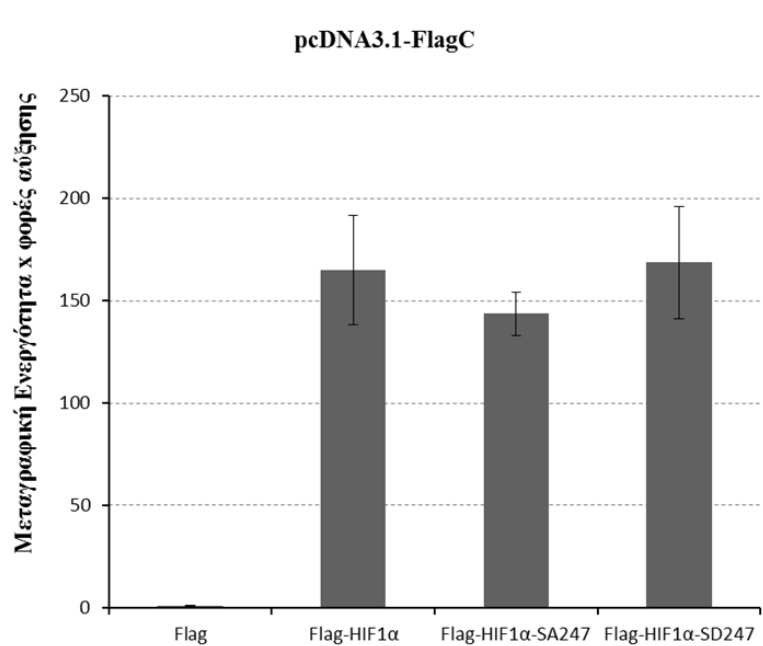
4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1α

Εφόσον παρατηρήθηκε ότι ο αγρίου τύπου HIF-1α και οι μεταλλαγμένες μορφές του σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, εκφράζονται και εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων, στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα αυτών των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση του γονιδίου της λουσιφεράσης του οργανισμού *Photinus pyralis* ως γονίδιο αναφοράς και το γονίδιο της λουσιφεράσης του οργανισμού *Renilla reniformis* ως γονίδιο μάρτυρας. Η διαμόλυνση με τις πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag-HIF1α-WT, pCMV2-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pCMV2-Flag-HIF1α-SD₂₄₇ μαζί με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla, έγινε σε κύτταρα HEK293T με το αντιδραστήριο πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες και λύθηκαν ώστε να μετρηθεί το σήμα από τις λουσιφεράσες στο λουμινόμετρο. Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το σήμα από τη λουσιφεράση *Renilla reniformis*. Η έκφραση των τιμών αυτών έγινε ως προς την τιμή για τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς ένθεμα HIF-1α (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με δοκιμασία λουσιφεράσης. Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293T με τις πλασμιδιακές κατασκευές pCMV2-Flag-HIF1α έγινε με το αντιδραστήριο PEI και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες πριν μετρηθεί το σήμα της λουσιφεράσης. Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το σήμα από τη λουσιφεράση *Renilla reniformis*. Η έκφραση των τιμών αυτών έγινε ως προς την τιμή για τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς ένθεμα HIF-1α. Οι τιμές προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα, που έγιναν εις τριπλούν.

Για τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-Flag-HIF1α-WT, pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και pcDNA3.1-Flag-HIF1α-SD₂₄₇, η συνδιαμόλυνση με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3-VEGF-5xHRE και pCI-Renilla, έγινε σε κύτταρα HEK293T με το αντιδραστήριο πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες και λύθηκαν ώστε να μετρηθεί το σήμα από τις λουσιφεράσες στο λουμινόμετρο. Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το σήμα από τη λουσιφεράση *Renilla reniformis*. Η έκφραση των τιμών αυτών έγινε ως προς την τιμή για τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς ένθεμα HIF-1α (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ με δοκιμασία λουσιφεράσης. Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293T με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-Flag-HIF1α έγινε με το αντιδραστήριο PEI και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες πριν μετρηθεί το σήμα της λουσιφεράσης. Οι τιμές του σήματος από τη δράση της λουσιφεράσης της *Photinus pyralis* κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το σήμα από τη λουσιφεράση *Renilla reniformis*. Η έκφραση των τιμών αυτών έγινε ως προς την τιμή για τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς ένθεμα HIF-1α. Οι τιμές προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα, που έγιναν εις τριπλούν.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Ο HIF-1 ελέγχει την μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, την ερυθροποίηση, την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, τον μεταβολισμό των κυττάρων, την απόπτωση, την διήθηση και μετάσταση του καρκίνου. Ως εκ τούτου, ο HIF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, αλλά και στην εξέλιξη των όγκων. Ο HIF-1 είναι ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από την υπομονάδα HIF-1α που επάγεται από την υποξία και από την υπομονάδα HIF-1β που εκφράζεται ιδιοστατικά. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α εκφράζεται συνεχώς, υδροξυλιώνεται από τις PHDs και αποικοδομείται ταχύτατα στο πρωτεάσωμα, ενώ κατά την υποξία, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου καθιστούν τις PHDs ανενεργές, σταθεροποιώντας τον HIF-1α και ενεργοποιώντας τη μεταγραφική του δράση. Εκτός της οξυγονο-εξαρτώμενης ρύθμισης, η δράση του HIF-1α υπόκειται σε ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής, σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης, αλλά και με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ένας από τους πολλούς μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-1α είναι η φωσφορυλίωση. Διάφορες κινάσες φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν τη δράση του. Μια από αυτές, η CK1δ, έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη σερίνη 247 και η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον HIF-1β και κατά συνέπεια μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του ετεροδιμερούς HIF-1 (*Kalousi et al. 2010*). Συγκεκριμένα, η μετατροπή της σερίνης 247 σε αλανίνη, ένα αμινοξύ που δεν φωσφορυλιώνεται, η χρήση χημικών αναστολέων για την CK1, αλλά και η εξειδικευμένη αποσιώπηση της CK1δ με siRNA, αύξησαν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Αντίθετα, η υπερέκφραση της CK1δ, η μετάλλαξη της σερίνης 247 σε ασπαρτικό, μία φωσφομιμητική μετάλλαξη, μείωσαν σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, υποδεικνύοντας άμεσα ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α στη σερίνη 247 από την CK1δ έχει αρνητική επίδραση στη δράση του.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η κλωνοποίηση των γονιδίων του αγρίου τύπου HIF-1α και των μεταλλαγμένων του μορφών HIF-1α-SA₂₄₇ και HIF-1α-SD₂₄₇ σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον επίτοπο Flag και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για κύτταρα θηλαστικών, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων θηλαστικών και τη μελέτη της επίδρασης αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών.

Ο επίτοπος Flag κωδικοποιεί το οκταπεπτίδιο DYKDDDDK και επιλέχθηκε ως επίτοπος του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης των μεταλλαγμάτων του HIF-1α, καθώς έχει μικρό μέγεθος, μόλις 1 kDa, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει τη δομή και λειτουργία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, με την οποία βρίσκεται σε σύντηξη. Επίσης, υπήρχε διαθέσιμο ειδικό αντίσωμα για τον επίτοπο Flag, γεγονός που διευκόλυνε τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τη μελέτη της

έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού των υβριδικών πρωτεϊνών του HIF-1α και των μεταλλαγμένων του μορφών. Επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pCMV2-Flag, στον οποίο υπήρχε ήδη κλωνοποιημένο το γονίδιο του αγρίου τύπου HIF-1α, αλλά για τη σταθερή διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών πρέπει να γίνει διαμόλυνση και με πλασμίδιο που περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας για το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής για κύτταρα θηλαστικών. Επιπλέον επιλέχθηκε και ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-Flag, ο οποίος εκτός του επίτοπου Flag περιέχει και γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη, αντιβιοτικό επιλογής για κύτταρα θηλαστικών.

Αφού πραγματοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν οι κλωνοποιήσεις των επιθυμητών γονιδίων, έγινε μελέτη της έκφρασης, του υποκυτταρικού εντοπισμού και της μεταγραφικής ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag. Σύμφωνα με τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κύτταρα Huh7, παρατηρήθηκε ότι όλες οι μορφές του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇, εκφράζονται. Αυτή η παρατήρηση έγινε και με αντίσωμα για τον HIF-1α και με αντίσωμα για τον επίτοπο Flag και οι πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν είχαν το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Για την υβριδική πρωτεΐνη Flag-HIF1α-SD₂₄₇ παρατηρήθηκε μειωμένη ανίχνευση σε σχέση με την Flag-HIF1α-WT και την Flag-HIF1α-SA₂₄₇, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε τοξικότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που οδηγεί πιθανώς σε μειωμένη επιβίωση των κυττάρων που την εκφράζουν. Από τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των υβριδικών πρωτεϊνών Flag-HIF1α-WT, Flag-HIF1α-SA₂₄₇ και Flag-HIF1α-SD₂₄₇ σε κύτταρα Huh7 και HEK293T, βρέθηκε ότι όλες οι μορφές του HIF-1α σε σύντηξη με τον Flag, εντοπίζονται στον πυρήνα, όπως ήταν αναμενόμενο και συμφωνεί με τα αποτελέσματα της δημοσιευμένης μελέτης που βασίστηκε η παρούσα εργασία (Kalousi *et al.* 2010).

Όσον αφορά τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α και των μεταλλαγμάτων του σε σύντηξη με τον Flag, βρέθηκε ότι όλες οι υβριδικές πρωτεΐνες είναι μεταγραφικά ενεργές. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν οι αναμενόμενες επιδράσεις των μεταλλάξεων S₂₄₇A και S₂₄₇D στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Χρήσιμο θα ήταν να εξεταστεί η μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών του HIF-1α ύστερα από διαμόλυνση κυττάρων σε ίδιες πειραματικές συνθήκες, με τις πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν τον επίτοπο Flag και με τις πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν τα γονίδια του HIF-1α σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της προαναφερθείσας μελέτης (Kalousi *et al.* 2010).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bae, S.H., Jeong, J.-W., Park, J.-A., Kim, S.-H., Bae, M.-K., Choi, S.-J. *Sumoylation increases HIF-1α stability and its transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun. (2004).
- Beischlag, T.V., Luis Morales, J., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H. *The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. (2008) 18(3):207-250.
- Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., Brahimi-Horn, M.C. *SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1α reduces its transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun. (2007) 360(3):646-652.
- BIO-RAD Web Page, Available from: <http://www.bio-rad.com>.
- Biswas, S., Mukherjee, R., Tapryal, N., Singh, A.K., Mukhopadhyay, C.K. *Insulin regulates hypoxia-inducible factor-1α transcription by reactive oxygen species sensitive activation of Sp1 in 3T3-L1 preadipocyte*. PLoS One. (2013) 8(4):e62128.
- Brahimi-Horn, C., Mazure, N., Pouyssegur, J. *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1α requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal. (2005) 17(1):1-9.
- Cam, H., Easton, J.B., High, A., Houghton, P.J. *mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1α*. Mol Cell. (2010) 40(4):509-520.
- Carroll, V.A., Ashcroft, M. *Targeting the molecular basis for tumor hypoxia*. Expert Rev Mol Med. (2005) 7:1-16.
- Cellular Physiology Web Page, Available from: <https://cellularphysiology.wikispaces.com>.
- Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J.M., Braliou, G.G., Gorlich, D., Simos, G. *Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1α into the nucleus involves importins 4 and 7*. Biochem Biophys Res Commun. (2009) 390(2):235-240.

- Dengler, V.L., Galbraith, M.D., Espinosa, J.M. *Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors*. Crit Rev Biochem Mol Biol. (2014) 49(1):1-15.
- Dery, M.A., Michaud, M.D., Richard, D.E. *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol. (2005) 37(3):535-540.
- Flügel, D., Görlach, A., Michiels, C., Kietzmann, T. *Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner*. Mol Cell Biol. (2007) 27(9):3253-3265.
- Görlach, A., Bonello, S. *The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison*. Biochem J. (2008) 412(3):e17-19.
- Invitrogen Web Page, Available from: <http://www.invitrogen.com>.
- Jeong, J.-W., Bae, M.-K., Ahn, M.-Y., Kim, S.-H., Sohn, T.-K., et al. *Regulation and Destabilization of HIF-1α by ARD1-Mediated Acetylation*. Cell. (2002) 111:709-720.
- Kaelin, W.G., Jr., Ratcliffe, P.J. *Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway*. Mol Cell. (2008) 30(4):393-402.
- Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A.S., Chachami, G., Paraskeva, E., Simon, M.C. *Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1*. Journal of Cell Science. (2010) 123:2976-2986.
- Keith, B., Johnson, R.S., Simon, M.C. *HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression*. Nat Rev Cancer. (2012) 12(1):9-22.
- Leinco Web Page, Available from: <http://www.leinco.com>.
- Lisý, K., Peet, D.J. *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*. Cell Death Differ. (2008) 15(4):642-649.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., Simon, M.C. *Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress*. Mol Cell. (2010) 40(2):294-309.
- Mazure, N.M., Chen, E.Y., Yeh, P., Laderoute, K.R., Giaccia, A.J. *Oncogenic Transformation and Hypoxia Synergistically Act to Modulate Vascular Endothelial Growth Factor Expression*. Cancer Res. (1996) 56:3436-3440.

- Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E., Simos, G. *Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK*. J Biol Chem. (2008) 283(41):27620-27627.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., et al. *Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem. (2006) 281(44):33095-33106.
- Okuyama, H., Krishnamachary, B., Zhou, Y.F., Nagasawa, H., Bosch-Marcé, M., Semenza, G.L. *Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem. (2006) 281:15554-15563.
- Papadakis, A.I., Paraskeva, E., Peidis, P., Muaddi, H., Li, S., et al. *eIF2α Kinase PKR Modulates the Hypoxic Response by Stat3-Dependent Transcriptional Suppression of HIF-1α*. Cancer Res. (2010) 70(20):1916-1930.
- Ratcliffe, P.J. *Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer*. J Physiol. (2013) 591(Pt 8):2027-2042.
- Scheuermann, T.H., Yang, J., Zhang, L., Gardner, K.H., Bruik, R.K. *Hypoxia-Inducible Factors Per/ARNT/Sim Domains: Structure and Function*. Methods in Enzymology. (2007) 435.
- Semenza, G.L. *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda). (2009) 24:97-106.
- Semenza, G.L. *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine*. Cell. (2012) 148(3):399-408.
- Stellar, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E.J., Krek, W. *Chemokine receptor CXCR4 down-regulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature. (2003) 425:307-311.
- Thermoscientific Web Page, Available from: <http://www.thermoscientificbio.com>.
- Tsapournioti, S., Mylonis, I., Hatziefthimiou, A., Ioannou, M.G., Stamatiou, R., et al. *TNFalpha induces expression of HIF-1alpha mRNA and protein but*

inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. J Cell Physiol. (2013) 228(8):1745-1753.

- Webb, J.D., Coleman, M.L., Pugh, C.W. *Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing.* Cell Mol Life Sci. (2009) 66(22):3539-3554.

- Wolff, M., Jelkmann, W., Dunst, J., Depping, R. *The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics.* Cell Physiol Biochem. (2013) 32(4):849-858.

- Yasinska, I.M., Sumbayev, V.V. *S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity.* FEBS Letters. (2003) 549:105-109.