



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΙΝΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ HIF-1 α
ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1 & ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ
ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΑΣΙΚΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

Λάρισα 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΟΙΝΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ HIF-1 α
ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ HIF-1 & ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ
ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ**

Υπεύθυνη καθηγήτρια:

- Γεωργιάτσου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Λάρισας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Γεωργιάτσου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Λάρισας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας Ιατρικής Σχολής Λάρισας

Λάρισα 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά:

Την κα. Γεωργιάτσου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για όλα όσα μου δίδαξε και για την συμπαράσταση σε κάθε στάδιο της διπλωματικής εργασίας.

Τον κ. Σίμο Γεώργιο, Καθηγητή Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη δυνατότητα διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας.

Τον κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.

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

Τον κ. Μυλωνή Ηλία, Λέκτορα Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεργασία και τη φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
• Υποξία.....	11
✓ Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1.....	11
✓ Δομή και λειτουργία του HIF-1α.....	13
• Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο (Υποξία).....	14
• Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1α (Νορμοξία).....	17
• Ρύθμιση του HIF-1α από τον NF-kB.....	18
• Ο ρόλος του HIF-1α στην ανάπτυξη και σε ασθένειες.....	19
✓ Καρκίνος.....	19
✓ Ισχαιμία.....	20
• Κοινοί πολυμορφισμοί (SNP's) του HIF-1α και συσχετίσή τους με ασθένειες.....	21
• Υποξία και οστίτης ιστός.....	23
• Ο ρόλος του HIF-1α στην οστεονέκρωση.....	25
ΣΚΟΠΟΣ	28
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
➤ ΥΛΙΚΑ	30
• Βακτηριακά στελέχη.....	30
• Θρεπτικά υλικά.....	30
• Κυτταρικές σειρές.....	30
• Πλασμιδιακοί φορείς.....	30
• Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας.....	32
• Αντισώματα.....	33
• Μάρτυρες μοριακών βαρών DNA.....	33
• Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών.....	34
➤ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
• Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T & Saos-2 με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς.....	34
• Μέτρηση δράσης της λουσιφεράσης.....	35
• Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ευκαριωτικά κύτταρα Saos-2 & HEK 293T.....	35
• Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκεντρωσης.....	36
• Ανάλυση πρωτεϊνών με (SDS-PAGE).....	36
• Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	37

• Ανοσοφθορισμός.....	38
• Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
• Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	40
• Απομόνωση και καθαρισμός από την πηκτή αγαρόζης (Gel extraction).....	41
• Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	42
• Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA (CIP).....	42
• Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης).....	43
• Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων E.coli δεκτικών (competent) στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA.....	43
• Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (E.coli transformation).....	44
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation).....	44
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation).....	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
➤ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ (WT) ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ PS ΚΑΙ AT ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Saos-2 ΚΑΙ HEK 293T.....	46
• Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α αγρίου τύπου (WT) και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T.....	46
✓ Επιμόλυνση κυττάρων Saos-2 με τα πλασμίδια p-FLAG-CMV2, p-FLAG-CMV2 HIF-1α WT, p-FLAG-CMV2 HIF-1α PS, p-FLAG-CMV2 HIF-1α AT και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας τους.....	46
✓ Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2, pFLAG-CMV2 HIF-1α WT, pFLAG-CMV2 HIF-1α PS, pFLAG-CMV2 HIF-1α AT και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας τους.....	49
• Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης HIF-1α αγρίου τύπου (WT) και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T.....	52
✓ Ανίχνευση των πρωτεϊνών HIF-1α (WT, PS, AT) σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 και HEK 293T με ανοσοαποτύπωση.....	53
✓ Παρατήρηση της έκφρασης του HIF-1α WT, και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T με ανοσοφθορισμό.....	54
➤ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1Α PS ΚΑΙ AT ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (PBEVY-GU) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ S.CEREVISIAE.....	57
• Ενίσχυση των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και AT με αντίδραση PCR.....	57
• Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBenvy GU για την αντίδραση σύνδεσης.....	59

✓ Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBluescript για την αντίδραση σύνδεσης.....	60
✓ Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pBluescript/BamHI/CIP με το DNA HIF-1α PS, AT.....	61
✓ Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης.....	61
✓ Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation) και πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI.....	61
✓ Απομόνωση του ενθέματος HIF1α PS από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescript.....	62
• Κλωνοποίηση του ενθέματος HIF-1α PS στον φορέα pBenvy GU.....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας επαγόμενος από την υποξία και άλλα κυτταρικά ερεθίσματα και η έκφραση του οδηγεί σε ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Τα κύτταρα αποκρίνονται στην υποξία μέσω της αύξησης των επιπέδων του HIF-1 και οδηγούνται σε αυξημένη ερυθροποίηση και αγγειογένεση, αυξημένη γλυκόλυση και αυξημένο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο-απόπτωση και μειωμένο πολλαπλασιασμό. Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μία ρυθμιζόμενη α υπομονάδα (HIF-1α) η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου 21%) συντίθεται και αποικοδομείται συνεχώς, ενώ σταθεροποιείται κατά την υποξία (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου χαμηλότερη από 6%), μεταναστεύει στον πυρήνα και συνδέεται με την συνεχώς εκφραζόμενη β υπομονάδα (HIF-1β ή ARNT) σχηματίζοντας τον HIF-1. Ο HIF-1 βρίσκεται στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας στην προσπάθεια αντιμετώπισης ασθενειών οξείων και χρόνιων, όπου επικρατούν συνθήκες υποξίας ή και ανοξίας. Τέτοιες είναι πολλές μορφές καρκίνου, μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο και ισχαιμικές ασθένειες όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Διάφορες ερευνητικές ομάδες μελέτησαν τη επίδραση που έχουν κοινοί πολυμορφισμοί του HIF-1α (SNPs) στη μεταγραφική του ενεργότητα. Μεγάλος αριθμός μελετών συσχετισμού ανάμεσα στους SNPs και τη γονοτυπική κατανομή τους σε διάφορες ομάδες πληθυσμών έχουν διενεργηθεί, προσπαθώντας να αναδείξουν την επίδραση των SNPs στην εμφάνιση, πρόοδο και πρόγνωση παθήσεων στις οποίες κυριαρχούν υποξικές συνθήκες. Όμως τα αποτελέσματα τους είναι αντιφατικά μια και άλλες ομάδες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί του HIF-1α φαίνεται να αυξάνουν την ενεργότητά του και άλλες ότι τη μειώνουν. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: P582S (μετατροπή του νουκλεοτιδίου 1744 κυτοσίνης σε νουκλεοτίδιο θυμίνης C-T), και A588T (μετατροπή του νουκλεοτιδίου 1762 γουανίνης σε νουκλεοτίδιο αδενίνης G-A), οι οποίοι εδράζονται στο εξόνιο 12 που κωδικοποιεί για την οξυγόνο-εξαρτώμενη περιοχή ODD.

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε και να αναδείξουμε τη σχέση κοινών πολυμορφισμών του HIF-1α

(P582S, A588T) με ασθένειες του μυοσκελετικού. Μια καλά μελετημένη ασθένεια του μυοσκελετικού και μάλιστα μια στην οποία κυριαρχούν ανοξικές συνθήκες στους πάσχοντες ιστούς είναι η οστεονεκρωση. Η νοσολογική αυτή οντότητα είναι πολυπαραγοντική και οφείλεται σε μειωμένη αιματική παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον οστίτη ιστό. Η μείωση αυτή συμβαίνει στα πλαίσια της καταστροφής του αιματικού δικτύου στην περιοχή όπως σε ένα τραυματισμό ή σε ανακατασκευή και στρεβλή διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του αγγειακού δικτύου όπως στη μακροχρόνια ή στην εντοπισμένη έγχυση στεροειδών. Τελικά το οστό γίνεται υποξικό και νεκρώνεται.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα των μορφών του HIF-1α , αγρίου τύπου (WT) όσο και των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του (P582S και A588T) και μετρήθηκε αν και πόσο τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα επηρεάζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Έτσι, κύτταρα Saos-2 και HEK-293T επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τον HIF-1α αγρίου τύπου (WT) ή τα αλληλόμορφα (PS) και (AT) και μετρήθηκαν οι μεταγραφικές τους ενεργότητες. Παραθέτουμε στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του HIF-1α είναι ίση με αυτήν του αγρίου τύπου. Επίσης, μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης δείχθηκε για πρώτη φορά ότι τα αλληλόμορφα του HIF-1α έχουν πυρηνικό εντοπισμό όπως ο HIF-1α αγρίου τύπου και παράγονται ισόποσα με αυτόν.

Επίσης έγινε προσπάθεια έκφρασης των αλληλομόρφων PS και AT σε φορείς έκφρασης *Sacharomyces cerevisiae* με στόχο τη σύγκριση της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών HIF-1 σε ένα 'πρωτόγονο' ευκαρυωτικό σύστημα όπου δεν θα εμπλέκονταν ιστοειδικοί παράγοντες, στους οποίους ίσως να οφείλονταν τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που εμφανίζονταν στη βιβλιογραφία. Το c-DNA της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α PS κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης προκειμένου να παραχθεί η πρωτεΐνη HIF-1α PS και να μελετηθεί η ενεργότητα της σε σύγκριση με τον HIF-1 αγρίου τύπου (WT) σε κύτταρα *S. cerevisiae*, όπου ο HIF-1 εκφράζεται, είναι ενεργός και η ενεργότητα του είναι μετρήσιμη.

ABSTRACT

HIF-1 is a transcription factor induced by hypoxia and other cellular stimuli and its expression regulates cell metabolism, proliferation and apoptosis. Cells respond to hypoxia through increase of HIF-1 protein levels, which in turn activate various genes that are linked to regulation of angiogenesis, erythropoiesis, energy metabolism and apoptotic, proliferative responses. HIF-1 is a heterodimer consisting of the HIF-1 α and HIF-1 β subunits. Under normoxic conditions (molecular oxygen concentration 21%) the HIF-1 α subunit is rapidly synthesized and degraded, whereas under hypoxic conditions (molecular oxygen concentration lower than 6%) it is stabilized and translocates into the nucleus where it heterodimerizes with the constantly expressed HIF-1 β subunit (also called Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ARNT) forming the transcription factor HIF-1. HIF-1 lies in the center of the investigation of the effort to treat acute or chronic diseases in which hypoxia or even anoxia dominates. Such diseases are cancer, metabolic disorders such as metabolic syndrome, obesity and ischemic diseases like acute myocardial infarction. Several scientific groups have studied the impact of common HIF-1 α polymorphisms, on its transcriptional activity. Several association studies, between HIF-1 α SNPs and their genotype distribution have been conducted trying to highlight the impact of HIF-1 α SNPs, in the development, progression and prognosis of diseases, where hypoxic conditions prevail. Their results however, were inconsistent. Several groups conclude that the polymorphisms appear to increase HIF-1 α activity and other, support that the polymorphisms appear to reduce its activity. The SNPs that have been studied are the P582S (conversion of nucleotide 1744 cytosine in thymine C-T) and the A588T (conversion of nucleotide 1762 guanine in adenine G-A). These polymorphisms lie in exon 12 that encodes for the oxygen dependent domain (ODD). In this study we tried to comprehend and to highlight the relationship between common HIF-1 α polymorphisms (P582S, A588T) and musculoskeletal diseases. A disease well characterized is osteonecrosis. In this pathological condition, hypoxic conditions prevail. This pathological condition is multivariate and is developed due to a reduction of blood, nutrients and oxygen offered in the bone tissue. This reduction occurs when the bone vascular network is destructed, either after an injury of the bone or when the bone is rebuilding and its vascular network is distorted, like after steroid usage in long term basis or when steroids are injected topically. Finally, the bone

becomes hypoxic and necrotic in places.

In this study we investigated the transcriptional activity of HIF-1 α WT and its mutant alleles P582S and A588T. We measured whether and how the mutant alleles affect the transcriptional activity of HIF-1 α . Thus, Saos-2 and HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing HIF-1 α WT or the alleles PS and AT and their transcriptional activity was measured. We present evidence suggesting that the transcriptional activity of the mutated alleles of HIF-1 α is equal with that of HIF-1 α (WT). Also, we have shown by immunofluorescence and immunoblotting experiments for the first time that the HIF-1 α alleles have nuclear localization similar to HIF-1 α WT and are equally produced. We also attempted the expression of the PS and AT alleles using *Sacharomyces cerevisiae* expression vectors, in order to compare the transcriptional activity of these forms of HIF-1 α with the HIF-1 α WT, in a 'primitive' eukaryotic system where tissue-specific factors wouldn't be engaged and wouldn't be responsible for the conflicting results appearing in the literature. We cloned the c-DNA of the mutant form of HIF-1 α PS in Yeast expression vector in order to produce the HIF-1 α PS protein and to also study and compare its transcriptional activity with the HIF-1 WT, in *S. cerevisiae* cells, where HIF-1 is expressed, is active and its activity can be measured.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

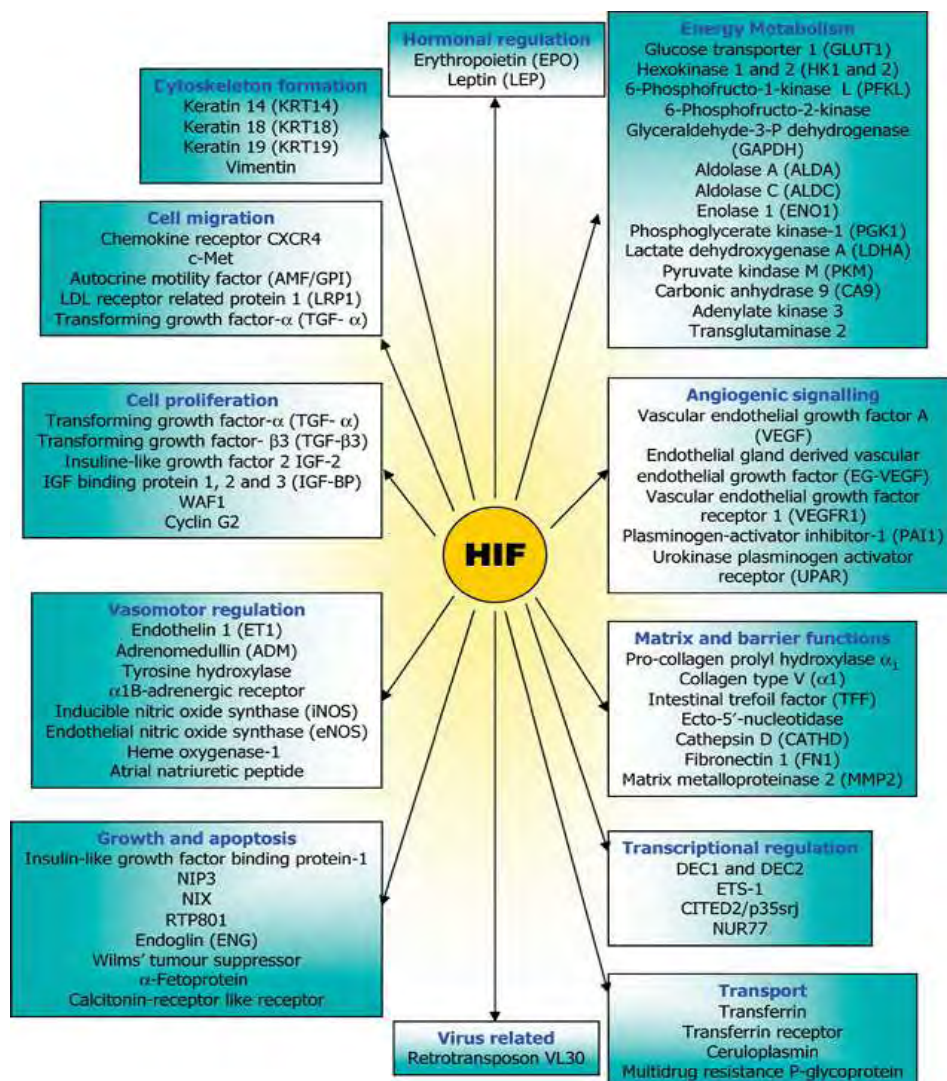
Υποξία

Υποξία είναι η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στους ιστούς και κατά συνέπεια και ενδοκυττάρια. Το οξυγόνο είναι ένα από τα στοιχεία που η διατήρηση της ομοιοστασίας του κρίνεται απαραίτητη για το κύτταρο καθώς είναι ζωτικής σημασίας για το μεταβολισμό και την επιβίωση του. Έτσι τα κύτταρα ανέπτυξαν μηχανισμούς απόκρισης σε χρόνιες (καρκίνος) και οξείες (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) συνθήκες υποξίας. Το υποξικό περιβάλλον των ιστών ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην επαγωγή ή αναστολή της μεταγραφής μιας πληθώρας γονιδίων που αντίστοιχα επάγουν ή αναστέλλουν κυτταρικές λειτουργίες όπως η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση (Semenza 2003). Κύριος μεσολαβητής της μεταγραφικής απόκρισης στην υποξία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (Hypoxia Inducible Factor 1, HIF-1).

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας HIF-1

Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από μία ρυθμιζόμενη υπομονάδα (HIF-1 α) η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου 21%) συντίθεται και αποικοδομείται συνεχώς, ενώ σταθεροποιείται κατά την υποξία (συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου χαμηλότερη από 6%), και την συνεχώς εκφραζόμενη β υπομονάδα (HIF-1 β ή ARNT). Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών basic helix-loop-helix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) (Wang et al., 1995). Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 200 διαφορετικά γονίδια που επάγονται άμεσα από τον HIF-1. Τα γονίδια αυτά περιέχουν στους υποκινητές τους συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (A/G)CGTG, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements, HRE), τις οποίες αναγνωρίζει ο HIF-1 και προσδένεται σε αυτές. Τα προϊόντα των γονιδίων στόχων του HIF-1 είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με συγκεκριμένες και σημαντικές

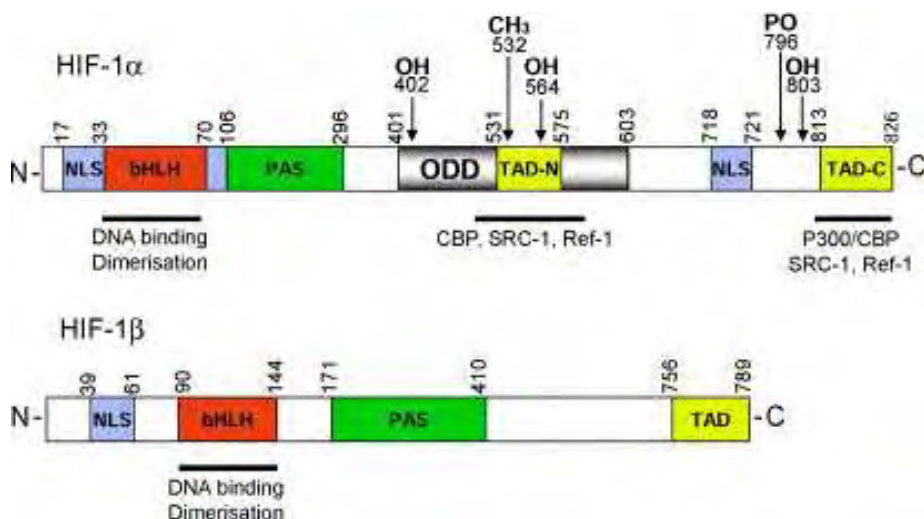
λειτουργίες του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και του σιδήρου, η διατήρηση του αγγειακού τόνου, η ερυθροποίηση και η αγγειογένεση (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ο HIF-1 και τα «γονίδια-στόχοι» του. Ο HIF-1 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τον ενεργειακό μεταβολισμό, την ορμονική ρύθμιση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μεταγραφική ρύθμιση, τη μετάσταση κ.α.

Δομή και λειτουργία του HIF-1α

Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και σχηματίζει ετεροδιμερές με τον HIF-1β που αρχικά είχε αναγνωριστεί ως Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT). Και οι δύο υπομονάδες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία και είναι αρκετά συντηρημένες. Έχουν αναγνωριστεί τρεις ισομορφές της α υπομονάδας του HIF: ο HIF-1α, ο HIF-2α (επίσης γνωστός σαν EPAS-1, MOP2, HLF και HRF) και ο HIF-3α.



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

Για το διμερισμό του HIF-1α με τον ARNT και την πρόσδεση στα HREs με αλληλουχία 5'RCGTG3' απαιτούνται τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS (1-390 αα) (Jiang et al., 1996). Τα μοτίβα αυτά εδράζονται στην αμινοτελική περιοχή του HIF-1α και απαντώνται και στον ARNT. Πιο αναλυτικά η περιοχή 17-30 αα αποτελεί ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signal) το οποίο τον οδηγεί στον πυρήνα, τα αμινοξέα 31-71 την περιοχή HLH και τα αμινοξέα 99-343 την περιοχή PAS, η οποία διακρίνεται σε A (99-209) και B (242-343) υποπεριοχές (Taylor και Zhoulin 1999). Κατά την υποξία ο HIF-1α μετατίθεται στον πυρήνα, μια διαδικασία που γίνεται μέσω ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη και ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Ο HIF-1α περιέχει δυο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: nuclear

localization signals). Το ένα εδράζεται στο αμινοτελικό άκρο του N-NLS (αμινοξέα 17-33) όπως προαναφέρθηκε και το άλλο εδράζεται στο καρβοξυτελικό του άκρο C-NLS (αμινοξέα 718-721) (Kallio et al., 1998) καθώς και ένα σήμα εξαγωγής του από τον πυρήνα NES (αα 631-639) (Mylonis et al., 2008). Ο HIF-1α διαθέτει δυο περιοχές trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), την N-TAD (αμινοξέα 531-575) και την C-TAD (αμινοξέα 831-826) που εντοπίζονται στο κάρβοξυ-τελικό τμήμα του συνόλου του HIF-1α. Αυτές οι περιοχές συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του μορίου με συνενεργοποιητές της μεταγραφής όπως είναι οι: CBP/p300, SRC-1 και TIF-2. Οι περιοχές C-TAD και N-TAD διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ρυθμιστική περιοχή (ID, Inhibitory Domain αα 576-785) η οποία καταστέλλει την δράση των TADs ειδικά σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της σταθερότητας του μορίου (Semenza et al., 1997). Η N-TAD περιοχή αλληλεπικαλύπτεται με την ODDD περιοχή (Oxygen Dependent Degradation Domain) (αμινοξέα 401-603). Η ODDD περιοχή παίζει ρόλο στη σταθερότητα της πρωτεΐνης αφού οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της οδηγούν στην αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία). Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων περιλαμβάνει διμερισμό των δύο υπομονάδων HIF-1α και HIF-1β και πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία, HRE's, τα οποία βρίσκονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών (Semenza 1998).

Ρύθμιση του HIF-1α από το οξυγόνο (Υποξία)

Σε συνθήκες φυσιολογικής πίεσης οξυγόνου PO_2 , η υδροξυλίωση καταλοίπων προλίνης (P402 και P564) (Masson et al., 2001) στην ODD περιοχή από υδροξυλάσες προλίνης ή πρόλυλο-υδροξυλάσες (Proline Hydroxylase Domain, PHD) κάνει δυνατή την πρόσδεση της πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau, pVHL) στον HIF-1α (εικόνα 3). Η pVHL αποτελεί μέρος του συμπλέγματος της E_3 λιγάσης της ουβικουιτίνης και μαζί με τις πρωτεΐνες elongin B, elongin C, Cul2 και Rbx-1 προσδέονται στον HIF-1α και του δίνουν χρόνο ημιζωής μικρότερο των 5 λεπτών σε συνθήκες νορμοξίας (Hon et al., 2002). Αυτό συμβαίνει μέσω μετά-μεταφραστικής ουβικουιτινυλίωσης του HIF-1α, αναγνώρισής του από το πρωτεάσωμα και αποικοδόμησής του από αυτό.

Έτσι, παρουσία οξυγόνου και μέσα σε 5 λεπτά από τη σύνθεσή του, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται, ουβικουτινυλιώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα. Η μείωση των επιπέδων του οξυγόνου (υποξία) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή των PHD's, λόγω έλλειψης μοριακού οξυγόνου. Έτσι, ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται και σταθεροποιείται, επειδή η μη υδροξυλιωμένη του μορφή δεν αναγνωρίζεται από τον pVHL (εικόνα 3). Έτσι σε υποξικές συνθήκες ο HIF-1α σταθεροποιείται, μεταναστεύει στον πυρήνα και διμερίζεται με τον παράγοντα HIF-1β, του οποίου η έκφραση είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την παρουσία οξυγόνου, και σχηματίζεται το σύμπλοκο HIF-1. Ο HIF-1 ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων όπως της ερυθροποιητίνης (EPO), του αυξητικού παράγοντα της αγγειογένεσης (VEGF) και πρωτεϊνών μεταφορέων γλυκόζης (GLUT-1) για να διεγείρει την ερυθροποίηση, την αγγειογένεση και τη γλυκόλυση. Οι PHDs συναντώνται σε τρεις ισομορφές, τις PHD1, PHD2 και PHD3. Από πειράματα siRNA σε κύτταρα θηλαστικών που πραγματοποιήθηκαν για να απενεργοποιηθούν κάθε μία από τις τρεις PHD σε διάφορους κυτταρικούς τύπους αποδείχτηκε ότι η απενεργοποίηση της PHD2 είναι αρκετή ώστε να αυξήσει τα επίπεδα του HIF-1α και άρα και την μεταγραφή γονιδίων στόχων και έτσι προτάθηκε η PHD2 ως το πιο σημαντικό ένζυμο που ρυθμίζει το HIF-1α κατά τη νορμοξία (Berra et al., 2003).

6

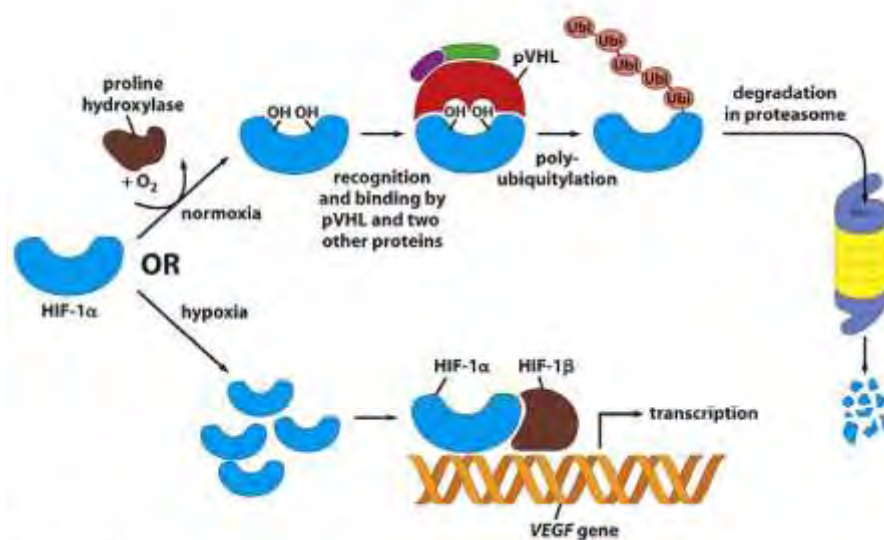
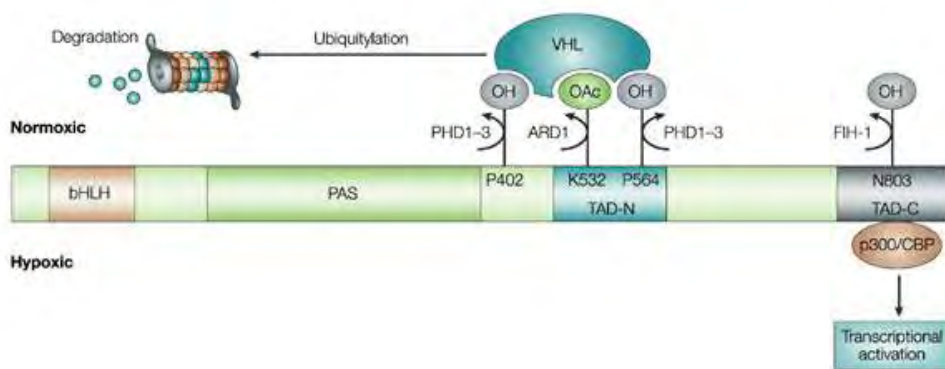


Figure 7-28a: The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Εικόνα 3: Ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1 από το οξυγόνο. Κατά τη νορμοξία υδροξυλιώνονται οι προλίνες 402 και 564 του HIF-1α από τα ένζυμα υδροξυλάσες της

προλίνης (PHD) 1-3. Έτσι γίνεται εφικτή η πρόσδεση της πρωτεΐνης pVHL που αναγνωρίζεται από την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης. Η ουβικουιτινυλίωση του HIF-1α οδηγεί την πρωτεΐνη για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα. Επίσης κατά τη νορμοξία ρυθμίζεται η αλληλεπίδραση του HIF-1α με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές. Η υδροξυλίωση της ασπαραγίνης 803 του HIF-1α από το ένζυμο FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) εμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών p300 και CBP στον HIF-1α με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων.

Εκτός από οξυγόνο οι PHD's απαιτούν ως συν-υπόστρωμα 2-οξογλουταρικό (2-OG) και σαν συμπράγοντες Fe^{2+} και ασκορβικό. Αν για κάποιο λόγο η αποσταθεροποίηση του HIF-1α από τις PHD's δεν είναι αποτελεσματική, τότε η δράση του θα ανασταλεί από υδροξυλίωση από μια άλλη οξυγόνο-εξαρτώμενη υδροξυλάση που ονομάζεται παράγοντας αναστολής του HIF-1 (Factor Inhibiting HIF, FIH-1). Η υδροξυλίωση από αυτό το ένζυμο γίνεται σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στο C-TAD (Asn 803) (Lando et al., 2002) και έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασης με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP και p300. Ο FIH δεν επηρεάζει τη σταθερότητα του HIF-1α (Safran et al., 2003). Κατ'αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα επιπρόσθετο μηχανισμό ελέγχου του HIF σε περίπτωση δυσλειτουργίας των PHD's.

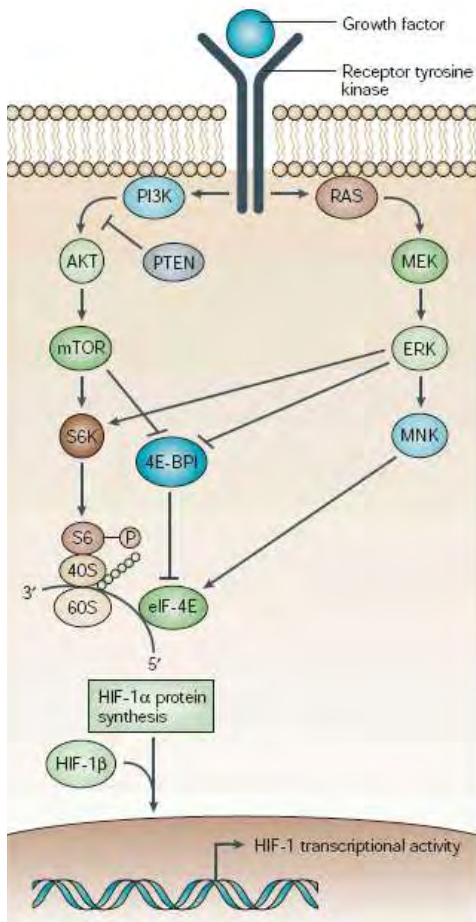


Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της υδροξυλίωσης του HIF-1α από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες. Ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στις προλίνες 402 και 564. Οι PHD's απαιτούν οξυγόνο ως υπόστρωμα αλλά και 2-οξογλουταρικό (2-OG) ως συν-υπόστρωμα και σαν συμπράγοντες Fe^{2+} και ασκορβικό.

Ανεξάρτητη του οξυγόνου ρύθμιση του HIF-1α (νορμοξία)

Οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια διεγείρουν τη



σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK), (Zhong, H. et al. 2000). Η αύξηση στα επίπεδα του HIF-1α ως απόκριση στα ερεθίσματα αυξητικών παραγόντων διαφέρει σε δύο σημαντικά σημεία από την αύξηση του HIF-1α κατά την υποξία. Πρώτον, ενώ η υποξία αυξάνει τα επίπεδα του HIF-1α σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, η διέγερση από αυξητικούς παράγοντες επάγει την έκφρασή του με ιστοειδικό τρόπο. Δεύτερον, ενώ η υποξία σχετίζεται με μειωμένη αποικοδόμηση του HIF-1α οι αυξητικοί παράγοντες διεγείρουν κυρίως τη σύνθεση του HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, οι αυξητικοί

παραγόντες ενεργοποιούν ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την PI3K ή/και τις MAPK.

Εικόνα 5. Ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α μέσω αυξητικών παραγόντων: Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε ένα γειτονικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί μονοπάτια της κινάσης PI3K ή/και των κινασών MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B PKB) και την mTOR (mammalian target of rapamycin). Στο μονοπάτι των MAP κινασών ή ERK (extracellular signal-regulated kinase) ενεργοποιείται από την MEK. Τελικά η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών mTOR και ERK έχει το συνεργατικό αποτέλεσμα ενεργοποίησης (μέσω φωσφορυλίωσης) της p70 S6 κινάσης και της 4E-BP1 πρωτεΐνης-πρόσδεσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης μετάφρασης 4E (eIF-4E). Τελικό αποτέλεσμα είναι η επαγωγή της μετάφρασης των mRNA συμπεριλαμβανομένου και του mRNA του HIF-1α (Semenza G. et al., 2003).

Ρύθμιση του HIF-1α από τον NF-κB

Παρόλο που ο HIF-1 είναι ο κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, έχει αναφερθεί ότι περίπου 20 ακόμη διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην ευαισθησία των ιστών στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Ανάμεσα αυτούς ο πιο σημαντικός είναι ο NF-κB. Ο NF-κB είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιείται στη χρόνια φλεγμονή από προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως οι κυτοκίνες (Rius et al., 2008). Έτσι έχουμε ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού του συμπλέγματος της κινάσης IKK. Ο NF-κB ενεργοποιείται επίσης από την υποξία αποτρέποντας την απόπτωση και άρα δίνοντας το πλεονέκτημα της παρατεταμένης κυτταρικής επιβίωσης σε κύτταρα που υφίστανται συνθήκες στρες όπως οι χαμηλές συνθήκες οξυγόνου (Koong AC et al., 1994, Cummins et al., 2006). Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί μια αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1 και του NF-κB. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι οι προλυλουδροξυλάσες που εμπλέκονται στο μοριακό μονοπάτι ενεργοποίησης του HIF-1 επίσης ρυθμίζουν σημαντικά στάδια του μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κB (Cummins et al., 2006). Επίσης ο NF-κB μετά από ενεργοποίησή του από υποξικά ή μη υποξικά ερεθίσματα (προφλεγμονώδεις παράγοντες) μπορεί να επάγει την έκφραση του m-RNA του HIF-1α. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι αυτή η εξάρτηση της έκφρασης του HIF-1α από τον NF-κB έχει αποδειχθεί *in vivo* (Rius et al., 2008). Ένας μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α από τον NF-κB είναι ο εξής: ο προαγωγέας του HIF-1α περιέχει μια θέση πρόσδεσης για τον NF-κB στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής (van Uden et al., 2008). Ένας άλλος μηχανισμός ρύθμισης του HIF από τον NF-κB είναι μέσω αλληλεπίδρασης της υπομονάδας IKK γ της κινάσης IKK και του HIF-2α ενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη CREB (Bracken et al., 2005). Τέλος ο HIF-1α μπορεί να ρυθμίσει το μοριακό μονοπάτι του NF-κB. Κερατινοκύτταρα ποντικών που υπερεκφράζουν τον HIF-1α επιδεικνύουν αυξημένη ενεργότητα για τον NF-κB και αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων του NF-κB που κωδικοποιούν για προφλεγμονώδεις παράγοντες οδηγώντας σε υπερανταπόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα μέσω φαύλου κύκλου (Scortegagna et al., 2008).

Ο ρόλος του HIF-1α σε ασθένειες

Η υποξία και το μονοπάτι του HIF έχουν συνδεθεί με την παθοφυσιολογία πληθώρας ασθενειών. Κατά την καρκινογένεση και για την επαρκή ανάπτυξη των όγκων, είναι αναγκαία η αγγειογένεση και η ενεργοποίηση του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Seagroves et al., 2001). Δεδομένης της σημασίας του HIF-1 στην ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων βασικών για τις παραπάνω διαδικασίες, δεν είναι περίεργο ότι και ο HIF-1α και ο HIF-2α έχουν εμπλακεί στη διαδικασία της ογκογένεσης προσφέροντας επιλεκτικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα.

Καρκίνος

Η υπερέκφραση του HIF-1α και του HIF-2α βρέθηκε σε πλήθος διαφορετικών ανθρώπινων καρκίνων πιθανόν σαν αποτέλεσμα της υποξίας στο εσωτερικό των όγκων ή λόγω γενετικής εξαλλαγής (Talks et al., 2000; Zhong et al., 1999). Το εσωτερικό της μάζας του νεοσύστατου όγκου, το οποίο αυξάνει συνεχώς σε μέγεθος, γίνεται σταδιακά υποξικό μέχρις ότου να αποκτήσει επαρκή αιμοφόρα αγγεία και να αποκατασταθεί η αιμάτωση. Οι υποξικές συνθήκες στο εσωτερικό των όγκων μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη σταθερότητα και ενεργότητα του HIF-1. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις απέδειξαν ότι υπάρχουν ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε καλοήθεις όγκους, αυξημένα επίπεδα σε πρόωρα κακοήθεις όγκους και ένα ενδεικτικό ποσοστό σε μεταστάσεις όγκων σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς (Harris 2002; Zhong et al., 1999). Η έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF γενικά φαίνεται να συμβαδίζει με τα επίπεδα του HIF-1α.

Έχει παρατηρηθεί μεγάλη συχνότητα κοινών γενετικών αλλαγών σε καρκινικά κύτταρα που σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση του HIF-1α. Για παράδειγμα στο σύνδρομο Von Hippel-Lindau, η απώλεια της πρωτεΐνης pVHL έχει σαν αποτέλεσμα ιδιοστατικά εκφραζόμενο HIF-1α (Iliopoulos et al., 1996). Επιπλέον η απώλεια λειτουργίας της p53, η οποία είναι ανενεργή στους περισσότερους ανθρώπινους καρκίνους, αυξάνει τα επίπεδα του HIF-1α και ενισχύει την εξαρτώμενη από τον HIF μεταγραφή σε κύτταρα όγκων (Ravi et al., 2000). Απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου της PTEN σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του HIF-1α και έκφραση γονιδίων μέσω του HIF, πιθανότατα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των PI3K/AKT

(Zundel et al., 2000). Επίσης ενεργοποίηση του ογκογονιδίου v-Src μέσω μεταλλάξεων βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση του HIF-1α και των επαγόμενων γονιδίων του (Jiang et al., 1997). Τέλος, ενισχυμένη σηματοδότηση από τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης HER2 έχειδειχθεί ότι αυξάνει το ρυθμό σύνθεσης του HIF-1α (Laughner et al., 2001). Αυξημένη ενεργότητα του HER2 είναι μια κυρίαρχη και σημαντική γενετική αλλαγή στον καρκίνο του μαστού και σχετίζεται με επιθετικότητα του όγκου και κακή πρόγνωση. Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η υπερέκφραση του HIF-1α προσφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα. Σε πολλές μελέτες έχει σημειωθεί συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του HIF-1 και της θνησιμότητας του ασθενούς, κακή πρόγνωση ή αντίσταση στη θεραπεία (Semenza et al., 2003).

Ισχαιμία

Η ενεργοποίηση της δράσης του HIF έχειδειχθεί σε μια ευρεία κλίμακα φυσιολογικών αποκρίσεων σε ισχαιμικές, υποξικές και φλεγμονώδεις συνθήκες, όπου παίζει θετικό ρόλο στην απόκριση στις βλάβες που υφίστανται όργανα και ιστοί.

Για παράδειγμα, τα επίπεδα του HIF-1α και του VEGF αυξάνονται στο μυοκάρδιο όταν οι ασθενείς αναπτύσσουν οξύ αποκλεισμό της στεφανιαίας αρτηρίας (Lee et al., 2000). Η αποτελεσματική αναδιαμόρφωση των αγγείων έπειτα από ισχαιμική βλάβη βρέθηκε ότι εξαρτάται από την επαγόμενη από τον HIF-1 έκφραση γονιδίων. Αύξηση της έκφρασης του HIF-1α και των επαγόμενων γονιδίων του παρατηρήθηκε σε μοντέλα μυοκαρδιακής και εγκεφαλικής ισχαιμίας σε ποντίκια και πρόβατα (Bergeron et al., 1999; Martin et al., 1998).

Επιπλέον, η επαγωγή του HIF-1α και του HIF-2α και των γονιδίων στόχων τους έχειδειχθεί σε προεκλαμπτικό πλακούντα (Rajakumar et al., 2003), από μακροφάγα σε ρευματοειδές αρθρικό υγρό (Hollander et al., 2001), σε ισχαιμικό αμφιβληστροειδή (Grimm et al., 2002; Ozaki et al., 1999), καθώς επίσης και σε περιοχές επούλωσης τραυμάτων (Elson et al., 2000).

Κοινοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphism's / SNP's) του HIF-1 και συσχετισμοί τους με ασθένειες

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 είναι το κλειδί της ρύθμισης της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνου και μεταστάσεων μέσω ενεργοποίησης διαφόρων γονιδίων που ελέγχουν την αγγειογένεση, τη ερυθροποίηση, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι πολυμορφισμοί του HIF-1α (SNPs) έχουν μελετηθεί εκτενώς με σκοπό να καθοριστεί ο πιθανός συσχετισμός τους με την εμφάνιση και την εξέλιξη ασθενειών στις οποίες η υποξία παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο. Έχουν περιγραφεί πάνω από 30 πολυμορφισμοί του HIF-1α από τους οποίους τρεις βρίσκονται πάνω σε εξόνια (C1772T, G1790A, C111A). Δύο από αυτούς (C1772T, G1790A) είναι πιο συχνοί, βρίσκονται στην οξυγονοεξαρτώμενη περιοχή (ODD) του HIF-1α και οδηγούν σε αλλαγές αμινοξέων, από προλίνη σε σερίνη στο κωδικόνιο 582 (P582S) και από αλανίνη σε θρεονίνη στο κωδικόνιο 588 (A588T). Σε προηγούμενες μελέτες είχε δηχθεί ότι οι πολυμορφισμοί C1772T και G1790A παίζουν ρόλο σε διάφορους τύπους καρκίνου και σε άλλες ασθένειες όπως σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και ισχαιμία του μυοκαρδίου. Παρ'όλα αυτά ο γενετικός συσχετισμός των πολυμορφισμών αυτών με τις ασθένειες, όπως και το πόσο σημαντικοί είναι για την παθογένεια, την εξέλιξη και την πρόγνωση των ασθενειών είναι αντικείμενο αντιπαράθεσης ανάμεσα στις ερευνητικές ομάδες που τους μελέτησαν. Το ίδιο ισχύει και για τα αποτελέσματα ερευνών που αναζητούν τον αντίκτυπο που έχουν οι πολυμορφισμοί στην πρωτεϊνική έκφραση και λειτουργία του HIF-1α.

Έχουν γίνει γενετικοί συσχετισμοί των πολυμορφισμών PS, AT με πολλές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων καρκίνων του στήθους, της πεπτικής οδού, του παγκρέατος, του προστάτη και των νεφρών αλλά και άλλων ασθενειών, όπως ισχαιμίας του μυοκαρδίου και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Τα αποτελέσματα των ερευνών ήταν αντικρουόμενα. Σε μια έρευνα γενετικού συσχετισμού των πολυμορφισμών PS, AT σε σχέση με τον καρκίνο του πνεύμονα οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή των πολυμορφισμών στους ασθενείς ως προς τους υγιείς σε σχέση με τον HIF-1α αγρίου τύπου (WT) (Konac et al., 2009). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη γονιδιακή κατανομή του

πολυμορφισμού PS ανάμεσα σε ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του οισοφάγου και σε υγιείς κινεζικού πληθυσμού (Ling et al., 2005). Αντίθετα, μια σημαντική διαφορά στη γονοτυπική κατανομή παρατηρήθηκε ανάμεσα σε ασθενείς από ανδρογονοεξαρτώμενο καρκίνο προστάτη και υγιείς όσο αφορά τον πολυμορφισμό PS, συνδέοντας μάλιστα τον πολυμορφισμό με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων μετά από καρκίνο του προστάτη. Σε ασθενείς που έπασχαν από κολορθικό καρκίνο και έφεραν τον πολυμορφισμό PS βρέθηκε ότι εμφάνιζαν στατιστικά σημαντικότερα υψηλό κίνδυνο για ελκωτικούς όγκους παρά από τους ασθενείς που έφεραν τον HIF-1A WT (Fransen et al., 2006).

Όσο αφορά στα αποτελέσματα ερευνών για τον αντίκτυπο των πολυμορφισμών στην πρωτεϊνική έκφραση και λειτουργία του HIF-1α είναι και αυτά αντικρουόμενα. Ο πολυμορφισμός PS συνδέθηκε με υπερέκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α σε καρκίνο του μαστού σε Κορεάτικο πληθυσμό (Kim et al., 2008). Μια άλλη ερευνητική ομάδα έφτασε στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί PS, AT αυξάνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε κύτταρα COS7. Επίσης, παρόλο που βρήκαν συσχέτισμο ανάμεσα στους πολυμορφισμούς αυτούς και στην εμφάνιση χειρότερης πρόγνωσης για τον καρκίνο κεφαλής τραχήλου (αυξημένη πυκνότητα μικροτριχοειδικής κυκλοφορίας του όγκου) σε πληθυσμό Ιαπώνων, δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική γονοτυπική κατανομή των πολυμορφισμών PS, AT στους ασθενείς ως προς τους υγιείς (Tanimoto et al., 2003). Ο πολυμορφισμός PS σχετίζεται με τον καρκίνο του προστάτη και αναφέρθηκε ότι αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σ κύτταρα CV1 έχοντας σαν αποτέλεσμα αυξημένη πυκνότητα μικροαγγείων στον όγκο με αποτέλεσμα να προσφέρει μεγαλύτερη επιθετικότητα στον όγκο (Fu et al., 2005). Επίσης, ο πολυμορφισμός PS αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε κύτταρα HEK 293T μόνο σε υποξικές συνθήκες και θα μπορούσε να δρα προστατευτικά στην έναρξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (Yamada et al., 2005). Επίσης ο Hlatky και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας ινοβλάστες από έμβρυα ποντικών βρήκαν ότι ο πολυμορφισμός PS δεν αυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Hlatky et al., 2007). Τέλος ο Hong J.M και οι συνεργάτες του το 2007 βρήκαν ότι ο πολυμορφισμός PS συσχετίζεται με ιδιοπαθή οστεονέκρωση σε Κορεάτικο πληθυσμό ανδρών και ίσως οι πολυμορφισμοί παίζουν ρόλο στην παθογένεια και αποτελούν παράγοντα κίνδυνου για την ανάπτυξη οστεονέκρωσης (Hong et al., 2007).

Υποξία και Οστίτης Ιστός

Όργανα όπως ο νωτιαίος μυελός, ο πλακούντας και ο σκελετός αναπτύσσονται απουσία ενσωματωμένων αγγειακών δικτύων (Cowden et al., 2005). Ο σχηματισμός λοιπόν του σκελετού αρχίζει όταν πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα, μεταμορφώνονται σε προχονδροκύτταρα, δεσμεύονται στην κυτταρική σειρά των χονδροκυττάρων και αθροίζονται σχηματίζοντας πυκνώσεις, οι οποίες μέσω διαδοχικών σταδίων διαφοροποίησης σχηματίζουν ένα χόνδρινο υπόστρωμα του μελλοντικού σκελετού. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων αυτής της διαδικασίας το αγγειακό δίκτυο των πρωτοσχηματιζόμενων άκρων υφίσταται μια ανακατασκευή η οποία καθιστά τις μεσεγχυματικές πυκνώσεις ανάγγειες (Feinberg et al., 1986). Καθώς οι πυκνώσεις αυξάνουν σε μέγεθος τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα και σχηματίζουν ένα χόνδρινο υπόστρωμα από το οποίο θα σχηματιστούν τα μελλοντικά οστά. Τα χονδροκύτταρα των χόνδρινων υποστρωμάτων συνθέτουν κολλαγόνο τύπου 2, αγγρεκάνη και εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Sox9. Ο παράγοντας Sox9 είναι απαραίτητος για την έκφραση γονιδίων ειδικών των χονδροκυττάρων όπως είναι το κολλαγόνο τύπου 2 και η αγγρεκάνη (Bi et al., 1999). Δυο άλλα μέλη της οικογένειας Sox, η πρωτεΐνη L-Sox5 και η πρωτεΐνη Sox6 είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της διαδικασίας διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων. Καθώς συνεχίζεται η ανάπτυξη του ζυγωτού, η διαφοροποίηση προς τον οστικό φαινότυπο ακολουθείται από θάνατο των υπερτροφικών κυττάρων, μετανάστευση και εγκατάσταση αγγειακού δικτύου και αντικατάσταση του χόνδρινου υποστρώματος και της χόνδρινης θεμέλιας ουσίας από μια αγγειούμενη δοκιδωτή οστική θεμέλια ουσία σε μια διαδικασία που ονομάζεται ενδοχονδριακή οστεοποίηση (Olsen et al., 2000).

Η Ernestina Schipani και οι συνεργάτες της έδειξαν για πρώτη φορά ότι το χόνδρινο υπόστρωμα από το οποίο ξεκινούν οι αναπτυξιακές διαδικασίες της πρώιμης σκελετογένεσης είναι υποξικό και ότι ο παράγοντας HIF-1α εκφράζεται στα κύτταρα του χόνδρινου υποστρώματος. Η ερευνητική ομάδα πραγματοποιώντας απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α σε χονδροκύτταρα έφτασε στο συμπέρασμα ότι τα χονδροκύτταρα που έχουν έλλειψη σε HIF-1α αποθνήσκουν μέσω απόπτωσης και αυξάνουν την έκφραση VEGF (Schipani et al., 2001). Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι ο HIF-1α είναι πολύ σημαντικός για την οστεογένεση των μακρών οστών συμμετέχοντας στην ομαλή ανάπτυξη των χόνδρινων υποστρωμάτων τα οποία

είναι η αφετηρία των νεοσχηματιζόμενων οστών, μέσω της ανάπτυξης αγγειακού δικτύου και της αναδιαμόρφωσης του χόνδρου.

Παρ'όλα αυτά το γενετικό αυτό μοντέλο της απαλοιφής του HIF-1α δεν επιτρέπει να εξακριβωθεί πλήρως ο ρόλος του HIF-1α στην πρόιμη σκελετογένεση καθώς η απαλοιφή του γονιδίου έγινε σε κύτταρα τα οποία είχαν ήδη δεσμευτεί στην χονδροκυτταρική σειρά. Έτσι μια άλλη ερευνητική ομάδα έφτασε στο συμπέρασμα ότι ο HIF-1α πρώτον εκφράζεται στις μεσεγχυματικές πυκνώσεις που δημιουργούνται στα πρώιμα στάδια της σκελετογένεσης και δεύτερον ρυθμίζει και τα πρώιμα και τα όψιμα στάδια της σκελετογένεσης και του σχηματισμού αρθρώσεων (Sylvain et al., 2007). Παρόλο που η ομάδα πρότεινε και ένα πιθανό μηχανισμό ρύθμισης της σκελετογένεσης από τον HIF-1α μέσω συνεργατικής με τους μεταγραφικούς παράγοντες Sox trio (Sox9, L-Sox5, Sox6) αύξησης της σύνθεσης του απαραίτητου για την πρόιμη σκελετογένεση κολλαγόνου τύπου 2 στα χονδροκύτταρα, δεν μπόρεσε να τον αποδείξει.

Έμελλε αυτό το συμπέρασμα να προκύψει από τις εργασίες του Roy Amarilio και της ομάδας του. Η απαλοιφή του HIF-1α από τις μεσεγχυματικές κυτταρικές συναθροίσεις σε έμβρυα ποντικών οδήγησε σε δραματική μείωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox9 και ακολουθήθηκε από διακοπή της διαδικασίας διαφοροποίησης κατά τα πρώιμα στάδια της σκελετογένεσης με αποτέλεσμα σοβαρές σκελετικές ανωμαλίες. Απέδειξαν λοιπόν ότι ο HIF-1α είναι απαραίτητος ρυθμιστής της έκφρασης του ρυθμιστικού παράγοντα της χονδρογένεσης Sox9 για να διατηρηθεί η χονδρογένεση. Επίσης βρέθηκε ότι ο HIF-1α ρυθμίζει την έκφραση και των παραγόντων Sox5, Sox6 κολλαγόνου τύπου 2 και αγγρεκάνης που είναι απαραίτητοι για την διαφοροποίηση προς χονδροκυτταρικό φαινότυπο των κυττάρων (Roy et al., 2007).

Τέλος από εργασίες μιας άλλης ερευνητικής ομάδας (Chao et al., 2010), προέκυψε το συμπέρασμα ότι υπερέκφραση του HIF-1α μέσω απώλειας της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης pVHL σε ώριμους οστεοβλάστες αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την αγγειογένεση και την οστεογένεση μέσω αύξησης της έκφρασης του παράγοντα VEGF. Το μοντέλο αυτό δράσης επιβεβαιώθηκε ότι λειτουργεί και για την αναγέννηση τραυματισμένου οστίτη ιστού.

Όλα αυτά τα ερευνητικά συμπεράσματα αναδεικνύουν ένα πιθανό άμεσο ρόλο του HIF-1α στην σκελετογένεση αλλά και στην αναγέννηση του οστίτη ιστού μετά από τραυματισμό του.

Ο ρόλος του HIF-1α στην οστεονέκρωση

Η οστεονέκρωση είναι μια σημαντική πάθηση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση των ζωντανών στοιχείων του οστού λόγω προσωρινής ή μόνιμης απώλειας της αγγείωσης του, κατάρρευση του οστού, απώλεια του λειτουργικού ρόλου του οστού (στήριξη, κίνηση) και συνεπεία αυτού πρόωμη εκφυλιστική αρθρίτιδα. Η οστεονέκρωση μπορεί να διακριθεί σε: 1. Ισχαιμική νέκρωση, 2. Άσηπτη νέκρωση (όπως συμβαίνει στις επιφύσεις των οστών), 3. Οστεονέκρωση από οστικό έμφρακτο (στις διαφύσεις και μεταφύσεις των οστών). Εντοπίζεται κατά κύριο λόγο σε συγκεκριμένα μέρη του σκελετού: 1. Μηριαία κεφαλή, 2. Έσω μηριαίος κόνδυλος, 3. Βραχιόνιος κεφαλή ή αστράγαλος, 4. Μηνοειδές οστό, 5. Κεφαλή μεταταρσίων οστών, με πιο συχνή εντόπιση αυτή της μηριαίας κεφαλής. Το τραύμα είναι η πιο κοινή αιτία οστεονέκρωσης. Στις μη τραυματικές περιπτώσεις οστεονέκρωσης το πρόβλημα διάγνωσης της αιτίας της οστεονέκρωσης είναι μεγάλο. Η μη τραυματική νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού έχει συσχετιστεί με χρήση κορτικοστεροειδών, αλκοολισμό, μολύνσεις, ανωμαλίες του μηχανισμού πήξης του αίματος (εμβολή, δρεπανοκυτταρική αναιμία, εγκυμοσύνη), ακτινοβολία, χημειοθεραπεία και ορισμένες αυτοάνοσες ασθένειες. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετιστεί με άμεσο ή έμμεσο τραυματισμό του οστού. Παρόλο όμως που διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη οστεονέκρωσης, η διαταραχή της αιματικής παροχής φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου (Assouline et al., 2002). Έτσι, μέσω μείωσης ή παρεμπόδισης της ομαλής αιματικής παροχέτευσης στο οστό ο μυελός του οστού νεκρώνεται και τελικά το οστό καταστρέφεται. Η διαταραχή και η βλάβη στην αιματική παροχή στο οστό έχει ως τελικό αποτέλεσμα την διαταραχή στην οξυγόνωση του. Η οστεονέκρωση όμως παραμένει μια ασθένεια η οποία αποτελεί μια από τις πιο μεγάλες προκλήσεις ως προς τη θεραπεία της λόγω έλλειψης κατανόησης της βιολογίας της πάθησης και της δυσκολίας πειραματικής προσομοίωσης της διαδικασίας και των μηχανισμών επανόρθωσης. Η κατανόηση των μηχανισμών επανόρθωσης όπως η υποξική και η αγγειογεννητική που έπονται της ισχαιμίας ίσως θα προσφέρει νέες απαντήσεις για την εξέλιξη της νόσου και ίσως μπορεί να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Από όλες τις μορφές οστεονέκρωσης αυτή που έχει μελετηθεί καλύτερα είναι η οστεονέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού. Βασιζόμενοι για χρόνια σε ιστοπαθολογικές μελέτες της νόσου σε ενήλικους πληθυσμούς

κυριαρχούσε η αντίληψη ότι η διαστρέβλωση της αιματικής παροχής στην κεφαλή του μηριαίου επάγει τον κυτταρικό θάνατο στο μηριαίο οστό αλλά όχι και στον επιφυσιακό χόνδρο (ανώριμος αρθρικός χόνδρος) που συμμετέχει στον σχηματισμό της άρθρωσης (Glimcher and Kenzora 1979). Αποτελέσματα ωστόσο από μελέτες σε ζώα εργαστηρίου δείχνουν ότι διαφορετικές περιοχές του επιφυσιακού χόνδρου επηρεάζονται επίσης από την διαταραχή της αιμάτωσης στο οστό. Κυτταρικός θάνατος επήλθε για τη ζώνη του επιφυσιακού χόνδρου που βρίσκεται εν τω βάθει, ενώ η πιο επιφανειακή περιοχή του χόνδρου παρέμεινε ζωτική δείχνοντας μάλιστα ενίσχυση της έκφρασης του VEGF (Kim et al., 2004). Ο μηχανισμός αυτής της απόκρισης των ζωτικών χονδροκυττάρων του επιφυσιακού χόνδρου και η σημασία του για τη διαδικασία της νεοαγγείωσης του οστού παραμένει ασαφής. Επίσης λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό που οδηγεί τον αποικισμό της κεφαλής του μηριαίου οστού από δίκτυο νεοσυντιθεμένων αγγείων μετά από ισχαιμη νέκρωσή της. Αποτέλεσμα της διαταραγμένης αυτής αιματικής παροχής στο οστό είναι η υποξία των ιστών του. Τελικά μέσω της υποξίας ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α. Συγκεκριμένα ο HIF-1α και τελικά και ο ενεργός VEGF παίζει ρόλο στην επισκευή τραυματισμένου οστίτη ιστού (Komatsu et al., 2004; Mori et al., 2006). Παρότι ο ρόλος του HIF-1α στην οστεογένεση μέσω ρύθμισης των γονιδίων αυτών έχει καθιερωθεί, ο ρόλος του στην ισχαιμη οστεονέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού δεν έχει ακόμα μελετηθεί επαρκώς.

Παρ'όλα αυτά, αποτελέσματα από μια μελέτη (Harry et al., 2009), υποστηρίζουν την καινούργια υπόθεση ότι το μοριακό μονοπάτι του HIF-1α ενεργοποιείται σε ένα μέρος του επιφυσιακού χόνδρου της κεφαλής του μηριαίου μετά από ισχαιμία και επίσης ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία νεοαγγειογένεσης και τη δημιουργία αιματικής παροχέτευσης του οστού. Ακόμη, από τα πειράματά τους φαίνεται πως η υποξία ως αποτέλεσμα της ισχαιμίας επηρεάζει την επίφυση και μάλιστα με αύξηση της έκφρασης και ενεργοποίησης του HIF-1α. Επίσης αποτελέσματα από άλλες μελέτες δείχνουν ότι η κεφαλή του μηριαίου μετά από τραυματική ισχαιμία είναι υποξική και ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α στον επιφυσιακό χόνδρο του οστού (Kim et al., 2009).

Τέλος μια ερευνητική ομάδα προσφέρει νέα δεδομένα μοριακών μηχανισμών δράσης του HIF-1α στη νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου (Zhang et al., 2011). Έτσι, έφτασε στο συμπέρασμα ότι μετά από ισχαιμική νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α ενεργοποιείται και

εν συνέχεια ενεργοποιεί τον παράγοντα Sox9 ο οποίος ενεργοποιεί εκ νέου τον HIF-1α μέσω ανατροφοδότησης. Είναι λοιπόν φανερό ότι ο HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεονέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού όπως φαίνεται από τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα αλλά ακόμα πρέπει να διεξαχθούν πολυετείς έρευνες για να εξακριβωθεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ο HIF-1α ρυθμίζει την απόκριση των ιστών στην υποξία συνεπεία της ισχαιμίας στην περιοχή.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των κοινών πολυμορφισμών PS και AT του HIF-1α στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κύτταρα διαφόρων τύπων. Οι κοινοί πολυμορφισμοί PS και AT μελετήθηκαν από το Εργαστήριο Βιοχημείας σε συνεργασία με την Ορθοπαιδική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το I.B.E.T για πιθανή συσχέτιση τους με την οστεονέκρωση, μια συχνή ασθένεια του μυοσκελετικού. Γι' αυτό, δείγματα DNA ασθενών με οστεονέκρωση καθώς και υγιών αντίστοιχα, μελετώνται για το κατά πόσον φέρουν τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς σε τυχόν διαφορετικό ποσοστό. Πιθανός συσχετισμός αυτών των πολυμορφισμών με την οστεονέκρωση θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικό διαγνωστικό δείκτη. Παράλληλα με την εξέταση των δειγμάτων, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί η επίδραση αυτών των πολυμορφισμών στη μεταγραφική δράση του HIF-1 σε συστήματα κυττάρων θηλαστικών, αλλά και σε ένα απλό ετερογενές σύστημα έκφρασης του HIF-1 σε κύτταρα *S. cerevisiae*. Τα κύτταρα *S. cerevisiae* δεν εκφράζουν HIF-1 ενδογενώς και δεν περιλαμβάνουν πολλά από τα συστατικά ρύθμισης του HIF-1 εξασφαλίζοντας έτσι την όσο το δυνατόν μικρότερη εμπλοκή ιστοειδικών κυτταρικών παραγόντων στις μετρήσεις της μεταγραφικής ενεργότητας του εξωγενώς εκφραζόμενου HIF-1. Η μελέτη αυτή των μεταγραφικών ενεργοτήτων των HIF-1α PS και AT σε σύγκριση με τον HIF-1α αγρίου τύπου (WT) αποτέλεσε το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επιλέχτηκε η κυτταρική σειρά Saos-2 που προέρχεται από οστεοσάρκωμα, όπως επίσης και η τυπική καρκινική σειρά, HEK 293T στην οποία έχουν γίνει επανειλημμένα μελέτες της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 (βλ. Εισαγωγή). Στόχος ήταν να επιμολυνθούν οι δυο αυτές καρκινικές σειρές με πλασμίδια που να εκφράζουν τις τρεις μορφές του HIF-1α (WT, PS, AT) και να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης τους (ανοσοαποτύπωση), ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός (ανοσοφθορισμός) και η μεταγραφική τους ενεργότητα. Η τελευταία ελέγχεται με συνέκφραση των ισομορφών του HIF-1α με πλασμίδιο αναφοράς όπου η έκφραση του ενζύμου της λουσιφεράσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο στοιχείων HRE και άρα τα επίπεδά της αντικατοπτρίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 που προσδένεται στα στοιχεία HRE. Τέλος, προκειμένου να ερευνηθεί η ενεργότητα των ισομορφών του HIF-1 σε ένα απλό ετερογενές σύστημα *S. cerevisiae* που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Βιοχημείας (Braliou et al., 2006) έπρεπε αυτές

να κλωνοποιηθούν στους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του εν λόγω συστήματος. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των δράσεων των πολυμορφικών HIF-1 σε κύτταρα θηλαστικών και yeast, σε συνδυασμό με τη συσχέτιση τους με την οστεονέκρωση θα αποτελέσουν μια επαρκώς ολοκληρωμένη μελέτη που θα αντιμετωπίζει το ερώτημα της σχέσης του HIF-1 με τη συγκεκριμένη ασθένεια του μυοσκελετικού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: TOP10 (InVitrogen) : Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης.

Θρεπτικά Υλικά

- LB (για 1000 ml):10 gr bacto tryptone, 5 gr bacto yeast extract, 10 gr NaCl / Για τρυβλία: +20 gr agar
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL), το οποίο περιέχει 10% ορό βόου (FBS, Fetal Bovine Serum, Biochrom KG Seromed), 2mM glutamine (Biochrom KG Seromed) και αντιβιοτικό (antibiotic-antimycotic solution, Gibco BRL)

Κυτταρικές σειρές

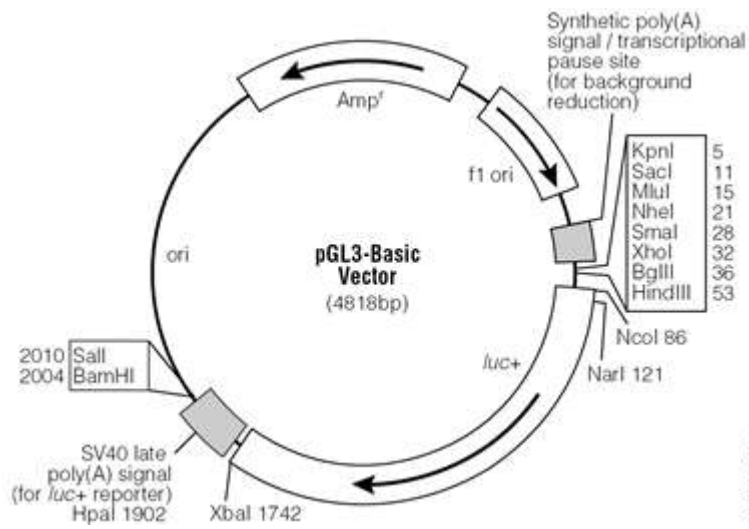
Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK 293T και Saos-2

Οι πλασμιδιακοί φορείς

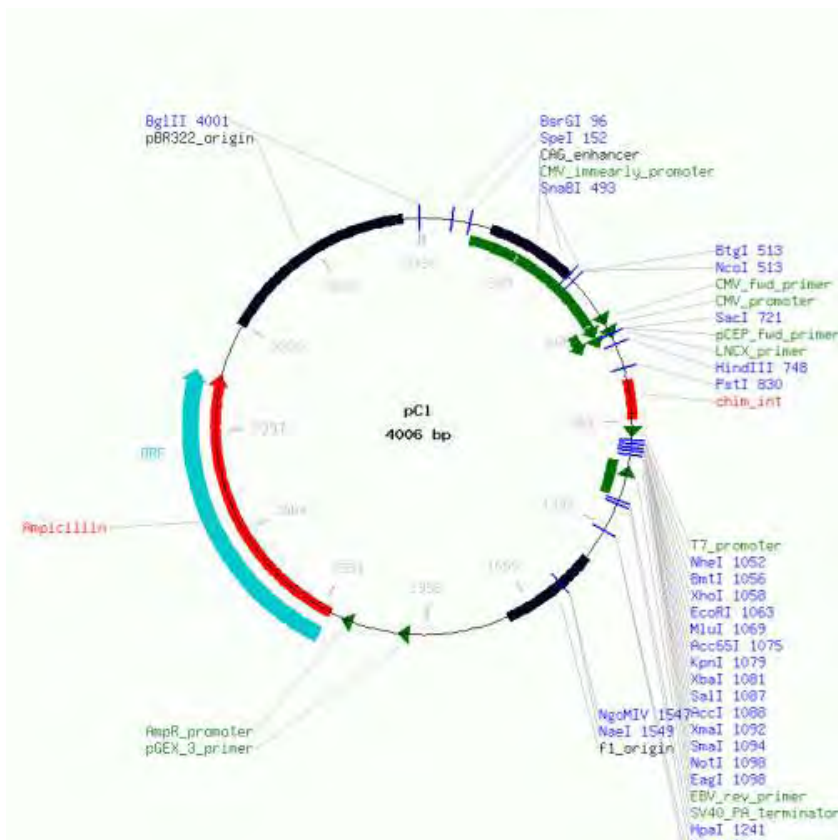
pFLAG-CMV2 (Tanimoto et al., 2003)



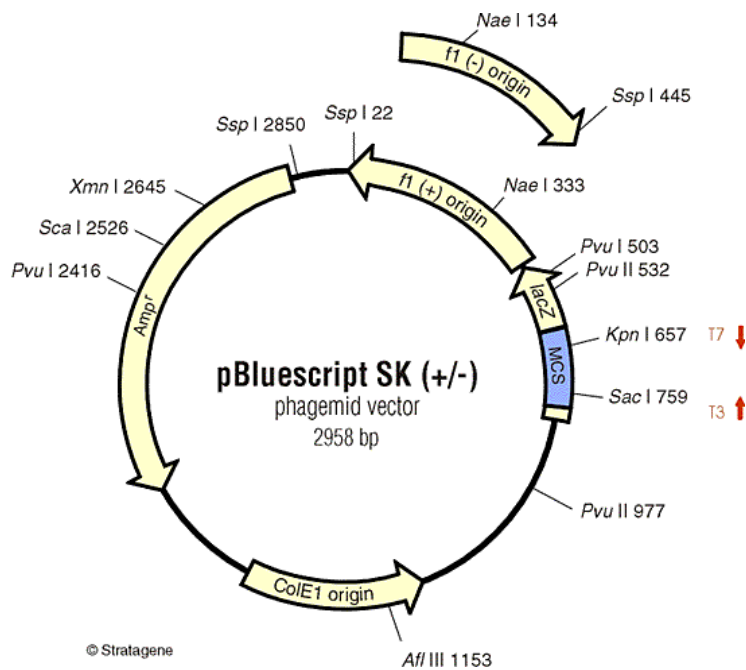
pGL3-VEGF-5HRE



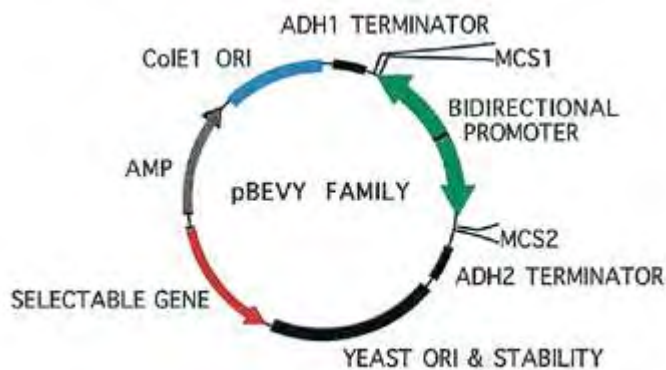
pCI-Renilla



pBluescript SK(-)



pBevy Gu



Εικόνα 6. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν

Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας

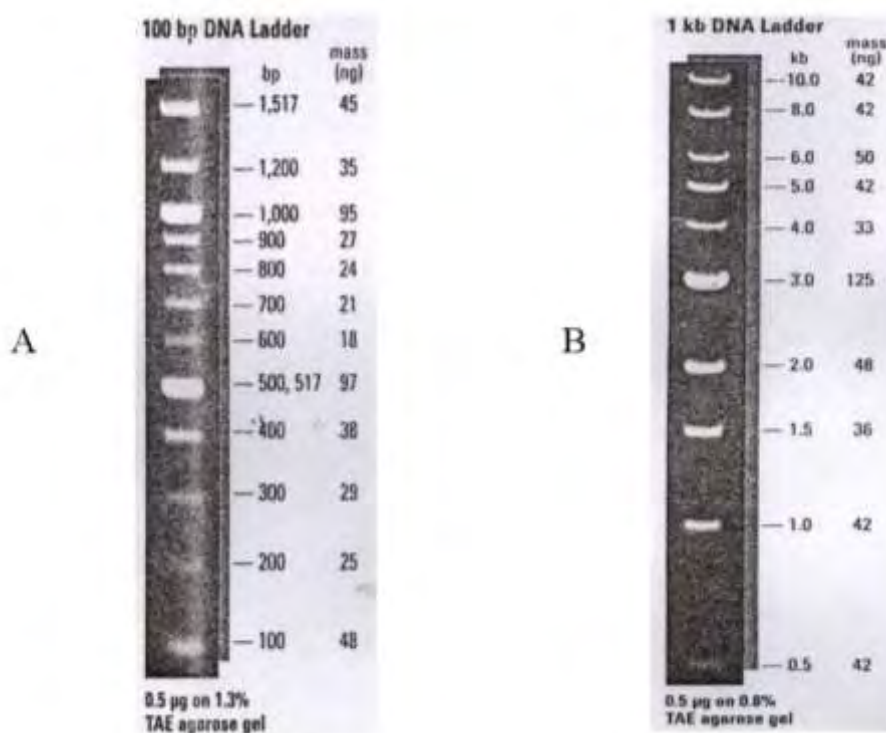
Τα ένζυμα μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

Αντισώματα :

1. rabbit anti-Hif-1α polyclonal antibody (1:1.000, Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Θεσσαλίας),
2. mouse anti-tubulin monoclonal antibody (1:5.000, Milipore Billerica MA U.S.A.),
3. anti-rabbit IgG-HRP (1:3.000, Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A.),
4. anti-mouse IgG-HRP (1:3.000, Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A.),
5. anti-rabbit IgG-FITC (1:500, Jackson Immunoresearch, Baltimore Pike, U.S.A.)

Μάρτυρες μοριακών βαρών DNA

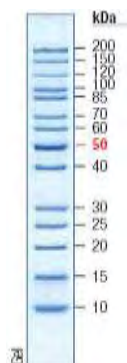
Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων του DNA ήταν της εταιρίας New England Biolabs και παρουσιάζονται παρακάτω



Εικόνα 7. DNA Μάρτυρες μοριακών βαρών 100bp (A) και 1kb (B)

Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών.

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που αναφέρονται στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας που απεικονίζεται. Δίνονται τα kDa για κάθε ζώνη.



Εικόνα 8. Πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών βαρών

ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T και Saos-2 με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Το πλασμιδιακό DNA εισέρχεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω ενός ιζήματος που σχηματίζεται με τη βοήθεια ενός μη λιπιδικού πολυμερούς και προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων. Σε τρυβλίο με κύτταρα HEK 293T ή Saos-2 αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και ξεπλένονται με 1,5 ml PBS 1X. Προστίθεται 1,5 ml τρυψίνη, ανακινούνται προσεκτικά, επωάζονται για 5 min στους 37⁰C και προστίθεται 5ml πλήρες DMEM προκειμένου να ανασταλεί η δράση της τρυψίνης. Σε άδειο τρυβλίο προστίθενται 8 ml πλήρες DMEM στο οποίο προστίθενται 1 ml από τα αιωρημένα κύτταρα ούτως ώστε την επόμενη μέρα η επικάλυψη του τρυβλίου να είναι της τάξης του 60-70%. Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος, τα κύτταρα μοιράζονται σε τρυβλία των 10cm ή πιάτα με 12 πηγαδάκια (12-well plates). Σε όλα τα πειράματα το ολικό πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2,2μg /πηγαδάκι (ανασυνδιασμένο πλασμίδιο/p-FLAG-CMV2 ή p-FLAG-CMV2 HIF-1α WT ή p-FLAG-CMV2 HIF-1α PS ή p-FLAG-CMV2 HIF-1α PS 1,2 μg : pGL3-5HRE-VEGF

0,75 μg : pCI-Renilla 0,25 μg, 5:3:1). Για κάθε τρυβλίο ετοιμάζονται τέσσερα μίγματα. Το κάθε ένα περιέχει 1,5 ml θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό, 6μl από το αντιδραστήριο TranspassTM D2 Transfection Reagent (New England Biolabs Inc. / λιπόφιλη ουσία η οποία χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση) και 6,6 μg ολικού πλασμιδιακού DNA. Αντίστοιχα για κάθε πηγαδάκι το μίγμα περιέχει 500 μl θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό, 2μl από το αντιδραστήριο Transpass D2 και 2,2μg πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα επιμόλυνσης αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για το σχηματισμό των συμπλοκών της επιμόλυνσης. Αφαιρείται το πλήρες DMEM ξεπλένονται μια φορά με DMEM χωρίς ορό και αντιβιοτικό και στη συνέχεια προστίθεται το μίγμα επιμόλυνσης σε κάθε erpendorf και επωάζονται στους 37⁰C για 3 ώρες. Αντικαθίσταται το μίγμα με πλήρες DMEM και επωάζονται στους 37⁰C για 24 ή 48 ώρες ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος.

Μέτρηση δράσης της λουσιφεράσης

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

Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα Saos-2 & HEK 293T

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο σε 150μl διαλύματος λύσης (25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, και 1mM Na₃VO₄). Οι αναστολείς PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και Na₃VO₄ (αναστολέας φωσφατασών) προστίθενται πριν τη χρήση στο διάλυμα λύσης. Το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι των 1,5 ml, επωάστηκε για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 10000xg για 30

λεπτά στους 4°C. Για την ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων με SDS και ακολούθησε θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά.

Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

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

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Biorad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετريέται στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Biorad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8-10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel): 8-10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβαξής (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O. Πάνω από την πηκτή επιστοιβαξής τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8,3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0,1% SDS). Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% glycerol, 0,05% Bromophenol Blue, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 min, με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Όταν η ηλεκτροφόρηση τέλειωσε η πηκτή αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη συσκευή και τοποθετήθηκε μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ειδική θήκη για μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη. Στη θήκη τοποθετήθηκαν η νιτροκυτταρίνη και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί, όλα είχαν εμποτιστεί με διάλυμα μεταφοράς (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, pH 9,2). Αφού αφαιρέθηκαν οι τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από την πηκτή και τη νιτροκυτταρίνη η ειδική θήκη τοποθετήθηκε στη συσκευή για μεταφορά, με τη νιτροκυτταρίνη να είναι προς τον θετικό πόλο. Η μεταφορά έγινε στα 400 mA για 1 ώρα και 30 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, αφαιρέθηκε η νιτροκυτταρίνη, ξεπλύθηκε με λίγο νερό και τοποθετήθηκε για 2 λεπτά περίπου σε διάλυμα Ponceau S 0,2% (2% Ponceau, 30% τριγλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10), μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Κατόπιν η νιτροκυτταρίνη ξεπλύθηκε με PBS (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4)-Tween 20 υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να αφαιρεθεί το Ponceau. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού

(5% γάλα σε σκόνη, και PBS-0,1% Tween 20) για 1 ώρα για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Έπειτα έγινε ολονύχτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 3% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα 3 φορές με PBS-0,1% Tween 20 (3x 5 min). Ακολούθως έγινε επώαση με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδέεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, με 3% γάλα σε σκόνη και PBS-0,1 % Tween 20 για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση και ξέπλυμα 3 φορές σε PBS-Tween 20 (3x 5 min).

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM σε 0,1 M Tris-Cl pH 8,5), στο οποίο προστέθηκαν 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6,8 mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 λεπτά επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 λεπτά στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 λεπτά σε νερό.

Ανοσοφθορισμός

Στην μικροσκοπία ανοσοφθορισμού η ανίχνευση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που εντοπίζονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των ευκαριωτικών κυττάρων. Η επώαση των κυττάρων με δεύτερα αντισώματα ειδικά για

τα πρώτα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες επιτρέπει τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών στα κύτταρα.

Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος μοιράζουμε τα κύτταρα σε πιάτα με 6 πηγαδάκια, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφανείας. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένουμε με κρύο 1X PBS. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με PBS + 3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πλένουμε με κρύο 2X PBS από 5 λεπτά. Αφήνουμε τα κύτταρα για 15 λεπτά με πλύση 1X PBS / 1% Triton X-100 στους 4⁰C. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές. Πλένουμε με κρύο 3X PBS / Tween 20 από 3 λεπτά. Στη συνέχεια, γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στις καλυπτρίδες με PBS / 0,1% Tween 20 σε 3% BSA στους 4⁰C για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή σε 1% BSA για όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα σηκώνουμε τις καλυπτρίδες, στεγνώνουμε καλά και τοποθετούμε σε άλλο πιάτο (12 wells), το οποίο είναι στεγνό. Προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε PBS-Tween 20 σε 1% BSA για 1,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για όλη τη νύχτα στους 4⁰C. Απομακρύνουμε το πρώτο αντίσωμα με πλύσεις 3X PBS / 0,1% Tween 20 σε 1% BSA. Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα σε PBS-Tween 20 σε 1% BSA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το δεύτερο αντίσωμα με πλύσεις 3X PBS / Tween 20. Ακολουθούν πλύσεις 2X PBS 1% και πλύσεις 2X με dd H₂O από 5 λεπτά η καθεμία. Οι καλυπτρίδες στεγνώνονται. Τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα και προστίθεται σε κάθε μια 2μl vectashield / DAPI (Vector laboratories). Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες.

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 50 μl και περιλαμβάνει:

- DNA εκμαγείο, 10 ng
- Πολυμεράση TAQ ή VENT ή PFU (1,5u/ μl), 1 μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα, Buffer 10x, 5 μl
- dNTP's C=200 μM , 7 μl
- πρόσθιο εκκινητή, Forward Primer HIF-1 α NB (100ng/ μl), 1 μl
- ανάστροφο εκκινητή, Revers Primer HIF-1 α C-B-S (100ng/ μl), 1 μl
- H₂O 34 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

- 30 sec \rightarrow 94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec \rightarrow ($\theta^\circ\text{C}$ / εξαρτάται από την θερμοκρασίας τήξης του εκκινητή (T_m))
στάδιο υβριδοποίησης
- (Time_{min} 1'-3' / εξαρτάται από το μήκος του αναμενόμενου προϊόντος) \rightarrow
72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 25-30

Αρχική αποδιάταξη 5 min \rightarrow 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min \rightarrow 72°C

Στο τέλος 5 μl από κάθε αντίδραση PCR ηλεκτροφορεύεται σε πηκτική αγαρόζη.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Η Ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωσή τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών αγαρόζης με τήξη της αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με τη ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα που η πυκνότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως το μέγεθος και η διαμόρφωση των τμημάτων του DNA, η συγκέντρωση της αγαρόζης, το δυναμικό που εφαρμόζεται

στα άκρα της πηκτής και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04 M Tris-οξικό, 0.001 M EDTA pH 8.0), παρουσία και βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Η ιδιότητα του να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή. Διαλύεται τόση ποσότητα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, ώστε η συγκέντρωση της στον τελικό όγκο να είναι η επιθυμητή. Ανακινείται και θερμαίνεται στους 100°C. Όταν πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος στους 60°C, προστίθεται τόσος όγκος 10 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου ώστε στο διάλυμα η συγκέντρωση του να είναι 0,5 μg/ml. Το διάλυμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές έως ότου πήξει. Προστίθεται TAE ώστε να καλυφθεί η πηκτή. Προστίθεται στο διάλυμα με το DNA η χρωστική μπλε βρωμοφαινόλη (0,25%), και γλυκερόλη (30%), η οποία είναι 7x σε σχέση με τον συνολικό όγκο. Φορτώνεται το DNA στις εγκοπές της πηκτής. Συνδέονται τα ηλεκτρόδια στη συσκευή και ηλεκτροφορείται στα 100V για 20 τουλάχιστον λεπτά. Τοποθετείται η πηκτή πάνω από την λάμπα που να εκπέμπει στο υπεριώδες και φωτογραφίζεται.

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από την πηκτή αγαρόζης (Gel Extraction)

Απομονώνουμε με προσεκτικό κόψιμο από το σύνολο του gel αγαρόζης τις επιθυμητές μπάντες. Στη συνέχεια αφού τις τοποθετήσουμε σε σωληνάκια erpendorf τις ζυγίζουμε στο ζυγό ακριβείας. Για κάθε ένα όγκο gel αγαρόζης προσθέτουμε τρεις όγκους διαλύματος NT buffer. Κάνουμε καλό vortex για να διαλυθούν επαρκώς τα κομμάτια του gel. Εν συνέχεια αφήνουμε τα erpendorf's σε θερμοκρασία 50°C μέχρι να λιώσει επαρκώς όλο το gel. Μετά τοποθετούνται σε ειδική στήλη (QIA quick spin column) κάτω από την οποία τοποθετείται ένα σωληνάκι συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 min, απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 600μl διαλύματος NT3. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 11.000 g για 1 min, γίνεται απόρριψη του

αδέσμευτου κλάσματος (flow through) και ξέπλυμα της στήλης με προσθήκη 200μl διαλύματος NT3. Για ακόμα μια φορά απορρίπτεται το αδέσμευτο κλάσμα ξανά και φυγοκεντρείται στα 11.000 g για 2 min ώστε να απορριφθεί τελείως το διάλυμα NT3. Τέλος κάτω από τη στήλη τοποθετείται καθαρό σωληνάκι και το DNA εκλούεται με προσθήκη 30 μl H₂O και φυγοκέντρωση στα 11.000 g για 1 min.

Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και κάτω από ορισμένες συνθήκες προκαλούν την πέψη του DNA σε μικρότερα τμήματα. Ανάλογα με την ενεργότητα (Unit/μl) του κάθε ενζύμου καθορίζεται και η ποσότητα που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης. Ισχύει ότι 1 unit ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl σε μια ώρα και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε είτε για τον έλεγχο του μεγέθους των κομματιών DNA που κλωνοποιήθηκαν και τον σωστό προσανατολισμό τους ή για την απομόνωση συγκεκριμένων κομματιών που προορίζονται για κλωνοποίηση. Για μια αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 20 μl, χρησιμοποιείται 4μg πλασμιδιακού DNA (ή 5μl από μια καλή απομονωση πλασμιδιακού DNA μικρης κλιμακας), το αντίστοιχο ενζύμου περιορισμού 1-5u/μg DNA ή τοσο ώστε να μην ξεπερνα το 1/10 του τελικου ογκου της αντιδρασης (για τα 20 μl εως 2μl), 2 μl 10X κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε ένζυμο 0,5 μl BSA. Ενώ αντίστοιχα για πέψεις σε τελικό όγκο 100 μl, χρησιμοποιείται 15 μg πλασμιδιακού DNA, το αντίστοιχο ενζύμου περιορισμού 1-5u/μg DNA ή εως 10 μl, 10 μl 10X κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε ένζυμο και 10 μl BSA. Το υπόλοιπο του όγκου της αντίδρασης συμπληρώνεται με αποστειρωμένο και δις αποσταγμένο H₂O (ddH₂O). Η επώαση γίνεται για τουλάχιστον 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA (CIP)

Το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης (CIP: Calf Intestinal Phosphatase, New England BioLabs) χρησιμοποιείται για την αποφωσφορυλίωση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια),

παρεμποδίζοντας έτσι την επανασύνδεσή τους. Για 1 μg DNA που είχε κοπεί με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, χρησιμοποιήθηκε 1 Unit CIP στο αντίστοιχο για την φωσφατάση ρυθμιστικό διάλυμα και ddH₂O έως τα 50μl. Η επώαση έγινε στους 37⁰ C για 30 λεπτά. Η CIP απενεργοποιείται με προσθήκη 5mM EDTA με pH.8 και θέρμανση της αντίδρασης για 10 λεπτά στους 75⁰ C. Τέλος γίνεται κατακρήμνιση του αποφωσφορυλιωμένου DNA.

Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης)

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων δίκλωνου DNA με την προϋπόθεση ότι έχουν συμπληρωματικά ή τυφλά 3' και 5' άκρα.

Για την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε μοριακή αναλογία 1 /3, 2,5 Units λιγάσης T4 (5 Unit/μl, Fermentas), 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης και ddH₂O έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl. Το μίγμα επώαστηκε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και η απενεργοποίηση της λιγάσης έγινε στους 65⁰C για 10 λεπτά.

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

Με την μέθοδο αυτή οι κυτταρικές μεμβράνες ενός μικρού μέρους των κυττάρων γίνονται διαπερατές σε ξένο DNA γι' αυτό και τα κύτταρα στη συνέχεια ονομάζονται δεκτικά (competent). Καλλιέργειες βακτηρίων επωάζονται σε θρεπτικό μέσο TYM (2% τρυπτόνη, 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl και 10 mM MgSO₄) με αντιβιοτικό επιλογής, στους 37⁰C για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml TYM με αντιβιοτικό επιλογής και επωάζεται περαιτέρω στους 37⁰C για 2-3 ώρες. Ακολουθεί νέα αραιώση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό και επώαση της καλλιέργειας έως ότου η απορρόφηση (OD) στα 590nm γίνει 0,4. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 1800xg για 5 λεπτά, επαναιωρούνται σε 25ml διαλύματος TFBI (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη) και επωάζονται στον πάγο για 10

λεπτά. Το TFBI απομακρύνεται από τα κύτταρα, μετά από φυγοκέντρηση, στα 1800xg, για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται εκ νέου σε 2ml διαλύματος TFBI (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl και 20% γλυκερόλη) και επωάζονται για 60 λεπτά στον πάγο. Μετά την παραπάνω επεξεργασία αποθηκεύονται σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου στους -80⁰ C.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (E.coli transformation)

Ο μετασχηματισμός επιτρέπει την είσοδο πλασμιδίων μέσα σε δεκτικά βακτήρια. Το εκάστοτε πλασμίδιο φέρει κάποιο γονίδιο επιλογής (συνήθως γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό) ώστε να επιλεγούν μόνο τα κύτταρα που το έχουν προσλάβει. Πλασμιδιακό DNA (ή προϊόν της αντίδρασης λιγάσης) προστίθενται σε 200μl δεκτικών κυττάρων τα οποία επωάζονται 30 λεπτά σε πάγο και ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων για 1min στους 42°C, έτσι ώστε να προσλάβουν το πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml θρεπτικού LB, ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37 °C και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1700xg. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100 μl LB, επιστρώνονται σε τρυβλίο LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και επωάζονται στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάζεται ως εξής: Για 1 lt προστίθενται 10gr τρυπτόνης, 5gr εκχυλίσματος ζύμης και 5gr NaCl. Το pH του διαλύματος προσαρμόζεται στο 7,5 με NaOH. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου LB-άγαρ ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστίθενται επιπλέον 20gr άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται και αν χρειάζεται προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Mini Preparation)

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες, 3 ml θρεπτικού υλικού LBamp εμβολιάζονται με αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα και επωάζονται O/N στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Την άλλη μέρα συλλέγεται η καλλιέργεια σε μικροσωληνίσκους erpendorf's των 1,5 ml και φυγοκεντρείται στα 4.000 g για 2 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθεται 100 μl διαλύματος TE (Tris 10mM – EDTA 1mM pH 7.5) και γίνεται ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν προστίθενται 200μl διαλύματος TENS (0.1N NaCl, 0.5% SDS σε διάλυμα Tris 10mM –EDTA 1mM pH 7.5), ανακινούμε καλά και προσεκτικά και προσθέτουμε άλλα

150μl CH₃COONa 3M pH 5.2 και αναδεύουμε στον αναδευτήρα (vortex). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στα 12.000 g και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι. Έπειτα προστίθενται 450 μl ισοπροπανόλης 100%, ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) και φυγοκέντρηση για 15 min στα 12.000 g. Πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 70% και πιπετάρουμε καλά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 min και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε να αναδιαλυθεί τελικά σε 20μl αποστειρωμένου ddH₂O.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (Midi Preparation)

Από O/N καλλιέργειες E.coli Top10 σε 100ml θρεπτικού LB με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση (1/1000) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση με τα πλασμίδια pBeny GU-HIF-1α-1-834 WT, P582S, A588T φυγοκεντρούνται τα κύτταρα στα 4000 g για 15 min στους 4°C. Για τη διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το midi kit της Qiagen. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 8ml Buffer P₁ (Resuspension Buffer + RNase) από το kit της Qiagen και γίνεται ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex). Κατόπιν προστίθενται 8ml Buffer P₂ (Lysis Buffer) από το kit της Qiagen και μένει για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου αφού έγινε καλή ανάμιξη. Προστίθενται 8 ml Buffer P₃ (Neutralization Buffer) και γίνεται ανάμιξη και επώαση στον πάγο για 15 min. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στα 4000 g για 45 min, το υπερκείμενο αποχύνεται σε νέο Falcon αφού διηθείται μέσα από γάζα. Χρησιμοποιούνται τρεις στήλες της Qiagen (μια για κάθε πλασμίδιο). Πρώτα η στήλη ξεπλένεται με 12ml Buffer P₄ (Equilibration buffer). Έπειτα το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποχύνεται στη στήλη και ακολουθεί ξέπλυμα με 5ml Buffer P₄ (Equilibration buffer). Αφαιρείται το άσπρο πώμα από τις στήλες. Εκλούεται το DNA που επικάθησε στις στήλες με 8ml Buffer P₅ (Wash buffer). Στη συνέχεια παίρνουμε τα γυάλινα σωληνάκια της υπερφυγοκέντρου, βάζουμε εκεί τις στήλες και αποχύνουμε 5ml Buffer P₆ (Elution buffer). Το προϊόν της έκλουσης κρατείται. Προστίθενται 3,5 ml ισοπροπανόλης 70% αναμιγνύονται και φυγοκεντρούνται στα 15.000 g για 30 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται άλλα 2ml από αιθανόλη 70%, φυγοκεντρούνται για 5 min στα 15.000 g στους 4°C. Τέλος το ίζημα ξεραίνεται και αναδιαλύεται σε 100 μl ddH₂O.

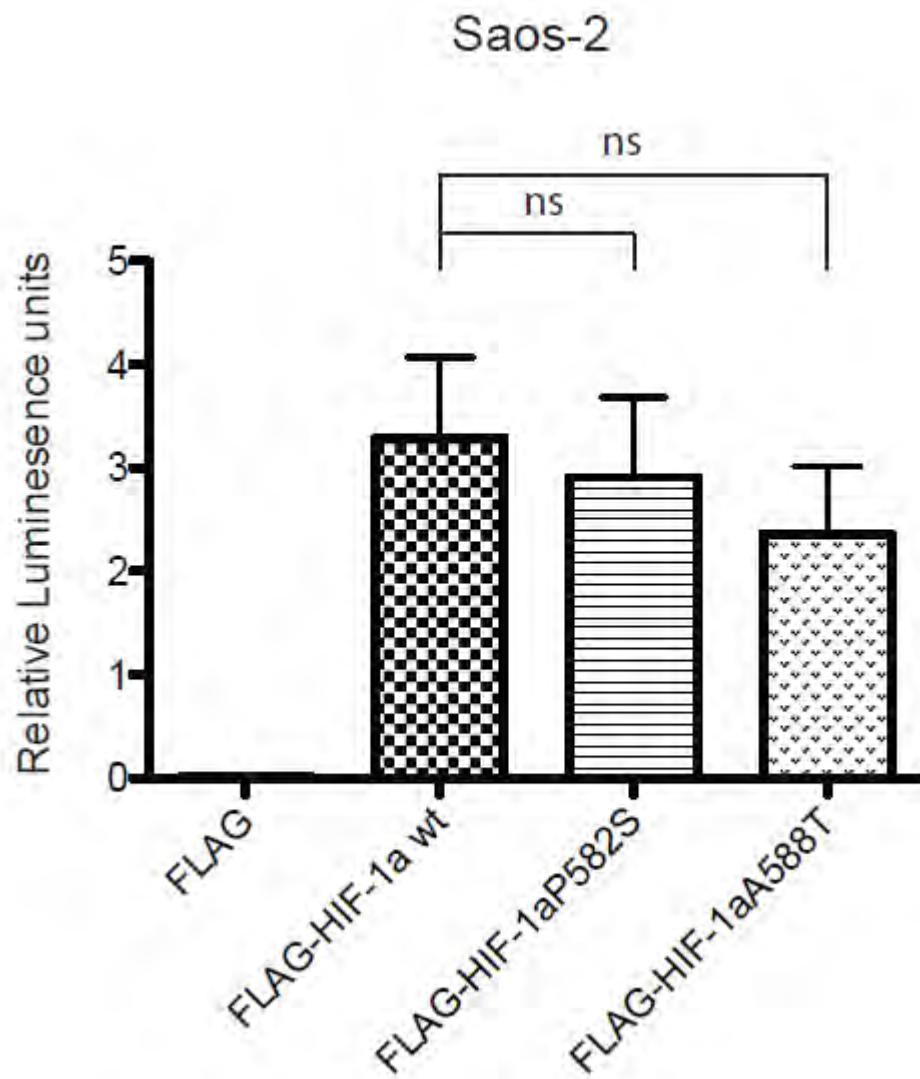
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α WT ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ PS ΚΑΙ AT ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Saos-2 και HEK 293T.

Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α αγρίου τύπου (WT) και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T.

A) Επιμόλυνση κυττάρων Saos-2 με τα πλασμίδια p-FLAG-CMV2, p-FLAG-CMV2 HIF-1α WT, p-FLAG-CMV2 HIF-1α PS, p-FLAG-CMV2 HIF-1α AT και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητάς τους.

Η κυτταρική σειρά Saos-2 χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας γιατί προέρχεται από οστεοσάρκωμα και προσομοιάζει καλύτερα το σύστημα του μυοσκελετικού που μελετάμε για την οστεονέκρωση. Επιπλέον δεν έχουν ξαναγίνει πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α και των συγκεκριμένων αλληλομόρφων του σε αυτή την κυτταρική σειρά. Κύτταρα Saos-2 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 12 θέσεων έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης να βρίσκονται σε πυκνότητα 60-70%. Η επιμόλυνση έγινε με τα πλασμίδια pGL3-VEGF-5HRE και pCI-Renilla (βλ. μέθοδοι) για όλες τις θέσεις του τρυβλίου και επιπλέον με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια pFLAG-CMV2, pFLAG-CMV2 HIF-1α WT, pFLAG-CMV2 HIF-1α PS και pFLAG-CMV2 HIF-1α AT. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές εις τριπλούν όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Στα τρυβλία σε κάθε θέση χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες και οι ίδιες συγκεντρώσεις DNA (ανασυνδιασμένο πλασμίδιο 1,2μg, pGL3-VEGF-5HRE 0,75μg, pCI-Renilla 0,25 μg) και αντιδραστηρίων (DMEM 500μl/θρεπτικό υλικό), (Transpass 2μl/λιπόφυλη ουσία). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέχτηκαν και λύθηκαν. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α (βλ. μέθοδοι) (σύστημα μέτρησης λουσιφεράσης). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω, εικόνα 9:



	FLAG-HIF-1α WT	FLAG-HIF-1α PS	FLAG-HIF-1α AT
1	1,354	1,619	0,46
2	0,498	0,737	0,40
3	0,887	0,273	1,03
4	0,378	0,803	0,39
5	0,837	0,814	1,38

6	0,729	0,664	0,31
7	7,537	3,712	3,24
8	4,825	3,617	3,03
9	5,517	4,057	7,60
10	5,172	4,791	4,14
11	5,477	9,512	1,46
12	6,228	4,298	4,85
RLU	3,287	2,908	2,36
STERROR	0,78	0,77	0,66
PVALUES	0,0002	0,3669	0,1862

Εικόνα 9. Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α μετά από επιμόλυνση κυττάρων Saos-2 με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που αναγράφονται στο γράφημα. Οι τιμές που απεικονίζονται στον πίνακα στις γραμμές από 1-12, αντικατοπτρίζουν 4 διαφορετικά πειράματα εις τριπλούν, μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Αποτελούν δώδεκα ξεχωριστές τιμές σχετικών μονάδων λουσιφεράσης, που αντιπροσωπεύουν το λογο firefly luciferase/renilla luciferin. Στη γραμμή RLU παρατηρούμε τον μέσο όρο των τιμών αυτών, ο οποίος αποτυπώνεται στο παραπάνω γράφημα με τις διαφορετικής σχεδίασης στήλες. Στη γραμμή STERROR παρατηρούμε την τυπική απόκλιση των τιμών δια του πλήθους των τιμών, η οποία αποτυπώνεται στο γράφημα με τις κατακόρυφες γραμμές σφάλματος πάνω από τις στήλες του γραφήματος. Τέλος η στήλη PVALUES αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα των τιμών. Τιμές PVALUES > 0,05 δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Με τις οριζόντιες γραμμές ns/non significance πάνω από τις στήλες του γραφήματος επισημαίνεται η μη ύπαρξη στατιστικής σημαντικότητας για τις τιμές των σχετικών μονάδων λουσιφεράσης μεταξύ του HIF-1α αγρίου τύπου WT και των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και HIF-1α AT.

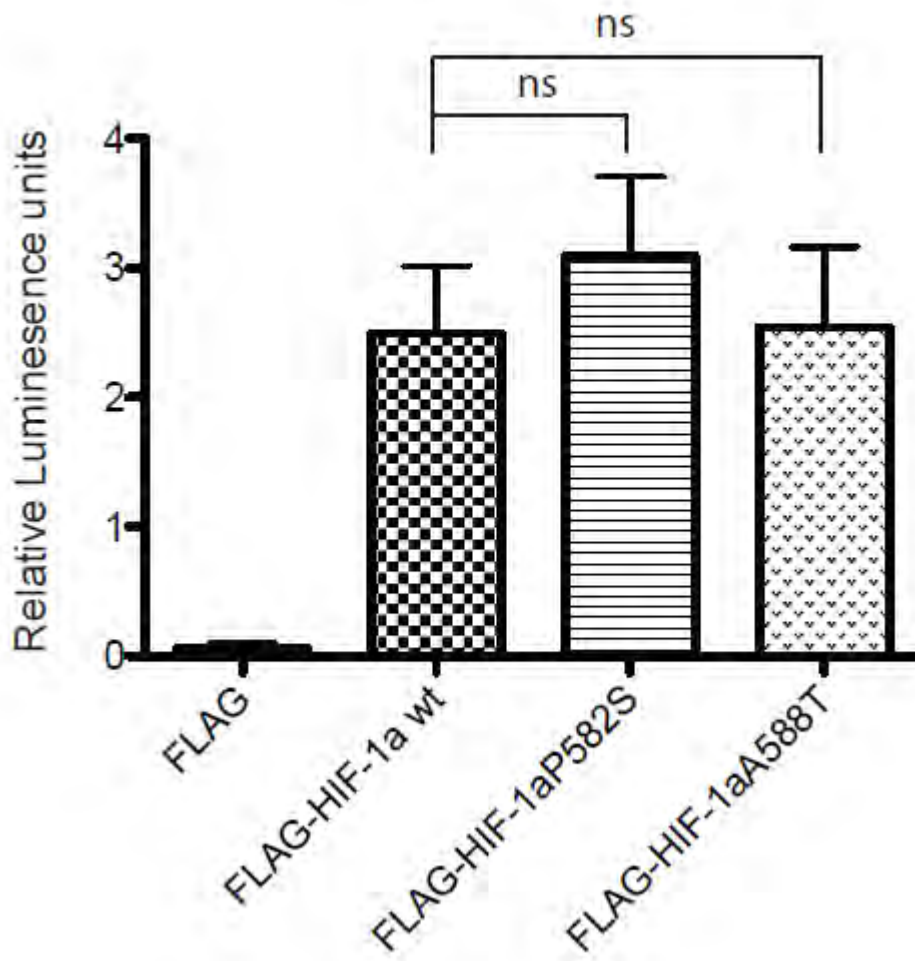
Παρατηρούμε πως η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α αγρίου τύπου σε σχέση με αυτή των αλληλομόρφων του δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα οι στήλες που αντιπροσωπεύουν τις σχετικές μονάδες

λουσιφεράσης των αλληλομόρφων HIF-1α PS και HIF-1α AT σε σχέση με του HIF-1α WT φαίνεται να μειώνονται ελαφρά. Μια μείωση η οποία όπως προκύπτει από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το t-test δεν είναι στατιστικά σημαντική (PVALUES > 0.05), πράγμα που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεταγραφική ενεργότητα των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και AT σε σχέση με αυτή του HIF-1α αγρίου τύπου WT σε κύτταρα Saos-2 δεν μεταβάλλεται αλλά παραμένει σταθερή.

B) Επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T με τα πλασμίδια pFLAG-CMV2, pFLAG-CMV2 HIF-1α WT, pFLAG-CMV2 HIF-1α PS, pFLAG-CMV2 HIF-1α AT και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητάς τους

Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε για τα πειράματά μας κύτταρα HEK 293T, αφενός γιατί η κυτταρική αυτή σειρά είναι κοινά χρησιμοποιούμενη σε πειράματα ελέγχου της μεταγραφικής ενεργότητας και αφετέρου γιατί έχει ήδη χρησιμοποιηθεί (όπως διαπιστώσαμε από τη βιβλιογραφία, Yamada et al., 2005) σε πειράματα ελέγχου της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α αγρίου τύπου και των αλληλομόρφων του PS και AT. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 12 θέσεων έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης να βρίσκονται σε πυκνότητα 60-70%. Η επιμόλυνση έγινε με τα πλασμίδια pGL3-VEGF-5HRE και pCI-Renilla (βλ. μέθοδοι) για όλες τις θέσεις του τρυβλίου και επιπλέον με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια pFLAG-CMV2, pFLAG-CMV2 HIF-1α WT, pFLAG-CMV2 HIF-1α PS, pFLAG-CMV2 HIF-1α AT. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές εις τριπλούν όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Στα τρυβλία σε κάθε θέση χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες και οι ίδιες συγκεντρώσεις DNA (ανασυνδιασμένο πλασμίδιο 1,2μg, pGL3-VEGF-5HRE 0,75μg, pCI-Renilla 0,25 μg) και αντιδραστηρίων (DMEM 500μl/θρεπτικό υλικό), (Transpass 2μl/λιπόφιλη ουσία). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέχτηκαν και λύθηκαν. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α (βλ. μέθοδοι / σύστημα μέτρησης λουσιφεράσης) και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 10:

HEK293



	FLAG-HIF-1α WT	FLAG-HIF-1α PS	FLAG-HIF-1α AT
1	0,182	0,214	0,240
2	0,189	0,405	0,466
3	0,177	0,382	0,880
4	3,737	4,531	2,12
5	2,036	4,128	2,07
6	2,256	1,896	2,09
7	2,111	3,433	2,27
8	3,938	3,654	1,10
9	4,613	1,580	2,03
10	1,686	5,765	6,47
11	3,408	6,031	3,96
12	5,598	5,094	6,81
RLU	2,494	3,093	2,542
STERROR	0,52	0,62	0,62
PVALUES	0,00006	0,23	0,48

Εικόνα 10. Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α μετά από επιμόλυνση κυττάρων HEK 293T με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που αναγράφονται στο γράφημα. Οι τιμές που απεικονίζονται στον πίνακα στις γραμμές από 1-12, αντικατοπτρίζουν 4 διαφορετικά πειράματα εις τριπλούν, μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Αποτελούν δώδεκα ξεχωριστές τιμές που αντιπροσωπεύουν το λογο firefly luciferase/renilla luciferin. Στη γραμμή RLU παρατηρούμε τον μέσο όρο των τιμών αυτών, ο οποίος αποτυπώνεται στο παραπάνω γράφημα με τις διαφορετικής σχεδίασης στήλες. Στη γραμμή STERROR παρατηρούμε την τυπική απόκλιση των τιμών δια του πλήθους των τιμών, η οποία αποτυπώνεται στο γράφημα με τις κατακόρυφες γραμμές σφάλματος πάνω από τις στήλες του γραφήματος. Τέλος η στήλη PVALUES αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα των τιμών. Τιμές PVALUES > 0,05 δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Με τις οριζόντιες γραμμές ns/non significance πάνω από τις στήλες του γραφήματος επισημαίνεται η

μη ύπαρξη στατιστικής σημαντικότητας για τις τιμές των σχετικών μονάδων λουσιφεράσης μεταξύ του HIF-1α αγρίου τύπου WT και των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και HIF-1α AT.

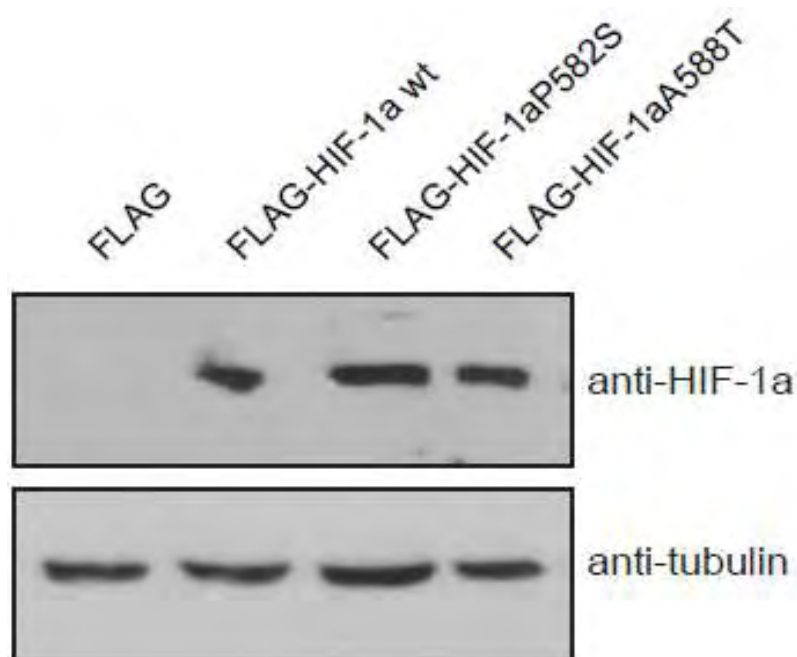
Παρατηρείται ότι η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α αγρίου τύπου σε σχέση με αυτή των αλληλομόρφων του δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα οι στήλες που αντιπροσωπεύουν τις σχετικές μονάδες λουσιφεράσης των αλληλομόρφων HIF-1α PS και HIF-1α AT σε σχέση με του HIF-1α WT φαίνεται να αυξάνονται ελαφρά. Μια αύξηση η οποία όπως προκύπτει από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το t-test δεν είναι στατιστικά σημαντική (PVALUES > 0.05), πράγμα που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεταγραφική ενεργότητα των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και AT σε σχέση με την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α WT σε κύτταρα HEK 293T δε μεταβάλλεται αλλά παραμένει σταθερή. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και στα πειράματα που έγιναν με την κυτταρική σειρά Saos-2.

Έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης του HIF-1α αγρίου τύπου (WT) και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T

Δεδομένου ότι η επιμόλυνση των κυττάρων Saos-2 και HEK 293T με τα πλασμίδια p-FLAG-CMV2 HIF-1α (WT, PS, AT) έδειξε ότι η μεταγραφική ενεργότητα των αλληλομόρφων του HIF-1α PS, AT σε σχέση με τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α αγρίου τύπου φαίνεται να παραμένει αμετάβλητη ήταν απαραίτητη η επιβεβαίωση της ισόποσης έκφρασης των πρωτεϊνών HIF-1α WT, PS, AT στα κύτταρα αυτά. Έτσι, έγινε ανίχνευση του HIF-1α WT και των ισομορφών του PS και AT σε κύτταρα HEK 293T με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης αλλά και παρατήρηση των επιπέδων τους με ανοσοφθορισμό. Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού ελέγχθηκε και ο σωστός υποκυτταρικός εντοπισμός των εκφρασμένων πρωτεϊνών.

Ανίχνευση των πρωτεϊνών HIF-1α (WT, PS, AT) σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 και HEK 293T με ανοσοαποτύπωση.

Με σκοπό να ανιχνευτούν οι πρωτεΐνες HIF-1α (WT, PS, AT) και να ποσοτικοποιηθεί η έκφραση τους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης (βλ. μέθοδοι) σε εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 και HEK 293T. Έτσι κύτταρα Saos-2 και HEK 293T τα οποία είχαν αναπτυχτεί σε τριβλία στους 37 °C, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια p-FLAG-CMV2 που εκφράζουν τις πρωτεΐνες HIF-1α (WT, PS, AT) καθώς και με το πλασμίδιο p-FLAG-CMV2 χωρίς ένθεμα. Στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων έγινε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με τα αντισώματα: Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα : 1. rabbit anti-Hif-1α, 2. mouse anti-tubulin και ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν τα : 3. anti-rabbit IgG-HRP, 4. anti-mouse IgG-HRP. Μετά από τη μεταφορά υγρής φάσης έγινε βαφή με ronseau για 2 λεπτά περίπου μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα και δούμε ότι όντως έγινε μεταφορά πρωτεϊνών. Στη συνέχεια έγινε επώαση της μεμβράνης με τα αντισώματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε φωτογραφικό φιλμ (βλ. μέθοδοι). Δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε τον HIF-1α στα Saos-2 λόγω χαμηλής αποδοτικότητας της επιμόλυνσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (εικόνα 11):



Εικόνα 11. Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών HIF-1α (WT, PS, AT) σε εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 και HEK 293T

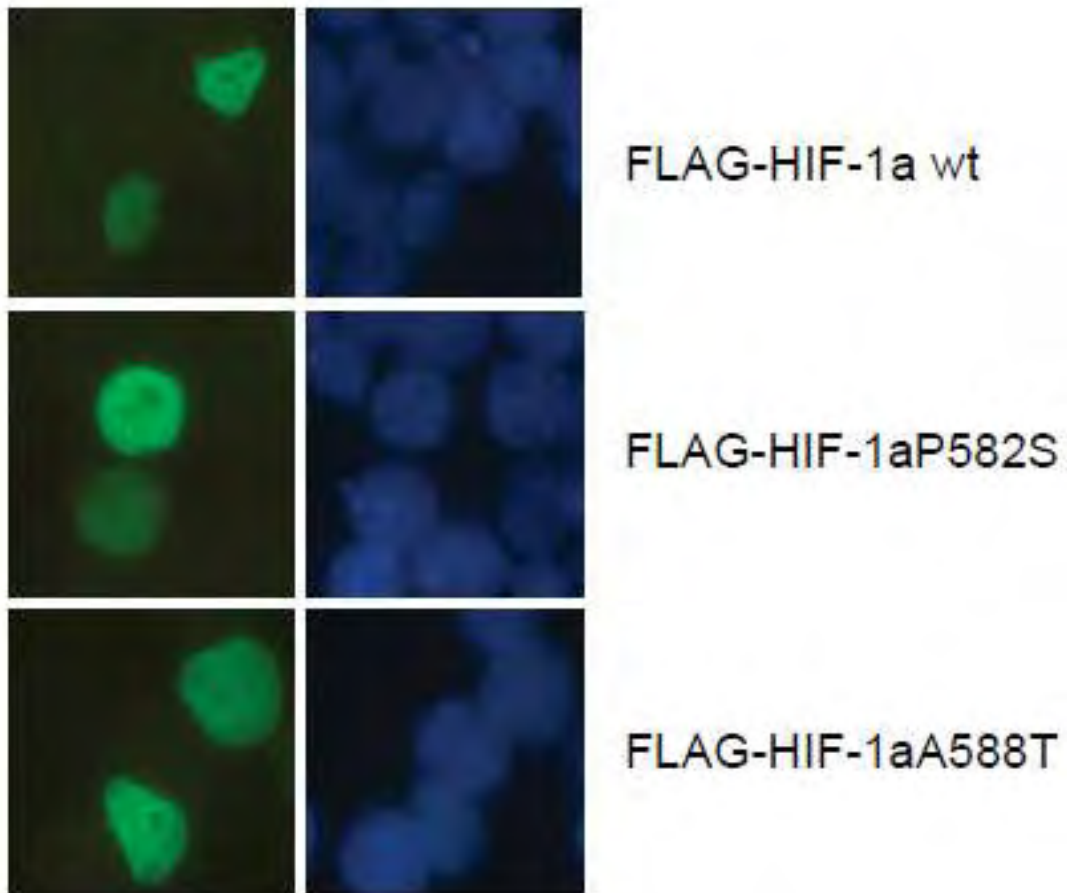
Παρατηρείται ότι στα κύτταρα HEK 293T τα επίπεδα των πρωτεϊνών HIF-1α WT, PS και AT φαίνεται να είναι ισόποσα και όμοια. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των πρωτεϊνών των πολυμορφισμών του HIF-1α PS και AT δεν μεταβάλλεται σε σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α αγρίου τύπου WT.

Παρατήρηση της έκφρασης του HIF-1α WT, και των αλληλομόρφων του PS και AT σε κύτταρα Saos-2 και HEK 293T με ανοσοφθορισμό.

Για την παρατήρηση των πρωτεϊνών στο μικροσκόπιο φθορισμού, αρχικά έγινε επιμόλυνση των κυττάρων HEK 293T και Saos-2 με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια p-FLAG-CMV2 (HIF-1α WT, PS, AT). Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα κατεργάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού (βλ. μέθοδοι) και στη συνέχεια έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το: rabbit anti-Hif-1α και ως δεύτερο το: anti-rabbit IgG-FITC.

Όσο αφορά στα κύτταρα HEK 293T τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω στην εικόνα 12:

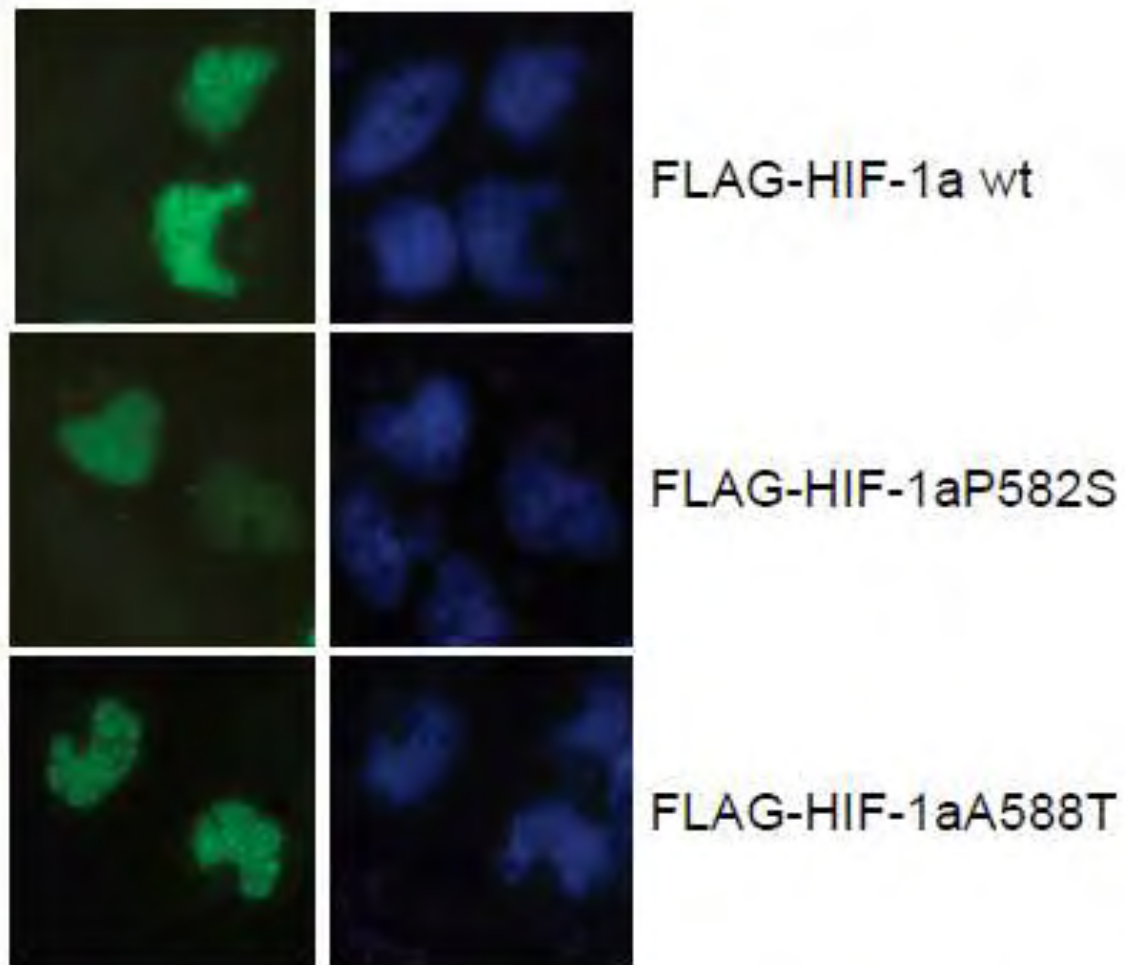
HEK293



Εικόνα 12. Κύτταρα HEK 293T στα οποία εκφράζονται οι αναγραφόμενες πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ύστερα από επεξεργασία των κυττάρων με DAPI (δεξιές εικόνες) οι πυρήνες τους εμφανίζονται μπλε στο μικροσκόπιο. Επεξεργασία των κυττάρων με δεύτερο αντίσωμα FITC (αριστερές εικόνες), έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των ισομορφών του HIF-1α με πράσινο χρώμα.

Από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όλες οι πρωτεΐνες, HIF-1α WT, HIF-1α PS και HIF-1α AT εκφράζονται σε ισόποσα επίπεδα και έχουν πυρηνικό εντοπισμό. Όσο αφορά στα κύτταρα Saos-2 τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 13:

Saos-2



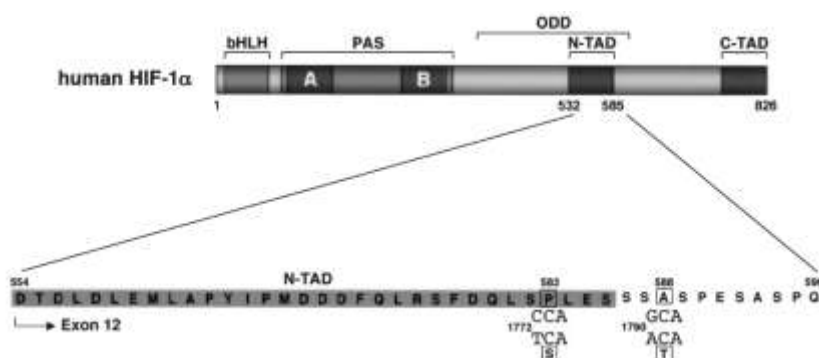
Εικόνα 13. Κύτταρα Saos-2 στα οποία εκφράζονται οι αναγραφόμενες πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ύστερα από επεξεργασία των κυττάρων με DAPI (δεξιές εικόνες) οι πυρήνες τους εμφανίζονται μπλε στο μικροσκόπιο. Επεξεργασία των κυττάρων με δεύτερο αντίσωμα FITC (αριστερές εικόνες), έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των ισομορφών του HIF-1α με πράσινο χρώμα.

Από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όλες οι πρωτεΐνες HIF-1α WT, HIF-1α PS και HIF-1α AT εκφράζονται ισόποσα και έχουν πυρηνικό εντοπισμό. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης και του ανοσοφθορισμού συμφωνούν μεταξύ τους, αλλά και με τα αποτελέσματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIF-1A PS και AT ΣΕ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (PBEVY-GU) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ S.CEREVISIAE

Ενίσχυση των αλληλομόρφων του HIF-1α PS και AT με αντίδραση PCR.

Στην εικόνα 14., φαίνεται η περιοχή στην οποία εντοπίζονται οι μεταλλάξεις PS και AT. Η περιοχή αυτή είναι η ODD ή αλλιώς οξυγονοεξαρτώμενη περιοχή του HIF-1α. Οι εν λόγω μεταλλάξεις επισυμβαίνουν στα νουκλεοτίδια 1772, (αλλαγή από κυτοσίνη C σε θυμίνη T που οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος από προλίνη P σε σερίνη S) και 1790, (αλλαγή από γουανίνη G σε αδενίνη A που οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος από αλανίνη A σε θρεονίνη T).



Εικόνα 14. Αμινοξική αλληλουχία των περιοχών του HIF-1α στην οποία εντοπίζονται οι SNPs PS & AT.

Προκειμένου να εκφραστούν οι μεταλλαγμένες μορφές του HIF-1α σε κύτταρα *S.cerevisiae*, έπρεπε να κλωνοποιηθούν στον κατάλληλο φορέα έκφρασης. Ο φορέας αυτός είναι ο pBenvy-GU (στον οποίο υπάρχει ήδη στο εργαστήριο κλωνοποιημένος ο HIF-1α WT). Τα cDNA των μορφών PS και AT ενισχύθηκαν με την αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα πλασμίδια pFLAG-CMV2 HIF1α PS και pFLAG-CMV2 HIF-1α AT αντίστοιχα και ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια στο 5' και 3' άκρο της κωδικοποιούσας περιοχής του HIF-1α με τεχνητά άκρα αναγνώρισης από την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI.

Ενισχύθηκε το τμήμα HIF-1α 1-834 (η αρίθμηση είναι σύμφωνα με την αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α).

Η αλληλουχία του πρόσθιου εκκινητή είναι η ακόλουθη:

HIF-N-B : 5'-TTT TTG GAT CCC GAT TCA CCA TGG AGG GC- 3'

Η αλληλουχία του ανάστροφου εκκινητή είναι η ακόλουθη:

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

Με υπογράμμιση έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *BamHI* (GGATCC), ενώ με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (ATG και TCA αντίστοιχα). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις μορφές θερμοάντοχων πολυμερασών προκειμένου να επιλεγεί η πιο αποδοτική κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν.

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 50 μl (βλ. μεθοδοι) και χρησιμοποιήθηκαν :

- Πολυμεράση TAQ ή VENT ή PFU (1,5u/μl), 1μl
- πρόσθιο εκκινητή, HIF-1α NB (100ng/μl), 1μl
- ανάστροφο εκκινητή, HIF-1α C-B-S (100ng/μl), 1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

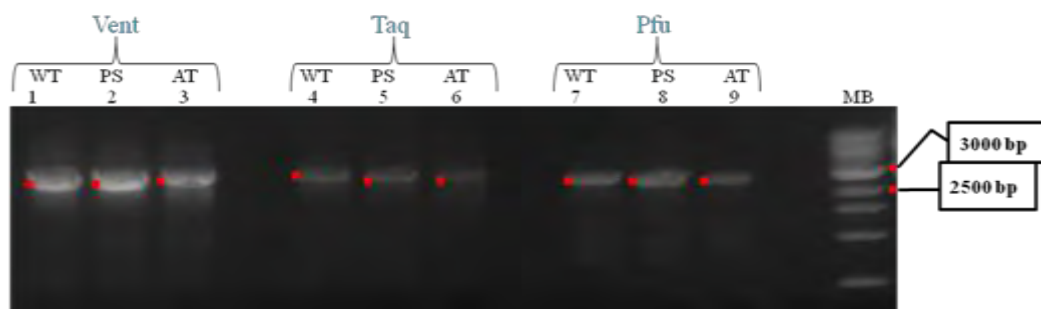
- 30 sec → 94°C στάδιο αποδιάταξης
- 30 sec → 50°C στάδιο υβριδοποίησης
- 2min 30sec → 72°C στάδιο επιμήκυνσης

Αριθμός κύκλων: 30

Αρχική αποδιάταξη 5 min → 94°C

Τελική επιμήκυνση 5 min → 72°C

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Διαδρομές 1-9: 5μl αντίδρασης PCR (HIF-1α WT, PS, AT) με τις πολυμεράσες Vent, Taq, Pfu. Διαδρομή MB: 5μl μάρτυρας μοριακού βάρους 1Kb. Όπως φαίνεται το μέγεθος των θραυσμάτων είναι το επιθυμητό (2500 bp).

Όπως παρατηρείται από την εικόνα τα προϊόντα της PCR έχουν τα αναμενόμενα μεγέθη (2500 bp). Επιλέχθηκε ως πιο αποδοτική αντίδραση και με λιγότερα παραπροϊόντα, η αντίδραση με την πολυμεράση Vent. Τα θραύσματα απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν όπως περιγράφεται στις μεθόδους/Gel extraction. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη των απομονωμένων προϊόντων της PCR, HIF-1α PS, AT με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI για την δημιουργία κατάλληλων άκρων.

Το μείγμα της πέψης περιέχει:

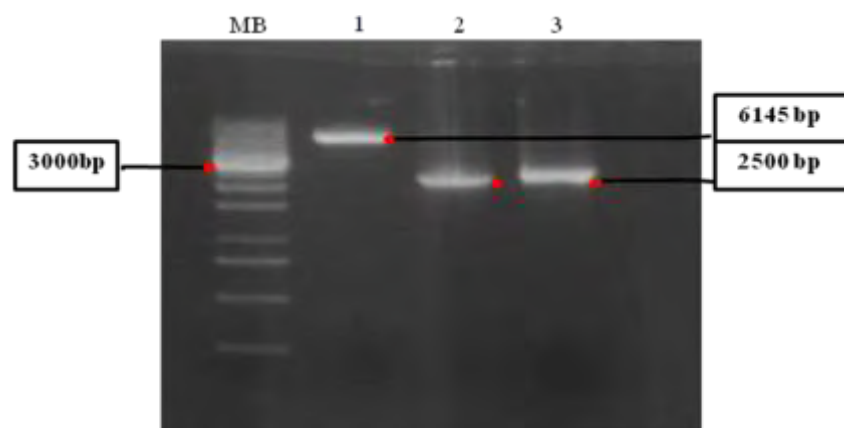
- 5μl Πλασμιδιακού DNA (1μg/μl)
- 1μl Ενζυμο περιορισμού BamHI (1,5u/μg DNA)
- 2μl Ρυθμιστικό διάλυμα 10X
- 12μl ddH₂O

V_{τελ.} 20 μl

Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBenvy GU για την αντίδραση σύνδεσης

Δέκα μg πλασμιδιακού φορέα pBenvy GU επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI ούτως ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης (βλ. μέθοδοι). Στη συνέχεια, ο φορέας pBenvy GU/BamHI επεξεργάστηκε με την αλκαλική φωσφατάση (CIP) που αφαιρεί τις φωσφορικές ομάδες, για να αποφευχθεί η

συνένωση των άκρων του (βλ. μεθόδους). Η αντίδραση αυτή έγινε στο διάλυμα της πέψης. Τα προϊόντα που θα χρησιμοποιούνταν για την αντίδραση σύνδεσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικ.16).



Εικόνα 16. Διαδρομή MB: Ο μοριακός μάρτυρας 1Kb. Διαδρομή 2: Ο πλασμιδιακός φορέας pBenvy GU/BamHI/CIP (6145 bp). Διαδρομή 2: Το ένθεμα HIF-1α PS/BamHI (2500 bp). Διαδρομή 3: Το ένθεμα HIF-1α/BamHI/AT (2500 bp).

Στη συνέχεια έγιναν επανειλημμένες προσπάθειες κλωνοποίησης των HIF-1α PS, AT στον πλασμιδιακό φορέα pBenvy GU χωρίς επιτυχία (τα στοιχεία αυτά δεν παρουσιάζονται). Έτσι ακολουθήθηκε ένας εναλλακτικός δρόμος κλωνοποίησης, μέσω του πλασμιδιακού φορέα pBluescript ο οποίος είναι μικρότερος σε μέγεθος (2.961bp έναντι 6.145bp του pBenvy GU) και έτσι συνδέεται πιο εύκολα με μεγάλα ένθεμα αλλά προσφέρει επίσης το πλεονέκτημα της εύκολης διαλογής των αποικιών που περιέχουν ανασυνδιασμένα πλασμίδια, μέσω της εμφάνισης διαφορετικού φαινοτύπου (λευκές αντί για μπλε όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται παρουσία του υποστρώματος της β-γαλακτοσιδάσης, x-gal). Απώτατος σκοπός ήταν η μετα-κλωνοποίηση των ενθεμάτων από το φορέα pBluescript στο φορέα pBenvy GU.

Προετοιμασία του πλασμιδιακού φορέα pBluescript για την αντίδραση σύνδεσης

Δέκα μg πλασμιδιακού φορέα pBluescript επώστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI ούτως ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα άκρα ένθεσης (βλ. μέθοδοι). Στη συνέχεια, ο φορέας pBluescript/BamHI επεξεργάστηκε με την αλκαλική φωσφατάση (CIP). Η αντίδραση αυτή έγινε στο διάλυμα της πέψης.

Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pBluescript/BamHI/CIP με το DNA HIF-1α PS, AT

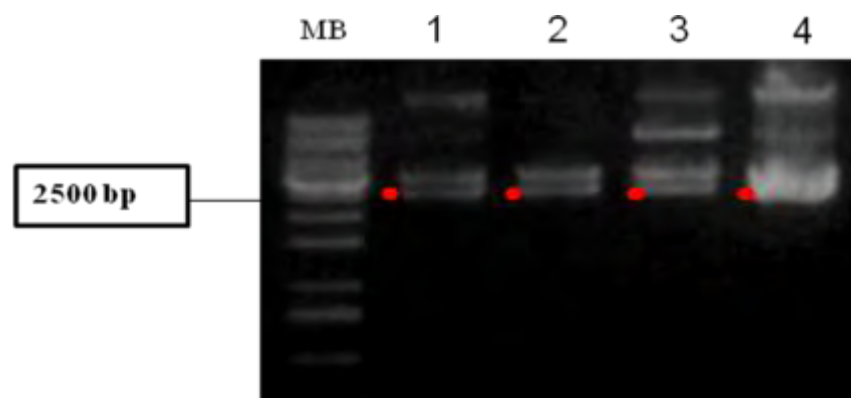
Για την αντίδραση σύνδεσης επώαστηκαν 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pBluescript/BamHI/CIP με 50 ng του HIF-1α PS και 50 ng του HIF-1α AT αντίστοιχα (βλ. μεθόδους)

Μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης

Δεκτικά κύτταρα E.coli Top 10 (competent cells) μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα σύνδεσης (βλ. μεθόδους). Η επώαση των κυττάρων έγινε σε τρυβλία LB που περιείχαν αμικιλίνη και x-gal ως μέσο επιλογής των κυττάρων που φέρουν τον ανασυνδιασμένο φορέα pBluescript (λευκές αποικίες).

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation) και πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχτηκαν μερικές (λευκές) και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας) (βλ. μέθοδοι), έτσι ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη ή μη του ενθέματος 2500 bp (HIF-1α PS, AT) στο φορέα pBluescript. Για τον λόγο αυτό τα πλασμίδια DNA επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Από την δοκιμαστική πέψη με BamHI που πραγματοποιήθηκε, μόνο η κλωνοποίηση του pBluescript/HIF-1α PS είχε γίνει επιτυχώς (εικ. 17). Όπως έχει ήδη αναφερθεί εφόσον το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στον πλασμιδιακό φορέα, θα παρατηρηθεί ένα θραύσμα στις 2500 bp (ένθεμα) και ένα στις 2.961 bp (φορέας). Όπως παρατηρείται, το ένθεμα έχει εισαχθεί επιτυχώς στα πλασμίδια τα οποία βρίσκονται στις διαδρομές 1, 2, 3, 4.

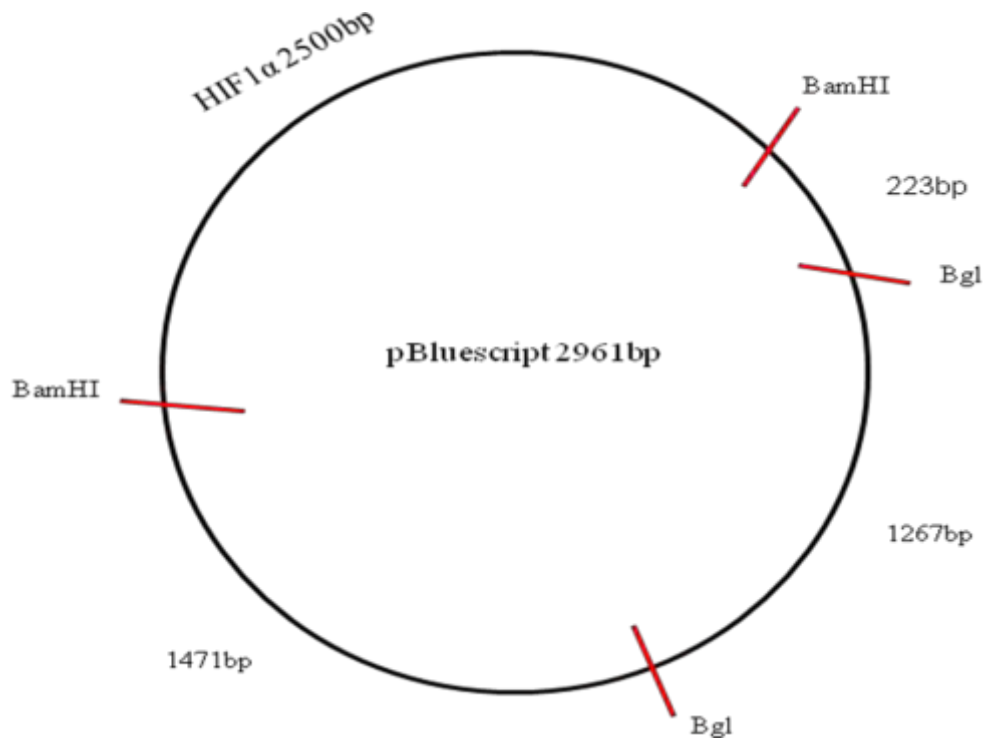


Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή MB: 5μl του μοριακού μάρτυρα 1Kb. Διαδρομές από 1-4 pBluescript/HIF-1α PS/BamHI

Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να εισαχθούν τα θραύσματα αυτά (HIF-1α PS) σε πλασμιδιακούς φορείς (pBenvy GU) ώστε να κατασκευαστεί το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pBenvy GU/HIF1α PS και να μελετηθεί η έκφραση του σε κύτταρα *S.cerevisiae*. Έτσι έπρεπε πρώτα να απομονωθεί το ένθεμα HIF-1α από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescript και στη συνέχεια να εισαχθεί στον φορέα pBenvy GU.

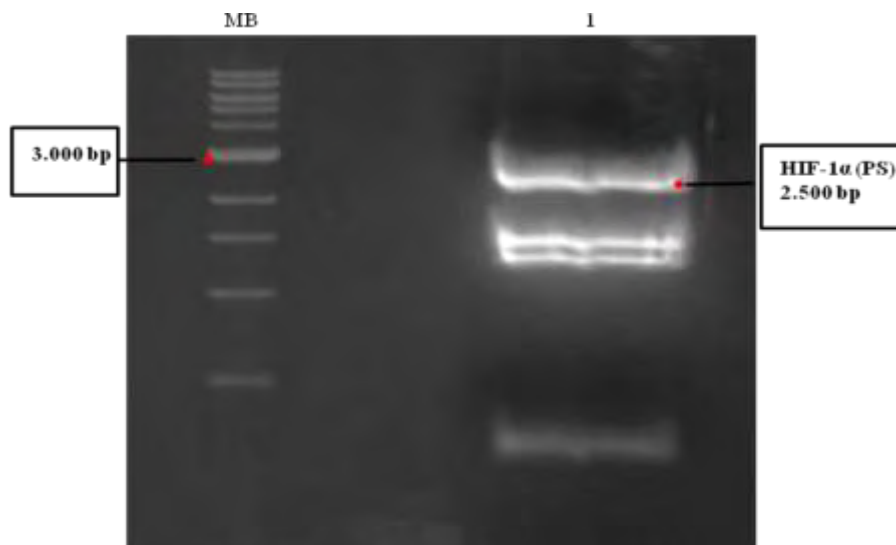
Απομόνωση του ενθέματος HIF1α PS από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescript

Επιλέχτηκε η μετασηματισμένη αποικία pBluescript/HIF-1α PS 1 (εικ.17) για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midí preparation). Στη συνέχεια έγινε παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (βλ. μέθοδοι). Το πλασμιδιακό DNA της αποικίας 1 επεξεργάστηκε με τα ενζυμα περιορισμού BamHI και BglII. Χρησιμοποιώντας τα δυο αυτά ενζυμα ταυτόχρονα από τη μια επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού φορέα pBluescript από το ένθεμα HIF-1α PS και από την άλλη διαχωρίζεται ο πλασμιδιακός φορέας σε τρία θραύσματα μια και το ενζυμο περιορισμού BglII αναγνωρίζει δυο θέσεις κοπής για τον φορέα pBluescript. Αυτό είναι άκρως αναγκαίο μια και χρησιμοποιώντας μόνο το ενζυμο περιορισμού BamHI θα είχαμε δυο θραύσματα με περίπου ίδιο μοριακό βάρος (ένα στις 2500bp/ένθεμα και ένα στις 2961bp/φορέας) που δύσκολα θα απομονώνονταν. Αντιθέτως και με τα δυο ένζυμα BamHI και BglII έχουμε τέσσερα θραύσματα (ένα στις 2500bp/ένθεμα, ένα στις 1471bp ένα στις 1267bp και ένα στις 223bp/κομμάτια του φορέα) με αποτέλεσμα το ένθεμα να ξεχωρίζει εύκολα. Μια διαγραμματική απεικόνιση κοπής του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου pBluescript/HIF1α PS από τα ενζυμα περιορισμού BamHI και BglI φαίνεται στο



Διάγραμμα 1. Χάρτης κοπής του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου pBluescript/HIF-1α από τα ενζυμα περιορισμού BamHI, BglI

Τα αποτελέσματα κοπής του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου με τα ενζυμα περιορισμού BamHI, BglI μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζης φαίνονται παρακάτω (εικόνα 18).

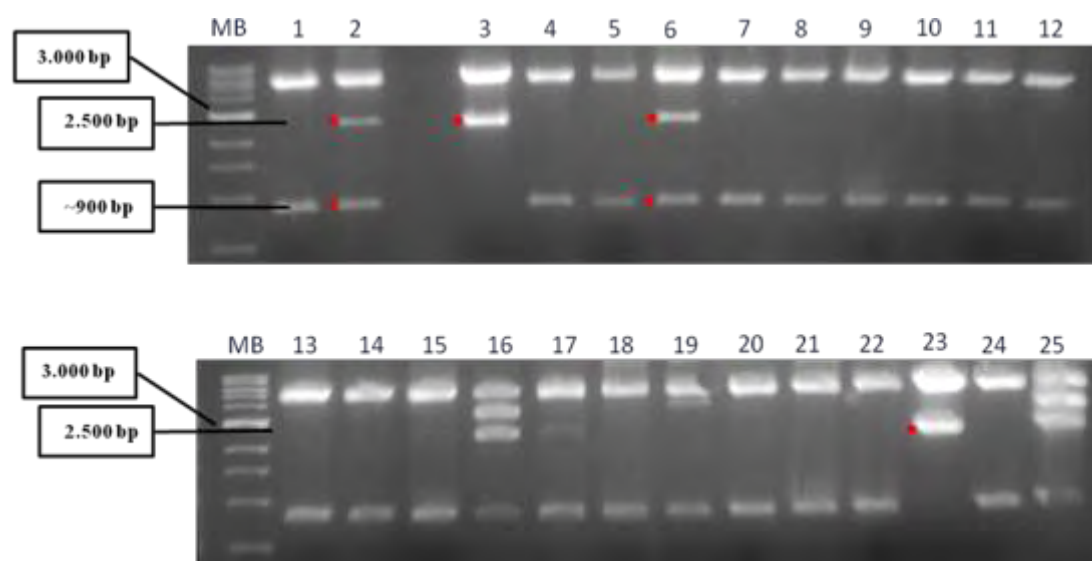


Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Διαδρομή MB: ο μοριακός μάρτυρας 1Kb. Διαδρομή 1: pBluescript/HIF-1α PS

Στη συνέχεια έγινε απομόνωση και καθαρισμός της ζώνης του HIF-1α PS με τη μέθοδο του “gel extraction” όπως περιγράφεται στις μεθόδους.

Κλωνοποίηση του ενθέματος HIF-1α PS στον φορέα pBenvy GU

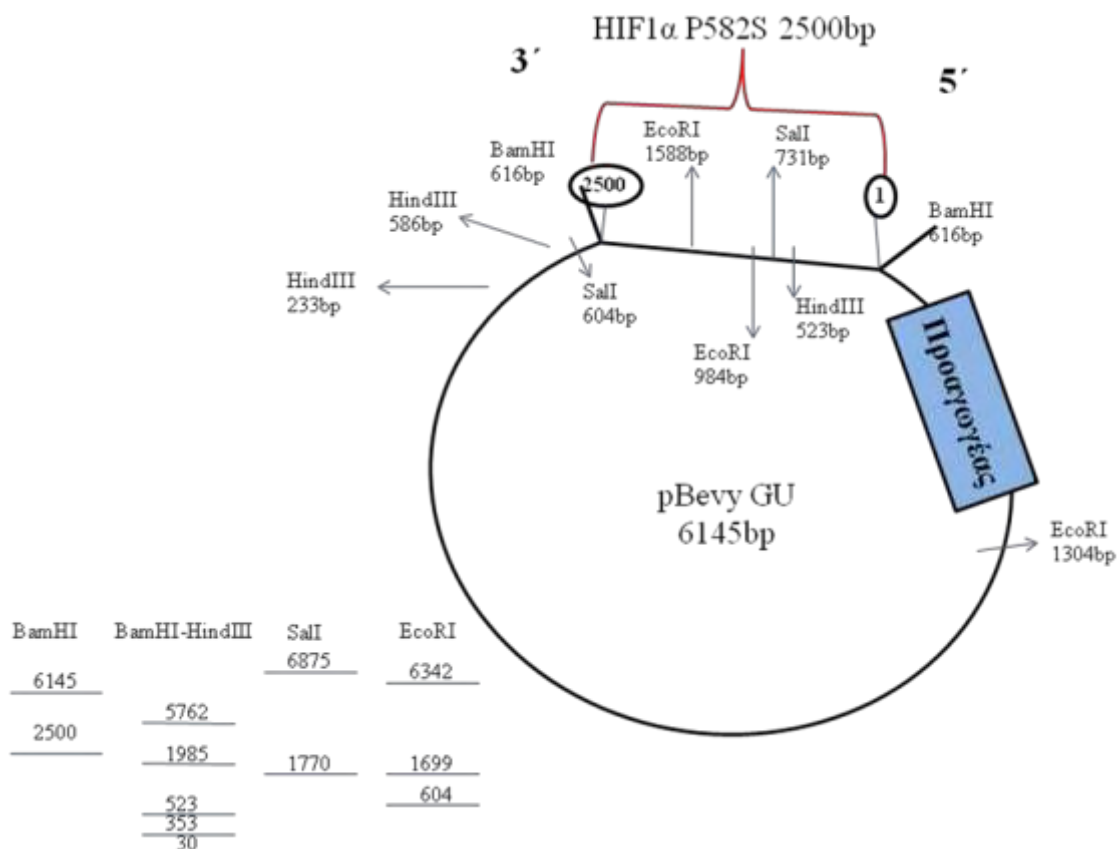
Επακολούθησε νέα αντίδραση σύνδεσης του αποφωσφορυλιωμένου πλασμιδιακού φορέα pBenvy GU (200ng), με το ένθεμα HIF-1α PS (200ng). Κατόπιν έγινε μετασχηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχθηκαν 25 και παρασκευάστηκε πλασμιδιακό DNA (μικρής κλίμακας), έτσι ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη ή μη ενθέματος 2500 bp (HIF-1α PS) στο φορέα pBenvy GU. Για τον λόγο αυτό τα πλασμίδια DNA επώαστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού BamHI και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (εικ. 19).



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Διαδρομές MB: 5μl Μοριακού μάρτυρα 1Kb. Διαδρομές 1-25: 5μl pBenvy GU/ HIF1α PS/BamHI.

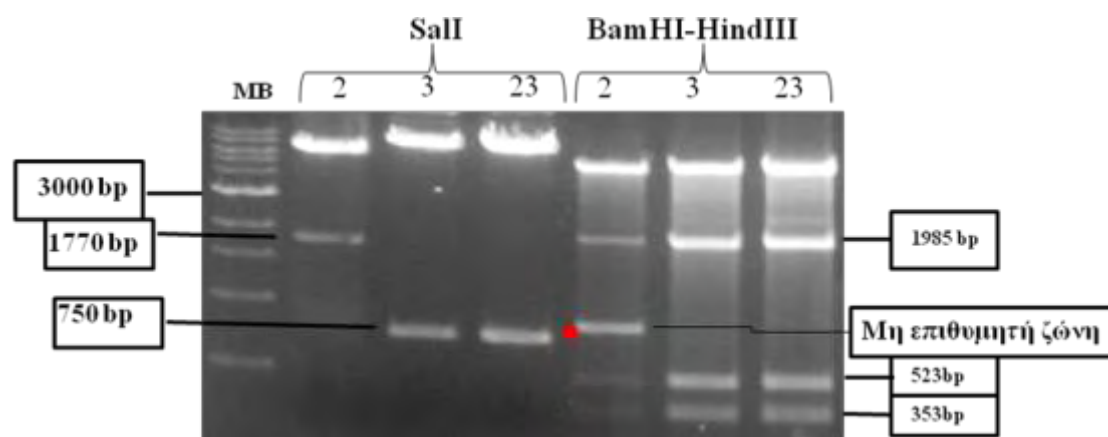
Όπως παρατηρείται, τα πλασμίδια τα οποία βρίσκονται στις εγκοπές 2, 3, 6, και 23 παρουσιάζουν ένα θραύσμα στις 2500bp μετά από πέψη με BamHI. Όμως στις εγκοπές 2 και 6 παρατηρείται ότι προκύπτει και ένα θραύσμα γύρω στα ~900bp το οποίο δεν αναμένεται να υπάρχει εάν σκεφτεί κανείς ότι το ένζυμο BamHI

αναγνωρίζει και κόβει τον φορέα pBenvy GU σε μια μόνο θέση (σημείο κοπής 616bp). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς εξηγείται από μια επιμόλυνση των βακτηρίων Top10 που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματά μας από άγνωστο σε εμάς πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να επιλεχθούν τα ενθέματα τα οποία βρισκόταν στο σωστό προσανατολισμό έτσι ώστε η αλληλουχία της κωδικοποιούσας περιοχής του HIF-1α PS να ελέγχεται από τον προαγωγέα του πλασμιδίου pBenvy GU. Επιλέξαμε να μελετήσουμε εκτός από τα πλασμίδια των εγκοπών 3 και 23 και το πλασμίδιο της εγκοπής 2. Έτσι τα πλασμίδια των εγκοπών 2, 3, 23 επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού SalI για να διευκρινιστεί ο προσανατολισμός του ενθέματος HIF-1α PS αλλά και ταυτόχρονα με τα ενζύμα περιορισμού BamHI-HindIII ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το ένθεμα είναι όντως ο HIF1α PS και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% (εικόνα 20). Οι θέσεις όπου τα ενζύμα περιορισμού (BamHI, HindIII, SalI και EcoRI) αναγνωρίζουν και κόβουν το φορέα pBenvy GU, το ένθεμα HIF-1α, καθώς και τα θραύσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται διαγραμματικά παρακάτω (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Χάρτης πέψης του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου pBenvy GU/HIF-1α από τα ενζύμα περιορισμού BamHI, HindIII, SalI και EcoRI. Το ένθεμα HIF-1α έχει κοινοποιηθεί με το σωστό προσανατολισμό.

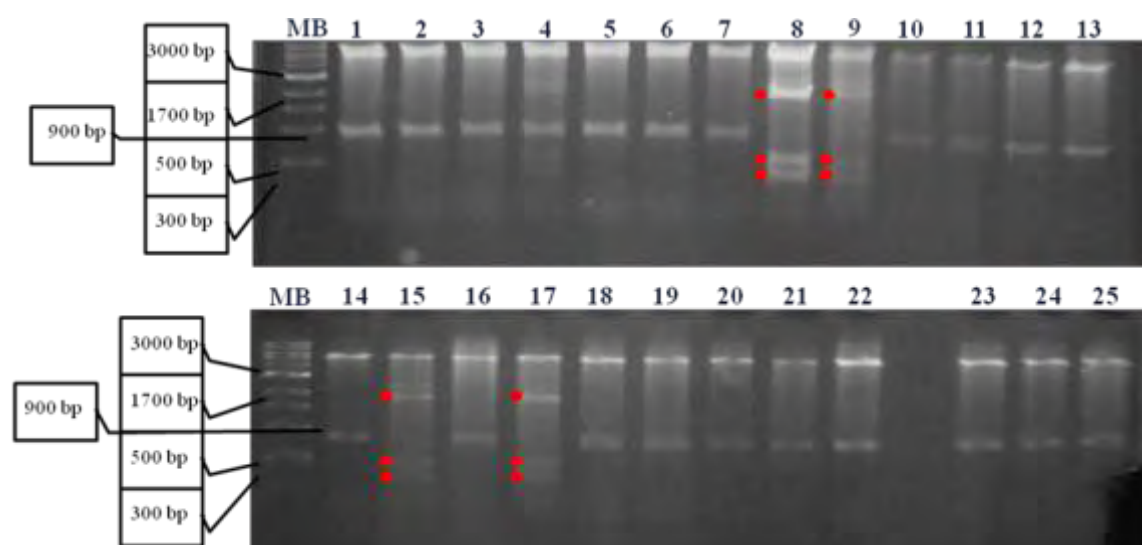
Λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζει το ένζυμο SalI το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pBevy GU/HIF1α PS, εφόσον το ένθεμα HIF1α PS έχει το σωστό προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 6875bp και ένα θραύσμα στις 1770 bp, ενώ αν έχει λάθος προσανατολισμό θα προκύψει ένα θραύσμα στις 7905bp και ένα θραύσμα στις 750bp. Λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις στις οποίες αναγνωρίζουν τα ένζυμα BamHI-HindIII το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pBevy GU/HIF1α PS, θα προκύψουν πέντε θραύσματα ένα στις 5762bp ένα στις 1985bp ένα στις 523bp ένα στις 353bp και ένα στις 30bp, ανεξαρτήτως προσανατολισμού.



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή MB: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb. Διαδρομή SalI 2, SalI 3, SalI 23, BamHI-HindIII 2, BamHI-HindIII 3, BamHI-HindIII 23: pBevy GU/HIF-1α PS (όπου 2, 3, 23=pBevy GU/HIF1α PS).

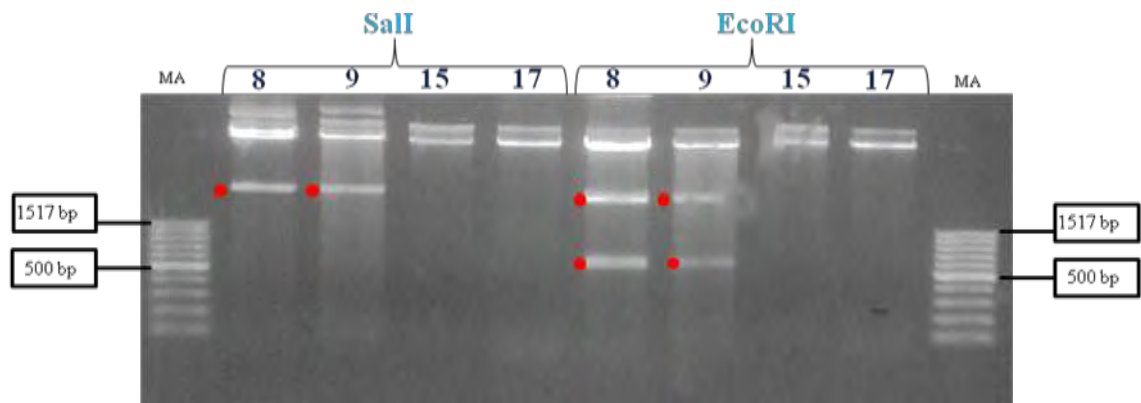
Όπως φαίνεται από την εικόνα 20, στο πλασμίδιο της εγκοπής SalI 2 επιβεβαιώνεται ότι έχει εισαχθεί επιτυχώς το ένθεμα HIF-1α PS, (όπως ήδη διαπιστώθηκε και από την εικόνα 19 στην επεξεργασία με το ένζυμο περιορισμού BamHI), και έχει και σωστό προσανατολισμό αφού σύμφωνα με τα πρότυπα κοπής προκύπτει ένα θραύσμα στις 1770bp. Αντιθέτως παρατηρούμε ότι στα πλασμίδια των εγκοπών SalI 3 και SalI 23 προκύπτουν θραύσματα στις 750bp, παρατήρηση που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ έχει εισαχθεί επιτυχώς ο παράγοντας HIF-1α PS στον φορέα pBevy GU δεν έχει το σωστό προσανατολισμό. Περιέργως παρατηρώντας τη διαδρομή BamHI-HindIII 2 βλέπουμε ένα μη αναμενόμενο θραύσμα στις ~900 bp. Στις διαδρομές BamHI-HindIII 3 και BamHI-HindIII 23 ενώ δεν παρατηρείται η ανεπιθύμητη ζώνη στις ~900 bp, ο HIF-1α PS δεν έχει εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό. Μετά από παρατήρηση όλων των πέψεων υποθέσαμε ότι η επιπλέον ζώνη προέρχεται πιθανώς από επιμόλυνση των αρχικών μας καλλιιεργειών

από άγνωστο πλασμίδιο. Έτσι αποφασίσαμε να συνεχίσουμε τα πειράματα μας με την αποικία της εγκοπής 2. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια καθαρισμού της αποικίας της εγκοπής 2 από το άγνωστο πλασμίδιο. Έτσι, έγινε εκ νέου μετασχηματισμός Top 10 competent βακτηρίων με το πλασμίδιο της εγκοπής 2. Ακολούθησε παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (mini preparation/25 αποικίες) και ανάλυση με ένζυμα περιορισμού BamHI-HindIII σε μια προσπάθεια να απομονωθεί ο κλώνος των βακτηρίων στον οποίο έχει εισαχθεί επιτυχώς το ένθεμα HIF-1α PS με το σωστό προσανατολισμό απαλλαγμένος από το θραύσμα των ~900 bp (εικόνα 21).



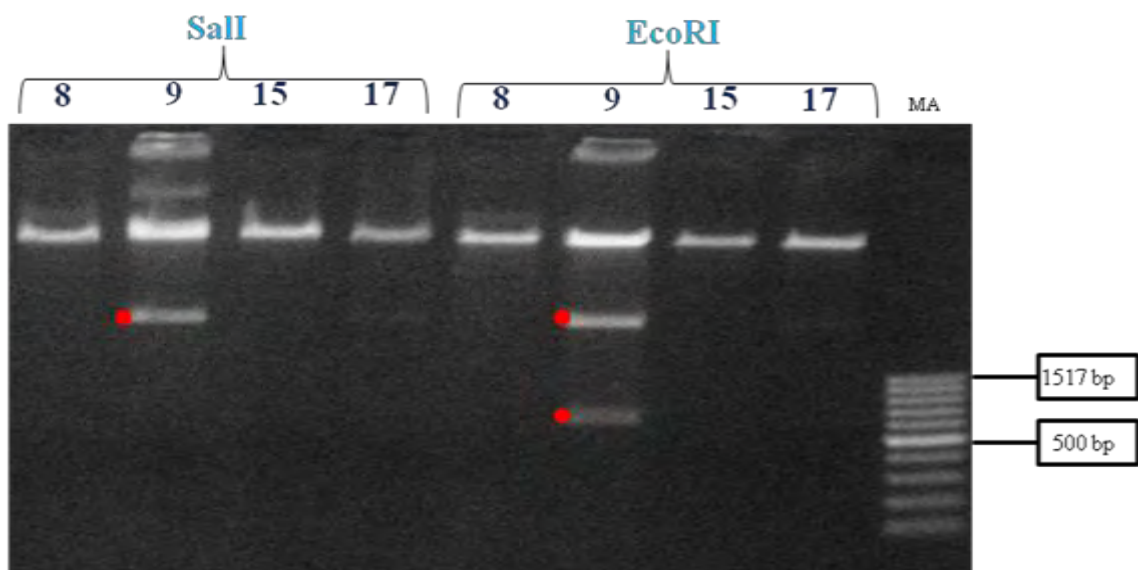
Εικόνα 21. Διαδρομή MB: Ο μοριακός μάρτυρας 1kb. Διαδρομές 1-25 pBeyv GU/HIF-1α PS/BamHI-HindIII

Όπως φαίνεται από την εικόνα 21, στις διαδρομές 8, 9, 15 και 17 τα πλασμίδια έχουν κοπεί σύμφωνα με το πρότυπο κοπής των ενζύμων περιορισμού BamHI-HindIII και άρα περιέχουν το ένθεμα HIF1α PS. Τέλος παρατηρούμε πως το ανεπιθύμητο θραύσμα των ~900 bp δεν παρατηρείται στις διαδρομές 8, 9, 15 και 17. Αντιθέτως στις υπόλοιπες διαδρομές το ανεπιθύμητο θραύσμα των ~900 bp είναι παρόν. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού SalI και EcoRI του DNA των αποικιών 8, 9, 15 και 17. Επιλέχθηκαν τα ένζυμα αυτά γιατί έχουν χρησιμοποιηθεί και στα προηγούμενα πειράματα πέψης για τη διαπίστωση της επιτυχούς ή όχι κλωνοποίησης του ενθέματος HIF1α στο φορέα pBeyv GU (βλ. εικόνα 20). Τα αποτελέσματα της πέψης φαίνονται παρακάτω(εικόνα 22):



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομές MA: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 kb. Διαδρομή SalI 8, SalI 9, SalI 15, SalI 17, EcoRI 8, EcoRI 9, EcoRI 15, EcoRI 17: pBevy GU/HIF-1α PS (όπου 8, 9, 15, 17=pBevy GU/HIF1α PS).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 22., μετά από πέψη του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου με SalI έχουμε δυο θραύσματα. Ένα στις 6875bp και ένα στις 1770bp και άρα το ένθεμα HIF-1α PS έχει εισαχθεί επιτυχώς και έχει το σωστό προσανατολισμό. Αντίστοιχα, από την πέψη με EcoRI βλέπουμε πως έχουμε τρία θραύσματα. Ένα στις 6342bp ένα στις 1699bp και ένα στις 604bp. Πράγμα που επιβεβαιώνει ότι το ένθεμα έχει εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό (βλ. διάγραμμα 2., σε λάθος προσανατολισμό προκύπτουν τρία θραύσματα, ένα στις 6468bp ένα στις 1573bp και ένα στις 604bp). Έπειτα έγινε παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας από τις αποικίες 8, 9, 15, 17 και ανάλυση με ένζυμα περιορισμού SalI και EcoRI, όπως φαίνεται και στην εικόνα 23.:



Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Διαδρομή MA: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 kb. Διαδρομή SalI 8, SalI 9, SalI 15, SalI 17, EcoRI 8, EcoRI 9, EcoRI 15, EcoRI 17: pBevy GU/HIF-1α PS (όπου 8, 9, 15, 17=pBevy GU/HIF1α PS).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 23., σωστή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού SalI (δύο θραύσματα στις 6875bp και στις 1770bp/βλ. εικόνα 22) και EcoRI (τρία θραύσματα στις 6342bp, στις 1699bp και στις 604bp/βλ. εικόνα 22) είναι μόνο η πέψη του DNA αποικίας 9. Τελικά αποφασίσαμε να κρατήσουμε το DNA της αποικίας 9 και να κάνουμε ανάλυση της αλληλουχίας του (sequencing analysis) για να διαπιστώσουμε αν είχε εισαχθεί επιτυχώς ο HIF-1α. Η αρτιότητα της πλασμιδιακής κατασκευής επιβεβαιώθηκε με εύρεση της αλληλουχίας της, από την οποία προέκυψε ότι στον φορέα pBevy GU είναι κλωνοποιημένος ο HIF-1α P582S. Το πλασμίδιο αυτό είναι ικανό να παράγει σε κύτταρα *S. cerevisiae* (Braliou et al., 2006) την πρωτεΐνη HIF-1α (P582S) ώστε να μελετηθεί η ενεργότητα της.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υποξία είναι κύριο χαρακτηριστικό πολλών ασθενειών όπως, καρκίνων, ισχαιμικών διαταραχών και μυοσκελετικών ασθενειών όπως είναι η οστεονέκρωση. Η οστεονέκρωση είναι μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία η κύρια διαταραχή είναι η μείωση έως και απώλεια της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του αγγειακού δικτύου του οστίτη ιστού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της προσφερόμενης ποσότητας οξυγόνου που είναι απαραίτητο για την ομοιοστασία του ιστού, την προοδευτική καταστροφή του οστού και συνεπώς την υποξία του ιστού. Έτσι διαφαίνεται ότι η υποξία παίζει σημαντικό ρολό στην παθογένεια της οστεονέκρωσης. Κύριος μεσολαβητής της υποξίας είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α. Συνεπώς ο HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεονέκρωση (βλ. Εισαγωγή).

Όπως περιγράψαμε προηγουμένως, ο HIF-1α παρουσιάζει αλληλόμορφα ανάμεσα στους ανθρώπινους πληθυσμούς, των οποίων ο συσχετισμός με ασθένειες σε άλλες περιπτώσεις είναι επιβεβαιωμένος και σε άλλες όχι, ενώ σε άλλες είναι και θέμα αντικρουόμενων αποτελεσμάτων. Τα αλληλόμορφα αυτά περιέχουν SNPs που εδράζουν κυρίως σε ιντρόνια και περιοχές που δεν μεταφράζονται, εκτός από 3, που βρίσκονται σε εξόνια. Οι δύο από αυτές (P582S και A588T) εμφανίζονται πιο συχνά και έχουν μελετηθεί σε περισσότερες ασθένειες. Σε κάποιες περιπτώσεις έχει μελετηθεί και η επίπτωση αυτών των πολυμορφισμών στη δράση του μορίου, στη μεταγραφική ενεργότητα δηλαδή του HIF-1, με αντικρουόμενα και πάλι αποτελέσματα, όπου έχει βρεθεί αυξημένη ή και μειωμένη ενεργότητα των αλληλομόρφων PS ή AT σε διάφορα κυτταρικά συστήματα (βλ. Εισαγωγή).

Η παρούσα διπλωματική αντιμετώπισε το ερώτημα του συσχετισμού των πολυμορφισμών του HIF-1α με την οστεονέκρωση στο επίπεδο του μορίου του HIF-1. Έτσι, κατ' αρχή έγινε προσπάθεια έκφρασης των αλληλομόρφων PS και AT σε φορείς έκφρασης *S. cerevisiae* με στόχο τη σύγκριση της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών HIF-1 σε ένα 'πρωτόγονο' ευκαρυωτικό σύστημα όπου δεν θα εμπλέκονταν ιστοειδικοί παράγοντες, στους οποίους ίσως να οφείλονταν τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που εμφανίζονταν στη βιβλιογραφία. Κλωνοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή PS η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε σύγκριση με τον HIF-1 αγρίου τύπου.

Παράλληλα, οι μορφές αγρίου τύπου (WT), PS και AT του HIF-1α εκφράστηκαν σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (Saos-2) και HEK293T και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασής του, ο υποκυτταρικός του εντοπισμός και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Όπως παρουσιάζεται στα Αποτελέσματα, δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στον HIF αγρίου τύπου και τα αλληλόμορφα του μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (τέσσερα διαφορετικά πειράματα εις τριπλούν για τη μεταγραφική ενεργότητα), σε καμία περίπτωση.

Ακόμα και οι αναφορές που προτείνουν επίδραση των πολυμορφισμών PS ή/και AT στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 σε κάποιο κυτταρικό σύστημα, δεν εξετάζουν το μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να επιτυγχάνεται αυτό και δεν είναι γνωστό τι αλλαγές επέρχονται στο μόριο όταν η προλίνη 582 αντικαθίσταται με σερίνη ή όταν η αλανίνη 588 αντικαθίσταται με θρεονίνη. Έχει προταθεί ότι, παρ'όλο που η προλίνη 582 δεν έχει αναγνωριστεί ως θέση υδροξυλίωσης και πρόσδεσης του παράγοντα VHL και η αλλαγή από σερίνη σε προλίνη δεν επηρεάζει την πρόσδεση του παράγοντα VHL στον HIF-1α ύστερα από υδροξυλίωση της προλίνης 564, ίσως οι αλλαγές που δρομολογούνται στη δομή του HIF-1α από τον πολυμορφισμό PS να επηρεάζουν την υδροξυλίωσή του σε άλλα σημεία επηρεάζοντας έτσι και την αποδόμηση του HIF-1α από το πρωτεάσωμα (Hlatky et al, 2007). Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης που δείχνουμε, όπου φαίνεται ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταλλαγμένων HIF-1α είναι ισόποσα με αυτά του αγρίου τύπου αποκλείουν αυτή την περίπτωση, τουλάχιστον σε κύτταρα HEK293T. Επίσης, και τα δύο κατάλοιπα που δημιουργούνται από τις SNPs είναι κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται, άρα τα αλληλόμορφα PS και AT του HIF-1α μπορεί να υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κάτω μόνο από συγκεκριμένες συνθήκες ή συγκεκριμένα ερεθίσματα και μόνο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, γεγονός που δεν έχει διερευνηθεί. Επιπλέον, είναι πιθανόν οι αλλαγές αυτές να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του HIF-1α με κάποια από τα πολλά μόρια που αλληλεπιδρά, αλλά μόνο με συγκεκριμένες μορφές τους, που πιθανόν επίσης να βρίσκονται σπάνια στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Έχει π.χ. περιγραφεί ισχυρός συσχετισμός πολυμορφισμών του γονιδίου-στόχου του HIF-1, του VEGF, με την οστεονέκρωση . Οι πολυμορφισμοί αυτοί βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου του VEGF, όπου προσδένεται και ο HIF-1 και σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 επάγει τη μεταγραφή του (Gray et al, 2005). Είναι πιθανόν ο πολυμορφισμός PS ή AT να επηρεάζει κάποιο

στάδιο στη διαδικασία επαγωγής του VEGF, εξαρτώμενο π.χ. από τον STAT3 ή ακόμα και επηρεαζόμενο από μεταλλάξεις του STAT3.

Τα αποτελέσματα αυτής της διπλωματικής συμπληρώνουν τη μελέτη που έγινε στο Εργαστήριο Βιοχημείας σε συνεργασία με την Κλινική της Ορθοπαιδικής του ΠΙΠΓΝΑ των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε επίπεδο πληθυσμιακό και η οποία επίσης δεν μπόρεσε να αναδείξει κάποιον συσχετισμό μεταξύ των δύο εν λόγω SNPs και ασθενών με οστεονέκρωση (δημοσίευση σε υποβολή). Μια αντίστοιχη μελέτη σε πληθυσμό Κορεατών (Hong et al 2009) έδειξε επίσης ότι δεν υπάρχει συσχετισμός. Οι συγγραφείς αυτής της μελέτης καταφέρανε και αναδείξανε μικρό συσχετισμό όταν απομονώσανε δείγματα μόνο ιδιοπαθούς οστεονέκρωσης και μόνο από δείγματα ανδρών.

Εν κατακλείδι, είναι προφανές ότι πρέπει να γίνουν ακόμα αρκετές έρευνες ως προς την επίδραση που έχουν οι κοινοί πολυμορφισμοί του HIF-1α στην ενεργότητα του για να αναδείξουν αν υπάρχει μια θετική ή αρνητική συσχέτιση. Γεγονός όμως είναι ότι δεδομένης της πολυπλοκότητας των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται στην υποξία, της πολυπαραγοντικής φύσης των ασθενειών στις οποίες κυριαρχούν υποξικές συνθήκες (καρκίνος), καθώς και της ετερογένειας που παρουσιάζουν οι διάφορες πληθυσμιακές ομάδες που ερευνώνται, καθιστούν δύσκολη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ο HIF-1α είναι το κλειδί στην κατανόηση των μηχανισμών της υποξίας και άρα και πολλών ασθενειών στις οποίες κυριαρχούν υποξικές συνθήκες. Έτσι η κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ενεργότητά του θα έχει ως τελικό αποτέλεσμα την κατανόηση των μηχανισμών των ασθενειών αυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Apaydin I, Konac E, Onen HI, Akbaba M, Tekin E, Ekmekci A. (2008) Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene in human sporadic breast cancer. *Arch Med Res.*, 39(3): 338-345
- Assouline-Dayyan Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME. (2002) Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum.* 32: 94-124.
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL and Sharp FR (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci.*, 11(12): 4159-4170.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. (2003), HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.*, 22: 4082-4090
- Berta M, Brahimi-Horn C, and Pouyssegur J. (2004) Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research. *J Soc Biol.*, 198(2): 113-20.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.*, 22: 85–9.
- Bilton RL and Booker GW. (2003) The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. *Eur J Biochem.*, 270(5): 791-8.
- Bilton R, Mazure N, Trottier E, Hattab M, Dery MA, Richard DE, et al. (2005) Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem.*, 280 (35): 31132-40.
- Bracken CP, Whitelaw ML & Peet DJ (2005). Activity of hypoxia-inducible factor 2a is regulated by association with the NF- κ B essential modulator. *J Biol Chem.*, 280: 14240–14251.
- Brahimi-Horn C, Mazure N, and Pouyssegur J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal.*, 17(1): 1-9.
- Braliou GG, Venieris E, Kalousi A, Simos G., (2006) Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1alpha effectors, *Biochem Biophys Res Commun.*, 346(4): 1289-96
- Chachami G., Simos G., Hatziefthimiou A., Bonanou S., Molyvdas P., Paraskeva E., (2004) Cobalt induces HIF-1 α expression in ASM cells by a ROS and PI3K dependent mechanism, *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 31(5): 544-51

- Chao Wan, Jin Shao, Shawn R. Gilbert, Ryan C. Riddle, Fanxin Long, Randall S. Johnson, Ernestina Schipani, and Thomas L. Clemens (2010) Role of HIF-1 α in skeletal development *Ann N Y Acad Sci.*, 1192: 322–326
- Chau CH, Permenter MG, Steinberg SM, Retter AS, Dahut WL, Price DK, Figg WD. (2005) Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1 α gene may confer susceptibility to androgen-independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther.*, 4(11): 1222–1225
- Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG., (2007) Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1 α . *FEBS Lett.*, 581(8): 1542-8
- Clifford, S.C., Astuti, D., Hooper, L., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J. and Maher, E.R. (2001) The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx and HIF-1 α in renal cell carcinoma. *Oncogene.*, 20: 5067-5071.
- Cowden Dahl, K. D., Fryer, B. H., Mack, F. A., Compennolle, V., Maltepe, E., Adelman, D. M., Carmeliet, P. and Simon, M. C. (2005) Hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulate trophoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 10479-10491.
- Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J & Taylor CT (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci.*, 103: 18154–18159.
- Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R and Arbeit JM (2000) Coordinate upregulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res.*, 60(21): 6189-6195
- Feinberg, R. N., Latker, C. H. and Beebe, D. C. (1986) Localized vascular regression during limb morphogenesis in the chicken embryo. I. Spatial and temporal changes in the vascular pattern. *Anat. Rec.*, 214: 405-409.
- Fisher TS, Etages SD, Hayes L, Crimin K, and Li B. (2005) Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference. *J Biol Chem.*, 280 (18): 17749-57.
- Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T., (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner., *Mol Cell Biol.*, 27(9): 3253-65
- Foley R, Marignol L, Thomas AZ, Cullen IM, Perry AS, Tewari P, O’Grady A, Kay E, Dunne B, Loftus B, Watson RW, Fitzpatrick JM, Woodson K, Lehman T, Hollywood D, Lynch TH, Lawler M. (2009) The HIF-1 α C1772T polymorphism may be associated with susceptibility to clinically localised prostate cancer but not with elevated expression of hypoxic biomarkers. *Cancer Biol Ther.*, 8(2): 118–24

- Franse'n K, Fenech M, Fredrikson M, Dabrosin C, So'derkvist P. (2006) Association between ulcerative growth and hypoxia inducible factor-1alpha polymorphisms in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog.*, 45(11): 833-40
- Fu XS, Choi E, Bublely GJ, Balk SP. (2005) Identification of hypoxiainducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *Prostate.*, 63(3): 215-21
- Glimcher MJ, Kenzora JE. (1979) The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications: II. The pathological changes in the femoral head as an organ and in the hip joint. *Clin Orthop Relat Res.*, 139: 283-312
- Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y. and Sogwa, K., (2002) The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J. Biol. Chem.*, 277: 23508-14
- Gray J Michael, Jing Zhang, Lee M Ellis, Gregg L Semenza Douglas B Evans Stephanie S Watowich and Gary E Gallick (2005) HIF-1a, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas
- Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M and Reme CE (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med.*, 8(7): 718-24
- Harris AL (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1):38-47.
- Harry K.W. Kim, Haikuo Bian, James Aya-ay, Amanda Garces, Elise F. Morgan, Shawn R. Gilbert (2009) Hypoxia and HIF-1 α expression in the epiphyseal cartilage following ischemic injury to the immature femoral head *Bone.*, 45: 280-8
- Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, Priest JR, Glassford AJ, Myers RM, Fortmann SP, Iribarren C, Tabor HK, Assimes TL, Tibshirani RJ (2007) Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J.*, 154(6): 1035-42.
- Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ and Lewis CE (2001) Expression of hypoxiainducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum.*, 44(7): 1540-4
- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY., (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature.*, 417: 975-8

- Hong JM, Kim TH, Chae SC, Koo KH, Lee YJ, Park EK, Choi JY, Ryoo HM, Kim SY. (2007) Association study of hypoxia inducible factor 1alpha (HIF1alpha) with osteonecrosis of femoral head in a Korean population. *Osteoarthritis Cartilage.*, 15(6): 688-94
- Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr. and Goldberg MA (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci.*, 93(20): 10595-9
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY and Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.*, 12(2): 149-162
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ and Kim KW (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1- mediated acetylation. *Cell.*, 111(5): 709-20
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of HIF-1 α . *J Biol Chem.*, 271: 17771-8
- Jiang BH, Agani F, Passaniti A and Semenza GL (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.*, 57(23): 5328-35
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor- 1alpha. *Embo J.*, 17(22): 6573-86
- Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2004) Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res.*, 19: 2041-8
- Kim HK, Bian H, Aya-ay J, Garces A, Morgan EF, Gilbert SR. (2009) Hypoxia and HIF-1alpha expression in the epiphyseal cartilage following ischemic injury to the immature femoral head. *Bone.*, 45: 280-8
- Kim JH, Jung CW, Cho YH, Lee J, Lee SH, Kim HY, Park J, Park JO, Kim K, Kim WS, Park YS, Im YH, Kang WK, Park K. (2005) Somatic VHL alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 13(5): 859-864
- Kim HO, Jo YH, Lee J, Lee SS, Yoon KS. (2008) The C1772T genetic polymorphism in human HIF-1alpha gene associates with expression of HIF-1alpha protein in breast cancer. *Oncol Rep.*, 20(5): 1181-7

- Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL and Prabhakar NR (2002) Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci.*, 99(2): 821-6
- Komatsu DE, Hadjiargyrou M. (2004) Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone.*, 34:680
- Konac E, Onen HI, Metindir J, Alp E, Biri AA, Ekmekci A. (2007) An investigation of relationships between hypoxia-inducible factor-1 alpha gene polymorphisms and ovarian, cervical and endometrial cancers. *Cancer Detect Prev.*, 31(2): 102-9
- Konac Ece, Irem Dogan, Hacer Ilke Onen, Ahmet Selim Yurdakul, Can Ozturk, AyhanVarol and Abdullah Ekmecki (2009) Genetic Variations in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene and Lung Cancer *Experimental Biology and Medicine.*, 234:1109-16
- Koong AC, Chen EY & Giaccia AJ (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor κ B through the phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues. *Cancer Res.*, 54: 1425-30
- Kotch LE, Iyer NV, Laughner E and Semenza GL (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.*, 209(2): 254-67
- Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Panagopoulos I, Maltezos E, Harris AL, Gatter KC, Sivridis E. (2006) C2028T polymorphism in exon 12 and dinucleotide repeat polymorphism in intron 13 of the HIF-1alpha gene define HIF-1alpha protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.*, 53(3):257-62
- Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Kuroda T, Ochiuni T, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Kaneyasu M, Tanimoto K, Nishiyama M, Chayama K. (2004) Single nucleotide polymorphism in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.*, 12(5): 1033-7
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML., (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain. *Science.*, 295: 858-61
- Laughner, E. *et al.* (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3995–4004.
- Lee JY, Choi JY, Lee KM, Park SK, Han SH, Noh DY, Ahn SH, Kim DH, Hong YC, Ha E, Yoo KY, Ambrosone CB, Kang D. (2008) Rare variant of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1A) and breast cancer risk in Korean women. *Clin Chim Acta.*, 389(1–2): 167-70

- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW and Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.*, 342(9): 626-33
- Li H, Bubley GJ, Balk SP, Gaziano JM, Pollak M, Stampfer MJ, Ma J. (2007) Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene polymorphisms, circulating insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 levels and prostate cancer. *Prostate.*, 67(12): 1354-61
- Ling TS, Shi RH, Zhang GX, Zhu H, Yu LZ, Ding XF. (2005) Common single nucleotide polymorphism of hypoxia-inducible factor-1alpha and its impact on the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Chin J Dig Dis.*, 6(4): 155-8
- Martin C, Yu AY, Jiang BH, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR and Semenza GL (1998) Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: Increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Obstet Gynecol.*, 178(3): 527-34
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ., (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.*, 20: 5197-206
- Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C (1999) Hypoxia induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction., *FEBS Lett.*, 460: 251-6
- Mori S, Akagi M, Kikuyama A, Yasuda Y, Hamanishi C. (2006) Axial shortening during distraction osteogenesis leads to enhanced bone formation in a rabbit model through the HIF-1alpha/vascular endothelial growth factor system. *J Orthop Res.*, 24: 653-63
- Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C., (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity, *Int J Cancer.*, 117(5): 764-74
- Mylonis I, Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G, Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S., and Simos G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor 1 α , *J Biol Chem.*, 281(44): 33095-33106
- Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem.* 2008 Oct 10., 283(41):27620-7
- Nadaoka J, Horikawa Y, Saito M, Kumazawa T, Inoue T, Narita S, Yuasa T, Satoh S, Nishiyama H, Ogawa O, Tsuchiya N, Habuchi T. (2008) Prognostic significance of HIF-1 alpha polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer.*, 122(6): 1297-1302

- Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A. (2004) Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1alpha gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet.*, 153(2): 122-6
- Olsen, B. R., Reginato, A. M. and Wang, W. (2000) Bone development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16: 191-220
- Ostergaard L, Gassmann M. (2011) Hypoxia Inducible Factor and Hypoxia-mediated Pulmonary Hypertension. *PVRI Review.*, 3: 5-11
- Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, Hackett SF, Okamoto N, ZackDJ, Semenza GL and Campochiaro PA (1999) Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 40(1): 182-9
- Peng J, Zhang L, Drysdale L and Fong GH (2000) The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci.*, 97(15): 8386-91
- Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G and Conrad KP (2003) Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1alpha and -2alpha proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta.*, 24(2-3): 199-208
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL and Bedi A (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.*, 14(1): 34-44
- Richard D.E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux, J. Pouyssegur, (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.*, 274: 32631-7
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG & Karin M (2008) NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature.*, 453: 807–811
- Roy Amarilio, Sergey V. Viukov, Amnon Sharir, Idit Eshkar-Oren, Randall S. Johnson and Elazar Zelzer (2007) HIF1-α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis *Development.*, 134: 3917-3928
- Ryan HE, Lo J and Johnson RS (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J.*, 17(11): 3005-15
- Safran M., W.G. Kaelin Jr., (2003) HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J. Clin. Invest.*, 111: 779-783
- Salceda S., Beck I., Srinivas V., Caro J. (1997) Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int.*, 51: 556-9

- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M. And Johnson, R. S. (2001) Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.*, 15: 2865-2876
- Scortegagna M, Cataisson C, Martin RJ, Hicklin DJ, Schreiber RD, Yuspa SH & Arbeit JM (2008) HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF κ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood.*, 111: 3343–3354
- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K and Johnson RS (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol.*, 21(10): 3436-3444
- Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.*, 3: 721-32
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al., (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1., *Kidney Int.*, 51: 553-5
- Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.*, 8(5): 588-594
- Sylvain Provot, Dawn Zinyk, Yasemin Gunes, Richa Kathri, Quynh Le, Henry M. Kronenberg, Randall S. Johnson, Michael T. Longaker, Amato J. Giaccia, and Ernestina Schipani (2007) Hif-1 α regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development *The Journal of Cell Biology.*, 177(3): 451-464
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Harris AL (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.*, 157(2): 411-421
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T and Poellinger L (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J.*, 19(16): 4298-4309
- Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M. (2003) Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis.*, 24(11): 1779–1783
- Taylor B L. and Zhulin I.B., (1999) PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light *Microbiology, Molecular Biology Reviews.*, 63(2): 479–506
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW and McKnight SL (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine *Genes Dev.*, 12(21): 3320-4

- Tian H, McKnight SL and Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.*, 11(1): 72-82
- Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S., (2006) Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism, *Free Radic Res.*, 40(8): 847-56
- Van Uden P, Kenneth NS & Rocha S (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J.*, 412: 477–484
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(12): 5510-4
- Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. (1995) Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 216: 669-75
- Yamada Norihiro , Yukio Horikawa, Naohisa Oda, Katsumi Iizuka, Nobuyuki Shihara, Shoji Kishi, and Jun Takeda (2005) Genetic Variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1_ Gene Is Associated with Type 2 Diabetes in Japanese *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 90(10): 5841-7
- Yasinska IM and Sumbayev VV. (2003) S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.*, 549(1-3): 105-9
- Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT and Semenza GL (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest.*, 103(5): 691-6
- Yuan, Y., G. Hilliard, T. Ferguson, and D. E. Millhorn. (2003) Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor-alpha and von Hippel- Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor-alpha *J. Biol. Chem.*, 278: 15911-6
- Zhang Chi, Fan Yang, Reuel Cornelia, Wanjin Tang, Susanne Swisher, Harry Kim (2011) Hypoxia-inducible factor-1 is a positive regulator of Sox9 activity in femoral head osteonecrosis *Bone.*, 48: 507–513
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL and Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.*, 59(22): 5830-5835
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL (2000) Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth

factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.*, 60: 1541-5

- Zundel, W. et al. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* **14**, 391–396.