

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

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

**Μελέτη του μηχανισμού απόκρισης στην υποξία:
διερεύνηση της λειτουργίας του μεταγραφικού
παράγοντα HIF-1α**

Λυμπεροπούλου Αγγελική
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

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

**Μελέτη του μηχανισμού απόκρισης στην υποξία:
διερεύνηση της λειτουργίας του μεταγραφικού
παράγοντα HIF-1α**

Λυμπεροπούλου Αγγελική
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

Στους γονείς μου

Στην Ζωή και το Γιάννη

Στην καθηγήτριά μου

Έλενα Γεωργιάτσου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

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

Μέλη:

- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Γιαννακούρος Θωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Στουρνάρας Χρήστος, Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.
- Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ, Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Σακελλαρίδης Νικόλαος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Γιαννακούρος Θώμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ.
- Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Σίμος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.
- Γεωργάτσου Έλενα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 με τίτλο: «Μοριακοί μηχανισμοί απόκρισης στην υποξία: Ενεργοποίηση και δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1», με επιστημονική υπεύθυνη την κ. Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία.

Ευχαριστίες.....	14
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	17
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
1.1. ΥΠΟΞΙΑ.....	19
1.2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1	20
1.2.1. Γονίδια-Στόχοι.....	20
1.2.2. Δομή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1	21
1.3. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1α	25
1.3.1. Ρύθμιση του HIF-1α από την υποξία.....	25
1.3.2. Ρύθμιση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου	27
1.3.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HIF-1α ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	30
1.3.4. HIF-1α ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ	40
1.3.5. HIF-1α ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	42
1.3.5.1 Ο HIF-1α ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	43
1.4. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ MgcRacGAP	46
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	52
3. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
3.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	53
3.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης χωρίς ένθεμα.....	53
3.1.2. Κυτταρικά στελέχη	55
3.1.3. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	56
3.1.4. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA.....	56
3.1.5. Κατεργασία του DNA με πολυμεράση Klenow	57
3.1.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	57
3.1.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης..	58
3.1.8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA.....	58
3.1.9. Αντίδραση λιγάσης	58
3.1.10. Παρασκευή βακτηρίων (E. coli) δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA	59
3.1.11. Μετασχηματισμός βακτηρίων	60

3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	60
3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation)	60
3.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με αλκαλική λύση	61
3.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit	61
3.3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	62
3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> υψηλής απόδοσης κατά Gietz & Woods.	62
3.3.2. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> με ταχεία διαδικασία κατά Gietz & Woods.	63
3.3.3. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> για την μέθοδο των δύο υβριδίων κατά Gietz & Woods.	63
3.4. ΔΙΑΣΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (Rescue).	66
3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ	66
3.6. ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>IN VITRO</i>.	67
3.6.1. Έπαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG	67
3.6.2. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια	67
3.6.3. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο ιστιδινών.	68
3.6.4. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης.	69
3.6.5 Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών <i>in vitro</i> .	70
3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	71
3.7.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	71
3.7.2. Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου	72
3.7.3. Προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων	72
3.7.4. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση με Coomassie Brilliant Blue	73

3.7.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	73
3.7.6. Ανοσοαποτύπωση.....	73
3.7.6.1. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)	74
3.7.6.2. Μεταφορά ημίξηρης φάσης (Semi-Dry Transfer).....	75
3.7.6.3. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών	75
3.8. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	76
3.8.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών.....	76
3.8.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη βοήθεια μη λιπιδικού πολυμερούς	77
3.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ HIF-1α.....	78
3.10. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	79
3.11. ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ.....	81
3.11.1. DNA μάρτυρες μοριακών βαρών.....	81
3.11.2. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών.....	83
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	84
ΜΕΡΟΣ Α	84
4.Α. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ.	84
4.Α.1. Εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων.....	84
4.Α.1.1. Επιλογή πλασμιδίου-δολώματος.	86
4.Α.1.2. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων του HIF-1α σε κύτταρα σακχαρομόκητα.	89
4.Α.1.3. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομόκητα με τα ανασυνδυνασμένα πλασμίδια pGHS και pGHE300.	90
4.Α.1.4. Παρασκευή και ενίσχυση της βιβλιοθήκης.....	90
4.Α.1.5. Τιτλοδότηση βιβλιοθήκης	92
Κλίμακα	92
4.Α.1.6. Μετασχηματισμός του <i>S. cerevisiae</i> PJ69-4A που περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα με την βιβλιοθήκη και επιλογή ανθεκτικών κλώνων σε μέσο επιλογής.	93

4.A.2. Διάσωση των πλασμιδίων-λειών από το μετασχηματισμένο στέλεχος του σακχαρομύκητα σε κύτταρα <i>E. coli</i>	96
4.A.2.1. Παρασκευή του πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i>	96
4.A.2.2. Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε δεκτικά κύτταρα <i>E. coli</i> KC8 και επιλογή του πλασμιδίου-λεία.....	97
4.A.2.3. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας και ανάλυση του πλασμιδιακού DNA με πέψη με <i>NotI</i>	98
4.A.3. Επιβεβαίωση του φαινοτύπου με επαναμετασχηματισμό κάθε πλασμιδίου-λείας στο αρχικό στέλεχος του σακχαρομύκητα που περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα.	99
4.A.4. Εύρεση της αλληλουχίας των ενθεμάτων που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη-λεία.....	100
ΜΕΡΟΣ Β	108
4.B. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΗΝ MgcRacGAP.....	108
4.B.1 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την MgcRacGAP	108
4.B.1.1. Επιβεβαίωση <i>in vitro</i> της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την MgcRacGAP.....	108

4.B.1.1.1. Κλωνοποίηση της <i>MgcRacGAP(1-138)</i> στον βακτηριακό φορέα έκφρασης <i>pGEX-4T1-Tev</i> .	108
4.B.1.1.2. Κλωνοποίηση του <i>HIF-1α(244-532)</i> στον βακτηριακό φορέα έκφρασης <i>H10GFP</i> .	111
4.B.1.1.3. Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών, <i>GST-MgcRacGAP(1-138)</i> , <i>His-GFPHIF-1α(244-532)</i> και <i>His-GFPHIF-1α</i> σε βακτηριακά κύτταρα.	113
4.B.1.1.4. Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης <i>HisGFP-HIF-1α(244-532)</i> από στήλη νικελίου.	114
4.B.1.1.5. Ο <i>HisGFP-HIF-1α(244-532)</i> συνδέεται <i>in vitro</i> με την <i>GST-MgcRacGAP(1-138)</i> .	116
4.B.1.1.6. Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης <i>GST-MgcRacGAP(1-138)</i> από στήλη γλουταθειόνης.	116
4.B.1.1.7. Η <i>GST-MgcRacGAP(1-138)</i> συνδέεται <i>in vitro</i> με τον <i>HisGFP-HIF-1α(244-532)</i> και τον <i>HisGFP-HIF-1α</i> .	118
4.B.1.2. Ανίχνευση του συμπλόκου <i>HIF-1α /MgcRacGAP(1-138)</i> <i>in vivo</i> σε κύτταρα θηλαστικών	119
4.B.1.2.1. Ανοσοκατακρήμνιση της <i>FLAG-MgcRacGAP</i> .	120
4.B.1.2.2. Ανίχνευση του συμπλόκου <i>GFP-HIF-1α / FLAG-MgcRacGAP(1-138)</i> με ανοσοκατακρήμνιση.	121
4.B.2. Έλεγχος της λειτουργικότητας της αλληλεπίδρασης <i>HIF-1α /MgcRacGAP</i>	123
4.B.2.1 Έλεγχος της δράσης της <i>MgcRacGAP</i> στην μεταγραφική ενεργότητα του <i>HIF-1α</i> .	123

4.B.2.1.1. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του εξωγενούς HIF-1α σε κύτταρα 293T.....	124
4.B.2.1.2. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα 293T.....	125
4.B.2.1.3. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε κύτταρα HeLa.....	127
4.B.2.1.3.1 Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του εξωγενούς HIF-1α σε κύτταρα HeLa.	127
4.B.2.1.3.2 Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα HeLa.	129
4.B.3. Η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από την δράση της MgcRacGAP δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του.....	130
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	132
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	145
SUMMARY	147
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	149

Ευχαριστίες...

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υπεύθυνη καθηγήτρια μου κ. Έλενα Γεωργιάτσου για την ανάθεση του διδακτορικού, την βοήθεια και συμπαράστασή της σε κάθε στάδιο της εργασίας. Εκτός από την συμβολή της σε επιστημονικά θέματα που με απασχόλησαν στάθηκε δίπλα μου και σε πολύ σημαντικές προσωπικές αποφάσεις που άλλαξαν την ζωή μου. Οι απόψεις της και η λογική της σκέψη βοήθησαν σε μια γενικότερη αντίληψη και αναθεώρηση του τρόπου σκέψης μου. Η κατανόηση και η υπομονή της με ενθάρρυναν να προσπαθήσω περισσότερο και σε κάποιες δύσκολες στιγμές που αντιμετώπισα φρόντισε να συνεχιστούν οι πειραματικές διαδικασίες για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας την κ. Σοφία Μπονάνου και μέλος της επταμελούς επιτροπής για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συνεχίσω και να επεκτείνω τις σπουδές μου ως τελειόφοιτος του ΠΣΕ Ιατρικής Βιοχημείας. Επιπλέον την ευχαριστώ για την συμβολή της στο θέμα της διατριβής μου με τις γνώσεις της αλλά και την κατανόηση που υπέδειξε.

Ευχαριστώ τον κ. Γεώργιο Σίμο και μέλος της τριμελούς επιτροπής για τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου, την συμβολή του σε τεχνικές δυσκολίες που αντιμετώπισα και τον οργανωτικό τρόπο σκέψης που μου υπέδειξε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Θωμά Γιαννακούρο και μέλος της τριμελούς επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις του όσον αφορά την εργασία μου. Επιπλέον τον ευχαριστώ για την φιλοξενία στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ. και την συμβολή του σε κάποια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εκεί μαζί με την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Ελένη Νικολακάκη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον κ. Χρήστο Στουρνάρα για το ενδιαφέρον που έδειξε εξ αρχής σχετικά με το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής και την προσπάθεια που κατέβαλλε προκειμένου να παραστεί στην παρουσίασή της, τον κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά και τον κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση της εργασίας μου και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την συνεργασία και τις εμπειρίες που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Τους Λέκτορες Βιοχημείας κ.

Παναγιώτη Λιάκο και κ. Ανδρέα Τσακάλωφ για την συμβολή τους και τις ιδέες τους όσον αφορά τα πειράματά μου, καθώς και την Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Ευφροσύνη Παρασκευά για τις τεχνικές της συμβουλές.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ε. Βενιέρη για την συμμετοχή του στα πειράματά μου, για την πάντα φιλική του διάθεση και γιατί υπήρξε ο άνθρωπός που με επηρέασε εξαρχής στην απόφασή μου να συνεχίσω τις σπουδές μου.

Ευχαριστώ την Αναστασία Τριανταφύλλου και την Γεωργία Χαχάμη για την συνεργασία τους και τις φιλικές στιγμές που έχουμε ζήσει, τον Ηλία Μυλωνή που αν και νέο μέλος του Εργαστηρίου είχαμε μια πολύ καλή επικοινωνία και πολλές φορές με βοήθησε σε θέματα της εργασίας μου. Την Γκρέτα Μπράλιου για τις παρατηρήσεις της στην δουλειά μου, αλλά προπαντός για τις κοινές εμπειρίες που ζήσαμε τον τελευταίο χρόνο και μας έφεραν πιο κοντά. Την Θεοδώρα Τσιάνου, την Αλκμήνη Καλούση, τον Πάνο Καββαδά, τον Λευτέρη Καρανάσιο και την Αλεξάνδρα Τζίτζιρα για τις στιγμές που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την ψυχική και υλική τους συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την βοήθειά τους θα μου ήταν ακόμη πιο δύσκολο να ολοκληρώσω αυτό το επίπονο έργο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την μητέρα μου που στάθηκε στο πλευρό μου κατά την συγγραφή της διατριβής μου αφήνοντας σε δεύτερη μοίρα όλες τις υπόλοιπες προτεραιότητές της, συντροφεύοντάς με στα ξενύχτια μου και κάνοντας υπομονή στις κρίσεις μου. Τον Θόδωρα και την Ευθυμία για την αγάπη τους γενικά αλλά και για την έμπρακτη βοήθεια που μου προσέφεραν σε ένα πρόβλημα υγείας που αντιμετώπισα. Την Σταυρούλα, την «μικρή» και την «μεγάλη» Πλουτώ για την χαρά που μου προσφέρουν και την αισιοδοξία τους.

Όλους μου τους φίλους που έδειξαν κατανόηση τον καιρό που έλειπα από την παρέα, τον Μπάμπη, την Ελένη, την Πωλίνα, την Βάγια, τον Ανδρέα, την Αμαλία, τον Κώστα και την Έλσα.

Ευχαριστώ τους καλούς μου φίλους Πάνο, Shelly και Alex που αν και μάκρια το ενδιαφέρον τους και η αγάπη τους έχουν εκμηδενίσει τις αποστάσεις.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αγγελική Σπυροπούλου και την οικογένειά της για την φιλία και την αγάπη που προσφέρουν σε μένα και στην οικογένειά μου και για την κατανόηση που δείχνουν καθημερινά. Την Ελευθερία και τον Βαγγέλη για την απλοχερία τους και την ευγένειά τους και για τις λίγες αλλά όμορφες στιγμές που έχουμε περάσει μαζί.

Τέλος θέλω να εκφράσω την αμέριστη αγάπη μου στην κόρη μου Ζωή, που αν και πολύ μικρή καταλάβαινε ότι η μαμά έχει διάβασμα, και στον σύζυγό μου Γιάννη που έκανε ότι μπορούσε για να εργάζομαι απερίσπαστη και έδειξε μεγάλη υπομονή και κατανόηση.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ARNT : Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator

ATP : Αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ

bHLH : βασική περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας

BSA : Αλβουμίνη ορού βοδιού

CIP : Αλκαλική φωσφατάση εντέρου μοσχαριού

cDNA : Συμπληρωματικό DNA

CMV : Cytomegalovirus

DFO : δεσφερριόξαμίνη

DMSO : διμεθυσουλφοξείδιο

DNA : Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

DTT : Διθειοθρεϊτόλη

EDTA : Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EPO : ερυθροποιητίνη

FBS : ορός εμβρύου βοός

GAP : GTPase Activating Protein

GDP : διφωσφορική γουανωσίνη

GTP : τριφωσφορική γουανωσίνη

GFP : Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GST : Τρανσφεράση της γλουταθειόνης

HBS : Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης HEPES

HEPES : N-2-υδροξυαιθυλ-πιπεραζίν-N'-2-αιθανοσουλφονικό οξύ

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

HRE : Στοιχείο απόκρισης στην υποξία

HRP : Υπεροξειδάση του αγριοραδικιού

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

LB : Luria Broth

MAPK : Κινάση πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από μιτογόνα

MCS : Περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης

MgcRacGAP : Male germ cell Rac GAP

ONPG : ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης
PAS : Per-Arnt-Sim
PBS : Διάλυμα φυσιολογικής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων
PHDs : πρόλυλο-υδροξυλάσες
PMSF : φαινυλομεθυλο φθοριούχος εστέρας του σουλφονικού οξέος
RNA : Ριβονουκλεϊνικό οξύ
ROS : Ενεργές ρίζες οξυγόνου
SDS : Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
SV40 : Simian Virus 40
TAE : Tris-οξικό οξύ-EDTA
TEMED : N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη
Tris : Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
VEGF : Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΥΠΟΞΙΑ.

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι των άνθρωπο. Η βαθμιαία μετατροπή της αναγωγικής ατμόσφαιρας σε οξειδωτική έγινε πριν 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια και οι οργανισμοί που απέκτησαν μηχανισμούς διατήρησης της ομοιοστασίας του οξυγόνου είχαν αυξημένο προσαρμοστικό πλεονέκτημα και επιβίωσαν. Η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου είναι 21% και μειώνεται με την αύξηση του υψομέτρου. Όλα τα κύτταρα του οργανισμού για να διατηρηθούν στη ζωή και να επιτελέσουν απαραίτητες λειτουργίες χρειάζονται οξυγόνο. Η διατήρηση των επιπέδων του οξυγόνου σε φυσιολογικά επίπεδα είναι επίσης καίριας σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου και την προστασία του από τοξικότητα.. Στα θηλαστικά η πρόσληψη του μοριακού οξυγόνου από το περιβάλλον και η διανομή του σε κάθε κύτταρο του οργανισμού για να χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και άλλων βιοχημικών αντιδράσεων προϋποθέτει την ανάπτυξη κυρίως του καρδιαγγειακού, του αιμοποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος [1],[2],[3].

Η μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξία) οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής ATP από τα κύτταρα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνεχιστεί ο αερόβιος μεταβολισμός και να προξενούνται βλάβες στο κύτταρο ενώ η αύξηση στα επίπεδα του οξυγόνου (υπεροξία) μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικές βλάβες.

Σε συνθήκες υποξίας αντιδρούν τροποποιώντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με σκοπό να αντεπεξέλθουν στο στρες της υποξίας. Επιπλέον σε ακραίες συνθήκες ανοξίας στο κύτταρο διαδραματίζεται μια σειρά γεγονότων που προκαλούν τελικά αποπτωτικό θάνατο κι αυτό γίνεται για να αποφευχθεί η συσσώρευση μεταλλαγμένων κυττάρων λόγω των μειωμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου [4, 5].

Ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα των θηλαστικών «αισθάνονται» τις μεταβολές στην συγκέντρωση του ενδοκυττάριου οξυγόνου παρέμενε για δεκαετίες άγνωστος, ενώ ο μηχανισμός αυτός ήταν προ πολλού γνωστός για τα βακτήρια και τους μύκητες [6]. Ο παράγοντας κλειδί για την κυτταρική απόκριση στην υποξία είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1, που αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη HIF-1α απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη

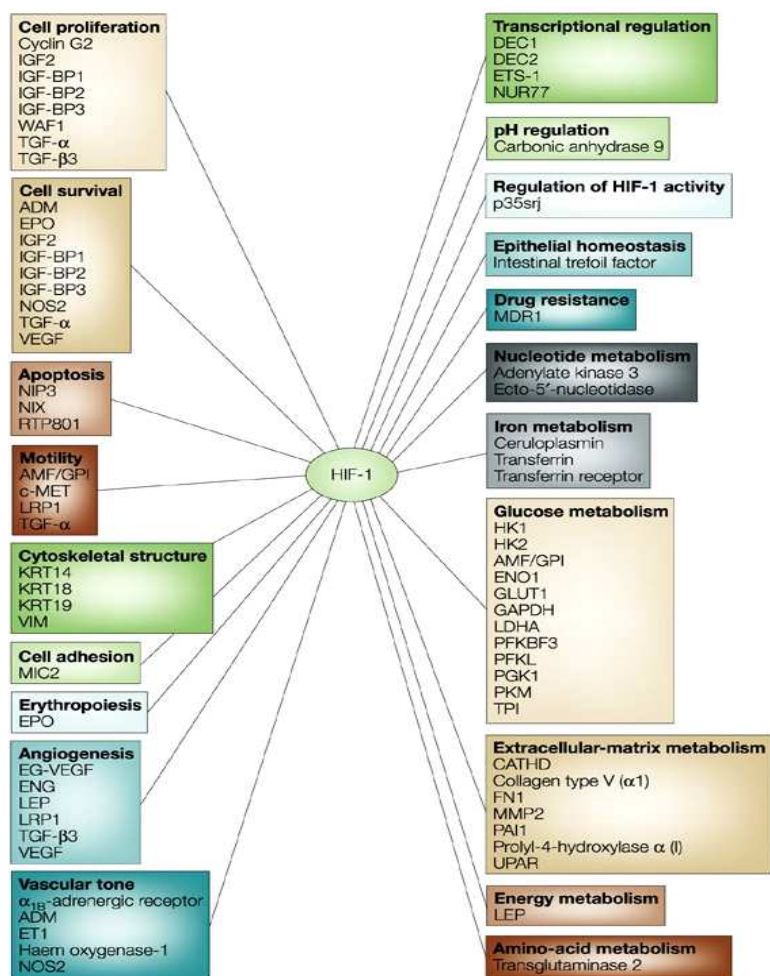
φορά το 1995 [7] και είναι αυτή στην οποία οφείλεται η επαγωγιμότητα του HIF-1 από την υποξία ενώ η δεύτερη υπομονάδα είναι ο HIF-1 β ή ARNT και δεν επηρεάζεται από την υποξία.

1.2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1

1.2.1. Γονίδια-Στόχοι

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 ανακαλύφθηκε το 1992 και θεωρήθηκε υπεύθυνος για την έκφραση της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας [8], [9]. Από τότε έχουν βρεθεί τουλάχιστον 60 διαφορετικά γονίδια που επάγονται άμεσα από τον HIF-1 (Εικ. 1) και με μικροσυστοιχίες DNA έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον 250 γονίδια είναι πιθανοί στόχοι του [10], [11], [5].

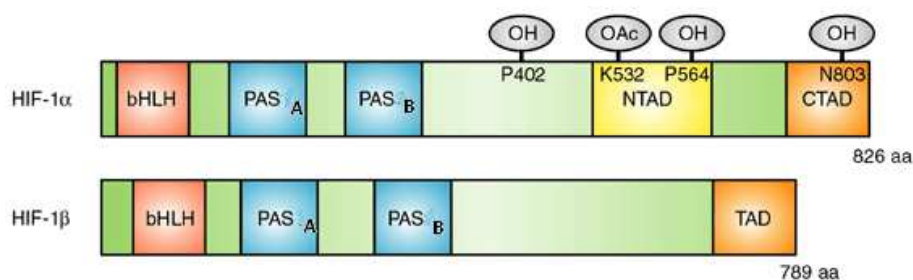
Τα γονίδια αυτά περιέχουν στους υποκινητές τους συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (A/G)CGTG, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE), τις οποίες αναγνωρίζει ο HIF-1 και προσδένεται σε αυτές. Τα προϊόντα των γονιδίων στόχων του HIF-1 είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με συγκεκριμένες και σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και του σιδήρου, η διατήρηση του αγγειακού τόνου, η ερυθροποίηση και η αγγειογένεση. Οι λειτουργίες αυτές έχουν στόχο να αντιρροπήσουν τις επιπτώσεις της υποξίας προκειμένου για την επιβίωση του κυττάρου. Έτσι έχουμε αύξηση της γλυκόλυσης και παραγωγή ενέργειας μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού. Για να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη μεταφορά ακόμη και του λιγοστού ενδοκυττάριου οξυγόνου που υπάρχει έχουμε αύξηση της αγγειογένεσης αλλά και της ερυθροποίησης. Επιπλέον ενεργοποιούνται γονίδια που σχετίζονται με την ομοιοστασία του σιδήρου. Ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες γονιδίων υπάρχουν κάποια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με δομές του κυτταροσκελετού, με τη μετακίνηση του κυττάρου και με τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους. Τέλος ο HIF-1 α στοχεύει γονίδια, η έκφραση των οποίων έχει να κάνει με την επιβίωση του κυττάρου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [11].



Εικόνα 1: Γονίδια στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 [11]

1.2.2. Δομή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1

Όπως αναφέρθηκε ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες τον HIF-1α, που είναι η υπομονάδα της οποίας η έκφραση υπόκειται σε ρύθμιση από την υποξία και εκφράζεται στα κύτταρα όταν η συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου είναι χαμηλότερη από 6%, που αντιστοιχεί σε μερική πίεση οξυγόνου 40 mm Hg [12], και τον HIF-1β ή αλλιώς ARNT που εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα (βλ. Εικ. 2).



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση των υπομονάδων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, του HIF-1α και του HIF-1β. Και οι δυο υπομονάδες διαθέτουν περιοχές bHLH και PAS A PAS B απαραίτητες για τον ετεροδιμερισμό τους και την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Ο HIF-1α έχει 2 περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, την N-TAD και την C-TAD και την αμινοξική περιοχή 401-603 που είναι περιοχή αποικοδόμησης εξαρτώμενη από το οξυγόνο (ODDD). Ο HIF-1β διαθέτει μία περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό άκρο. (Carroll V , Ashcroft M 2005 Expert Reviews in Mol. Med.)

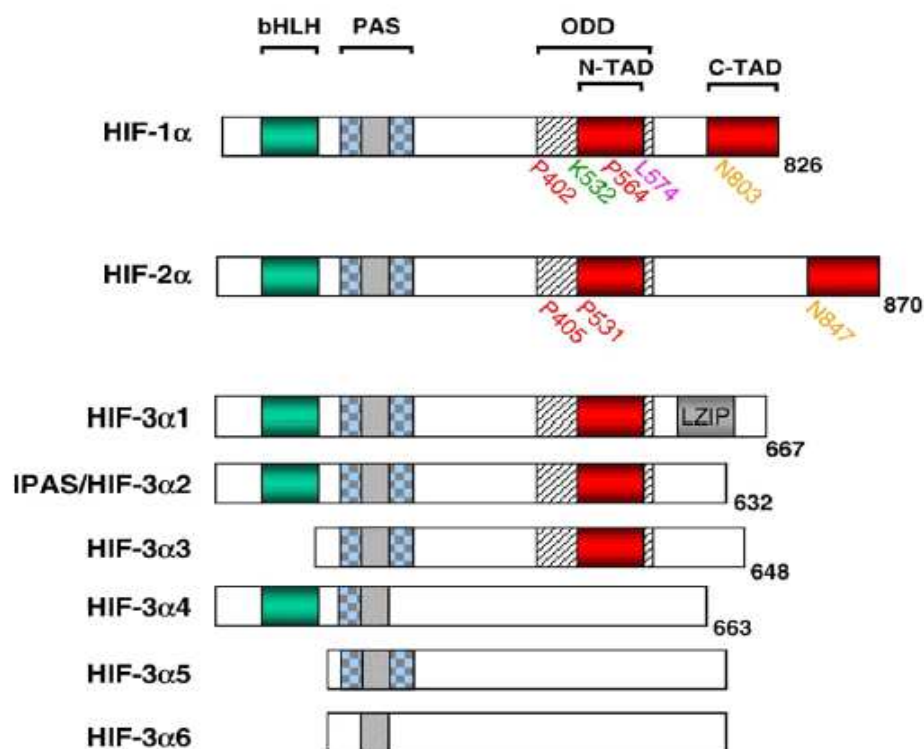
Ο διμερισμός των δύο υπομονάδων γίνεται μέσω της κοινής περιοχής bHLH-PAS που έχουν στο αμινοτελικό τους άκρο. Η περιοχή bHLH (basic Helix-Loop-Helix) είναι περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας και είναι χαρακτηριστική μιας κατηγορίας μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται στο DNA [13, 14]. Η περιοχή PAS (PER-ARNT-SIM) που αποτελείται από τις υποπεριοχές PAS A και PAS B συμμετέχει και αυτή στον διμερισμό με τον ARNT. Σε πειράματα που έχουν γίνει έχει αναφερθεί ότι οι περιοχές PAS έχουν το ρόλο αισθητήρα σε διάφορες μεταβολικές λειτουργίες και είναι περιοχές που εμπλέκονται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών [15],[16],[17].

HIF-1α: Αποτελείται από 826 αμινοξέα. Στο αμινοτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή HLH (31-71) και η περιοχή PAS που διαιρείται στο τμήμα PAS A (85-158) και στο PAS B (228-298)[18]. Ο HIF-1α σταθεροποιείται σε κατάσταση υποξίας ενώ σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου αποικοδομείται, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της περιοχής ODD (Oxygen Dependent Degradation Domain, αμινοξέα 401-603) [1], [19],[20]. Στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης υπάρχουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής η N-TAD (531-575) και η C-TAD (786-826), οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από μια ρυθμιστική περιοχή (ID, Inhibitory Domain 576-785) η οποία καταστέλλει την δράση των TADs ειδικά σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου[1]. Ο HIF-1α περιέχει δύο πιθανά σήματα

πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα προς το αμινοτελικό άκρο (17-74) και ένα προς το καρβοξυτελικό άκρο (718-721)

HIF-1β: ή αλλιώς ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator) λόγω του διμερισμού με τον παράγοντα AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) για την δημιουργία του υποδοχέα της διοξίνης [21]. Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές 774 και 789 αμινοξέων. Κατά αντιστοιχία με τον HIF-1α στο αμινοτελικό άκρο υπάρχει η περιοχή διμερισμού και σύνδεσης με το DNA bHLH (90-144), PAS (171-410) και στο καρβοξυτελικό υπάρχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD (756-789) η οποία όμως δεν χρειάζεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του HIF-1 [9].

Ισομορφές του HIF-1α: Ο HIF-1α και ο HIF-1β είναι μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών που σχετίζονται μεταξύ τους δομικά και λειτουργικά και περιλαμβάνει επιπλέον τις ισομορφές HIF-2α και HIF-3α (Εικ. 3). Ο HIF-2α ή αλλιώς ενδοθηλιακή PAS-1 πρωτεΐνη (EPAS-1) ρυθμίζεται επίσης από την υποξία, συνδέεται με τον HIF-1β και δημιουργείται έτσι το σύμπλοκο HIF-2, που ενεργοποιεί την μεταγραφή συνδεδεμένο στα HREs με τον ίδιο τρόπο όπως ο HIF-1. Ο HIF-1α και ο HIF-2α εκφράζονται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων και έχουν ομολογία 48% σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλά ενώ ο πρώτος εκφράζεται σε όλους τους ιστούς ο HIF-2α εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα [4]. Ο HIF-3α διαφέρει από τον HIF-1α και τον HIF-2α διότι δεν φέρει τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής ενώ διαθέτει περιοχές bHLH και PAS. Επάγεται από το οξυγόνο, διμερίζεται με τον HIF-1β και συνδέεται στην αλληλουχία των HRE αλλά έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1 [22]. Μια ισομορφή του HIF-3α, η HIF-3α2 ή αλλιώς ανασταλτική PAS πρωτεΐνη (IPAS, Inhibitory PAS-1) συνδέεται με τον HIF-1α και εμποδίζει τον διμερισμό του με τον HIF-1β ασκώντας έτσι ανασταλτική δράση στην επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1 από την υποξία [23].



Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση των διαφορετικών ισομορφών του HIF-1α [4].

Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών ισομορφών του HIF-1α θα μπορούσε να διασφαλίζει ότι η επαγωγή του HIF θα συμβεί ακόμη και σε περίπτωση απουσίας HIF-1α. παρόλα αυτά φαίνεται τα διάφορα μέλη της οικογένειας αυτής να έχουν ξεχωριστές λειτουργίες που δεν συμπίπτουν [4]. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες ισομορφές του HIF-1α έχουν στο μόριό τους την περιοχή PAS ή τμήμα αυτής. Επιπλέον, μετάλλαξη της περιοχής PAS B του HIF-2α εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό του με τον HIF-1β κι έτσι μειώνει την μεταγραφική ενεργότητά του [15], γεγονός που καθιστά αναγκαία την περιοχή αυτή για την οικογένεια των πρωτεϊνών HIFα.

1.3. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1α

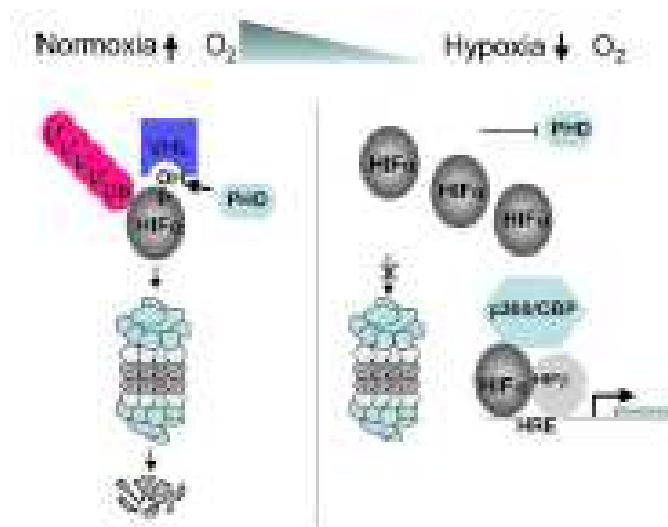
1.3.1. Ρύθμιση του HIF-1α από την υποξία

Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία): η πρωτεΐνη HIF-1α είναι πολύ ασταθής, με χρόνο ημιζωής περίπου 5 λεπτά [24]. Παρουσία οξυγόνου ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων, ουβικουϊτινιλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα (Εικ. 4). Η υδροξυλίωση αυτή συμβαίνει στις προλίνες 402 και 564 και πραγματοποιείται από τρία οξυγονο-εξαρτώμενα ένζυμα της οικογένειας των πρόλυλο-υδροξυλασών (PHD 1-3) [19], [20], [25]. Απαραίτητη προϋπόθεση για την πλήρη υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs είναι η ύπαρξη σιδήρου, οξυγόνου και 2-οξογλουταρικού [6]. Πιστεύεται ότι πρωταγωνιστικό ρόλο στην υδροξυλίωση έχει η PHD 2. Από πειράματα που έγιναν σε κυτταρικό επίπεδο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η απαλοιφή του RNA της PHD 2 οδήγησε σε σταθεροποίηση του HIF-1α, και δημιουργία του συμπλόκου HIF-1 σε συνθήκες νορμοξίας [26].

Ο υδροξυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (pVHL) που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου μιας λιγάσης E3 της ουβικουϊτίνης [27], [28]. Ο HIF-1α ουβικουϊτινιλιώνεται και στη συνέχεια πρωτεολύεται στο πρωτεάσωμα. Αν και αυτός είναι ο κύριος τρόπος αποικοδόμησης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας έχουν βρεθεί μέσω πρωτεϊνικών του αλληλεπιδράσεων που αναλύονται στη συνέχεια κι άλλα μονοπάτια που οδηγούν σε αποικοδόμηση του HIF-1α.

Σε μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία): αναιρείται η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs λόγω έλλειψης μοριακού οξυγόνου και αυτό οδηγεί στην σταθεροποίησή του επειδή η μη υδροξυλιωμένη του μορφή δεν αναγνωρίζεται από τον pVHL (βλ. Εικ. 4). Ο HIF-1α μπορεί να συνδεθεί με τον HIF-1β και να σχηματιστεί το σύμπλοκο HIF-1. Το ετεροδιμερές στη συνέχεια αναγνωρίζει και συνδέεται στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που περιέχουν τις αλληλουχίες HRE ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση των γονιδίων στόχων. Σημαντικό ρόλο στην δράση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας έχει η ακετυλο-τρανσφεράση p300/CBP που είναι μεταγραφικός συνενεργοποιητής και αλληλεπιδρά με τον ήδη σταθεροποιημένο HIF-1α με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής [29]. Πριν την σύνδεση του HIF-1α με την p300/CBP γίνεται άλλος ένας τελευταίος έλεγχος της ρύθμισης

του HIF-1α που πάλι καθορίζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα οξυγόνου (συνθήκες ήπιας υποξίας ή επανοξυγόνωσης). Κι εδώ η υδροξυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του HIF-1α, αυτή τη φορά από μια διαφορετική υδροξυλάση, την FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1)[30]. Η FIH-1 υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στη θέση 803 και εμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον παράγοντα p300/CBP απενεργοποιώντας τον έτσι σε συνθήκες νορμοξίας [9].



Εικόνα 4: Μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις PHDs, συνδέεται με τον pVHL και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1α σταθεροποιείται, μετακινείται στον πυρήνα, διμερίζεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του [31].

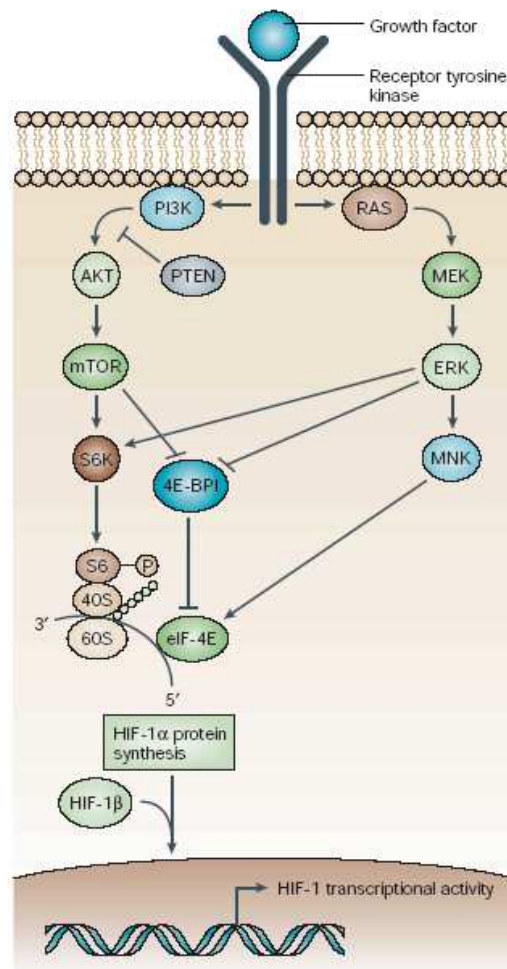
Εκτός από την υδροξυλίωση και την ουβικουϊτινίλωση το μόριο του HIF-1α υπόκειται και σε άλλες μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι απαραίτητες για την συντονισμένη δράση του. Οι πιο σημαντικές είναι επιπλέον: η φωσφορυλίωσή του που συμβαίνει προκειμένου να σταθεροποιηθεί, να διμεριστεί με τον ARNT και να ενεργοποιήσει στην συνέχεια την μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Η σουμυλίωσή του που συμβαίνει στο εσωτερικό των πυρηνικών πόρων και προκαλεί αναστολή της μεταγραφής. Η ακετυλίωση του που πιστεύεται ότι επισπεύδει την αποικοδόμησή του από τον pVHL. Η S-νιτροξυλίωσή του από το NO που επιδρά τόσο στην σταθεροποίησή του αλλά και στην μεταγραφική του ενεργότητα. Σχεδόν όλες αυτές οι τροποποιήσεις απεικονίζονται στις φυσικές αλληλεπιδράσεις του HIF-

1α με άλλες πρωτεΐνες και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να ξεκαθαριστεί απόλυτα ο ρόλος τους.

1.3.2. Ρύθμιση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου

Εκτός από την επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου στη σταθεροποίηση και την επαγωγή του HIF-1α, υπάρχουν περιπτώσεις ενεργοποίησής του σε συνθήκες νορμοξίας. Οι ενώσεις που έχουν αυτή την δράση είναι βιολογικά σημαντικά μόρια, όπως είναι αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και ορμόνες, ογκογονίδια και χημικές ουσίες που «μιμούνται» την υποξία όπως χαρακτηρίζονται η δεσφερριοξαμίνη, το χλωριούχο κοβάλτιο, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Υπάρχουν λοιπόν κι άλλα μονοπάτια ενεργοποίησης του HIF-1α τα οποία δεν είναι πλήρως κατανοητά και διαφέρουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τις συνθήκες στις οποίες αυτό βρίσκεται.

Επαγωγή του HIF-1α από βιολογικά μόρια: Η επαγωγή του HIF-1α στην νορμοξία συμβαίνει σαν απάντηση στην επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως είναι αυτά της PI3K/AKT και της MAPK/ERK [13],[32] με μηχανισμούς που δεν είναι απόλυτα γνωστοί (βλ. Εικ. 5). Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς είναι: ο EGF, ο IGF-1, ο IGF-2 [33], η ινσουλίνη, η ιντερλευκίνη-1β, ο TNF-α, η αγγειοτενσίνη II, ο PDGF, ο TGF-β και η θρομβίνη [4], [14]. Η αύξηση των επιπέδων του HIF-1α ως απόκριση στην επίδραση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών διαφέρει σε δύο κυρίως σημεία σε σχέση με την επαγωγή του HIF-1α από την υποξία. Πρώτον, η αύξηση των επιπέδων του HIF-1α από την υποξία συμβαίνει σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ η επαγωγή του από την επίδραση αυξητικών παραγόντων εξαρτάται από τον τύπο του κάθε κυττάρου. Δεύτερον, η ρύθμιση από την υποξία λειτουργεί μέσω ελεγχόμενης αποικοδόμησης, ενώ η επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και άλλων σηματοδοτικών μορίων συνήθως προκαλεί αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης [9], [11].



Εικόνα 5 : Επαγωγή του HIF-1α από αυξητικούς παράγοντες [11].

Επαγωγή του HIF-1α από ογκογονίδια: Κάποια ογκογονίδια έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας, όπως το *ras* [34], [35] και το *src* [36]. Πιστεύεται ότι η αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοβολία ή την χημειοθεραπεία οφείλεται κατά μένα μέρος στην επαγωγή του HIF-1α και στην δράση του HIF-1 [2].

Επαγωγή του HIF-1α από τους «μιμητές» της υποξίας: Πρόκειται για χημικές ουσίες που επάγουν τον HIF-1α με μηχανισμούς που δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Η δεσφεριοξαμίνη (DFO) είναι από τις πρώτες ενώσεις που βρέθηκε ότι επάγουν τον HIF-1α και η δράση της στηρίζεται στη συμπλοκοποίηση του σιδήρου που είναι απαραίτητος για τη δράση των PHDs [37], [38]. Τα δισθενή ιόντα του κοβαλτίου επάγουν τον HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες και οι αναφορές που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για τον τρόπο με τον οποίο αυτό συμβαίνει ποικίλουν. Συγκεκριμένα

έχει αναφερθεί ότι το κοβάλτιο αντικαθιστά το σίδηρο στο κέντρο πρόσδεσης του σιδήρου στις PHDs [6], ότι μπορεί να συνδεθεί με τον HIF-1α και να εμποδίσει με τον τρόπο αυτό την αποικοδόμησή του [39] και ότι επάγει τον HIF-1α μέσω του μονοπατιού της PI3K [40], [32], [37]. Επιπλέον οι χημικές ουσίες NO και CO, έχειδειχθεί ότι αυξάνουν τα επίπεδα του HIF-1α αλλά οι απόψεις που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για το πώς γίνεται αυτό δίστανται. Συγκεκριμένα αυτό συμβαίνει γιατί η δράση του NO επάγει αρχικά τον HIF-1α στα κύτταρα αλλά η παρατεταμένη επίδρασή του φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα του [14], [41].

Επαγωγή του HIF-1α από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS):

Η εμπλοκή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) στη ρύθμιση του HIF-1α είναι ένα γεγονός που είναι υπό αμφισβήτηση παρά το ότι αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Εικάζεται ότι ο ρόλος τους είναι να σταθεροποιούν τα επίπεδα πρωτεΐνης του HIF-1α [40], [42], [43]. Συγκεκριμένα προτείνεται, ότι η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών που πιθανότατα παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδροξυλίωση των καταλοίπων προλίνης του HIF-1α από τις PHDs [44]. Επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι σε κύτταρα στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του μιτοχονδριακού DNA, δεν λειτουργεί η αναπνευστική αλυσίδα, δεν παράγονται ROS και ο HIF-1α δεν μπορεί σταθεροποιηθεί [40].

Σε αντίθεση με τα παραπάνω υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν ακόμα να σταθεροποιήσουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου [45], [46].

Εκτός από την μιτοχονδριακή παραγωγή ROS υπάρχουν εξωγενείς παράγοντες που αυξάνουν την παραγωγή ROS από τα κύτταρα. Τέτοιοι παράγοντες είναι το H₂O₂ [42], το χρώμιο (VI) [47], η ιονίζουσα ακτινοβολία [48], η αγγειοτενσίνη II [49] και η υπερέκφραση της NADPH οξειδάσης I [50]. Όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του μορίου του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου.

1.3.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HIF-1α ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Ο HIF-1α σε όλα τα στάδια της ρύθμισής του αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες προκειμένου να είναι λειτουργικός. Για τις περισσότερες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις έχει γίνει ταυτοποίηση των περιοχών του HIF-1α που είναι απαραίτητες για τη σύνδεσή του με την εκάστοτε πρωτεΐνη. Επιπλέον, η ανίχνευση πολλών από αυτές τις αλληλεπιδράσεις οδήγησε στην ανακάλυψη νέων λειτουργιών του HIF-1α. Οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις προκαλούν μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο μόριο του HIF-1α, σημαντικές για την ρύθμιση του ίδιου και κατά συνέπεια των γονιδίων στόχων του και περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης, φωσφορυλίωσης, και ακετυλίωσης.

Προκειμένου να διευκολυνθεί η παράθεση των μοριακών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α, οι αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες κατατάχθηκαν ανάλογα με την δράση τους στην ρύθμιση του HIF-1α :

Αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με τη μεταγραφή του HIF-1α.

HIF-1β/ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator): Ο HIF-1α και ο ARNT αλληλεπιδρούν μέσω της κοινής περιοχής bHLH-PAS που διαθέτουν προκειμένου να συγκροτηθεί ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 σε συνθήκες υποξίας. Το ετεροδιμερές στην συνέχεια συνδέεται στα HRE που βρίσκονται στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων στόχων του και ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Ενώ η έκφραση του HIF-1α εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου ο ARNT εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα [1]. Η πρωτεΐνη ARNT απομονώθηκε το 1995 από τον Wang και τους συνεργάτες του. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι το σύμπλοκο HIF-1α /HIF-1β έχει την ικανότητα να συνδέεται με το DNA σε πειράματα που έγιναν σε κύτταρα θηλαστικών σε υποξία [7]. Στην συνέχεια με *in vitro* πειράματα αποδείχθηκε ότι η περιοχή PAS είναι απαραίτητη για τον ετεροδιμερισμό των δύο υπομονάδων του HIF-1 [51]. Ο ARNT είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα και διαθέτει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής στο καρβοξυτελικό

του άκρο για την οποία βρέθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων ότι αλληλεπιδρά με τον συμπαράγοντα ενεργοποίησης της μεταγραφής p300/CBP. Αποδείχθηκε όμως ότι η περιοχή αυτή δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής κι επομένως δεν έχει γίνει σαφής ο λειτουργικός της ρόλος [9]. Τέλος σε πειράματα απαλοιφής του γονιδίου του ARNT που έγιναν σε ποντίκια έδειξαν ότι είναι απαραίτητος για την επιβίωση των ζώων δεδομένου ότι αυτά πέθαιναν γύρω στην δέκατη μέρα της εμβρυογένεσης [52].

p300/CBP (Creb Binding Protein): Ο p300/CBP είναι ο γενικός συμπαράγοντας της μεταγραφής και έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του (Elbert B L 1998 Mol Cell Biol, Arany Z 1996 Proc Natl Acad Sci). Απαραίτητη για αυτήν την αλληλεπίδραση είναι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής TAD C του HIF-1α [53]. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι απαραίτητα αμινοξέα για αυτήν την αλληλεπίδραση ήταν οι Leu-795, Cys-800, Leu-818 και Leu-822 [54, 55]. Η δημιουργία του συμπλόκου HIF-1α /p300/CBP εξαρτάται από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου του HIF-1α με κυριότερη την υδροξυλίωση της Asn-803 από την FIH-1 σε συνθήκες νορμοξίας που εμποδίζει την δέσμευση του p300/CBP στον HIF-1α. Όταν δεν γίνεται η υδροξυλίωση της Asn-803 τότε ο p300/CBP μπορεί να συνδεθεί στον HIF-1α και να ξεκινήσει έτσι η μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF-1.

SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1): Ο SRC-1 είναι συμπαράγοντας της μεταγραφής και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών p160 που αλληλεπιδρούν με διάφορα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και αυξάνουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Με πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων βρέθηκε ότι ο SRC-1 συνδέεται με τον HIF-1α. [56].

TIF-2 (Transcription Intermediary factor 2): Ο TIF-2 είναι συμπαράγοντας της μεταγραφής και ανήκει όπως και ο SRC-1 στην οικογένεια των p160 συνενεργοποιητών που ενεργοποιούν την μεταγραφή μέσω μηνυμάτων από

πυρηνικούς υποδοχείς. Με *in vivo* πειράματα βρέθηκε ότι ο TIF-2 συνδέεται με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας στον πυρήνα του κυττάρου [56].

HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4): Στον υποκινητή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης εκτός από τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία τα οποία αναγνωρίζει ο HIF-1 και συνδέεται σε αυτά υπάρχουν και συγκεκριμένες αλληλουχίες αντίστοιχα στις οποίες συνδέεται ο HNF4. Με εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών αποδείχθηκε ότι ο HNF4 συνδέεται με την περιοχή των αμινοξέων 106-526 που είναι η περιοχή bHLH-PAS του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας [55]. Επιπλέον με απαλοιφή είτε των στοιχείων απόκρισης στην υποξία είτε των στοιχείων απόκρισης στον HNF4 δείχθηκε ότι είναι απαραίτητο να συνδεθούν και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες στον υποκινητή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης προκειμένου να γίνει ενεργοποίηση της μεταγραφής του σε συνθήκες υποξίας.

HDAC7 (Histone Deacetylase 7): Χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων σε κύτταρα σακχαρομύκητα ανιχνεύθηκε ότι το τμήμα 735-785 που αντιστοιχεί στην ρυθμιστική περιοχή (ID) των αμινοξέων του HIF-1α αλληλεπιδρά με την HDAC7 σε συνθήκες υποξίας και η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα HEK293 και HeLa [57]. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ειδική για τον HIF-1α αφού ούτε ο HIF-2α ούτε ο HIF-3α συνδέονταν με την HDAC7, αλλά και από όλα τα μέλη της οικογένειας των HDACs μόνο η HDAC7 αλληλεπιδρά ειδικά με τον HIF-1α. Επιπλέον, με εφαρμογή του συστήματος των τριών υβριδίων βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση HIF-1α /HDAC7 βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον συμπαράγοντα p300/CBP και με πειράματα ανοσοφθορισμού δείχθηκε ότι η HDAC7 ενώ είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μετακινείται στον πυρήνα σε συνθήκες υποξίας [57]. Με real-time PCR αποκαλύφθηκε ότι η δράση της HDAC7 είναι να αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α [57].

Jab1 (Jun Activation domain-binding protein 1): Η Jab1 αλληλεπιδρά με την περιοχή 401-603 (ODD) του HIF-1α όπως ανιχνεύθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων και επιβεβαιώθηκε με *in vitro* πειράματα και με πειράματα

ανοσοκατακρήμνισης [58]. Η Jab1 αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου CSN που φωσφορυλιώνει την c-Jun. Επιπλέον, με το σύστημα των δύο υβριδίων είχεδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την c-Jun και δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής της. Ο Bae και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η Jab1 σταθεροποιεί και αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας και με *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι η Jab1 ανταγωνίζεται την p53 για την σύνδεσή της με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η Jab1 συνδέεται με την p53 με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της τελευταίας και προτείνεται ότι αυτό συμβαίνει σε συνθήκες υποξίας προκειμένου να σταθεροποιηθεί ο HIF-1α και να μην οδηγηθεί το κύτταρο σε απόπτωση [59].

Necdin (Neurally differentiated embryonal carcinoma-cell derived factor): Η νεκδίνη είναι ένας κατασταλτικός παράγοντας της ανάπτυξης των κυττάρων. Με το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι η περιοχή των αμινοξέων 401-603 (ODD) του HIF-1α συνδέεται με την νεκδίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε ανθρώπινα κύτταρα και αποδείχθηκε ότι υπερέκφραση της νεκδίνης καταστέλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α χωρίς να μειώνει τα επίπεδα του mRNA του σε συνθήκες υποξίας, ενώ ασκεί και αντι-αγγειογενετική δράση *in vitro* και *in vivo* [60].

Αλληλεπιδράσεις που συνίστανται σε διάφορες τροποποιήσεις του μορίου του HIF-1α.

p42 /p44 MAPKs (p42/ p44 Mitogen Activated Protein Kinases): Οι p42/p44 MAPK είναι δύο κινάσες σερίνης /θρεονίνης που ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα και ρυθμίζουν την δράση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων. Μετά από την παρατήρηση ότι ο ενδογενής HIF-1α εμφάνιζε διαφορά στην ηλεκτροφορητική του κινητικότητα κατά 12 kDa σε σχέση με τον ανασυνδυασμένο, ο Richard και οι συνεργάτες του έδειξαν με πειράματα *in vitro* και *in vivo* ότι η διαφορά αυτή οφείλεται σε φωσφορυλίωσή του από τις p42/p44 MAPK. Επίσης έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση αυτή συμβαίνει μόνο από αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας των

MAP κινασών κι όχι από τις p38 και JNK. Τέλος με πειράματα μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης αποδείχτηκε ότι ο φωσφορυλιωμένος από τις p42/p44 MAPK κινάσες HIF-1 είναι μεταγραφικά ενεργός [24]. Παρόλα αυτά οι ακριβείς θέσεις φωσφορυλίωσης ήταν άγνωστες μέχρι που ο Μυλωνής και οι συνεργάτες του έδειξαν με *in vitro* πειράματα ότι ο ανασυνδυασμένος HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις p42/p44 MAPK στις σερίνες 641 και 643. Όπως δείχθηκε η φωσφορυλίωση στις συγκεκριμένες θέσεις παρεμποδίζει την έξοδο του HIF-1α μέσω της εξπορτίνης CRM-1 από τον πυρήνα [61].

PHDs (Prolyl-Hydroxylases): Ο HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου αποικοδομείται άμεσα κι αυτό οφείλεται στην υδροξυλίωση των προλινών 402 και 564 που βρίσκονται στην περιοχή ODD από τρία ένζυμα, τις πρόλυλο-υδροξυλάσες (PHD 1, 2, 3). Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών περιέχουν Fe^{+2} στο μόριό τους και για να δράσουν είναι απαραίτητη η ύπαρξη 2-οξογλουταρικού και ασκορβικού ενώ το μοριακό οξυγόνο αποτελεί υπόστρωμα της αντίδρασης. Παραπροϊόντα της αντίδρασης είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το ηλεκτρικό οξύ [62]. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους διαφέρει. Η PHD 1 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, η PHD 2 στο κυτταρόπλασμα, ενώ η PHD 3 και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα [63], [6]. Πειράματα με τη χρήση siRNA έδειξαν ότι κυρίως η PHD 2 είναι υπεύθυνη για την υδροξυλίωση του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας [26].

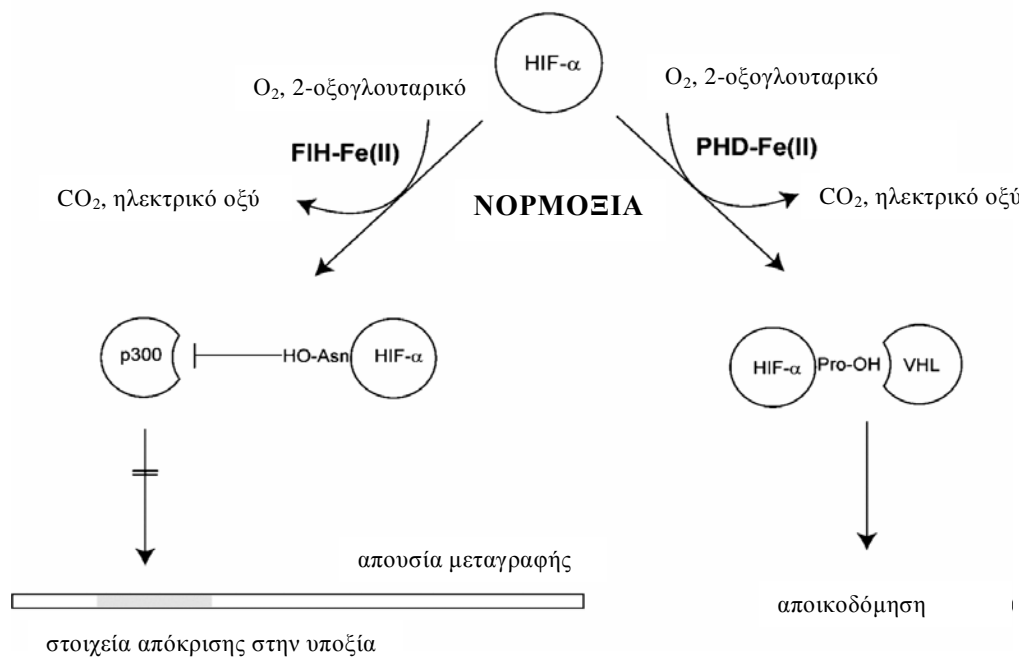
FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1): Η FIH-1 είναι η υδροξυλάση της Asn-803 του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Η αλληλεπίδραση FIH-1/ HIF-1α ανιχνεύθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιώντας την αμινοξική περιοχή του HIF-1α 576-826 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό του άκρο. Η υδροξυλίωση αυτή όπως και στην περίπτωση των PHDs απαιτεί μοριακό οξυγόνο για να πραγματοποιηθεί και αποτρέπει την σύνδεση του HIF-1α με τον p300 /CBP. Επιπλέον δείχθηκε ότι η FIH-1 αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α κι ότι έχει προταθεί ότι συνδέεται *in vitro* με τον pVHL [64]. Το 2002 ανακαλύφθηκε ότι η FIH-1 είναι μια ασπαραγινική υδροξυλάση [65] και τελικά ότι υδροξυλιώνει την ασπαραγίνη στη θέση 803 του HIF-1α [66].

Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί δίνονται συνοπτικά οι ιδιότητες των τριών PHDs και της FIH-1.

Υδροξυλάση	Θέση Υδροξυλίωσης		Km O ₂
	Pro ⁴⁰²	Pro ⁵⁶⁴	
PHD1	+	+	250μM
PHD2	+	+	230μM
PHD3	-	+	230μM
FIH-1	Asp-803		90μM

Πίνακας 1. Ιδιότητες των ενζύμων που υδροξυλιώνουν τον HIF-1α.

Ενώ και οι τέσσερις υδροξυλάσες έχουν πολλές ομοιότητες στον τρόπο δράσης τους (βλ. Σχήμα 1) διαφέρουν σημαντικά ως προς τις Km. Η Km των PHDs είναι κοντά στην συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού μοριακού οξυγόνου (200μM) ενώ η Km για την FIH-1 είναι λιγότερο από το μισό σε σχέση με εκείνη των PHDs. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχει ένα παράθυρο στην κυτταρική απόκριση στην υποξία, όπου ο HIF-1α θα είναι σταθερός λόγω της έλλειψης της δράσης των PHDs, αλλά θα είναι μεταγραφικά ανενεργός λόγω της υδροξυλίωσής του από την FIH-1.



Σχήμα 1: Υδροξυλίωση του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται από τις PHDs και FIH με αποτέλεσμα την απουσία μεταγραφικής ενεργότητας. Η αντίδραση των υδροξυλασών απαιτεί οξυγόνο, 2-οξογλουταρικό και Fe²⁺. Το 2-οξογλουταρικό αποκαρβοξυλιώνεται παράγοντας CO₂ και ηλεκτρικό οξύ [67].

ARD1 (ARrest Defective-1 protein): Με το σύστημα των δύο υβριδίων ανακαλύφθηκε ότι η περιοχή 401-603 (ODD) του HIF-1α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ARD1 και η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε *in vitro* και *in vivo* [68]. Στην συνέχειαδείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α κι ότι η ενδογενής πρωτεΐνη ARD1 επάγει την πρωτεόλυση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου από τον pVHL. Τελικά με *in vivo* πειράματα ακετυλίωσηςδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη ARD1 ακετυλιώνει τον HIF-1α στην λυσίνη 532 κι ότι αυτός ο μηχανισμός είναι ρυθμιστικός για την αποικοδόμηση του HIF-1α. Επομένως ο ARD1 είναι μια ακετυλοτρανσφεράση που ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1α ακετυλιώνοντάς τον τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε υποξία [68]. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες ακετυλιώνονται, όπως οι p53, E2F1, MyoD, GATA-1 προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν συνενεργοποιητές της μεταγραφής. Σε αντίθεση με τις πρόλυλο-υδροξυλάσες, η δραστηριότητα των ακετυλοτρανσφερασών δεν εξαρτάται από τη

συγκέντρωση του οξυγόνου. Στην περίπτωση του HIF-1α η ακετυλίωση του μορίου του επισπεύδει την αποικοδόμησή του από τον pVHL [68], [4]. Υπάρχει κι ο αντίλογος όμως στην βιβλιογραφία, ότι ο ARD1 αν και αλληλεπιδρά με τον HIF-1α δεν τον ακετυλιώνει, και επιπλέον, ότι ούτε η αναστολή της έκφρασης ούτε η υπερέκφραση του ARD1 επηρεάζει τη σταθεροποίηση του HIF-1α {Arnesen, 2005 #1223}. Η αλληλεπίδραση λοιπόν του HIF-1α με την ακετυλοτρανσφεράση ARD1 παραμένει ασαφής.

SUMO-1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1): Οι SUMO είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες (περίπου 12 kDa) και μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί τρεις ισομορφές, οι SUMO 1, 2 και 3 οι οποίες εμφανίζουν υψηλή δομική ομοιότητα με την ουβικουΐτίνη. Η τροποποίηση μιας πρωτεΐνης από κάποια SUMO μοιάζει πολύ με την ουβικουΐτινίωση εκτός ότι συμβαίνει στον πυρήνα του κυττάρου. Το αμινοξύ που έχει βρεθεί να τροποποιείται συνηθέστερα είναι η λυσίνη, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της ουβικουΐτινίωσης. Μεταγραφικοί παράγοντες που έχει βρεθεί ότι τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά από σουμοΐλωση είναι οι c-Myb, GRIP1, Sp3 και AP-2. Ο HIF-1α διαθέτει τρεις πιθανές περιοχές SUMOΐλωσης και είναι οι λυσίνες στις θέσεις 391, 477 και 532. Με πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης έχειδειχθεί ότι ο HIF-1α εντοπίζεται μαζί και αλληλεπιδρά *in vivo* με την SUMO-1 αλλά δεν έχει βρεθεί ακριβώς ποια ή ποιες λυσίνες ευθύνονται για αυτήν την αλληλεπίδραση {Shao, 2004 #1224}. Επιπλέον έχειδειχθεί *in vitro* ότι η E3 λιγάση RanBP2 που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων των κυττάρων προωθεί την τροποποίηση του HIF-1α από την SUMO [69].

Αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με την σταθεροποίηση και την αποικοδόμηση του HIF-1α.

pVHL (von Hippel Lindau protein): Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL είναι συστατικό μιας λιγάσης της E3 ουβικουΐτίνης και υπάρχει φυσιολογικά σε όλα τα κύτταρα. Το γονίδιο *VHL* κωδικοποιεί για δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα μοριακού βάρους 30 kDa και 19 kDa τα οποία μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και

κυτοπλάσματος. Ο pVHL βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά *in vitro* με την περιοχή 530-652 του HIF-1α. και τον οδηγεί παρουσία οξυγόνου σε πολυουβικουϊτινίωση [28]. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση αυτή είναι η προηγούμενη υδροξυλίωση του HIF-1α από τις PHDs και από την FIH-1 που γίνεται μόνο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η ασθένεια von Hippel-Lindau (VHL) οφείλεται σε μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *VHL* με αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών όγκων στα αγγεία, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους νεφρούς και στα επινεφρίδια. [70]. Σε κύτταρα που δεν παράγουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL ο HIF-1α δεν αποικοδομείται και σταθεροποιείται ακόμη και σε συνθήκες νορμοξίας [27].

OS-9: Η πρωτεΐνη OS-9 εκφράζεται σε κύτταρα του οστεοσαρκώματος και έχει εμπλακεί στην μεταφορά πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο Golgi [Su, 1996 #1225]. Χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων ο Baek και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι η περιοχή των αμινοξέων 576-826 του HIF-1α, συνδέεται με την OS-9 και με πειράματα σε κύτταρα θηλαστικών αποκάλυψαν ότι για αυτήν την σύνδεση είναι απαραίτητο ο HIF-1α να είναι υδροξυλιωμένος [71]. Επιπλέον με *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι η OS-9 μπορεί να συνδεθεί ταυτόχρονα με τον HIF-1α και με την PHD 2 [71]. Τέλος, *in vivo* πειράματα σε κύτταρα θηλαστικών όπου έγινε απαλοιφή του mRNA της OS-9, έδειξαν ότι τα επίπεδα του HIF-1α αυξάνονταν σε συνθήκες νορμοξίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι απαραίτητη η OS-9 προκειμένου να υδροξυλιωθεί ο HIF-1α και στην συνέχεια μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον pVHL να οδηγηθεί για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα [71]. Η σημασία της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την OS-9 χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

p53: Το προϊόν του ογκογονιδίου p53 κωδικοποιεί για έναν πολυπαραγοντικό μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται εκτός των άλλων στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων. Σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης βρέθηκε ότι η περιοχή των αμινοξέων 401-603 (ODD) του HIF-1α συνδέεται με την ενδογενή πρωτεΐνη p53 σε συνθήκες υποξίας. Η αλληλεπίδραση αυτή αποδείχθηκε με πειράματα σε ποντίκια ότι προκαλεί την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας

του HIF-1α, και ότι η p53 προωθεί την ουβικουϊτινίωση και αποικοδόμησή του σε συνθήκες υποξίας μέσω της MDM2 που ανήκει σε σύμπλοκο E3 λιγάσης της ουβικουϊτίνης [72], {Fels, 2005 #1226}.

MDM2 (Murine Double Minute 2): Η MDM2 είναι ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53 και αρχικά βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, λειτουργώντας σαν γέφυρα μεταξύ του HIF-1α και της πρωτεΐνης p53 [73]. Στην συνέχεια αποδείχθηκε ότι η σύνδεση της MDM2 με τον HIF-1α συμβαίνει *in vivo* σε συνθήκες υποξίας και δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη της p53. Με σκοπό να εξηγηθεί η βιολογική σημασία του συμπλόκου HIF-1α /MDM2 /p53 δειχθηκε σε κύτταρα ποντικού και ανθρώπου ότι η MDM2 ενισχύει την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1 [74].

Hsp90 (Heat Shock Protein 90): Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp90 είναι μια συντηρημένη εξελικτικά μοριακή συνοδός πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος άφθονη σε ευκαρυωτικά αλλά και σε προκαρυωτικά κύτταρα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποιείται από διάφορες καταστάσεις στρες συμπεριλαμβανομένου του στρες της αυξημένης θερμοκρασίας. Αρχικά ανακαλύφθηκε ότι η Hsp90 συνδέεται *in vitro* με την περιοχή bHLH-PAS του HIF-1α [75], ενώ περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι αυτό συμβαίνει σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και κατά την υποξία [76]. Αναστολή της Hsp90 σε συνθήκες υποξίας προκαλεί μείωση της σύνδεσης του HIF-1 στο DNA και της ενεργοποίησης της μεταγραφής [77]. Σε κύτταρα τα οποία δεν εξέφραζαν pVHL η χρήση αναστολέων της hsp90 προωθεί την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα, γεγονός που δείχνει ότι η ρύθμιση του HIF-1α από την Hsp90 είναι μπορεί να είναι ανεξάρτητη του pVHL [78]. Ο Katchinski και οι συνεργάτες του περιγράφουν ότι μετά την μετατόπιση του HIF-1α στον πυρήνα οι υψηλές συγκεντρώσεις του ARNT ανταγωνίζονται με την Hsp90 για την σύνδεση στην περιοχή bHLH-PAS, αλλά δεν είναι η Hsp90 που ευθύνεται για την είσοδο του HIF-1α στον πυρήνα [4].

1.3.4. HIF-1α ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ

Κύριο ρόλο στις λειτουργίες του κυτταροσκελετού παίζουν τα ινίδια ακτίνης και οι μικροσωληνίσκοι που για να διατηρήσουν την δομή τους χρειάζονται ATP. Η υποξία προκαλεί μεταβολές στο σχήμα των κυττάρων κυρίως λόγω της μειωμένης παραγωγής ATP. Τέτοιες μεταβολές έχουνδειχθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως είναι τα νεφρικά κύτταρα [79], [80], τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος και των πνευμόνων [81], [82] και τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών [83]. Η οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού γίνεται μέσω της οικογένειας των Rho GTPασών και η λειτουργία των Rho έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται σε διάφορες κυτταροσκελετικές λειτουργίες που σχετίζονται με την υποξία. Συγκεκριμένα, η ακαμψία και η δημιουργία ινιδίων του στρες (stress fibers) που φαίνεται να προκαλείται στα κύτταρα κατά την υποξία έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών [81], [80], [84], [85]. Από τα μέλη των Rho GTPασών, με πειράματα μέτρησης της δραστηριότητάς τους κατά την υποξία, βρέθηκε ότι κυρίως η Rac1 και η RhoA αποκρίνονται σε αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου, με την Rac1 να προηγείται [86]. Η αναστολή της Rac1 από τα χαμηλά επίπεδα του οξυγόνου προκαλεί ενεργοποίηση της RhoA που οδηγεί στην δημιουργία ινιδίων του στρες [86], [87].

Παρόλα αυτά οι μελέτες που συνδέουν την λειτουργία του HIF-1α με την λειτουργία των Rho πρωτεϊνών είναι λίγες. Έχειδειχθεί ότι η Rac1 ενεργοποιείται κατά την υποξία και ότι η ενεργοποίηση αυτή είναι απαραίτητη για την μετέπειτα ενεργοποίηση του HIF-1α και την λειτουργία της N-TAD περιοχής του [88]. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα του νεφρού η RhoA απαιτείται για την έκφραση του mRNA του HIF-1α και την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του [89]. Τέλος, η μείωση των επιπέδων της Rac1 σε πειράματα με siRNA ή με επικρατείς μεταλλαγμένες μορφές της, αναστέλλει την έκφραση του HIF-1α σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές [88], [90],[91].

Αν και ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται και δρά στον πυρήνα επηρεάζεται από κυτταροσκελετικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την υποξία και ειδικότερα έχει βρεθεί ότι αναστέλλεται από φάρμακα που επηρεάζουν τις τουμπουλίνες και συνεπώς τη δομή των μικροσωληνίσκων. Αρχικά, βρέθηκε ότι η χημική ουσία 2-μέθοξυ-οιστραδιόλη (2ME2) που δρα διασπώντας τους

μικροσωληνίσκους κατά την μετάφραση καταστέλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α αλλά και την μεταγραφική της ενεργότητα χωρίς όμως να μεταβάλλει τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης [92]. Η καταστολή αυτή ενισχύεται με αυξανόμενες δόσεις του φαρμάκου [92]. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν κι άλλες ουσίες που διασπούν τους μικροσωληνίσκους, όπως η βινκριστίνη (vincristine), η κολχικίνη (colchicine) η δισκοδερμολίδη (discodermolide), το taxotere και βρέθηκε ότι είχαν την ίδια επίδραση στον HIF-1α [93]. Προτείνεται ότι αυτό συμβαίνει μέσω της σύνδεσης του mRNA του HIF-1α με τους μικροσωληνίσκους επηρεάζοντας την μετάφραση, κάτι που έχει επίσηςδειχθεί και για άλλους παράγοντες όπως ο eIF-2 [93], [94].

Τέλος ο HIF-1α σαν μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει εκτός των άλλων και την επαγωγή γονιδίων στόχων που έχουν άμεση σχέση με απαραίτητες κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Επάγει τα γονίδια των κερατινών KRT 14, 18 και 19 και της βιμεντίνης (VIM) που συμμετέχουν στη δομή του κυτταροσκελετού, ενώ επηρεάζονται από τον HIF-1α παράγοντες σχετικοί με την κινητικότητα του κυττάρου (AMF, cMET, LRP1, TGF-α) αλλά και με την διασύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους, όπως η MIC-2 [11].

1.3.5. HIF-1α ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η ανάπτυξη των συμπαγών όγκων περιορίζεται λόγω της έλλειψης νέο-αγγειογένεσης που χρειάζεται για την μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Συνήθως η υποξία που οφείλεται στην ύπαρξη όγκων δημιουργείται σε μια απόσταση 100-200μm από αιμοφόρα αγγεία και κύτταρα που δεν καταφέρνουν να προσαρμοστούν στην έλλειψη οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και αποπίπτουν ή νεκρώνονται [95]. Από την άλλη μεριά η υποξία μπορεί να επηρεάσει θετικά την ανάπτυξη του καρκίνου οδηγώντας έτσι σε έναν κακοήγη φαινότυπο με επιθετική καρκινική συμπεριφορά, καθώς επίσης και σε αντίσταση των κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία. Τα καρκινικά κύτταρα που προσαρμόζονται στην υποξία αυξάνουν την νέο-αγγειογένεση με σκοπό την επαρκή μεταφορά οξυγόνου, παράγουν ενέργεια μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού και ρυθμίζουν διάφορους αντι-αποπτωτικούς και προ-αποπτωτικούς παράγοντες [96].

Τα καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α όπως βρέθηκε στον καρκίνο του δέρματος, του προστάτη, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και των νεφρών [97]. Γενικά η υπερέκφραση του HIF-1α σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα σε πρώιμα στάδια καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και σε ορισμένους τύπους καρκίνου του στήθους. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυτό γίνεται όταν τα κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο και αρχίζουν να αποπίπτουν. [96], [98], [11].

Απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της εξέλιξης του καρκίνου μέσω του HIF-1 είναι να διερευνηθούν οι επιπτώσεις της υπερέκφρασής του σε καρκινικά κύτταρα και οι μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην πρόκληση του κυτταρικού θανάτου [2].

1.3.5.1 Ο HIF-1α ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν τον HIF-1α στην αντιμετώπιση του καρκίνου στηρίζονται κυρίως στην αναστολή της επαγωγής ή της δράσης του ή στην μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του.

Φάρμακα που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αγγειογένεση χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές για την αντικαρκινική τους δράση [99]. Ο λόγος είναι ότι η αναστολή της αγγειογένεσης επιλέγει τα καρκινικά κύτταρα που έχουν προσαρμοστεί σε συνθήκες υποξίας εφόσον αυτά τα κύτταρα μπορούν να ανταπεξέλθουν στην μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Από τις κλινικές δοκιμές έχειδειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που μπορούν και επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας είναι ανθεκτικά στην ακτινοβολία και την χημειοθεραπεία και είναι αυτά που προκαλούν μεταστάσεις και τελικά τον θάνατο [100]. Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι ο HIF-1 προωθεί την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία [101]. Επομένως αναστολή της δράσης του HIF-1 θα μπορούσε να είναι ένας καλός συνδυασμός μαζί με κάποια αντι-αγγειογενετική θεραπεία.

Σε αντίθεση με την παραγωγή εξειδικευμένων φαρμάκων με αντι-αγγειογενετική δράση είναι γνωστό ότι πολλές χημικές ουσίες που στοχεύουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Αυτή η δράση οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι η αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του HIF-1α. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ουσιών φαίνονται στον Πίνακα , ενώ η έρευνα συνεχίζεται για την εύρεση μικρών μορίων αναστολέων του HIF-1 και της αγγειογένεσης.

Δραστικές Ουσίες	Μοριακοί Στόχοι	Παρούσα φάση
<i>Αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών</i>		
BAY43-9006	RAF kinase	Κλινικές Δοκιμές
CCI-779	mTOR	Κλινικές Δοκιμές
Celebrex	COX2	Κλινικές Δοκιμές
PD98059	MEK	Όχι για κλινική χρήση
Trastuzumab (Herceptin)	ERBB2 υποδοχέας κίνησης τυροσίνης	Εγκεκριμένη ουσία
ZD-1839N(Iressa) OSI-774	EGFR κινάση τυροσίνης	Κλινικές Δοκιμές
Imatinib (Gilevec)	BCR-ABL, PDGFR κινάσες τυροσίνης	Εγκεκριμένη ουσία
<i>Μικρά μόρια αναστολείς της δράσης του HIF-1</i>		
2ME2	Πολυμερισμός μικροσωληνίσκων	Κλινικές Δοκιμές
17-AAG	HSP90	Κλινικές Δοκιμές
Camptothecin, Topotecan	Topoisomerase I	Εγκεκριμένη ουσία
Pleurotin, 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulphide	Thioredoxin	Όχι για κλινική χρήση
YC-1	Δεν έχει διευκρινιστεί	Όχι για κλινική χρήση

Πίνακας 2: Νέα θεραπευτικά μόρια που αναστέλλουν την δράση του HIF-1 [11].

Μια πρώτη έρευνα που έγινε για την ανίχνευση τέτοιων μικρών μορίων αποκάλυψε ότι καταστολείς της τοποϊσομεράσης I εμποδίζουν την έκφραση του HIF-1α με έναν άγνωστο μέχρι τώρα μηχανισμό [102]. Το μόριο YC-1, που είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την δράση της γουανυλικής κυκλάσης, επίσης μείωσε τα επίπεδα του HIF-1α, αλλά και πάλι με άγνωστο τρόπο [103].

Η ανακάλυψη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν την δράση του HIF-1α, είναι άλλη μια προσέγγιση για να επιτευχθεί αναστολή της απόκρισης στην υποξία των καρκινικών κυττάρων. Όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση του HIF-1α με το p300/ CBP που είναι ο κύριος συνενεργοποιητής της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του. Η υπερέκφραση πεπτιδίων που κωδικοποιούν για την περιοχή TAD C του HIF-1α και ανταγωνίζονται την σύνδεσή του p300/ CBP αναστέλλει την

μεταγραφική δράση του HIF-1 και την ανάπτυξη όγκων [104]. Επιπλέον, η αναστολή της αλληλεπίδρασης με την Hsp90 που οδηγεί τον HIF-1α σε αποικοδόμηση με έναν μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τον VHL [78] αποτελεί έναν άλλον στόχο αντιμετώπισης του καρκίνου. Τέτοιοι αναστολείς της Hsp90 είναι η γκελνταναμυκίνη (GA) που έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη [92] και η ραδισικόλη που επίσης αναστέλλει την Hsp90 [105]. Η ανακάλυψη των PHDs και της FIH αποκάλυψε νέους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Αύξηση της αποικοδόμησης του HIF-1α με ενεργοποίηση των PHDs θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί μόνο μια ουσία που προκαλεί ενεργοποίηση των PHDs, η κυκλοσπορίνη Α (CsA) [106]. Αλλά και η προσθήκη ουσιών που είναι απαραίτητες για την δράση των PHDs, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και ο σίδηρος αναστέλλουν την επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1α [107].

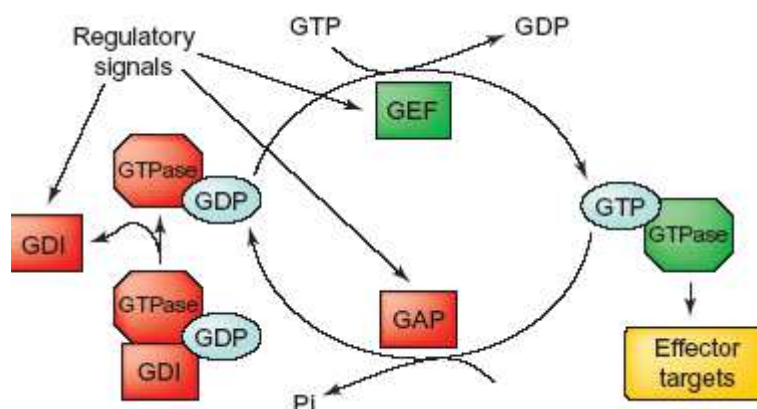
Άμεσο στόχο αποτελεί η αναστολή κάποιων ογκογονιδίων όπως είναι τα *ras* και *src*, τα οποία ενεργοποιούν τον HIF-1α και θα μπορούσαν να έχουν αντικαρκινική δράση αλλά και η επαγωγή ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως είναι τα *VHL*, *PTEN* και *p53* [108].

Επιπλέον όπως προαναφέρθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ισομορφή IPAS που ανήκει στην ίδια οικογένεια με τον HIF-1α και αναστέλλει τον διμερισμό του με τον ARNT, δρώντας ανταγωνιστικά [23].

Όλες οι παραπάνω προσεγγίσεις αποτελούν σημεία ελέγχου για την εύρεση νέων αντικαρκινικών παραγόντων που στοχεύουν τον HIF-1α και μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου.

1.4. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ MgcRacGAP

Η MgcRacGAP (Male Germ Cell Rac Gap) είναι μια GAP (GTPase Activating Protein) της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών. Οι GAPs συνδέονται με την GTP-συνδεόμενη μορφή των μικρών G πρωτεϊνών της οικογένειας Rho και καταλύουν την υδρόλυσή του GTP. Με τη δράση τους αυτή ασκούν αρνητική ρύθμιση στη λειτουργία των Rho πρωτεϊνών προωθώντας τις στην ανενεργή GDP-συνδεόμενη μορφή τους (βλ. Εικ. 6). Η MgcRacGAP είναι ειδική κυρίως για την Rho πρωτεΐνη Rac1 και σε μικρότερο βαθμό για την cdc42 [109].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου των GTPασών. Οι GTPάσες ρυθμίζουν την δράση τους κυκλικά μεταξύ μιας ανενεργής GDP-συνδεόμενης μορφής και μιας ενεργής GTP-συνδεόμενης μορφής. Για την κυκλική αυτή δράση είναι απαραίτητη η συμμετοχή των GAPs (GTP Activating Proteins), των GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) και των GDIs (Guanine nucleotide dissociation Inhibitors). Οι απενεργοποιητές των GTPασών απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ενεργοποιητές με πράσινο [110].

Η υπεροικογένεια των μικρών G πρωτεϊνών διακρίνεται σε πέντε επιμέρους οικογένειες όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 και αποτελείται από πολλά μέλη, η δράση των οποίων επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα για τα μέλη της Rho οικογένειας έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων

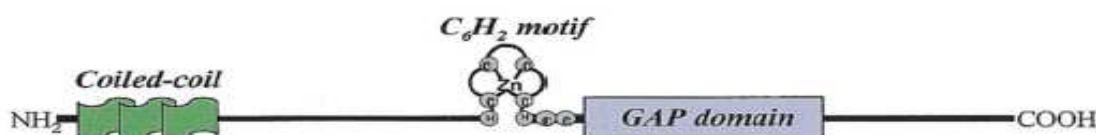
κι άλλων συστατικών του κυτταροσκελετού, στην ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και στις διακυτταρικές συνδέσεις [111].

The small G-protein superfamily									
	Ras family		Rho family		Rab family			Sar1/Arf family	Ran family
Mammal	Ha-Ras	Rheb	RhoA	Rnd2/	Rab1A	Rab11A	Rab26	Arf1	Ran
	Ki-Ras	κB-Ras1	RhoB	Rho7	Rab1B	Rab11B	Rab27A	Arf2	
	N-Ras	κB-Ras2	RhoC	Tc10	Rab2	Rab12	Rab27B	Arf3	
	R-Ras		RhoD		Rab3A	Rab13	Rab28	Arf4	
	M-Ras		RhoE/		Rab3B	Rab14	Rab29	Arf5	
	Ra1A		Rnd3/		Rab3C	Rab15	Rab30	Arf6	
	Ra1B		Rho8		Rab3D	Rab16	Rab31	Sar1a	
	Rap1A		RhoG		Rab4	Rab17	Rab32	Sar1b	
	Rap1B		RhoH/		Rab5A	Rab18	Rab33A	Arl1	
	Rap2A		TTF		Rab5B	Rab19	Rab33B	Arl2	
	Rap2B		Rac1		Rab5C	Rab20		Arl3	
	Tc21		Rac2		Rab6	Rab21		Arl4	
	Rit		Rac3		Rab7	Rab22		Arl5	
	Rin		Cdc42		Rab8	Rab23		Arl6	
	Rad		Rnd1/		Rab9	Rab24		Arl7	
	Kir/Gem		Rho6		Rab10	Rab25		Arl1	
Yeast	Ras1		Rho1		Ypt1	Ypt52		Arf1	Gsp1 Gsp2
	Ras2		Rho2		Sec4	Ypt53		Arf2	
	Rsr1		Rho3		Ypt31/	Ypt6		Arf3	
	Ycr7		Rho4		Ypt8	Ypt7		Sar1	
			Cdc42		Ypt32/	Ypt10		Arl1	
			Yns0		Ypt9	Ypt11		Arl2	
					Ypt51/			Cin4	
					Vps21				

Πίνακας 3: Τα μέλη της υπερικογένειας των μικρών G πρωτεϊνών [112].

Ενώ τα μέλη της οικογένειας των μικρών GTPασών δεν ξεπερνούν τα 140, έχουν προβλεφθεί τουλάχιστον 160 ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες GAPs και ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί δεδομένου ότι υπάρχουν GTPάσες για τις οποίες δεν έχουν βρεθεί οι αντίστοιχες GAP [113]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ένα σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των GTPασών αλλά και υπονοεί ότι ίσως οι GAPs να επιτελούν και άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Πράγματι, για τις GAPs έχειδειχθεί ότι λειτουργούν σαν μεταφορείς μηνυμάτων σε σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά κι ότι επηρεάζονται από διάφορα ενδοκυτταρικά μηνύματα [114], [115]. Επιπλέον εμπλέκονται σε ασθένειες, όπως είναι κάποιοι τύποι καρκίνου που προκαλούνται από μεταλλάξεις που καταργούν την δράση των GAPs, όπως η νευροϊνωμάτωση [113].

Η πρωτεΐνη MgcRacGAP αποτελείται από 632 αμινοξέα και η δομή της περιλαμβάνει μια περιοχή σπειρωμένου σπειράματος στο αμινοτελικό της άκρο που ονομάζεται περιοχή Myo και ακολουθεί μια περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου που ακολουθείται από την καταλυτική περιοχή GAP (Εικ. 7).



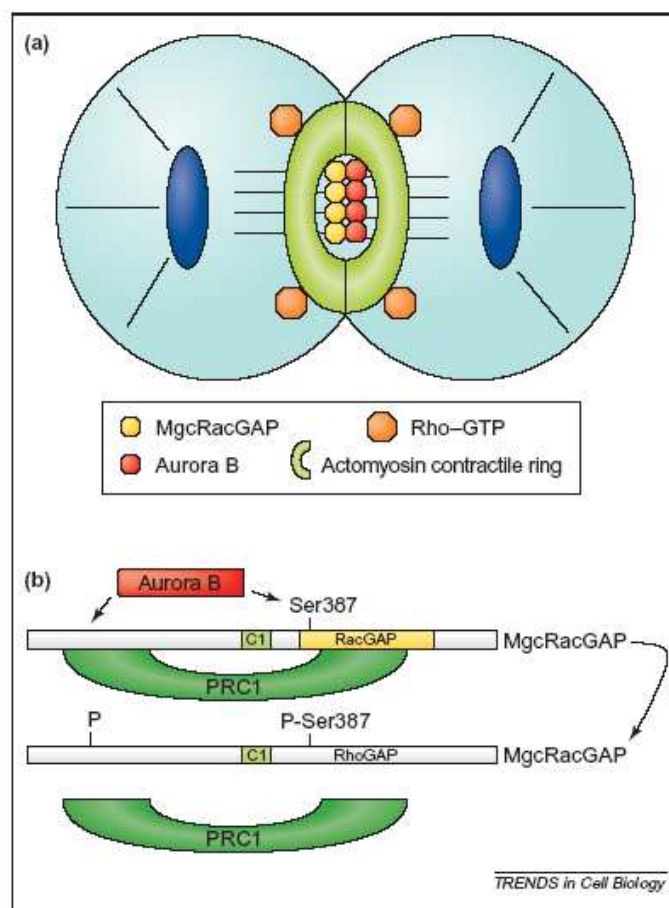
Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης MgcRacGAP. Στο αμινοτελικό άκρο φαίνεται η περιοχή σπειρωμένου σπειράματος Myo, ακολουθεί η περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου με την καταλυτική GAP περιοχή [116].

Η MgcRacGAP χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1998 και βρέθηκε ότι έχει ομολογία με το προϊόν rotundRacGAP της *Drosophila melanogaster* και ότι βρίσκεται σε αφθονία στα σπερματοκύτταρα [109]. Βρέθηκε επίσης ότι συμμετέχει στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των κυττάρων του λιπώδους ιστού [117] αλλά και ότι έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των λευχαιμικών κυττάρων. Στα συγκεκριμένα κύτταρα, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MgcRacGAP ανέστειλλε την ανάπτυξη και ενεργοποιούσε την διαφοροποίησή τους. Επιπλέον η δράση της αυτή ήταν ανεξάρτητη της καταλυτικής περιοχής της. Η ανάλυση του mRNA της πρωτεΐνης έδειξε ότι κατανέμεται και σε άλλους ιστούς όπως στο θύμο αδένα, στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στους σκελετικούς μύς [118].

Ωστόσο η πιο καλά μελετημένη μέχρι σήμερα δράση της MgcRacGAP αφορά τη συμμετοχή της στη μίτωση όπου είναι αναγκαία για την κυτοκίνηση. Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας αποκαλύφθηκε ότι η MgcRacGAP δεν είναι αποκλειστικά μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη αλλά εντοπίζεται και στον πυρήνα κατά μήκος των μικροσωληνίσκων [119]. Κατά την ανάφαση διανέμεται στη μιτωτική άτρακτο, ενώ στο τέλος της τελόφασης βρίσκεται στο μεσόσωμα (midbody). Η κατανομή αυτή της MgcRacGAP οφείλεται στην σύνδεση της περιοχής Myo με τις α -, β - και γ -τουμπουλίνες [119]. Το 2003 ανακαλύφθηκε ότι συνεντοπίζεται στην περιοχή του μεσοσώματος με την κινάση Aurora B και με την

RhoA, αλλά όχι με την cdc42 ή την Rac1 [120]. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά την Μ φάση του κυτταρικού κύκλου η MgcRacGAP φωσφορυλιώνεται από την Aurora B στην σερίνη 387. Η τροποποίηση αυτή μεταβάλλει την δράση της σαν GAP, προσδίδοντάς της αγχιστεία για την RhoA [120].

Κατά την φάση Μ του κυτταρικού κύκλου η MgcRacGAP είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί η κυτοκίνηση, εφόσον σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη PRC1 (Protein Regulating Cytokinesis 1) επηρεάζει την δράση της cdc42. Συγκεκριμένα ο PRC1 συνδέεται με την MgcRacGAP αναστέλλοντας την δράση της για την cdc42 [121]. Η αναστολή αυτή της MgcRacGAP οδηγεί στη σωστή δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου κατά τη μετάφαση. Αντίθετα, στην περίπτωση που η MgcRacGAP είναι φωσφορυλιωμένη και δεν συνδέεται με τον PRC1 τα κύτταρα εμφανίζουν ανωμαλίες στην δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου [121]. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη PRC1 έχειδειχθεί ότι συμβαίνει ταυτόχρονα και με την Myo και με την GAP περιοχή της MgcRacGAP [121]. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι επηρεάζει την δράση και της RhoA κατά την κυτοκίνηση [122], [123]. Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου που σχηματίζεται κατά την συγκρότηση του συσταλτού δακτυλίου της μιτωτικής ατράκτου (contractile ring) και είναι απαραίτητη για την διαίρεση του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει μέσω της σύνδεσης της MgcRacGAP με τον ECT2 κατά την κυτοκίνηση. Ο ECT2 είναι μια GEF (guanine exchange factor) για την RhoA και ο εντοπισμός του στην μιτωτική άτρακτο και στον συσταλτό δακτύλιο του κυττάρου οφείλεται στην σύνδεση του με την MgcRacGAP [124], [125]. Στην Εικ. 8 φαίνεται σχηματικά η ρύθμιση της MgcRacGAP κατά την κυτοκίνηση, η φωσφορυλίωσή της από την Aurora B και η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη PRC1 κατά την δημιουργία του συσταλτού δακτυλίου.



Εικόνα 8: Ρύθμιση της MgcRacGAP κατά την διάρκεια της κυτοκίνησης. a) Μια Rho-GTPάση είναι απαραίτητη για την δημιουργία του συσταλού δακτυλίου κατά την κυτοκίνηση. Η MgcRacGAP και η Aurora B συνεντοπίζονται στο μεσόσωμα. b) Φωσφορυλίωση της Ser³⁸⁷ της MgcRacGAP από την Aurora B ενεργοποιεί την δράση της MgcRacGAP για την Rho-GTPάση, προκαλώντας τελικά απενεργοποίηση της Rho και αποδιοργάνωση του δακτυλίου ακτομυοσίνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης PRC1 και της MgcRacGAP ρυθμίζεται επίσης μέσω φωσφορυλίωσης από την Aurora B. Ο PRC1 αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την περιοχή RhoGAP και με το αμινοτελικό άκρο της MgcRacGAP και η αλληλεπίδραση αυτή καταστέλλει την δράση της MgcRacGAP [110].

Τέλος έχει δειχθεί ότι απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την MgcRacGAP σε έμβρυα ποντικών έχει σαν αποτέλεσμα τον θάνατο λόγω ανώμαλων κυτταρικών διαιρέσεων. Συγκεκριμένα, δημιουργούνται πολυπυρηνικά βλαστομερή καθώς δεν είναι δυνατόν να ολοκληρωθεί η κυτοκίνηση [116].

Τα παραπάνω δείχνουν ότι η MgcRacGAP εκτός από την δράση που έχει σαν ρυθμιστής των Rho πρωτεϊνών, έχει και λειτουργίες που ίσως δεν συνδέονται άμεσα με την δράση της ως GAP. Η αλληλεπίδρασή της με τις τουμπουλίνες και η επίδραση που έχει στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων, αποκαλύπτει την συμμετοχή της σε λειτουργίες του κυτταροσκελετού και του πυρήνα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η υποξία είναι μια στρεσογόνο κατάσταση για τα κύτταρα και γενικότερα για τους οργανισμούς, η οποία απαντάται συχνά σε φυσιολογικές και πολύ συχνά σε παθολογικές καταστάσεις. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς απόκρισης στην υποξία με μεταβολή της γονιδιακής τους έκφρασης, η οποία στον άνθρωπο ελέγχεται κατά κύριο λόγο από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1. Η μία από τις δύο υπομονάδες του, η πρωτεΐνη HIF-1α, υπόκειται σε ρύθμιση των επιπέδων του από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση O₂, καθώς και από άλλα ενδοκυττάρια μονοπάτια που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων.

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανίχνευση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και η περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργικής τους σχέσης με τις δράσεις του HIF-1.

Με τη χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων ανιχνεύτηκαν τουλάχιστον τρεις νέες μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF με μια περιοχή του στην οποία δεν έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργική ταυτότητα. Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες σχετίζονται με λειτουργίες του κυτταροσκελετού με τον οποίο πολύ λίγο έχει συσχετισθεί μέχρι σήμερα ο HIF-1.

Επιλέξαμε να διερευνήσουμε σε βάθος την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη MgcRacGAP, μια πρωτεΐνη-ρυθμιστή της δράσης των Rho πρωτεϊνών, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας επιβεβαίωσαν τη δομική και λειτουργική συγγένεια του HIF-1α με την MgcRacGAP, προτείνοντας έτσι ανεξερεύνητες μέχρι τώρα λειτουργίες του HIF-1α που περιλαμβάνουν την εμπλοκή του σε κυτταροσκελετικές διεργασίες του κυττάρου.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμίδια, που είναι μικρά κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με ένα ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Το πλασμιδιακό DNA καθώς και το ξένο τμήμα DNA που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού μπορούν να συνδεθούν μέσω της δράσης της λιγάσης του DNA. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να εισαχθεί σε βακτηριακά κύτταρα και να αναπτυχθεί παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών.

3.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης χωρίς ένθεμα

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμημάτων cDNA του ενδιαφέροντος, φαίνονται διαγραμματικά στο Σχήμα 2 που ακολουθεί με τη σειρά που δίνονται και είναι:

A. pGBT9. Περιέχει την περιοχή σύνδεσης με το DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 σε συνέχεια με την περιοχή που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS: Multiple Cloning Site). Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp).

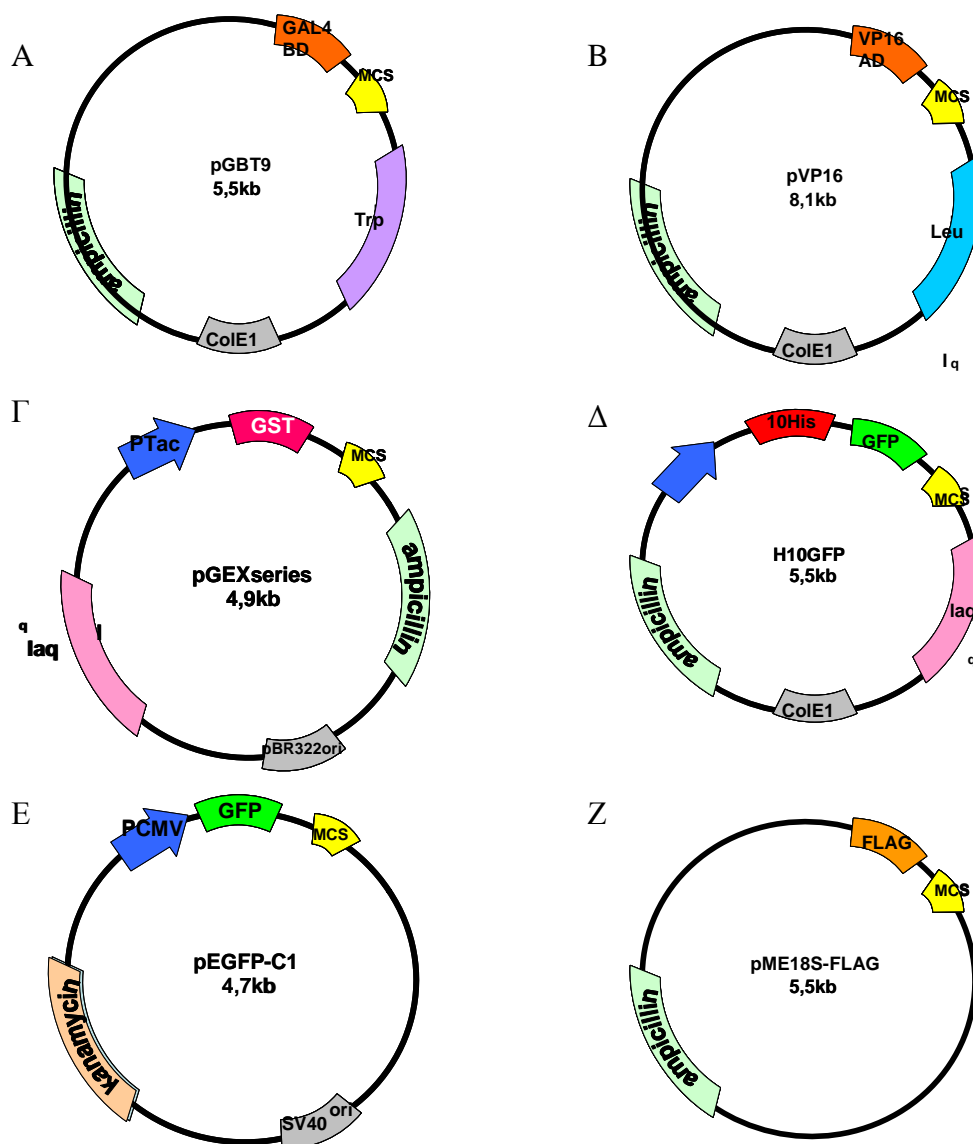
B. pVP16. Περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16 σε συνέχεια με την περιοχή που αποτελείται από πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (MCS). Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη (Leu).

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

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

E. pEGFP-C1 (Clontech). Χρησιμοποιείται για έκφραση μιας κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του υποκινητή CMV που περιέχει, αλλά και για εντοπισμό της πρωτεΐνης αυτής στο κύτταρο λόγω της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP για την οποία κωδικοποιεί και η οποία βρίσκεται μπροστά από το MCS

Z. pME18S-FLAG. Περιέχει τον υποκινητή SRa και χρησιμοποιείται στην περίπτωση έκφρασης κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Προηγείται του MCS, η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για τον επίτοπο FLAG.



Σχήμα 2: Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης χωρίς ένθεμα: Φαίνονται σχηματικά οι υποκινητές των πλασμιδίων, οι περιοχές έναρξης της αντιγραφής (ori), τα γονίδια ανθεκτικότητας του κάθε πλασμιδίου σε αντιβιοτικά, οι περιοχές κωδικοποίησης των ιστιδινών (His) ή της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) καθώς και η περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).

3.1.2. Κυτταρικά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

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

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

KC8 (Clontech): Βακτηριακό στέλεχος τροποποιημένο έτσι ώστε να μην παράγονται τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, ουρακίλη, ιστιδίνη και αδενίνη. Παρόλο που τα κύτταρα αυτά έχουν χαμηλή απόδοση μετασχηματισμού από πλασμίδια, είναι χρήσιμα στην περίπτωση που θέλουμε να διαχωρίσουμε ένα πλασμίδιο από κάποιο άλλο. Συγκεκριμένα, η πρωτοτροφία σε κάποιο αμινοξύ που προσδίδει στα κύτταρα το πλασμίδιο αυτό, π.χ. πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη και η καλλιέργεια των κυττάρων στο ανάλογο θρεπτικό μέσο επιλογής, βοηθάει στην επιλογή των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί με το επιθυμητό πλασμίδιο.

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

PJ69-4A (P. James, J. Halladay Genetics 1996): Τα συγκεκριμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της εφαρμογής του συστήματος των δύο υβριδίων. Περιέχουν ενσωματωμένα στο γονιδιώμά τους τα γονίδια αναφοράς LacZ, ADE2 και HIS3 των οποίων ο υποκινητής περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

3.1.3. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

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 1μg πλασμιδιακού DNA, περίσσεια του αντίστοιχου ενζύμου (Fermentas) και 2 μl κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε ένζυμο. Το υπόλοιπο του όγκου της αντίδρασης συμπληρώνεται με αποστειρωμένο και δις απεσταγμένο H₂O (ddH₂O). Η επώαση γίνεται για τουλάχιστον 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

3.1.4. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA

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.

3.1.5. Κατεργασία του DNA με πολυμεράση Klenow

Το ένζυμο πολυμεράση Klenow (DNA Polymerase I, Large Klenow Fragment, 5.000 units/ml BioLabs) λόγω της πολυμεριστικής δράσης που διαθέτει, χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις συμπληρώματος των άκρων τμήματος DNA. Αποτελεί τμήμα της *E.coli* DNA Polymerase I κι έχει προκύψει από την πρωτεόλυση της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να διατηρεί την 5'→3' πολυμεριστική της δράση και την 3'→5' εξωνουκλεολυτική δράση, αλλά έχει χάσει την δράση της σαν εξωνουκλεάση με κατεύθυνση 5'→3'. Για x μg πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιούνται αντίστοιχα x units Klenow (1 unit/μg DNA), 100μM από καθένα από τα dATP, dCTP, dTTP, dGTP και 1x ρυθμιστικού διαλύματος Klenow ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται στα 50 μl με ddH₂O. Η επώαση γίνεται για 15 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται με θέρμανση στους 75°C για 20 λεπτά.

3.1.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Τα διάφορα τμήματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Συγκέντρωση αгарόζης 1% είναι ιδανική για το διαχωρισμό κομματιών DNA από 500 βάσεις έως 7000 βάσεις. Για την παρασκευή προστίθεται 1% αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA) και ακολουθεί θέρμανση στους 100°C. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ml) το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Στη συνέχεια το διάλυμα αгарόζης αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πολυμεριστεί σε πηκτή. Προστίθεται διάλυμα TAE στη συσκευή ώστε να καλυφθεί η πηκτή. Τα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με μίγμα χρωστικών: 5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% μπλε του ξυλενίου τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής και η ηλεκτροφορούνται σε 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον. Τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή ανιχνεύονται μέσω της ιδιότητας του βρωμιούχου αιθιδίου να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα.

3.1.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Το κομμάτι αγαρόζης που περιέχει το προς απομόνωση DNA αφαιρείται από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι. Προκειμένου να αποπολυμεριστεί η αγαρόζη και να απομονωθεί το DNA γίνεται θέρμανση του κομματιού με διάλυμα QG στους 50⁰ C για 10 λεπτά. Προστίθεται ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύεται κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5. Η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων στη στήλη συστατικών γίνεται με πλύση με διάλυμα PE. Η έκλυση του δεσμευμένου στη στήλη DNA γίνεται με 30 μl ddH₂O σε pH 8.

3.1.8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm για να προσδιοριστεί η καθαρότητα του DNA. Απορρόφηση ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μg/ml δίκλωνου DNA κι επομένως η συγκέντρωση του δείγματος DNA υπολογίζεται ως εξής: Συγκέντρωση DNA = 50μg/ml x A₂₆₀ x παράγοντας αραίωσης. Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm (A₂₈₀) και υπολογίζεται ο λόγος A₂₆₀ / A₂₈₀. Για το καθαρό από προσμίξεις DNA ο λόγος A₂₆₀ / A₂₈₀ είναι μεταξύ 1,8-2,0.

3.1.9. Αντίδραση λιγάσης

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Με

αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 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.

3.1.10. Παρασκευή βακτηρίων (*E. coli*) δεκτικών 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 φυγοκεντρούνται στα 1800xg για 5 λεπτά, επαναιωρούνται σε 25ml διαλύματος TFB1 (30 mM CH₃COOK, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl και 15% γλυκερόλη) και επωάζονται στον πάγο για 10 λεπτά. Το TFB1 απομακρύνεται από τα κύτταρα, μετά από φυγοκέντρωση, στα 1800xg, για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται εκ νέου σε 2ml διαλύματος TFBII (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.

3.1.11. Μετασχηματισμός βακτηρίων

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.

3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation)

Χρησιμοποιούνται μικρές (3ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται σε 300μl διαλύματος TENS (0,1N NaOH, 0,5% SDS σε TE) και μετά προστίθενται 150μl διαλύματος 3M οξικού νατρίου, pH 5,2. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρου και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη αιθανόλης. Το ίζημα του DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 20μl διαλύματος TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM).

3.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με αλκαλική λύση

Πρόκειται για παρόμοια τεχνική με την απομόνωση με αλκαλική λύση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. 50 ml μετασχηματισμένης βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε 3.000xg. Το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος A (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH.8.0) και προστίθενται 2ml διαλύματος B (0,2N NaOH, 1% SDS). Το αιώρημα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στην συνέχεια προστίθενται 1,5ml ψυχρού διαλύματος CH₃COOK 5M pH 5,8 και η επώαση συνεχίζεται για 5 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 10.000xg, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιους σωλήνες μικροφυγόκεντρου και το DNA εκχυλίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης / χλωροφορμίου αναλογίας 1:1. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12.000 xg στους 4⁰C, απομονώνεται η υπερκείμενη στοιβάδα και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη αιθανόλης. Τέλος το ίζημα του DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 50μl διαλύματος TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM).

3.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με το Qiagen Midi Kit

Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγαλύτερες (100ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων και είναι εφικτή η ανάκτηση περίπου 75-100μg πλασμιδίου. Γίνεται λύση των κυττάρων με NaOH και CH₃COOK και το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται σε μια στήλη ανιοντοανταλλαγής σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας και pH. Το RNA και διάφορες πρωτεϊνικές προσμίξεις απομακρύνονται από τη στήλη χρησιμοποιώντας διαλύματα μέτριας αλατότητας. Το πλασμιδιακό DNA εκλούεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και τέλος κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη.

3.3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae* υψηλής απόδοσης κατά Gietz & Woods.

Υγρή καλλιέργεια με το αντίστοιχο στέλεχος του σακχαρομύκητα, όγκου 2ml επωάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) στους 30°C όλη νύχτα. Η καλλιέργεια φωτομετρείται στα 600 nm και ποσότητα αυτής μεταφέρεται σε 10ml θρεπτικού YPD ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι 5×10^6 κύτταρα /ml. Η επώαση συνεχίζεται με ανάδευση στους 30°C έως ότου ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 2×10^7 κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3.000xg. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 5 ml ddH₂O και ξαναφυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 1 ml οξικού λιθίου (CH₃COOLi) 0.1M, το μίγμα διαχωρίζεται σε σωληνάκια μικροφυγόκεντρου ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα σε 10.000 xg. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια με την εξής σειρά : 240 µl 50% (w/v) πολυαιθυλενγλυκόλη 3350MW (PEG), 36 µl 1M CH₃COOLi, 50µl ssDNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα θερμάνθηκε στους 100°C για 30 λεπτά), x µl πλασμιδιακού DNA (από 0,1-10 µg), 34-x µl ddH₂O. Γίνεται ανάδευση του μίγματος έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά και επώαση για 30 λεπτά στους 30°C. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 42°C. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται σε 12.000xg για 15 δευτερόλεπτα και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200-400 µl ddH₂O. Τέλος τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επωάζονται για 2-4 ημέρες στους 30°C.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού SC χρειάζονται: 20 gr glucose, 1,7 gr Yeast Nitrogen Base (χωρίς αμινοξέα και χωρίς (NH₄)₂SO₄), 5 gr (NH₄)₂SO₄, 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη), ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 5,6 με προσθήκη 5M NaOH και προστίθεται ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου SC σε τρυβλία χρησιμοποιούνται ακριβώς τα ίδια διαλύματα εκτός ότι προστίθενται επιπλέον και 20 gr άγαρ. Τα διαλύματα αποστειρώνονται και στη συνέχεια προστίθενται τα κατάλληλα αμινοξέα ανάλογα με το στέλεχος του σακχαρομύκητα.

Για το θρεπτικό υλικό YPD (Yeast Extract -Peptone-Dextrose) χρησιμοποιούνται, 20 gr glucose, 10 gr bacto yeast extract, 20 gr bacto peptone, ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1000 ml.

3.3.2. Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae* με ταχεία διαδικασία κατά Gietz & Woods.

Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο γρήγορος μετασχηματισμός οποιουδήποτε κυττάρου σακχαρομύκητα. Χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις που η απόδοση του μετασχηματισμού δεν είναι σημαντικός παράγοντας. Από ένα τρυβλίο με αποικίες του στελέχους του ενδιαφέροντός μας συλλέγονται (με scraper) τόσες αποικίες ώστε ο όγκος των κυττάρων να αντιστοιχεί περίπου σε 25 μ l. Το στέλεχος του σακχαρομύκητα επωάζεται σε κατάλληλο όγκο υγρής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο επιλογής στους 30⁰C όλη νύχτα. Την επόμενη ημέρα η καλλιέργεια φωτομετρείται στα 600 nm και ποσότητα αυτής μεταφέρεται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι 5x10⁶ κύτταρα /ml. Η επώαση συνεχίζεται με ανάδευση στους 30⁰ C έως ότου ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 2x10⁷ κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3.000xg και η διαδικασία που ακολουθείται στην συνέχεια είναι η ίδια που περιγράφεται στον «Μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης κυττάρων *S. Cerevisiae*».

3.3.3. Μετασχηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae* για την μέθοδο των δύο υβριδίων κατά Gietz & Woods.

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου υψηλής απόδοσης και χρησιμοποιείται στην περίπτωση αντιδράσεων πολλαπλάσιας κλίμακας. Επώαση της υγρής καλλιέργειας του στελέχους που θα μετασχηματιστεί σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο στους 30⁰ C όλη νύχτα. Ο όγκος της καλλιέργειας εξαρτάται από την κλίμακα που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Πολλαπλάσια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
Όγκος καλλιέργειας:	25 ml	50 ml	100 ml

Η απορρόφηση της καλλιέργειας μετράται στα 600 nm και ο τίτλος των κυττάρων θα πρέπει να είναι $1-2 \times 10^7/\text{ml}$. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 5 λεπτά σε 3.000xg και το ίζημα επαναδιαλύεται σε υγρό θρεπτικό μέσο YPAD για δύο κυτταρικές διαιρέσεις ακόμη έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 5×10^6 κύτταρα /ml.

Πολλαπλάσια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
Όγκος καλλιέργειας YPAD:	50ml	150 ml	300 ml
Αριθμός απαιτούμενων κυττάρων:	$2,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
Τίτλος κυττάρων	$5 \times 10^6/\text{ml}$		

Η επώαση συνεχίζεται με ανάδευση στους 30°C για 3-4 ώρες έως ότου τα κύτταρα να φτάσουν τα $2 \times 10^7/\text{ml}$. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3.000xg και τα κύτταρα ξεπλένονται με το 1/2 του αρχικού τους όγκου ddH₂O και ξαναφυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται στον κατάλληλο όγκο CH₃COOLi 0,1M.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
100mM CH₃COOLi	3 ml	3 ml	6 ml

Η επώαση συνεχίζεται για 15 λεπτά στους 30⁰ C, ακολουθεί φυγοκέντρωση και στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνονται :

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
50%(w/v) PEG 3350	2,4 ml	7,2 ml	14,4 ml
1M CH₃COOLi	360 μl	1,08 ml	2,16 ml
DNA από σπέρμα σολομού (2mg/ml)	500 μl	1,50 ml	3,00 ml
Πλασμιδιακό DNA βιβλιοθήκης	A μl	B μl	Γ μl
Δις απεσταγμένο H₂O	340-A μl	1,02-B ml	2,04 –Γ ml

Το μίγμα αναδεύτηκε έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά και συνεχίστηκε η επώαση για 30 λεπτά στους 30⁰ C. Ο χρόνος επώασης στους 42⁰C, που ακολουθεί, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
Χρόνος στους 42⁰ C	30 λεπτά	40 λεπτά	45-60 λεπτά

Με το πέρας της επώασης στους 42⁰C τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000xg για 10 δευτερόλεπτα και το ίζημα επαναδιαλύθηκε στον κατάλληλο όγκο ddH₂O.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	<i>10 X</i>	<i>30 X</i>	<i>60 X</i>
Όγκος dd H₂O:	10 ml	40 ml	40 ml

Τα κύτταρα απλώθηκαν σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επώαστηκαν για 3-5 ημέρες.

** Όλα τα διαλύματα που αναφέρονται και στα τρία πρωτόκολλα σχετικά με τον μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα πρέπει να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο πριν την χρήση.*

3.4. ΔΙΑΣΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ (Rescue).

Υγρές καλλιέργειες 1ml των μετασχηματισμένων κυττάρων του σακχαρομύκητα επωάζονται στους 30°C όλη νύχτα, στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής. Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά σε ταχύτητα 3.000xg. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 200μl διαλύματος Rescue (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0,1% SDS) και προστίθενται αποστειρωμένα υάλινα σφαιρίδια (glass beads, διαμέτρου 0,45 mm). Ακολουθεί ανάδευση για 2 λεπτά, προστίθενται 200μl διαλύματος φαινόλης και η ανάδευση συνεχίζεται για άλλο 1 λεπτό. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση για 10 λεπτά με ταχύτητα 3.000xg. Το υδατικό υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα μικροφυγόκεντρου και προστίθενται 200μl διαλύματος φαινόλης : χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1. Γίνεται ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 3.000xg. Ξαναμεταφέρεται η υδατική φάση σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρου και το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη αιθανόλης. Τέλος το ίζημα του DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 20μl διαλύματος TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM).

3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

Υγρές καλλιέργειες 100ml κυττάρων του σακχαρομύκητα επωάζονται στους 30°C όλη νύχτα, στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής. Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά σε ταχύτητα 3.000xg. Το ίζημα των κυττάρων αναμιγνύεται με 200μl διαλύματος επιφόρτωσης (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης, 25mM DTT) και

αποστειρωμένα υάλινα σφαιρίδια (glass beads, διαμέτρου 0,45 mm). Ακολουθεί βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95°C.

3.6. ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *IN VITRO*.

3.6.1. Έπαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG

Τα κλωνοποιημένα σε πλασμίδια γονίδια των πρωτεϊνών βρίσκονται υπό τον έλεγχο κάποιου ισχυρού υποκινητή (π.χ. T5, T7 κ.α.), ο οποίος συνήθως είναι συνδεδεμένος με περιοχές του «χειριστή» (operator) του οπερονίου της λακτόζης. Τα συγκεκριμένα γονίδια βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το lacI γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Το εναρκτήριο σήμα για την ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων και της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών δίνεται από τη λακτόζη ή χημικά ανάλογα της (π.χ. IPTG), τα οποία απενεργοποιούν τον καταστολέα. Έτσι επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με IPTG γίνεται σε καλλιέργεια LB (με κατάλληλο αντιβιοτικό) ή οποία επωάζεται στους 37°C έως ότου η απορρόφηση της καλλιέργειας είναι 0.6-0.7 (μέτρηση στα 600nm). Τότε στην καλλιέργεια προστίθεται 1 mM IPTG και η επώαση συνεχίζεται στους 30° C. Μετά την πάροδο 4 ωρών τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 3000xg, ξεπλένονται με ddH₂O και αποθηκεύονται στους -20°C.

3.6.2. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτήρια

Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1/20 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας σε κατάλληλο διάλυμα λύσης. Για την πλήρη λύση των κυττάρων γίνονται υπέρηχοι στο διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα και φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος στα 10.000xg για 30min για το διαχωρισμό του διαλυτού

από το αδιάλυτο κλάσμα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία αγγιστείας χρησιμοποιείται το διαλυτό κλάσμα. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις γίνονται στους 4°C.

Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιείται για τις πρωτεΐνες με GST-επίτοπο περιέχει 1x PBS, 5mM DTT 0,1mM PMSF και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche). Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιείται για τις πρωτεΐνες με His-επίτοπο περιέχει 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche).

3.6.3. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο ιστιδινών.

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

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

Το διαλυτό κλάσμα που προέκυψε από την λύση βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χημικές His-πρωτεΐνες επωάζεται για 1-2 ώρες στους 4°C με σφαιρίδια Ni-NTA της Qiagen (500μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2lt καλλιέργειας), τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλες στήλες όγκου 10ml (Qiagen) όπου κατακρατούνται τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνεται το διαλυτό κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στα

σφαιρίδια. Ακολουθούν διαδοχικά 3 πλύσεις των σφαιριδίων με 10ml διαλύματος λύσης. Τα σφαιρίδια ξεπλένονται με 10ml διαλύματος λύσης που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (20mM) για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Η έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών γίνεται με 2,5ml διαλύματος λύσης με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (250mM). Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

3.6.4. Απομόνωση πρωτεϊνών με επίτοπο τρανσφεράσης της γλουταθειόνης.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Στην περίπτωση αυτή ο προσδέτης που ακινητοποιείται στην αгарόζη είναι το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται μέσω της GST, η οποία έχει ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη. Χρησιμοποιώντας κατάλληλα πλασμίδια (σειρά-pGEX) που φέρουν το γονίδιο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης πριν τη θέση του ενθέματος, είναι δυνατή η παραγωγή χιμαιρικών GST-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να απομονωθούν. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια καθαρής γλουταθειόνης η οποία ανταγωνίζεται τη γλουταθειόνη των σφαιριδίων της στήλης για τις θέσεις σύνδεσης στη GST. Το διαλυτό κλάσμα από τη λύση βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν τις χιμαιρικές GST-πρωτεΐνες επώαζεται για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με σφαιρίδια GSH- Sepharose (Amersham) (500μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 2lt καλλιέργειας), τα οποία έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το μίγμα μεταφέρεται σε κατάλληλες στήλες των 10ml όπου κατακρατούνται τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες ενώ απομακρύνεται το κλάσμα των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Ακολουθούν 3 διαδοχικές πλύσεις της στήλης με 10ml διαλύματος λύσης και μία φορά με 10ml διαλύματος λύσης απουσία απορρυπαντικού. Η έκλυση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στα σωματίδια έγινε με 1,5ml διαλύματος GSH Elution Buffer (10mM GSH, 50mM Tris-HCl pH.8.0). Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

3.6.5 Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών *in vitro*.

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

Συγκατακρήμνιση με μέσο καθήλωσης την στήλη GST: 25μl σφαιρίδιων GSH εξισορροπούνται με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4°C, σε διάλυμα 1x PBS, 5mM DTT 0,1mM PMSF και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche). Η δέσμευση της GST ή της GST- MgcRacGAP με την GSH στα σφαιρίδια της στήλης γίνεται παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4° C για 2 ώρες. Το υπερκείμενο της στήλης απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπούνται με το διάλυμα σύνδεσης (50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche)) στους 4° C. Στη συνέχεια περίπου 50μg GST ή GST-MgcRacGAP προσκολλημένης σε σφαιρίδια γλουταθειόνης επωάζονται με περίπου 85μg καθαρής HisGFP-HIF-1α πρωτεΐνης σε μικροστήλες Mobicol (Mobictec) για 4 ώρες στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και απομάκρυνση του υπερκειμένου, ακολουθούν 3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα που προαναφέρθηκε, στους 4° C. Τελικά, έγινε έκλουση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με προσθήκη 40μl διαλύματος επιφόρτωσης χωρίς DTT. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

Συγκατακρήμνιση με μέσο καθήλωσης σφαιρίδια Ni-NTA: 25μl σφαιρίδιων Ni-NTA εξισορροπούνται με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4°C, σε διάλυμα λύσης 50mM Tris-Cl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-μερκαπταιθανόλη, 5% γλυκερόλη, 1mM PMSF, 0,1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών

(Roche). Η δέσμευση της HisGFP ή HisGFP-HIF-1α(244-532) ή HisGFP-HIF-1α στα σφαιρίδια νικελίου της στήλης γίνεται παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού, υπό ανακίνηση, στους 4° C για 2 ώρες. Το υπερκείμενο της στήλης απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και τα σφαιρίδια της στήλης εξισορροπούνται με το διάλυμα σύνδεσης (1x PBS, 5mM DTT 0,1mM PMSF και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche)). Στη συνέχεια περίπου 25μg HisGFP ή HisGFP-HIF-1α(244-532) ή HisGFP-HIF-1α προσκολλημένης σε σφαιρίδια νικελίου επωάζονται με περίπου 50μg καθαρής GST ή GST-MgcRacGAP πρωτεΐνης σε μικροστήλες Mobicol (Mobitec) για 4 ώρες στους 4⁰C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 12.000xg και απομάκρυνση του υπερκειμένου, ακολουθούν 3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα που προαναφέρθηκε, στους 4° C. Τελικά, γίνεται έκλυση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με προσθήκη 30μl διαλύματος επιφόρτωσης χωρίς DTT. Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση τους στους 95⁰C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

3.7.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων μίας πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των πρωτεϊνών στην πηκτή εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης σύμφωνα με την εξίσωση: $v = E * q / f$ όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες της πηκτής μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Ο σχηματισμός των πηκτών πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου (CH₂=CH-CO-NH₂) και του N,N μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου (CH₂=CH-CO-NH-CH₂-NH-CO-CH=CH₂) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει

πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβάξης που είναι υπεύθυνο για τη συμπίκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πήκτωμα διαχωρισμού που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σ' αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και τη σύστασή τους. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται παρουσία του απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulfate). Το SDS αποδιατάσει τις πρωτεΐνες και δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο το οποίο είναι σταθερό ανά μονάδα μάζας κι έτσι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.

3.7.2. Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου είναι: διάλυμα ηλεκτροφόρησης : (50 mM Tris, 0.38 M γλυκίνη, 2mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.9), πήκτωμα επιστοιβάξης: (4,5% ακρυλαμίδιο:bis, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 2mM EDTA, για τον πολυμερισμό 0.08% APS, 0.04% TEMED, πήκτωμα διαχωρισμού: (8-12% ακρυλαμίδιο:bis, 0.1% SDS, 0.375 M Tris-Cl pH 8.8, 2mM EDTA, για τον πολυμερισμό 0.04% APS, 0.04% TEMED).

3.7.3. Προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων

Τα δείγματα αναμιγνύονται με το διάλυμα επιφόρτωσης (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης, 25mM DTT). Ακολουθεί βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95°C.

3.7.4. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 200 Volt, για 60 λεπτά. Για την ανίχνευση των θέσεων των πρωτεϊνών, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (0,25 % Coomassie Brilliant Blue, 50% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 30 λεπτά. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (30 % αιθανόλη, 10 % οξικό οξύ).

3.7.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διαλύματος φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (BioRad). Βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής Coomassie Brilliant blue σε όξινο περιβάλλον και τη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου. Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα έως τελικό όγκο 1 ml, 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.

3.7.6. Ανοσοαποτύπωση

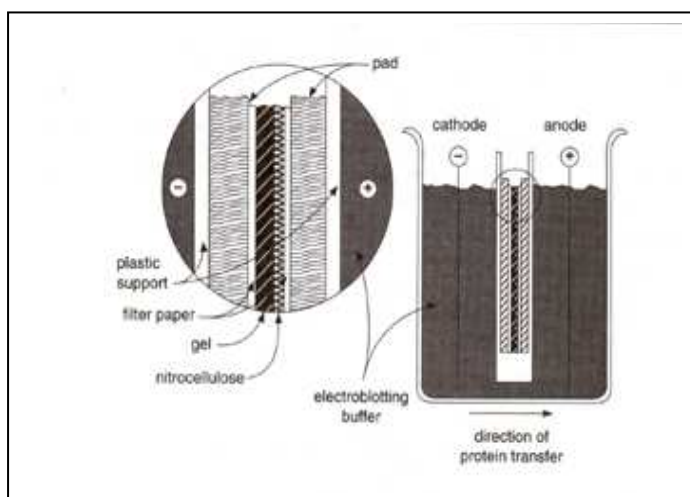
Η τεχνική αυτή αποτελείται από δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη συνήθως νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε υγρή φάση (Wet transfer) ή σε ημίξηρη φάση (Semi-dry transfer). Η μεταφορά επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό πεδίο το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

Το δεύτερο μέρος είναι η ανοσοανίχνευση. Ο εντοπισμός δηλαδή μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης (αντιγόνο) με τη βοήθεια αντισωμάτων. Η τεχνική βασίζεται στην αλληλεπίδραση του αντιγόνου με το ειδικό για αυτό αντίσωμα. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος το οποίο εκτός ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-

δείκτη (όπως το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP) το οποίο αντιδρώντας με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση ή εκκλύει φωταύγεια καταδεικνύοντας έτσι τη ζώνη του αντιγόνου.

3.7.6.1. Μεταφορά υγρής φάσης (Wet Transfer)

Μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται η πηκτή διαχωρισμού για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Έξι διηθητικά χαρτιά Whatman των 3mm και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται στο διάλυμα μεταφοράς (48mM Tris, 39mM Glycine, 1,3mM SDS, 20% μεθανόλη). Έπειτα τοποθετούνται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να δημιουργείται ένα «σάντουιτς» με τα χαρτιά Whatman τη μεμβράνη και την πηκτή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Το σάντουιτς τοποθετείται με το σωστό προσανατολισμό στη συσκευή Transport Electrophoration Unit της Hoefer, η οποία είναι γεμάτη με το διάλυμα μεταφοράς



Εικόνα 9: Διάταξη του σάντουιτς πηκτής-μεμβράνης στη μεταφορά πρωτεϊνών υγρής φάσης (Current protocols in Molecular Biology 10.8).

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

3.7.6.2. Μεταφορά ημίξηρης φάσης (Semi-Dry Transfer)

Με αυτήν την τεχνική η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μεταξύ 2 μεγάλων ηλεκτροδίων, χωρίς τη χρήση μεγάλης ποσότητας διαλύματος μεταφοράς (48mM Tris, 39mM Glycine, 1,3mM SDS). Η διαφορά με την προηγούμενη μέθοδο είναι ότι το «σάντουιτς» που δημιουργείται τοποθετείται σε οριζόντια θέση σε συσκευή Trans-Blot SD της BioRad. Η μεταφορά διαρκεί 1 ώρα στα 10Volt και η μεμβράνη χρωματίζεται προσωρινά με Ponceau S 0,2%.

3.7.6.3. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη σε PBS+0,1% Tween 20) για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις των διαφόρων πρωτεϊνών με το αντίσωμα. Μετά την επώαση ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με PBS+0,1% Tween 20. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4°C με το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS+0,1% Tween 20). Ακολουθούν 3 πλύσεις για 10 λεπτά για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη με PBS+0,1% Tween 20. Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με ένα 2ο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το 1ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS+0,1% Tween 20). Ακολουθούν οι απαραίτητες πλύσεις με PBS+0,1% Tween 20. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αραιώσεις τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πρώτα αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρεία
αντι-HIF-1α	ποντίκι	1/500	BD Biosciences
αντι-GST	κατσίκια	1/1000	Amersham
αντι-tetra-His	ποντίκι	1/1000	Qiagen
αντι-GFP	ποντίκι	1/1000	Roche
αντι-F-actin	ποντίκι	1/500	Serotec

Δεύτερα αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρεία
αντι-IgG ποντικού	κατσίκας	1/3000	BioRad
αντι-IgG κουνελιού	κατσίκας	1/3000	Cell Signalling
αντι-IgG κατσίκας	ποντίκι	1/3000	Jackson Immuno.

Πίνακας 4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση στα διάφορα πειράματα. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν.

Η μεμβράνη στη συνέχεια επωάζεται για ένα λεπτό με διάλυμα που περιέχει 10ml λουμινόλης (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5), 10μl 3% H₂O₂ και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO). Στη συνέχεια εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham) το οποίο εμφανίζεται με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (διάλυμα ανάπτυξης, διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak)).

3.8. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.8.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών

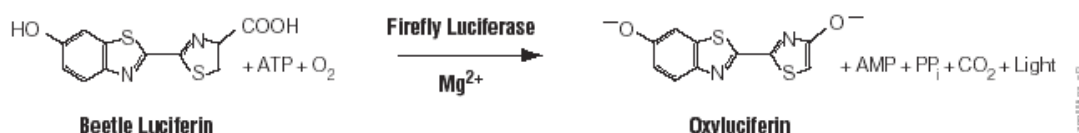
Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται είναι HeLa και 293T. Τα HeLa είναι επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου τραχηλικού καρκινώματος. Τα 293T είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο καρκίνο του νεφρού (επιμολυσμένα με τον αδενοϊό 5DNA). Και τα δύο είδη κυττάρων διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, High Glucose, 1mM sodium pyruvate) (Gibco BRL), στο οποίο προστίθεται 2mM L-γλουταμίνη (L-glutamine) (Biochrom KG Seromed), 10% fetal bovine serum (FBS) (Biochrom KG Seromed) και μίγμα αντιβιοτικών (antibiotic-antimycotic solution) (Gibco BRL). Καλλιεργούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες ή αποστειρωμένα πιάτα (Greiner) σε έναν επωαστήρα (Forma Scientific Inc) σε θερμοκρασία 37°C και ατμοσφαιρικό αέρα - 5% CO₂. Διπλασιάζονται περίπου κάθε 18 ώρες, οπότε σε ένα πιάτο 10cm² τοποθετούνται 3x10⁶ κύτταρα και αφήνονται για 2-3 μέρες ώσπου να καλύψουν τον πάτο του πιάτου και έπειτα μοιράζονται σε νέα πιάτα.

3.8.2. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων 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. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa ή 293T που καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό 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) και αναπτύσσονται σε κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂. Σε συνθήκες υποξίας τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κλίβανο (Billups-Rothernberg) και επωάζονται για τέσσερις ώρες σε 1% O₂ / 5% CO₂ / 94% N₂. Όπου αναφέρεται ο επαγωγέας του HIF-1α δεσφερριτοξαμίνη (DFO) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 150μM επίσης για τέσσερις ώρες. 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 DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10μg /τρυβλίο ή 2μg /πηγαδάκι. Τα κύτταρα τοποθετούνται έτσι ώστε την ημέρα που θα γίνει η διαμόλυνση να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας. Για κάθε τρυβλίο ετοιμάζεται ένα μίγμα που περιέχει 4ml θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, 15μl από το αντιδραστήριο Transpass D2 και 10μg πλασμιδιακού DNA, ενώ για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται ένα μίγμα το οποίο περιέχει 0,6ml θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, 1μl από το αντιδραστήριο Transpass D2 και 2μg πλασμιδιακού DNA. Πριν προστεθεί το μίγμα στα κύτταρα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Αφού προστεθεί αφήνεται για 2-3 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, γίνεται αντικατάσταση του μίγματος διαμόλυνσης με φρέσκο θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% ορό και τα κύτταρα αφήνονται για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προσθέτονται οι επαγωγείς για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.

3.9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ HIF-1α

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{+2} (Εικόνα 10). Ταυτόχρονα με την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση της ως γονίδιο αναφοράς.



Εικόνα 10 : Οξείδωση της λουσιφερίνης από το ένζυμο λουσιφεράση (Promega)

Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιείται για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α σε κύτταρα 293T και HeLa.. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL3-VEGF/5HRE το οποίο περιέχει 5 HRE στοιχεία του γονιδίου του VEGF πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης αλλά και το pGLHIF1.3 το οποίο περιέχει 3 HRE στοιχεία του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) πριν το γονίδιο της λουσιφεράσης και σαν πλασμίδιο μάρτυρας για την απόδοση της επιμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το pCMV-*lacZ*, που μας δόθηκε από την δρ. Α. Κρετσόβαλη (Πανεπιστήμιο Ηρακλείου, Κρήτη).

Η επιμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια γίνεται με το TranspassTM D2 Transfection Reagent αντιδραστήριο της New England Biolabs το οποίο επιτρέπει την επιμόλυνση κυττάρων χωρίς τη χρήση ορού στο θρεπτικό υλικό. Όπου αυτό αναφέρεται, τα κύτταρα επωάζονται με 150μM DFO ή εκτίθενται σε συνθήκες υποξίας (1% O₂). Τα κύτταρα σε κάθε θέση της 12πλέτας λύνονται με 75μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assay System kit της Promega). Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος των κυττάρων (20.000xg) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου. 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμειγνύονται με 20μl του διαλύματος της λουσιφερίνης

(του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παράγεται μετράται σε λουμινόμετρο.

Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμιγνύονται με 1000μl μίγματος: 850μl διαλύματος lacZ (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 40mM β-μερκαπταιθανόλης) + 150μl ONPG 0,5mg/ml ,Sigma. Το μίγμα παραμένει στους 30°C μέχρι το χρωματισμό του διαλύματος σε κίτρινο. Η αντίδραση διακόπτεται με 200μl ανθρακικού νατρίου 1M. Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων γίνεται στα 420nm.

3.10. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της πρωτεΐνης A (Protein A) του μικροοργανισμού *staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στις ανοσοσφαιρίνες. Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα αυτή, τα αντισώματα που έχουν δεσμεύσει το αντιγόνο τους από ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα δεσμεύονται στη συνέχεια στην πρωτεΐνη A η οποία είναι καθηλωμένη σε ένα αδρανές υλικό. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα όπως είναι το αντίσωμα που αναγνωρίζει την ακολουθία FLAG σε πρωτεΐνες σύντηξης, η στήλη που χρησιμοποιείται είναι πρωτεΐνη G-σεφαρόζη.

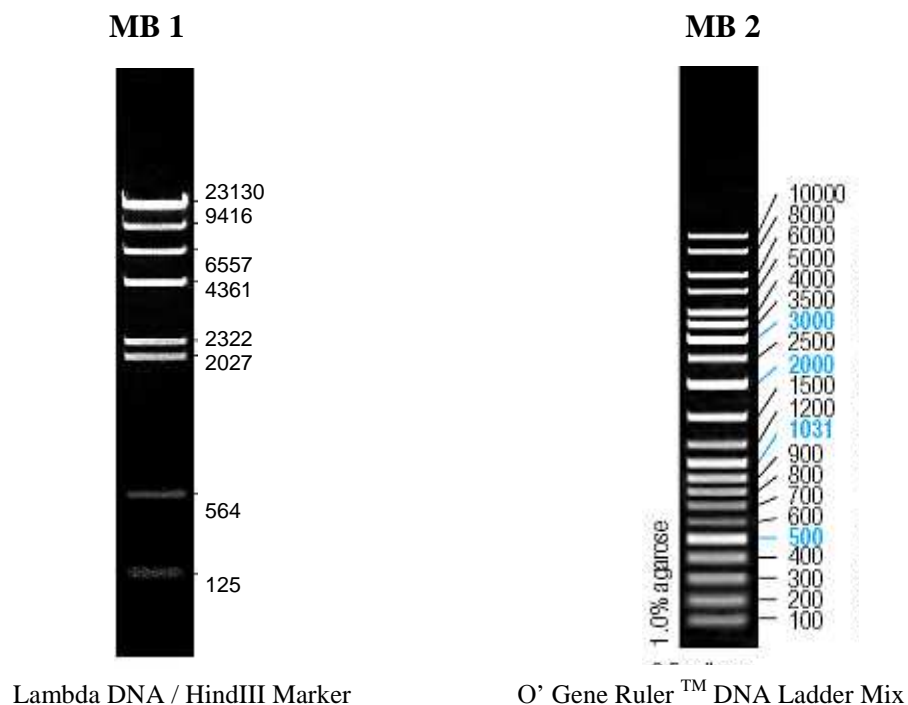
Κύτταρα HeLa (ή 293T) που είχαν αναπτυχθεί σε τρυβλία των 10cm επιμολύνονται με ίσες ποσότητες πλασμιδίων που εκφράζουν για GFP ή GFP-HIF-1α και FLAG ή FLAG-MgcRacGAP ή FLAG-ΔMyo-MgcRacGAP για 24 ώρες. Τα κύτταρα λύνονται με το ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-Cl, pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM PMSF, 1% Triton X-100 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche)) και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά σε 12.000xg στους 4°C. Η περιεκτικότητα του υπερκείμενου σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford και ο όγκος του σταθεροποιήθηκε στα 500μl με το ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται με 0,6μg μονοκλωνικού αντισώματος από ποντικό αντι-FLAG M2 (Sigma) ή 1μl πολυκλωνικού αντισώματος από ορό κουνελιού αντι-GFP, το οποίο είναι μια ευγενική χορηγία της δρ. Μπολέτη (Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα).

Επιπλέον και τα σφαιρίδια εξισορροπούνται με το ρυθμιστικό διάλυμα, με 3 πλυσίματα των 10 λεπτών το καθένα. 20μl σφαιριδίων G πρωτεΐνης (Sigma) ή σφαιριδίων A πρωτεΐνης (Amersham) επωάζονται με τα δείγματα και η επώαση συνεχίζεται για 12 ώρες με ανάδευση στους 4⁰C. Τα σφαιρίδια συλλέγονται με φυγοκέντρωση, ακολουθούν τρία πλυσίματα των 10 λεπτών με το ρυθμιστικό διάλυμα και οι συνδεδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλύονται με 25μl διαλύματος επιφόρτωσης χωρίς DTT. Πριν την ανάλυση με SDS-PAGE στα δείγματα προστίθενται 25mM DTT και βρασμός στους 95⁰C για 3 λεπτά ώστε να διασπαστούν τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Τέλος γίνεται ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

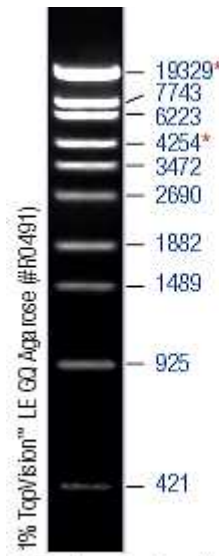
3.11. ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ.

Απεικονίζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης ή της ποσοτικοποίησης DNA και στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Όλοι οι μάρτυρες είναι της εταιρίας Fermentas και η συγκέντρωση καθενός ήταν 0,5 μg/μl.

3.11.1. DNA μάρτυρες μοριακών βαρών.



MB 3

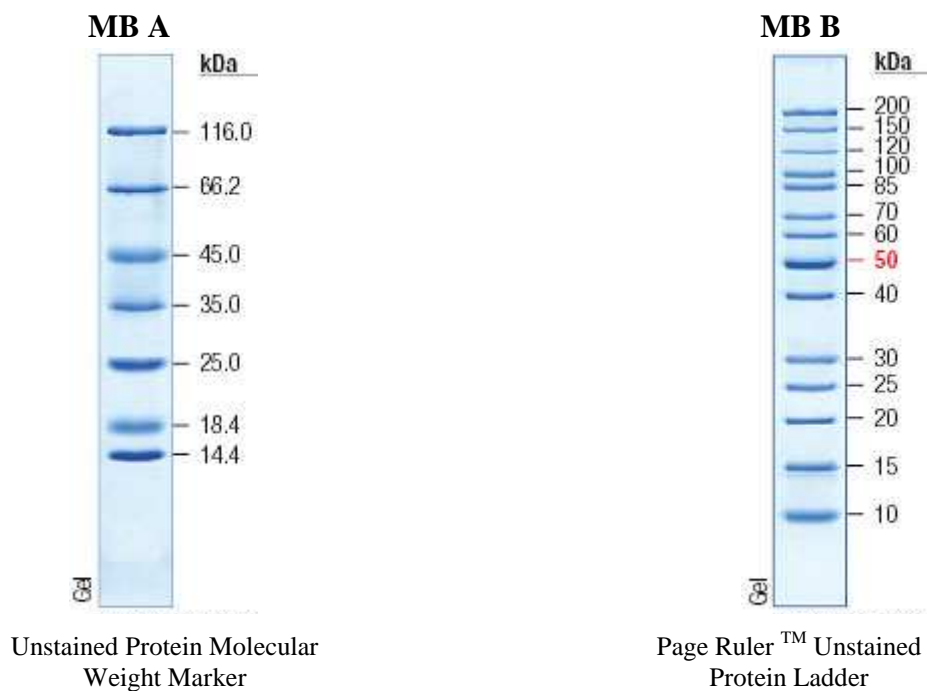


Lambda DNA / Eco130I (StyI) Marker

Οι αριθμοί αναφέρονται στις έντονες ζώνες που αντιστοιχούν σε θραύσματα του DNA. Στη συνέχεια στο κείμενο θα αναφέρεται κάθε ένας μοριακός μάρτυρας με το όνομα MB 1, MB 2 ή MB 3 ανάλογα.

3.11.2. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μοριακών βαρών.

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που αναφέρονται στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακοί μάρτυρες που απεικονίζονται. Δίνονται τα kDa για κάθε ζώνη.



Στη συνέχεια στο κείμενο θα αναφέρεται κάθε ένας μοριακός μάρτυρας με το όνομα MB A ή MB B ανάλογα

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α

4.A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ.

4.A.1. Εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων

Με στόχο να ανιχνευθούν νέες μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες εφαρμόστηκε το σύστημα των δύο υβριδίων.

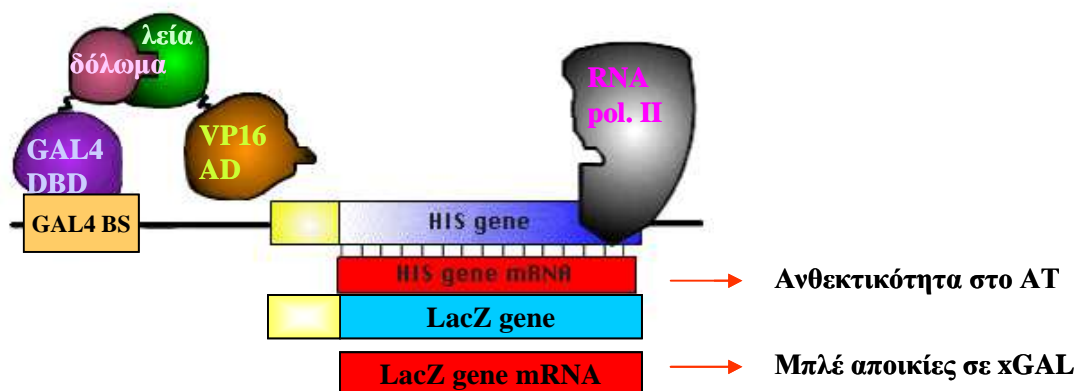
Πρόκειται για μία πρόσφατη σχετικά τεχνική που χρησιμοποιεί έναν μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό, τον *Saccharomyces cerevisiae*. Εφαρμόζεται στα κύτταρα *in vivo* και δίνει την δυνατότητα μαζικών σαρώσεων μεγάλων πληθυσμών πρωτεϊνών προς ανίχνευση αλληλεπιδράσεων. Εκμεταλλεύεται την ιδιότητα που έχουν οι περιοχές σύνδεσης με το DNA (BD, Binding Domain) και ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD, Activation Domain) των μεταγραφικών παραγόντων να δρουν χωριστά.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση το πλασμίδιο-δόλωμα περιέχει το τμήμα του cDNA του HIF-1α κλωνοποιημένο σε συνέχεια με την περιοχή σύνδεσης με το DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (GAL4 BD) στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9. Από την άλλη τα πλασμίδια-λεία περιέχουν cDNA που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16 (VP16 AD) στον πλασμιδιακό φορέα pVP16. Το σύνολο των πλασμιδίων-λεία αποτελεί τη cDNA βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε και η οποία περιέχει cDNA που προέρχονται από έμβρυο ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών.

Το πλασμίδιο-δόλωμα και τα πλασμίδια-λεία χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν κύτταρα *S. cerevisiae* PJ69-4A τα οποία περιέχουν τα γονίδια αναφοράς HIS3, ADE2 και LacZ. Η εισαγωγή των γονιδίων αναφοράς στο σακχαρομύκητα έχει γίνει έτσι ώστε αυτά να ελέγχονται από τις θέσεις αναγνώρισης στο DNA του GAL4 BD. Ειδικότερα ο υποκινητής που υπάρχει πριν από τα γονίδια

αναφοράς φέρει συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων (BS, Binding Site) με την οποία συνδέεται η περιοχή BD του μεταγραφικού παράγοντα του GAL4.

Όταν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του πλασμιδίου-δολώματος και ενός πλασμιδίου-λείας τότε αυτή ανιχνεύεται με βάση τον φαινότυπο των κυττάρων. Συγκεκριμένα, εφόσον υπάρχει λεία που εμφανίζει αγκιστεία με το δόλωμα, τότε η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής θα προσεγγίσει μέσω της αλληλεπίδρασης των χημικών πρωτεϊνών την περιοχή σύνδεσης με το DNA και θα ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς (βλ. Εικ. 11). Τα κύτταρα του σακχαρομύκητα αποκτούν πρωτοτροφία για τα αμινοξέα ιστιδίνη και αδενίνη κι έχουν την δυνατότητα παραγωγής του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να επιβιώνουν σε θρεπτικό μέσο επιλογής SC απουσία ιστιδίνης ή παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων 3-αμινο-1,2,4-τριαζόλης (AT), ενός συναγωνιστικού αναστολέα του ενζύμου HIS3. Ακόμη, τα κύτταρα παρουσία αδενίνης δίνουν άσπρες αποικίες (στην αντίθετη περίπτωση θα είναι κόκκινες) και επειδή παράγουν β-γαλακτοσιδάση έχουν την ικανότητα όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει Xgal να το υδρολύουν δίνοντας αποικίες μπλε χρώματος (σε αντίθετη περίπτωση οι αποικίες θα είναι άσπρες).



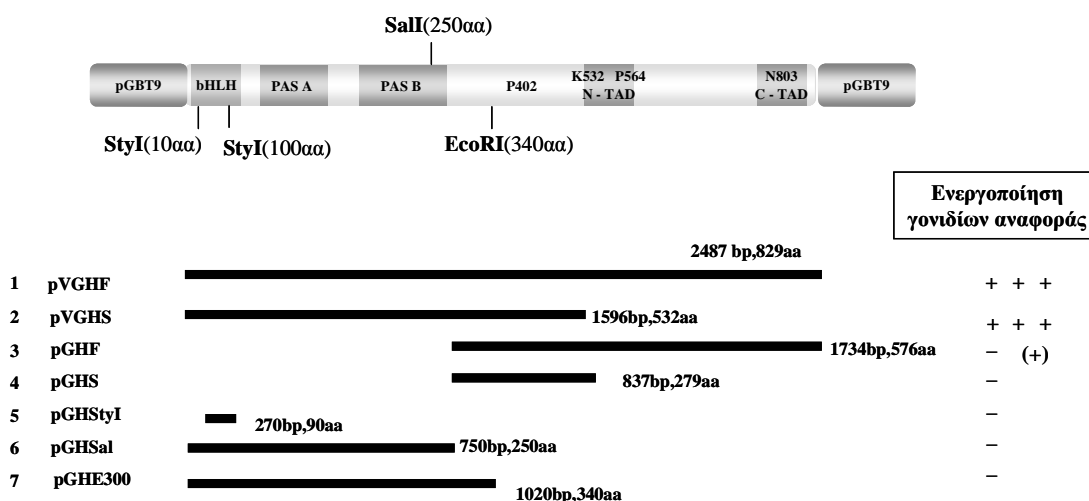
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς λόγω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης-λείας με την πρωτεΐνη-δόλωμα στο κύτταρο του σακχαρομύκητα με το σύστημα των δύο υβριδίων

Στην περίπτωση που δεν συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ του πλασμιδίου-δολώματος και ενός πλασμιδίου-λείας, τότε δεν συμβαίνει ενεργοποίηση της

μεταγραφής των γονιδίων αναφοράς κι άρα δεν παράγονται από τα κύτταρα τα αμινοξέα ιστιδίνη και αδενίνη καθώς και το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης. Επομένως, τα κύτταρα αυτά δεν επιβιώνουν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ιστιδίνη, δίνουν αποικίες με κόκκινο χρώμα όταν μεγαλώνουν απουσία αδενίνης και δεν διασπούν το υπόστρωμα Xgal.

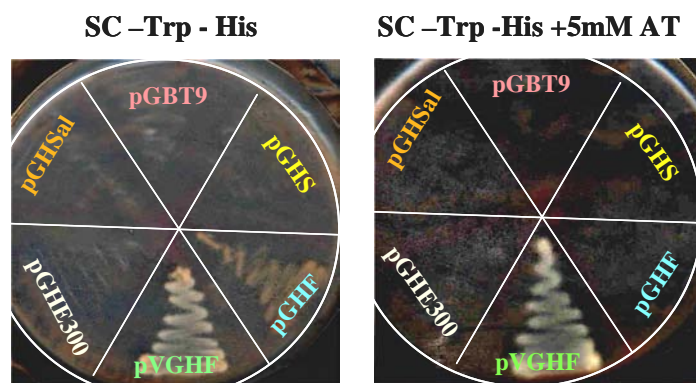
4..A.1.1. Επιλογή πλασμιδίου-δολώματος.

Τα πειράματα που περιγράφονται αρχικά είναι αποτελέσματα που έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη εργασία (Μελέτη των μοριακών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία: Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α με το σύστημα των δύο υβριδίων, Λυμπεροπούλου Αγγελική, Λάρισα 2002, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) [146] και παρατίθενται εδώ εισαγωγικά. Θελήσαμε να χρησιμοποιήσουμε ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης HIF-1α ως πρωτεΐνη-δολώμα. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που την παράγει, είναι αποτέλεσμα κλωνοποίησης του προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στο φορέα pGBT9, και ονομάζεται pVGHF (Σχήμα 3, πλασμιδιακή κατασκευή 1). Συγκεκριμένα το cDNA του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *Sma*I και *Bam*HI του πλασμιδιακού φορέα pGBT9 σε συνέχεια με την περιοχή GAL4-BD.



Σχήμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση πλασμιδιακών κατασκευών του HIF-1α στο φορέα pGBT9. Με + και – υποδηλώνεται η ικανότητα αύξησης του στελέχους PJ69-4A μετασχηματισμένου με τα αναγραφόμενα πλασμίδια σε θρεπτικό μέσο επιλεκτικό για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς HIS3.

Το πλασμίδιο pVGHF δεν χρησιμοποιήθηκε όμως στο σύστημα των δύο υβριδίων, διότι βρέθηκε ότι ενεργοποιεί από μόνο του τα γονίδια αναφοράς. Θεωρήθηκε ότι η ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς οφείλεται στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του HIF-1α, που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αφαιρώντας το τμήμα του cDNA που κωδικοποιεί για την περιοχή των αμινοξέων 530-826 (N-TAD, ID, C-TAD) δημιουργήθηκε η κατασκευή pVGHS (βλ. Σχήμα 3, πλασμιδιακή κατασκευή 2), που όμως και αυτή ήταν θετική όσον αφορά την ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς. Δεδομένου ότι στην κατασκευή pVGHS δεν περιέχονται οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, τελικά θεωρήθηκε ότι, υπάρχει πιθανόν διμερισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης-δόλωμα με ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* μέσω της περιοχής διμερισμού και αλληλεπίδρασης, bHLH-PAS [126]. Επιλέχθηκε να απομονωθεί το τμήμα *SalI*, από τις παραπάνω δύο κατασκευές, και να κλωνοποιηθεί στην θέση *SalI* του φορέα pGBT9. Έτσι, οι νέες κατασκευές –που ονομάζονται pGHF και pGHS, αντίστοιχα (βλ. Σχήμα 3, πλασμιδιακές κατασκευές 3 και 4)- δεν θα κωδικοποιούν για την περιοχή bHLH και ένα μεγάλο τμήμα της PAS περιοχής. Αυτές δοκιμάστηκαν για ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς, και ενώ το πλασμίδιο pGHS έδινε αρνητικά αποτελέσματα, το pGHF παρουσίαζε μια μικρή αυτενεργοποίηση που έκανε αδύνατη την χρήση του ως πλασμίδιο-δόλωμα (βλ. Εικ. 12). Καταλήξαμε με το πλασμίδιο pGHS το οποίο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πλασμίδιο-δόλωμα στο σύστημα των δύο υβριδίων, αλλά η περιοχή του cDNA του HIF-1α που θέλαμε να μελετήσουμε εξ αρχής είχε περιοριστεί αρκετά.



Εικόνα 12 : Παράδειγμα ελέγχου ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς. Το στέλεχος pJ6-4A μετασχηματίστηκε με τα αναγραφόμενα πλασμίδια και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό SC κάτω από τις συνθήκες που αναφέρονται.

Στο σημείο αυτό είναι ανάγκη να ειπωθεί ότι οι αρχικές κλωνοποιήσεις του cDNA του HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9 έγιναν από την Π. Μηνά. Οι υποκλωνοποιήσεις για την κατασκευή των πλασμιδίων-δολωμάτων 2, 3 και 4 (βλ. Σχήμα. 3), καθώς και ο έλεγχος ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς στο σακχαρομύκητα για καθεμία από αυτές τις κατασκευές, πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον ερευνητή Εμμ. Βενιέρη. Επιπλέον κατασκευάστηκαν από τον Γ. Γκαντάρα και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGHStyI, pGHSalI, pGHE300 (βλ. Σχήμα 3, πλασμιδιακές κατασκευές 5, 6 και 7) και έγινε και για αυτές έλεγχος ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς (βλ. Εικ. 12) με σκοπό να μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε για πλασμίδιο-δόλωμα όσον το δυνατόν μια μεγαλύτερη περιοχή του cDNA του HIF-1α .

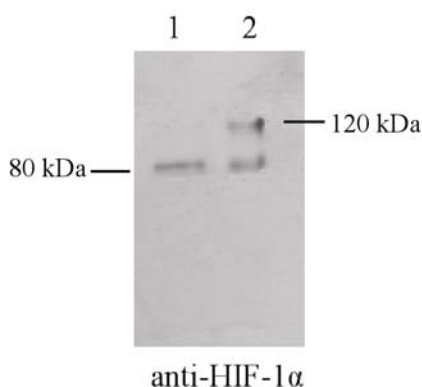
Μετά από τις διαδοχικές αυτές κλωνοποιήσεις, και τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν τα πλασμίδια pGHS και pGHE300 στα πειράματα που ακολουθούν. Πραγματοποιήθηκαν δύο παράλληλες σαρώσεις της cDNA βιβλιοθήκης με το σύστημα των δύο υβριδίων με καθεμία πλασμιδιακή κατασκευή ως πλασμίδιο-δόλωμα κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Ο λόγος που επιλέχθηκε να γίνουν δύο ξεχωριστές πειραματικές διαδικασίες με δύο διαφορετικά πλασμίδια-δολώματα είναι γιατί μόνο με αυτόν τον τρόπο η πλασμιδιακή κατασκευή pVGHS (βλ. Σχήμα 3, πλασμιδιακή κατασκευή 2) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί χωρίς να ενεργοποιεί τα

γονίδια αναφοράς. Επίσης αποφεύχθηκε να χρησιμοποιηθεί μόνο ένα πολύ μικρό τμήμα του cDNA του HIF-1α στο σύστημα των δύο υβριδίων (π.χ. μόνο το πλασμίδιο pGHS) γεγονός που θα περιόριζε εξ αρχής των αριθμό αλληλεπιδράσεων που θα μπορούσαν να ανιχνευθούν.

4.A.1.2. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων του HIF-1α σε κύτταρα σακχαρομύκητα.

Για τις πλασμιδιακές κατασκευές που περιγράφονται στο Σχήμα έγινε έλεγχος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους με την μέθοδο Sanger. Επιπλέον, ελέγχθηκε αν τα τμήματα του HIF-1α που κωδικοποιούνται εκφράζονται στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, πριν χρησιμοποιηθούν στο σύστημα των δύο υβριδίων.

Κύτταρα *S. cerevisiae* μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pVGHF και pGHF. Έγινε λύση των κυττάρων κάτω από ειδικές συνθήκες και ακολούθησε ανάλυση κατά Western του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος με αντι-HIF-1α αντίσωμα.



Εικόνα 13 : Κύτταρα *S. cerevisiae* επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pGHF και pVGHF. Στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων έγινε ανάλυση κατά Western με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-HIF-1α.

Από την Εικ. 13 φαίνεται ότι οι χιμαιρικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια pGHF (διαδρομή 1) και pVGHF (διαδρομή 2), εκφράζονται στα κύτταρα σακχαρομύκητα και στο αναμενόμενο για κάθε πρωτεΐνη μέγεθος.

Δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν και αναγράφονται στο Σχήμα 3 για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, στα κύτταρα του σακχαρομύκητα· διότι το μονοκλωνικό αντίσωμα του HIF-1α αναγνωρίζει την περιοχή των αμινοξέων 610-727 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Επομένως, δεν μπορούσε να διερευνηθεί αν τα τμήματα του HIF-1α που κωδικοποιούνται από τα πλασμίδια pGHS και pGHE300 εκφράζονται σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Το γεγονός όμως ότι πρόκειται για ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έχουν προκύψει από υποκλωνοποιήσεις ενός αρχικού πλασμιδίου (pVGHF) και ότι επιβεβαιώθηκε η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία καθιστά ασφαλή την χρήση τους στο σύστημα των δύο υβριδίων.

4.A.1.3. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGHS και pGHE300.

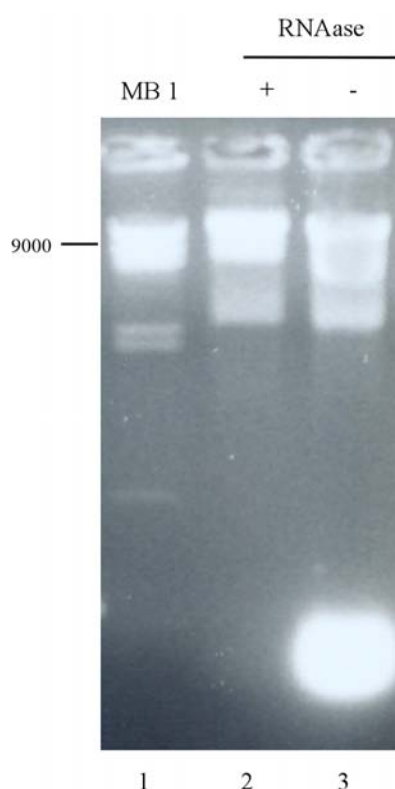
Έγιναν δύο παράλληλοι μετασχηματισμοί του στελέχους PJ69-4A (P. James, J. Halladay 1996) με 1 μg από το πλασμίδιο δόλωμα pGHS και με την ίδια ποσότητα από το πλασμίδιο pGHE300. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό επιλογής SC χωρίς τρυπτοφάνη (SC -Trp) και επιβεβαιώθηκε ξανά ότι τα μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια στελέχη δεν ενεργοποιούν τα γονίδια αναφοράς. Τα πλασμίδια-δολώματα ήταν έτοιμα για την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων. Έπρεπε να γίνει κατεργασία των πλασμιδίων-λειών.

4.A.1.4. Παρασκευή και ενίσχυση της βιβλιοθήκης

cDNA βιβλιοθήκη αποκαλείται ένα ετερογενές σύνολο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που το καθένα φέρει ένα διαφορετικό ένθεμα cDNA και το σύνολό τους αντιπροσωπεύει τα mRNA που εκφράζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε [127] έχει παρασκευαστεί με εισαγωγή $2,5 \times 10^6$ διαφορετικών cDNA (πολυπλοκότητα βιβλιοθήκης), 350 έως 700 νουκλεοτιδίων, στη

θέση *NotI* του φορέα pVP16 και προέρχεται από αγέννητο έμβρυο ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών.

Δεδομένου ότι σε υγρή καλλιέργεια υπάρχει κίνδυνος κάποια από τα βακτήρια της βιβλιοθήκης να υπέρ- ή υπό- πολλαπλασιαστούν με αποτέλεσμα τελικά να μην υπάρχει σωστή αντιπροσώπευση των διαφορετικών cDNA της βιβλιοθήκης, προτιμήσαμε την καλλιέργεια σε τρυβλία, όπου εκεί κάθε κύτταρο σχηματίζει μια αποικία και δεν ανταγωνίζεται με τα άλλα. Η παρασκευή του πλασμιδιακού DNA της βιβλιοθήκης από τα κύτταρα *E. coli*, έγινε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

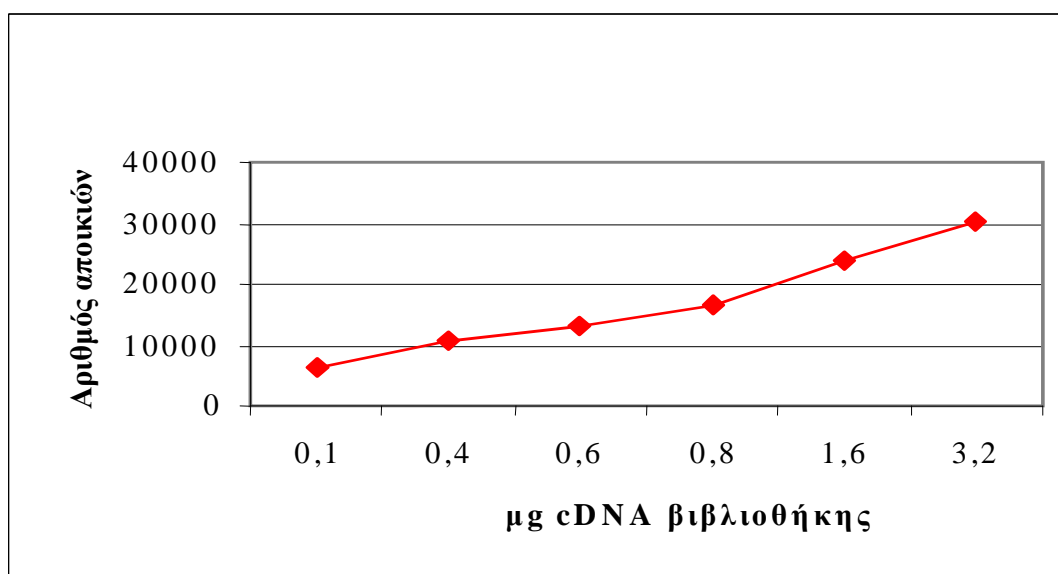
Διαδρομή 1: 3μl μάρτυρας μοριακών βαρών MB 1. Διαδρομές 2 και 3: 5μl του πλασμιδιακού DNA της βιβλιοθήκης που παρασκευάστηκε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης, με και χωρίς RNAase αντίστοιχα.

Από την Εικ. 14 φαίνεται ότι παρασκευάστηκε ικανοποιητική ποσότητα cDNA βιβλιοθήκης και καθαρίστηκε από προσμίξεις με RNA συγκρίνοντας τις διαδρομές 2 και 3 με και χωρίς RNAase αντίστοιχα (πληροφορίες για τους DNA μάρτυρες μοριακών βαρών βλ. Μέθοδοι σελ.). Χρησιμοποιήθηκε η παρασκευή με

αλκαλική λύση στην οποία είχε γίνει κατεργασία με RNAase για την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων.

4.A.1.5. Τιτλοδότηση βιβλιοθήκης

Έγινε έλεγχος της αποδοτικότητας του μετασχηματισμού του στελέχους *S. cerevisiae* PJ69-4A που ήδη περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα pGHS, με την βιβλιοθήκη και η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για την περίπτωση του μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο pGHE300 στελέχους. Ο έλεγχος αυτός γίνεται για να καθοριστεί ποια είναι η ελάχιστη ποσότητα DNA βιβλιοθήκης που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ώστε να είμαστε σίγουροι ότι έχουμε συμπεριλάβει στο πείραμά μας και τα $2,5 \times 10^6$ διαφορετικά cDNA που περιέχονται στην βιβλιοθήκη.



μgDNA \ Κλίμακα	0,1	0,4	0,6	0,8	1,6	3,2
1x	6.400	10.720	13.360	16.800	24.000	30.000
60x	384.000	643.200	801.600	1.008.000	1.440.000	1.800.000

Σχήμα 4. Αριθμός αποικιών του ήδη μετασχηματισμένου με το πλασμίδιο pGHS στελέχους *S. cerevisiae* PJ69-4A, με την βιβλιοθήκη.

Στην πρώτη γραμμή του πίνακα αναγράφονται οι διαδοχικές ποσότητες DNA βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήθηκαν και που αποτελούνται από μίγμα cDNA των βιβλιοθηκών ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών σε αναλογία 1:1. Στη δεύτερη γραμμή αναγράφεται ο αριθμός αποικιών από την κάθε αντίδραση (1x), οι οποίες απεικονίζονται στο Σχήμα 4 και διαγραμματικά. Στην τρίτη γραμμή αναγράφεται ο αριθμός αποικιών που προβλέπεται εάν η κάθε αντίδραση (1x) γίνει σε πολλαπλάσια κλίμακα (60x). Με βάση τον παρακάτω τύπο, υπολογίστηκε ο αριθμός των αποικιών που προκύπτει από τον μετασχηματισμό της βιβλιοθήκης προκειμένου η πιθανότητα να αντιπροσωπευθούν όλοι οι κλώνοι της βιβλιοθήκης, η οποία έχει πολυπλοκότητα $n = 2,5 \times 10^6$, να έχει τιμή $P = 0,99$.

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)}$$

Ο αριθμός αυτός είναι $N=11.512.926$. Χρειάζεται δηλαδή να διερευνηθούν $11,5 \times 10^6$ αποικίες για να είναι σίγουρο πως έχει αντιπροσωπευθεί το σύνολο της cDNA βιβλιοθήκης. Τελικά χρησιμοποιήθηκε ποσότητα cDNA βιβλιοθήκης 0,8 μg και έγιναν δέκα αντιδράσεις της κλίμακας (60x) στην αντίδραση μετασχηματισμού με την βιβλιοθήκη.

4.A.1.6. Μετασχηματισμός του *S. cerevisiae* PJ69-4A που περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα με την βιβλιοθήκη και επιλογή ανθεκτικών κλώνων σε μέσο επιλογής.

Το μετασχηματισμένο στέλεχος με το πλασμίδιο-δόλωμα pGHS ή pGHE300 μετασχηματίστηκε επιπλέον με τη βιβλιοθήκη. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Two Hybrid System Trafo Protocol, όπου έγιναν δέκα αντιδράσεις σε κλίμακα (60x) για κάθε ένα από τα πλασμίδια-δολώματα. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε 5 τρυβλία

επιλογής (SC -Trp, -Leu, -His, -Ade, +5 mM AT) για κάθε αντίδραση. Αναμένεται σε αυτά τα τρυβλία, να μεγαλώσουν μόνο τα κύτταρα στα οποία το γονίδιο HIS3 έχει ενεργοποιηθεί (και άρα τα κύτταρα επιβιώνουν παρουσία AT) υποδηλώνοντας ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των χιμαιρικών πρωτεϊνών δολώματος και λείας. Συγχρόνως, απλώθηκαν υποσύνολα της βιβλιοθήκης σε τρυβλία χωρίς επιλογή (SC -Trp, -Leu) για να εκτιμηθεί η απόδοση του μετασχηματισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύνολο των μετασχηματισμένων κυττάρων είναι περίπου 12×10^6 , για καθεμία αντίδραση μετασχηματισμού με διαφορετικό πλασμίδιο-δόλωμα, αριθμός που καλύπτει των απαιτούμενο αριθμό κυττάρων για την πλήρη αντιπροσώπευση της βιβλιοθήκης.

Μετά από 4, 10 και 20 ημέρες έγινε μεταφορά των αποικιών των μετασχηματισμένων στελεχών που επιβιώνουν στο μέσο επιλογής, σε καινούργια τρυβλία επιλογής (SC -Trp, -Leu, -His, -Ade, +5 mM AT), ώστε μετά από τρεις ημέρες επώασης στους 30°C , να εφαρμοστεί η μέθοδος του «πιστού αποτυπώματος» (replica plating),

- για να επιβεβαιωθεί ότι στα μετασχηματισμένα στελέχη τα γονίδια αναφοράς είναι ενεργοποιημένα και
- για να ανιχνευθεί πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης-δόλωμα και της πρωτεΐνης-λείας και να ιεραρχηθούν οι αποικίες ανάλογα με τον βαθμό ισχύος της αλληλεπίδρασης με τη χρήση AT.

Η κατάταξη έγινε με τρυβλία με αυξανόμενες ποσότητες AT και στηρίζεται στο μέγεθος της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς HIS3.

Για τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pGHS κύτταρα σακχαρομύκητα οι κλώνοι που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων κατατάχθηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.

SC -Trp,-Leu, -His, -Ade αρ. αποικ	+ 5 mM AT	+ 10 mM AT	+ 50 mM AT
100	60	23	17
130	90	32	8
50	30	15	5

Σύνολο	180	70	30
---------------	-----	----	----

Πίνακας 5. Κατάταξη των αποικιών, που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων σε κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο-δόλωμα pGHS και με την βιβλιοθήκη, με βάση την ικανότητα επιβίωσης στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις AT.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση των μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pGHE300 κυττάρων σακχαρομύκητα με την βιβλιοθήκη. Οι κλώνοι που προέκυψαν κατατάχθηκαν όπως φαίνεται στον Πίνακα 6 με βάση την ανθεκτικότητα στο AT.

SC -Trp,-Leu, -His, -Ade αρ. αποικ	+ 5 mM AT	+ 10 mM AT	+ 50 mM AT
50	30	15	5
10	4	4	2
Σύνολο	34	19	7

Πίνακας 6. Κατάταξη των αποικιών, που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων σε κύτταρα σακχαρομύκητα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο-δόλωμα pGHE300 και με την βιβλιοθήκη, με βάση την ικανότητα επιβίωσης στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις AT.

Στο σημείο αυτό και τα δύο διαφορετικά πλασμίδια-δολώματα έχουν εισαχθεί στα κύτταρα του σακχαρομύκητα, και τα κύτταρα έχουν μετασχηματισθεί επιπλέον με την βιβλιοθήκη. Οι αποικίες που προέκυψαν για κάθε πλασμίδιο-δόλωμα κατατάχθηκαν με βάση την έκφραση των γονιδίων αναφοράς. Η ανάλυση και ταυτοποίηση των κλώνων άρχισε με τους κλώνους που μεγάλωναν κανονικά στα 50 mM AT και έδιναν και έντονο μπλε χρώμα σε θρεπτικό υλικό που περιείχε Xgal. Πρόκειται για 30 συνολικά κλώνους που προέρχονται από την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων για το pGHS και 7 για το pGHE300. Οι υπόλοιποι κλώνοι που προέκυψαν και για τις δύο διαφορετικές αντιδράσεις μετασχηματισμού των κυττάρων σακχαρομύκητα (συνολικά 303) φυλάχθηκαν στους -80°C στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό με προσθήκη γλυκερόλης.

Στα πλαίσια της παρούσης διδακτορικής διατριβής ξεκίνησε η μελέτη των αλληλεπιδράσεων με το πλασμίδιο-δόλωμα pGHS. Η διερεύνηση των πρωτεϊνών-λειών που προέκυψαν ότι αλληλεπιδρούν με το τμήμα του cDNA του HIF-1α που κωδικοποιεί το πλασμίδιο pGHE300 είναι αποτέλεσμα διπλωματικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια στο Εργαστήριο Βιοχημείας από τον Π. Καββαδά (Μοριακή απόκριση στην υποξία: Εύρεση καινούργιων μοριακών αλληλεπιδράσεων του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α), Καββαδάς Παναγιώτης, Λάρισα 2005, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.) [147]. Από την ανάλυση των πλασμιδιακών DNA αυτών των πλασμιδίων-λειών αποδείχθηκε ότι δύο δείγματα παρουσιάζουν πολύ υψηλή ομολογία με δύο πρωτεΐνες του ποντικού, την πρωτεΐνη DnaJB3 ή heat shock protein J3 ή MSJ-1 και την πρωτεΐνη DnaJB6 ή heat shock protein J2 ή Mrj. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι μοριακοί συνοδοί και ανήκουν και οι δύο στην οικογένεια Hsp40 (ή DnaJ1α). Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλα μέλη της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP), είναι γνωστή ήδη από την πρωτεΐνη Hsp90. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις Hsp40 δεν έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Περισσότερα για τα δύο μέλη της οικογένειας Hsp40 που ανιχνεύθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α αναλύονται στην προαναφερθείσα διπλωματική εργασία.

4.A.2. Διάσωση των πλασμιδίων-λειών από το μετασχηματισμένο στέλεχος του σακχαρομύκητα σε κύτταρα *E. coli*.

Στα κύτταρα του σακχαρομύκητα υπάρχουν δύο πλασμίδια, το πλασμίδιο-δόλωμα και το πλασμίδιο-λεία. Επειδή δεν μπορεί να παραχθεί μεγάλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA από κύτταρα σακχαρομύκητα, τα πλασμίδια πρέπει να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν για να μετασχηματίσουν βακτηριακά κύτταρα έτσι ώστε να παραχθούν στη συνέχεια οι απαραίτητες ποσότητες από τα βακτήρια.

4.A.2.1. Παρασκευή του πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *S. cerevisiae*.

Από δέκα κλώνους που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων με πλασμίδιο-δόλωμα το pGHS και μεγάλωναν κανονικά στα 50 mM AT επωάστηκαν υγρές καλλιέργειες σε SC -Leu στους 30⁰C, όλη νύχτα. Οι κλώνοι αυτοί επιλέχθηκαν τυχαία από τους 30 που επιβίωναν στα 50 mM AT και ταυτόχρονα έδιναν μπλε χρώμα σε τρυβλία με το υπόστρωμα Xgal. Επιδιώχθηκε να μελετηθούν πρώτα αυτές οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μιας και βάση του φαινοτύπου θα ήταν και οι πιο ισχυρές. Στο υγρό μέσο προστέθηκε τρυπτοφάνη με σκοπό να βοηθηθούν τα κύτταρα του σακχαρομύκητα κατά τους διπλασιασμούς να χάσουν το πλασμίδιο-δόλωμα (το οποίο τείνει να “χαθεί” από το κύτταρο εφόσον δεν είναι απαραίτητη η έκφραση του γονιδίου επιλογής του TRP1).

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο Rescue για να διασώσουμε το πλασμιδιακό DNA από τα κύτταρα σακχαρομύκητα σε βακτηριακά κύτταρα.

4.A.2.2. Μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* KC8 και επιλογή του πλασμιδίου-λεία.

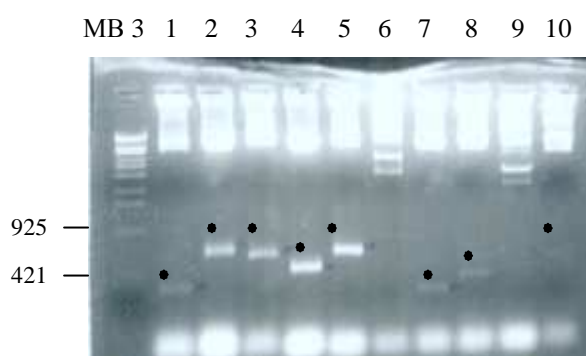
Δεκτικά κύτταρα *E. coli* KC8 (-Leu, -Ura, -His, -Trp,) μετασχηματίστηκαν με το εκχύλισμα από κάθε έναν από τους δέκα επιλεγμένους κλώνους σακχαρομύκητα. Η επώαση έγινε σε τρυβλία LB που περιείχαν αντιβιοτικό.

Οι μετασχηματισμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με επιλογή για το αμινοξύ στο οποίο τα κύτταρα αποκτούν πρωτοτροφία όταν μετασχηματισθούν με το πλασμίδιο-λεία. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο-λεία αποκτούν πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη και άρα αναπτύσσονται σε μέσο που δεν περιέχει λευκίνη.

4.A.2.3. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας και ανάλυση του πλασμιδιακού DNA με πέψη με *NotI*.

Μετά από την απομόνωση βακτηριακών στελεχών στα οποία έχει διασωθεί το πλασμίδιο-λεία καθενός από τους επιλεγμένους κλώνους σακχαρομύκητα, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης για την παραγωγή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας.

Τα πλασμιδιακά DNA επώστηκαν με το ένζυμο *NotI*. Όπως προαναφέρθηκε τα διαφορετικά cDNA της βιβλιοθήκης, μήκους 350-700 νουκλεοτιδίων, έχουν εισαχθεί στην θέση *NotI* του πλασμιδιακού φορέα pVP16.



Εικόνα 15 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. MB 3: 3μl του μάρτυρα μοριακών βαρών MB 3. Διαδρομές 1 έως 10: 5μl αντίδραση πέψης του αντίστοιχου πλασμιδιακού DNA με *NotI*

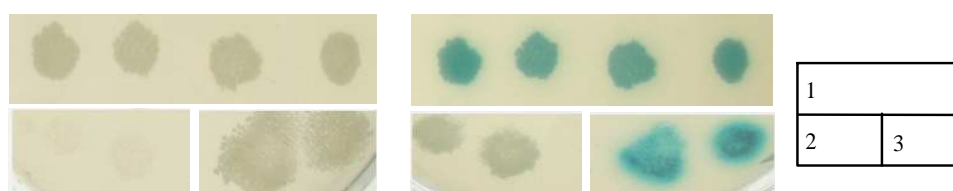
Στην Εικ. 15 όλα τα δείγματα εκτός από τα 6 και 9 περιέχουν ένθεμα στην θέση *NotI*.

Μετά την ανάλυση των πλασμιδίων-λειών με την ενδονουκλεάση *NotI* για την ανίχνευση της ύπαρξης ενθέματος, είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση της εξάρτησης του φαινοτύπου από το πλασμίδιο-λεία και από τη συνύπαρξή του με το πλασμίδιο-δόλωμα. Συγκεκριμένα γίνεται μετασχηματισμός του αρχικού κυττάρου σακχαρομύκητα που φέρει το πλασμίδιο-δόλωμα με το πλασμίδιο-λεία για το οποίο έγινε ο έλεγχος της ύπαρξης ενθέματος, έτσι ώστε να είναι σίγουρο πως ο φαινότυπος

που προκύπτει οφείλεται αποκλειστικά στο απομονωμένο πλασμίδιο-λεία. Η επιβεβαίωση αυτή έγινε χρησιμοποιώντας πάλι τα ίδια γονίδια αναφοράς που υπάρχουν στο κύτταρο του σακχαρομύκητα και κυρίως τα HIS3 και LacZ.

4.A.3. Επιβεβαίωση του φαινοτύπου με επαναμετασχηματισμό κάθε πλασμιδίου-λείας στο αρχικό στέλεχος του σακχαρομύκητα που περιέχει το πλασμίδιο-δόλωμα.

Τα κύτταρα του στελέχους PJ69-4A του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* που είχαν μετασχηματισθεί με το πλασμίδιο pGHS, μετασχηματίστηκαν επιπλέον με καθένα από τα πλασμίδια-λεία στα οποία επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχει ένθεμα στις θέσεις που αναγνωρίζει η *NotI*. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά επιστρώθηκαν σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (SC -Leu, -Trp, -His, -Ade, +5 mM AT) και ακολούθησε η εφαρμογή του «πιστού αποτυπώματος» (replica plating) για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου. Ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου HIS3 χρησιμοποιώντας αυξανόμενες ποσότητες AT και του γονιδίου LacZ σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιείχε Xgal (SC -Leu, -Trp, -His, -Ade, +X-gal). Στην Εικ. 16, απεικονίζεται το παράδειγμα ελέγχου του φαινοτύπου για τα γονίδια HIS3 και LacZ ενός κλώνου ανθεκτικού στα 50 mM AT.



Εικόνα 16 : Τρυβλία SC -Trp, -Leu, -His, -Ade, + 50 Mm AT (αριστερά) και SC -Trp, -Leu, -His, -Ade, + X-gal (δεξιά) που έχουν προκύψει από την εφαρμογή της μεθόδου του «πιστού αποτυπώματος» (replica plating). Το στέλεχος *S. cerevisiae* PJ69-4A μετασχηματίστηκε με τα πλασμίδια, όπως απεικονίζεται στο υπόμνημα δεξιά: 1. pGHS και pVP16-λεία (τέσσερις διαφορετικές

αποικίες), 2: pGBT9 και pVP16 (δύο διαφορετικές αποικίες, αρνητικός μάρτυρας), 3: pGBT9-SRPK1aNt και pVP16-SAF-B (δύο διαφορετικές αποικίες, θετικός μάρτυρας) [128].

Ο έλεγχος του φαινοτύπου ήταν θετικός, δηλαδή ενεργοποιήθηκαν τα γονίδια αναφοράς στο σακχαρομύκητα, μόνο για τις τέσσερις από τις οκτώ περιπτώσεις που εξετάστηκαν (βλ. Εικ. 15 διαδρομές 2, 3, 4 και 5). Στη συνέχεια το πλασμίδιο pVP16 που περιέχει ένθεμα περίπου 700 bp στην διαδρομή 2 θα ονομάζεται pVPR2, το δείγμα στην διαδρομή 3 που δίνει θραύσμα περίπου 650 bp θα ονομάζεται pVPR3, το δείγμα στην διαδρομή 4 που δίνει θραύσμα περίπου 500 bp, pVPR4 και τέλος το δείγμα της διαδρομής 5 που δίνει θραύσμα περίπου 700 bp, pVPR5. Για τα συγκεκριμένα πλασμίδια-λείες ελέγχθηκε με μετασχηματισμό στο αρχικό στέλεχος σακχαρομύκητα ότι δεν αναπαράγουν το φαινότυπο.

4.A.4. Εύρεση της αλληλουχίας των ενθεμάτων που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη-λεία.

Για τα τέσσερα πλασμίδια που επιλέχθηκαν έγινε εξακρίβωση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των ενθεμάτων τους με τη μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων του Sanger, στο Εργαστήριο Μικροβιοχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ερευνητικού Κέντρου στην Κρήτη (IMBB). Τα αποτελέσματα της εύρεσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δίνονται παρακάτω, καθώς και η ταυτόχρονη μετάφραση αυτής της αλληλουχίας στο αναγνωστικό πλαίσιο που βρίσκεται σε συνέχεια με το αναγνωστικό πλαίσιο της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής του VP16. Με έντονα γράμματα φαίνεται η περιοχή βάσεων που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση περιορισμού *NotI*. Μετά από αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων δίνεται η στοίχιση της κάθε αλληλουχίας με την αλληλουχία που έδωσε το υψηλότερο ποσοστό ταυτότητας.

pVPR2:

```
gcggccgc tatggggtcgagagagctatgcgtttgatggttctcagcctccagaggaattc
R P L W G R E S Y A F D G S Q P P E E F
ggtttcagcttcagccccaggggagggatgcgattccacggcaactttggctttgatgat
G F S F S P R G G M R F H G N F G F D D
ctagtacgagattttaatagcatcttcagcgagatgggggcctggaccttgccttccac
L V R D F N S I F S E M G A W T L P S H
tctcctgaacttccagggtcctgagtcagaaacacctggtagagagactgcgggaggggag
S P E L P G P E S E T P G E R L R E G Q
acactacgagactcaatgcttaagtacccagatagtcaccaacccaggatctttgagggg
T L R D S M L K Y P D S H Q P R I F E G
gtcttgagagatcatgccaaacctgaatcccccaaaccagctccagattgggggtcgcag
V L E S H A K P E S P K P A P D W G S Q
ggaccttttcataggttgatgatacatggcctgtgagtccttctagagccaaagag
G P F H R L D D T W P V S P H S R A K E
gacaaagatcttgactcccagggttcccaggaaggtctgggtccacttctcaacccag
D K D L D S Q V S Q E G L G P L L Q P Q
cccaaatacggcggccgc
P K S A A
```

Η αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε βάσεις δεδομένων έδωσε ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας του ενθέματος pVPR2 με την πρωτεΐνη του ποντικού HAX-1.

```
sp 035387 HS1-associating protein X-1 (HAX-1) (HS1-binding 280
HAX1_MOUSE protein) [Hax1] AA
[Mus musculus (Mouse)] align

Score = 346 bits (887), Expect = 2e-94
Identities = 161/163 (98%), Positives = 161/163 (98%)

Query: 1 RPLWGRESYAFDGSQPPEEFGFSFSPRGGMRFHGNFGFDDLVRDFNSIFSEMGAWTLPSH 60
R WGRESYAFDGSQPPEEFGFSFSPRGGMRFHGNFGFDDLVRDFNSIFSEMGAWTLPSH
Sbjct: 45 RGAWGRESYAFDGSQPPEEFGFSFSPRGGMRFHGNFGFDDLVRDFNSIFSEMGAWTLPSH 104

Query: 61 SPELPGPESETPGERLREGQTLRDSMLKYPDSHQPRIFEGVLESHAKPESPKPAPDWGSQ 120
SPELPGPESETPGERLREGQTLRDSMLKYPDSHQPRIFEGVLESHAKPESPKPAPDWGSQ
Sbjct: 105 SPELPGPESETPGERLREGQTLRDSMLKYPDSHQPRIFEGVLESHAKPESPKPAPDWGSQ 164

Query: 121 GPFHRLDDTWPVSPHSRAKEDKDLDQSQSQEGLGPLLQPQPKS 163
GPFHRLDDTWPVSPHSRAKEDKDLDQSQSQEGLGPLLQPQPKS
Sbjct: 165 GPFHRLDDTWPVSPHSRAKEDKDLDQSQSQEGLGPLLQPQPKS 207
```

Η HAX-1 είναι μια μικρή πρωτεΐνη 280 αμινοξέων. Στην αλληλουχία της που παρατίθεται παρακάτω φαίνεται με κόκκινο χρώμα η αλληλουχία που περιλαμβάνεται στον pVPR2.

MSVFDLFRGFFGFPGPRSHRDPFFGGMTRDDDDDDDDDEAEEDRGAWGRESYAFDGSQPPEEFGFSFS
 PRGGMRFHGNGFDDLVDFNSIFSEMGAWTLPSHSPPELPGPESETPGERLREGQTLRDSMLKYPDSHQ
 PRIFEGVLESHAKPESPKPAPDWGSQGFHRLDDTWPVSPHSRAKEDKDLDQSQVSQEGLGPLLQPQPKS
 YFKSISVTKITKPDGTVEERRTVVDSEGRRETTVTHQEAHDSRSSDPDSQRSSALDDPFISILDLLLGRW
 FRSR

pVPR3:

gcggccgctagaacgcctgggctccttcggcagcatcaccgcgcagcaggaaggtgagggc
 R P L E R L G S F G S I T R Q Q E G E A
 agctctcaggacatgacagcccaggtgacaagtcctgctggcaagacagaagccgcagag
 S S Q D M T A Q V T S P S G K T E A A E
 atcgttgagggagaagacagcgcatacagtggtgctgattcgtgccccaggagatgggtccc
 I V E G E D S A Y S V R F V P Q E M G P
 cacacagtcactgtcaagtacgcggccaacacgtgccccggaagcccttttcagttcact
 H T V T V K Y R G Q H V P G S P F Q F T
 gtgggtccgctaggtgaaggtgggtgcccacaaggtgctgagctggaggcacagggctggag
 V G P L G E G G A H K V R A G G T G L E
 cgaggtgtagctgggtgtgcccagctgagtttagcatctggacccgagaagctgggtgctggg
 R G V A G V P A E F S I W T R E A G A G
 ggattgtccatcgctgtggaaggtcccagcaaggcagagattgcatttgaggaccgcaaa
 G L S I A V E G P S K A E I A F E D R K
 gatggttccttggtggcgtctcctatggtgtccaggagccaggtgactacgaggtctccatc
 D G S C G V S Y V V Q E P G D Y E V S I
 aagttcaatgatgagcacatcccagac**gcggccgc**
 K F N D E H I P D A A

Η αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε βάσεις δεδομένων έδωσε ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας του ενθέματος pVPR3 με την πρωτεΐνη του ποντικού Filamin C.

sp [Q8VHX6](#) Filamin-C (Gamma-filamin) (Filamin-2) (FLN-C) 1144
 FLNC_MOUSE (Actin-binding-like protein) (ABP-L) (ABP-280-like protein) (Fragment) AA
 [Flnc] [Mus musculus (Mouse)] [align](#)

Score = 337 bits (864), Expect = 1e-91
 Identities = 166/167 (99%), Positives = 167/167 (100%)

Query: 4 ERLGSFGSITRQQEGEASSQDMTAQVTSPSGKTEAAEIVEGEDSAYSVRFPQEMGPHTV 63
 ERLGSFGSITRQQEGEASSQDMTAQVTSPSGKTEAAEIVEGEDSAYSVRFPQEMGPHTV
 Sbjct: 648 ERLGSFGSITRQQEGEASSQDMTAQVTSPSGKTEAAEIVEGEDSAYSVRFPQEMGPHTV 707

Query: 64 TVKYRGQHVPGPSFPQFTVGPLGEGGAHKVRAGGTGLERGVAGVPAEFSIWTREAGAGGLS 123
 TVKYRGQHVPGPSFPQFTVGPLGEGGAHKVRAGGTGLERGVAGVPAEFSIWTREAGAGGLS
 Sbjct: 708 TVKYRGQHVPGPSFPQFTVGPLGEGGAHKVRAGGTGLERGVAGVPAEFSIWTREAGAGGLS 767

Query: 124 IAVEGPSKAEIAFEDRKDGSCGVSYVVQEPGDYEVSIKFNDEHIPDA 170
 IAVEGPSKAEIAFEDRKDGSCGVSYVVQEPGDYEVSIKFNDEHIPD+
 Sbjct: 768 IAVEGPSKAEIAFEDRKDGSCGVSYVVQEPGDYEVSIKFNDEHIPDS 814

Η FLNC είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 2725 αμινοξέα. Στην αλληλουχία της που παρατίθεται παρακάτω φαίνεται με κόκκινο χρώμα η αλληλουχία που περιλαμβάνεται στον pVPR3.

EGKPKKANIRDNGDGYTVSYLPDMSGRYTITIKYGGDEIPYSPFFTRIHALPTGDASKCLVTVSIGGHGLGA
CLGPRIQIGEETVITVDAKAAGKGKVTCTVSTPFTDGAELDVDVVENHDGTFDIYYTAPEPGKYVITIRFGGE
HIPNSPFHVLACDPLPHVEEPFTAEMLQMRQPYAPLRPGTCPTHWATEEPVVPVEPLESMLRPFNLVIPFTVQ
KGELTGEVRFMTMPSGKTARPNIITDNKDGTITVRYAPTEKGLHQMGIKYDGNHIPGSPLQFYVDAINSRLHV
FTSAYGPGLSHGMVNKPFATFTIVTKDAGEGGLSLAVEGPSKAEITCKDNKDGTCTVSYLPFTTAPGDYSIIVR
FDDKHIPGSPFTAKITGDDSMRTSQLNVGTSTDVSLKITEGDLSQLTASFTIRAPSGNEEPCLLKRLPNRHIG
ISFTPKVEGHEHVSVRKSGKHVTNSPFKILVGPSEIGFTDASKVRVWGKGLSEGQTFQVAEFIVDTRNAGYGG
LGLSIEGPSKVDINCEMEDGTCKVFTTYCPTTEPGTYIINIKFADKHVPGSPFTVKVTGEGRMKESITRRRQA
PSIATIGSTCDLNF TLKIPGNWFQMVSAQERLRTFTTRSSHTYTRTERTEISKTRGGETKREVRVEESTQVGG
DFTPFPAVFGDFLGR**ERLGSFGSITRQGEGEASSQDMTAQVTSPSGKTEAAEIVEGEDSAYSFTVRFVPQEMG**
PHTVTVKYRGQHVPGPSFPQFTVGPLGEGGAHKVRAGGTGLERGVAGVPAEFTFSIW TREAGAGGLSIAVEGPS
KAETIAFEDRKDSCGVS YVQEPGDYEVSIKFND EHIPFTD SPFVVPVASLSD DARRLT VTSLQETGLKVNQP
ASFAVQLNGARGVIDARVHTPSGAVEFTECYVSELDSDKHTIRFIPHENGVSIDVKFNGAHIPGPSFKIRVG
EQSQAGDPGLVSAYFTGPGLEGGTTGVSSEFIVNTQNAGSGALSVTIDGPSKVQLDCRECPEGHVVYTPMAP
GNFTYLIAIKYGGPQHIVGSPFKAKVTGPRLSGGHSLHETSTVLVETVTKSSSSRGASYSSIPFTKFS SDASK
VVTRGPGLSQAFVGQKNSFTVDCSKAGTNMMMVGVHGP KTPCEEVYVKHMGFTNRVYNVTYTVKEKGDYILIV
KWGDESVPGSPFKVNVP

pVPR4:

gcgggcgcgcgagcctcgaagatggatactacaatgggtgaatttgtggactctgtttgagcag
G R E P R K M D T T M V N L W T L F E Q
cttgtgcgccggatggagattatcaatgaaggaaatgaaagcattgaattcatccaggtt
L V R R M E I I N E G N E S I E F I Q V
gtgaaggacttcgaggacttccgaaagaagtatcaaagaaccaaccaggagctggagaaa
V K D F E D F R K K Y Q R T N Q E L E K
ttcaaagacctattgttgaaagcagagactgggcggagcgccttgacgtgaagctgaag
F K D L L L K A E T G R S A L D V K L K
catgcccgtaatcaagtggacgtggagatcaagcggaggcagcgcgtgaggcagagtg
H A A R N Q V D V E I K R R Q R A E A E C
gcaaagctggaacaacagattcagctgattcgagacatactcatgtgtgacacatctggc
A K L E Q Q I Q L I R D I L M C D T S G
agtattcagctgagtgaggaacaaaaatcagctctcgctttcctcaaccgaggccaagca
S I Q L S E E Q K S A L A F L N R G Q A
tccagtgggcacgcccggcaacaatagactgtcaacgattgatgaatctgggtccatttta
S S G H A G N N R L S T I D E S G S I L
tc**gcgggcgcgc**
S A A

Η αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε βάσεις δεδομένων έδωσε ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας του ενθέματος pVPR4 με την πρωτεΐνη του ποντικού MgcRacGAP.

sp [Q9WVM1](#) Rac GTPase-activating protein 1 (MgcRacGAP) [Racgap1] 628
 RGAP1_MOUSE [Mus musculus AA
 (Mouse)] align

Score = 301 bits (770), Expect = 7e-81
 Identities = 155/155 (100%), Positives = 155/155 (100%)

Query: 7 MDTTMVNLWTLFEQLVRRMEIINEGNESIEFIQVVKDFEDFRKKYQRTNQELEKFKDLLL 66
 MDTTMVNLWTLFEQLVRRMEIINEGNESIEFIQVVKDFEDFRKKYQRTNQELEKFKDLLL
 Sbjct: 1 MDTTMVNLWTLFEQLVRRMEIINEGNESIEFIQVVKDFEDFRKKYQRTNQELEKFKDLLL 60

Query: 67 KAETGRSALDVKLKHARNQVDVEIKRRQRAEAECAKLEQQIQLIRDILMCDTSGSIQLSE 126
 KAETGRSALDVKLKHARNQVDVEIKRRQRAEAECAKLEQQIQLIRDILMCDTSGSIQLSE
 Sbjct: 61 KAETGRSALDVKLKHARNQVDVEIKRRQRAEAECAKLEQQIQLIRDILMCDTSGSIQLSE 120

Query: 127 EQKSALAFLNRGQASSGHAGNNRLSTIDESGSILS 161
 EQKSALAFLNRGQASSGHAGNNRLSTIDESGSILS
 Sbjct: 121 EQKSALAFLNRGQASSGHAGNNRLSTIDESGSILS 155

Η MgcRacGAP αποτελείται από 628 αμινοξέα. Στην αλληλουχία της που παρατίθεται παρακάτω φαίνεται με κόκκινο χρώμα η αλληλουχία που περιλαμβάνεται στον pVPR4.

MDTTMVNLWTLFEQLVRRMEIINEGNESIEFIQVVKDFEDFRKKYQRTNQELEKFKDLLLKAETGRSAL
 DVKLKHARNQVDVEIKRRQRAEAECAKLEQQIQLIRDILMCDTSGSIQLSEEQKSALAFLNRGQASSGH
 AGNNRLSTIDESGSILSDISFDKTDSESLDWDSSLVKNFKMKKREKRRSNSRQFIDGPPGPVKKTCSIG
 TVDQANESIVAKTTVTVPDGGPIEAVSTIETLPSWTRSRGKSGPLQPVNSDSALNSRPLEPRTDNDL
 GTPQNTGGMRLHDFVSKTVIKPESCVPCGKRIKFGKLSLKCRDCRLVSHPECRDRCPLPCIPPLVGT
 PVKIGEGMLADFVSQASPMIPAIIVVSCVNEIEQRGLTEAGLYRISGCDRTVKELKEKFLKVKTVPLLSK
 VDDIHVICSLKDFLRNLKEPLLTFWLSKAFMEAAEITDEDNSTAAMYQAVSELPQANRDTLAFMIHLQR
 VSQSPDTKMDIANLAKVFGPTIVAHTVPNPDPVTMFQDIKRQLKVVERLLSLPLEYWNQFMMVDQENID
 SQRNGNSTPRTPDVKVSLLGPVTTPEFQLVKTPLSSSLSQRLYNLSKSTPRFGNKSATNLGQQGKF
 FPA

pVPR5:

Η εξακρίβωση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων για αυτό το δείγμα δεν έδωσε αποτελέσματα.

Η μέθοδος των δύο υβριδίων μας αποκάλυψε τρεις νέες πιθανές μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α.

Η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλασμιδίου pVPR2 αποκάλυψε ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία cDNA κωδικοποιεί για την για την πρωτεΐνη HAX-1. Πρόκειται για μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη κυρίως πρωτεΐνη που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια αλλά και στο κυτταρόπλασμα στην οποία έχουν αποδοθεί πολλές διαφορετικές ιδιότητες. Η ονομασία της προέρχεται από την αλληλεπίδρασή της με την HS1 (HS1-Associated Protein X-1) πρωτεΐνη, ομόλογη της κορτακτίνης που εκφράζεται σε κύτταρα του αιμοποιητικού [129] και ήδη από τα αρχικά στάδια του χαρακτηρισμού της έχει συσχετισθεί με τον κυτταροσκελετό [130]. Πιο πρόσφατα έχει συσχετισθεί άμεσα με την κυτταρική κινητικότητα μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη μεμβρανική G πρωτεΐνη Gα13 με την οποία βρίσκεται σε σύμπλοκο που περιλαμβάνει επίσης τη μικρή G πρωτεΐνη της Rho οικογένειας, Rac1, και την κορτακτίνη. Η σιώπηση της έκφρασής της αναστέλλει την Gα13 εξαρτώμενη κυτταρική μετανάστευση [131]. Έχει επιπλέον βρεθεί να υπερεκφράζεται ειδικά σε υποξικούς όγκους [132] και πολύ πρόσφατα περιγράφηκε η συμμετοχή της ως αντι-αποπτωτικό μόριο σε καταστάσεις υποξίας-επανοξυγόνωσης [133]. Πρόκειται για μία μικρή σε μέγεθος πρωτεΐνη 360 αμινοξέων εκ των οποίων τα 161 περιέχονται στον κλώνο που απομονώθηκε.

Η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλασμιδίου pVPR3 αποκάλυψε ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία cDNA κωδικοποιεί για την για την πρωτεΐνη FLNC. Η FLNC ή αλλιώς Filamin 2 είναι συνδετική πρωτεΐνη των μορίων της ακτίνης μεταξύ τους. Πρόκειται για μια μεγαλομοριακή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία σχηματίζει διμερή, συγκρατεί τα μόρια της ακτίνης μεταξύ τους και συμβάλλει στην μετακίνηση του κυττάρου με σχηματισμούς γνωστούς ως λαμελλιπόδια. Απαντάται σε αφθονία στους μύες και ιδιαίτερα στους ραβδωτούς. Στο μόριο της ανθρώπινης πρωτεΐνης FLNC υπάρχουν 24 επαναλαμβανόμενα ομόλογα μοτίβα [134] και η περιοχή που βρέθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων αντιστοιχεί στο 21ο που βρίσκεται προς το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η περιοχή σύνδεσης με την ακτίνη είναι στο αμινοτελικό άκρο. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν τύποι καρκίνου που οφείλονται σε έλλειψη της φιλαμίνης, κάποιοι τύποι

μελανώματος, στους οποίους τα κύτταρα δεν μπορούν να μετακινηθούν κανονικά [135].

Η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλασμιδίου pVPR4 αποκάλυψε ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία cDNA κωδικοποιεί για την για την πρωτεΐνη MgcRacGAP. Το πλασμιδιο-λεία κωδικοποιεί για την περιοχή των αμινοξέων 1-138 της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της Myo περιοχής που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η MgcRacGAP είναι μια GAP (GTPase Activating Protein) για τις πρωτεΐνες Rho και πιο ειδικά για την Rac1. Συνδέεται με την GTP μορφή των Rho πρωτεϊνών και καταλύει την υδρόλυση του GTP [109]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η Rho πρωτεΐνη να μεταπίπτει γρηγορότερα στην GDP-συνδεδεμένη μορφή της κι άρα να απενεργοποιείται. Για την MgcRacGAP όμως, πέρα από την δράση της ως GAP της έχουν αποδοθεί κι άλλες ιδιότητες που έχουν να κάνουν με την κυτοκίνηση, την μίτωση ή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [119], Lee 2003 Exp Cell Res, [123].

Στα πειράματα που ακολουθούν, θα αναλυθεί περαιτέρω η σχέση του HIF-1α με την MgcRacGAP. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η MgcRacGAP σε σχέση με τις άλλες δύο πρωτεΐνες-λείες για τους εξής λόγους: Έχει πλειοτροπικές δράσεις όπως για παράδειγμα ότι εκτός από την συμμετοχή της στην διαμόρφωση κυτταροσκελετικών δομών εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, γεγονός που σημαίνει ότι μπορεί να έχει κοινά σημεία με τον HIF-1α. Επιπλέον, δεν πρόκειται για πολύ μεγάλη σε μέγεθος πρωτεΐνη όπως είναι η FLNC, ιδιότητα που την καθιστά πιο εύκολη στο χειρισμό. Όσον αφορά την HAX-1, όταν ξεκίνησαν τα πειράματα μελέτης των αλληλεπιδράσεων του HIF-1α, δεν ήταν ακόμη γνωστό ότι συνδέεται με την Galpha13 που επίσης σχετίζεται με κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση (η δράση της αυτή δημοσιεύτηκε το 2004), και ήδη είχαν γίνει οι πρώτες πειραματικές προσεγγίσεις της αλληλεπίδρασης HIF-1α/ MgcRacGAP.

Στη συνέχεια, το DNA της λείας, αλλά και η πρωτεΐνη που αυτό κωδικοποιεί, θα αναφέρονται με την ονομασία MgcRacGAP(1-138), ενώ το DNA του HIF-1α που

χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα στο σύστημα των δύο υβριδίων και η πρωτεΐνη που αυτό κωδικοποιεί με την ονομασία HIF-1α(244-532).

ΜΕΡΟΣ Β

4.B. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΜΕ ΤΗΝ MgcRacGAP

4.B.1 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την MgcRacGAP

Για να επιβεβαιωθεί η ειδική αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGAP διερευνήθηκε η δημιουργία συμπλόκου των δύο πρωτεϊνών α) *in vitro*, ώστε να επιβεβαιωθεί η άμεση επαφή μεταξύ τους β) *in vivo*, σε κύτταρα θηλαστικών ώστε να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα δημιουργίας του συμπλόκου σε ομόλογο κυτταρικό σύστημα.

4.B.1.1. Επιβεβαίωση *in vitro* της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την MgcRacGAP.

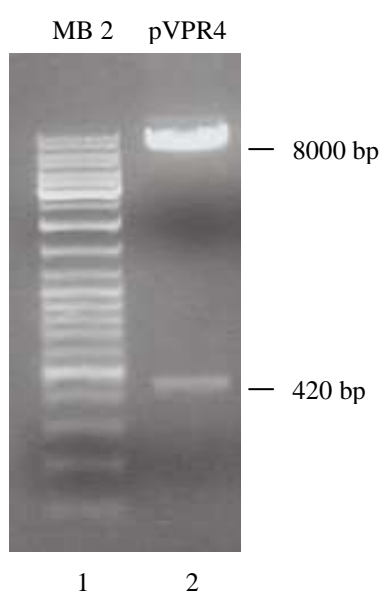
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η άμεση αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGAP έγιναν *in vitro* πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας με καθαρισμένες τις δύο πρωτεΐνες.

4.B.1.1.1. Κλωνοποίηση της MgcRacGAP(1-138) στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pGEX-4T1-Tev.

Η κλωνοποίηση της MgcRacGAP(1-138) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1-Tev που είναι φορέας έκφρασης πρωτεϊνών σε σύντηξη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, θα οδηγήσει στην παρασκευή της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-MgcRacGAP(1-138) σε βακτηριακά κύτταρα.

Η διαδικασία της κλωνοποίησης περιλαμβάνει δύο μέρη: 1. την απομόνωση του cDNA που κωδικοποιεί για την MgcRacGAP(1-138) από το pVPR4, και 2. την δημιουργία συνεκτικών άκρων στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1-Ten έτσι ώστε να εισαχθεί το cDNA που κωδικοποιεί για την MgcRacGAP(1-138).

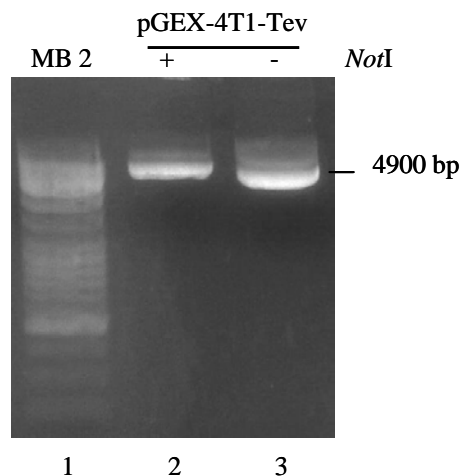
Όσον αφορά το πρώτο μέρος, εφόσον όλες οι «λείες» της cDNA βιβλιοθήκης έχουν κλωνοποιηθεί στη θέση *NotI* του πλασμιδίου pVP16 έπρεπε να ανακτηθεί μόνο το DNA που κωδικοποιεί για την MgcRacGAP(1-138). Για το λόγο αυτό, έγινε πέψη του πλασμιδίου pVPR4 με *NotI*, όπως φαίνεται στην Εικ. 17.



Εικόνα 17 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 2 μl του μάρτυρα μοριακών βαρών MB 2, Διαδρομή 2: 20 μl αντίδραση πέψης του pVPR4 με *NotI*.

Η ζώνη αгарόζης που περιέχει το θραύσμα 420 bp αποκόπηκε από την πηκτή και το DNA εκλούστηκε με το Gel Extraction Kit της Qiagen.

Για το δεύτερο μέρος της κλωνοποίησης ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1-Ten, επωάστηκε με το ένζυμο *NotI*. Από την Εικ. 18 βλέπουμε ότι έχει γίνει πλήρης πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο.



Εικόνα 18 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 2 μl του μάρτυρα μοριακών βαρών MB 2, Διαδρομή 2: 10 μl αντίδραση πέψης του pGEX-4T1-Tev με *NotI*, Διαδρομή 3: Άκοπο πλασμίδιο pGEX-4T1-Tev.

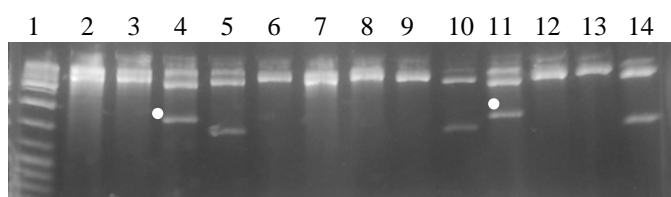
Ο κομμένος με το ένζυμο *NotI* πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T1-Tev έχει συνεκτικά άκρα και για το λόγο αυτό έγινε επεξεργασία με την αλκαλική φωσφατάση CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) που αφαιρεί τις 5' φωσφορικές ομάδες, προκειμένου αυτός να μην επανακυκλοποιηθεί παρουσία λιγάσης.

Στη συνέχεια έγινε η κατεργασία των επιθυμητών DNA που προέκυψαν κάτω από ειδικές συνθήκες προκειμένου να κατασκευαστεί το πλασμίδιο που θα κωδικοποιεί για την GST- MgcRacGAP(1-138). Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Για την κάθε αντίδραση επώαστηκαν 50 ng αποφωσφορυλιωμένου pGEX-4T1-Tev / *NotI* με 25 ng MgcRacGAP(1-138). Δεκτικά κύτταρα *E. coli* Top 10 μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της σύνδεσης και μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό μεγάλωσαν σε θρεπτικό υγρό LB με αμπικιλίνη στους 37°C με ανάδευση όλη νύχτα. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο TENS για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η εισαγωγή του DNA της MgcRacGAP(1-138) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1-Tev / *NotI* πρέπει να επιβεβαιωθεί με ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού και επιπλέον, το ένθεμα πρέπει να ελεγχθεί ότι έχει τον σωστό

προσανατολισμό έτσι ώστε να παράγει την MgcRacGAP (1-138) σε σύντηξη με την GST.

Κατάλληλο ένζυμο σε αυτήν την περίπτωση είναι η ενδονουκλεάση περιορισμού *PvuII*, επειδή έχει θέση αναγνώρισης στο νουκλεοτίδιο 360 του ενθέματος των 420 νουκλεοτιδίων, καθώς και στον φορέα pGEX-4T1-Tev 1637 bp πριν από την θέση ένθεσης *NotI*. Έτσι, εφόσον το ένθεμα έχει κλωνοποιηθεί στο σωστό προσανατολισμό θα απελευθερωθεί θραύσμα μεγέθους περίπου 2000 bp ενώ σε αντίθετη περίπτωση περίπου 1700 νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 19 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 2 μl μάρτυρα μοριακών βαρών MB 2, Διαδρομές 2-14: 10 μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με *PvuII*.

Η ανάλυση με *PvuII*, έδειξε ότι υπάρχει το σωστό θραύσμα στις διαδρομές 4 και 11, κι όπως αναμενόταν είναι στα 2000 bp (Εικ. 19)

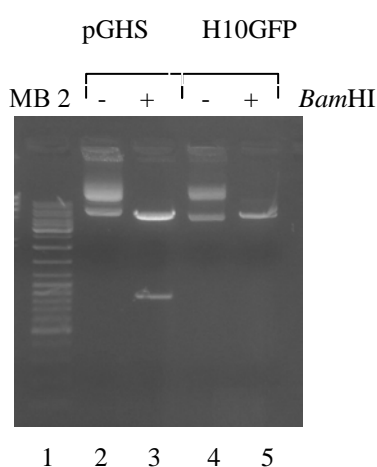
Με την παραπάνω διαδικασία κλωνοποιήθηκε το τμήμα του DNA που αλληλεπιδρά με τον HIF-1α όπως προέκυψε από το σύστημα των δύο υβριδίων σε κύτταρα σακχαρομύκητα, σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια. Το νέο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ονομάστηκε pGEX-MgcRacGAP(1-138) και κωδικοποιεί για το αμινοτελικό τμήμα της MgcRacGAP σε σύντηξη με την τρानσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Η χημική πρωτεΐνη που παράγεται θα αναφέρεται στα πειράματά μας ως GST- MgcRacGAP(1-138).

4.B.1.1.2. Κλωνοποίηση του HIF-1α(244-532) στον βακτηριακό φορέα έκφρασης H10GFP.

Η κλωνοποίηση του HIF-1α(244-532) στον πλασμιδιακό φορέα H10GFP που είναι φορέας έκφρασης της πρωτεΐνης GFP σε σύντηξη με δέκα ιστιδίνες στο

αμινοτελικό της άκρο, θα οδηγήσει στην παρασκευή της χιμαιρικής πρωτεΐνης HisGFP-HIF-1α(244-532).

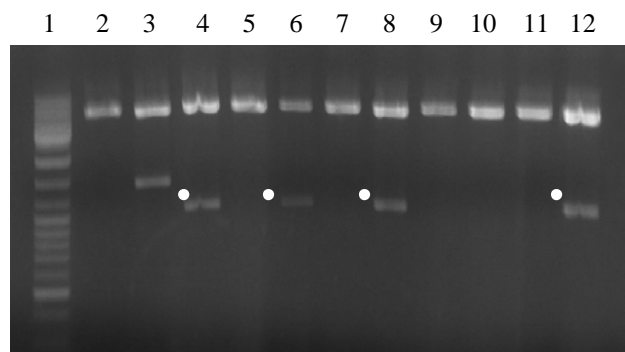
Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή της κλωνοποίησης της MgcRacGAP(1-138) στο πλασμίδιο pGEX-4T1-Tev. Από την πέψη του pGHS με το ένζυμο *Bam*HI προέκυψε το αναμενόμενο κομμάτι DNA στα 837 bp (Εικ. 20, διαδρομή 3). Ακολούθησε κατεργασία με πολυμεράση Klenow. Το ένζυμο Klenow αποτελεί τμήμα της *E.coli* DNA Polymerase I και σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε για να μετατρέψει σε δίκλωνα 5'προεξέχοντα άκρα. Το θραύσμα των 837 bp απομονώθηκε από πηκτή αгарόζης.



Εικόνα 20 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 2 µl μάρτυρας μοριακών βαρών MB 2, Διαδρομή 2: Άκοπο πλασμίδιο pGHS, Διαδρομή 3: 20 µl αντίδραση πέψης του pGHS με *Bam*HI, Διαδρομή 4: Άκοπο πλασμίδιο H10GFP, Διαδρομή 5: 10 µl αντίδραση πέψης του H10GFP με *Bam*HI.

Μετά την πέψη του H10GFP με *Bam*HI (βλ. Εικ. 20, διαδρομή 5), ακολούθησε αποφωσφορυλίωσή του λόγω των συνεκτικών άκρων που δημιουργήθηκαν.

Έγινε η αντίδραση σύνδεσης, ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων, η παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA και ανάλυση με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Eco*RI. Το σωστά ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιείχε το ένθεμα θα έδινε ένα θραύσμα DNA 1086 bp (Εικ.21,διαδρομές 4, 6, 8, 12), ενώ σε αντίθετη περίπτωση 1300 bp (Εικ.21,διαδρομή 3).



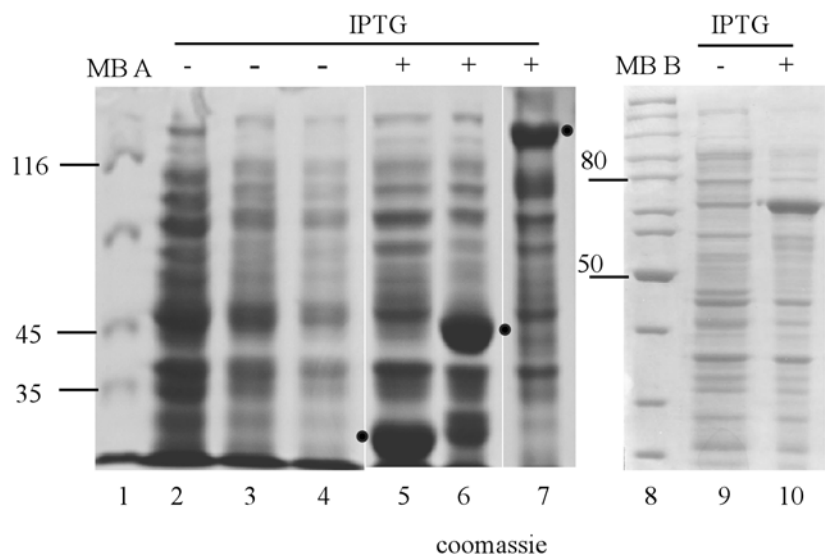
Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Διαδρομή 1: 2 µl μάρτυρας μοριακών βαρών MB 2, Διαδρομές 2-12: 10 µl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με *EcoRI*.

Με την παραπάνω διαδικασία κλωνοποιήθηκε το τμήμα του DNA του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα των δύο υβριδίων σε κύτταρα σακχαρομύκητα, στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε βακτήρια H10GFP. Η παραγόμενη πρωτεΐνη για την οποία κωδικοποιεί το νέο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ονομάστηκε HisGFP-HIF-1α(244-532) και αποτελείται από το συγκεκριμένο τμήμα του HIF-1α σε σύντηξη με την GFP και δέκα ιστιδίνες.

Σε μετέπειτα πειράματα της αλληλεπίδρασης *in vitro* των δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή H10GFP-HIF-1α που παράγει την πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη HIF-1α σε σύντηξη με την GFP και δέκα ιστιδίνες και είχε κλωνοποιηθεί από την Γ. Χαχάμη στα πλαίσια του διδακτορικού της στο Εργαστήριο Βιοχημείας.

4.B.1.1.3. Επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών, *GST-MgcRacGAP(1-138)*, *His-GFPHIF-1α(244-532)* και *His-GFPHIF-1α* σε βακτηριακά κύτταρα.

Μετά την κατασκευή των πλασμιδίων που έφεραν τα επιθυμητά cDNA και τον μετασχηματισμό τους σε κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL), έγινε επαγωγή των αντίστοιχων χιμαιρικών πρωτεϊνών με IPTG. Ακολούθησε λύση των κυττάρων, ειδική κατεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων και ηλεκτροφορήσή των διαλυτών κλασμάτων με SDS-PAGE. Στην Εικ. 22 φαίνεται η χρώση με Coomassie που ακολούθησε.



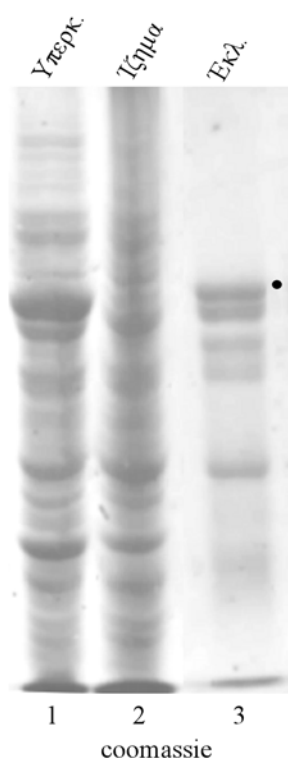
Εικόνα 22 : Κύτταρα *E.coli* που περιέχουν τα πλασμίδια pGEX-4T1-Tev (διαδρομές 2 και 5), pGEX-4T1-Tev-MgcRacGAP(1-138) (διαδρομές 3 και 6), H10GFP-HIF-1α (διαδρομές 4 και 7) και H10GFP-HIF-1α(244-532) (διαδρομές 9 και 10), επώαστηκαν απουσία (-, διαδρομές 2, 3, 4 και 9) ή παρουσία (+, διαδρομές 5, 6, 7 και 10) IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση Coomassie. Στις διαδρομές 1 και 8 απεικονίζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών.

Συγκρίνοντας τις διαδρομές 3 και 6 στην Εικ. 22 βλέπουμε ότι έχουμε επαγωγή της GST-MgcRacGAP(1-138) κι ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι στα 40 kDa, όπως αναμενόταν. Το ίδιο συμβαίνει και για την πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη HisGFP-HIF1α, όπου έχουμε επαγωγή της στα 120 kDa (διαδρομές 4 και 7) και τον HisGFP-HIF1α(244-532) στα 75 kDa (διαδρομές 9 και 10) αντίστοιχα.

4.B.1.1.4. Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης HisGFP-HIF-1α(244-532) από στήλη νικελίου.

Βακτηριακό εκχύλισμα κυττάρων που υπερεκφράζουν τον HisGFP-HIF-1α(244-532) φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου

(Ni-NTA) και εκλούστηκε μετά από τις απαραίτητες πλύσεις. Όπως φαίνεται στην Εικ. 23 η πρωτεΐνη ήταν διαλυτή σε ικανοποιητικά επίπεδα (διαδρομή 1) και ανακτήθηκε αρκετή ποσότητα μετά από την διαβίβαση του διαλυτού κλάσματος από τη στήλη νικελίου (Ni-NTA Sepharose) (διαδρομή 3).

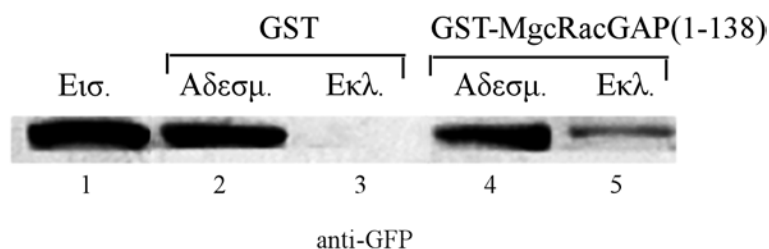


Εικόνα 23: Ανάλυση με SDS PAGE και βαφή με Coomassie των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων HisGFP-HIF-1α(244-532). Το υπερκείμενο (Υπερκ., διαδρομή 1) *E.coli* κυττάρων στα οποία είχε γίνει επαγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης HisGFP-HIF-1α(244-532) εισήλθε σε στήλη νικελίου και ανακτήθηκε η καθαρή πρωτεΐνη (διαδρομή 3). Εκλ.: Εκλουόμενο κλάσμα.

Ποσοτικοποιήσαμε το έκλουσμα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε, χρησιμοποιώντας γνωστή ποσότητα αλβουμίνης (BSA), και βρέθηκε ότι είναι περίπου 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.B.1.1.5. Ο *HisGFP-HIF-1α(244-532)* συνδέεται *in vitro* με την *GST-MgcRacGAP(1-138)*.

Περίπου 85μg καθαρισμένου *HisGFP-HIF-1α(244-532)* (βλ. Εικ 23) επωάστηκαν με 50μg *GST* ή *GST-MgcRacGAP(1-138)* αντίστοιχα, καθηλωμένων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης μέσω του επιτόπου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 24: Χρωματογραφία αγκιστείας της καθαρισμένης πρωτεΐνης *HisGFP-HIF-1α(244-532)*, με σφαιρίδια γλουταθειόνης επωασμένα με *GST* ή *GST-MgcRacGAP(1-138)*. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αντι-GFP. Το εισαγόμενο κλάσμα (Εισ.) (διαδρομή 1) αντιπροσωπεύει το 1/10 της ποσότητας του *HisGFP-HIF-1α(244-532)* που χρησιμοποιήθηκε, ενώ το αδέσμευτο κλάσμα (Αδεσμ.) που απεικονίζεται (διαδρομές 2 και 4) αποτελεί επίσης το 1/10 της ποσότητας που δεν κατακρατήθηκε από την στήλη. Εκλ.: το εκλουόμενο κλάσμα.

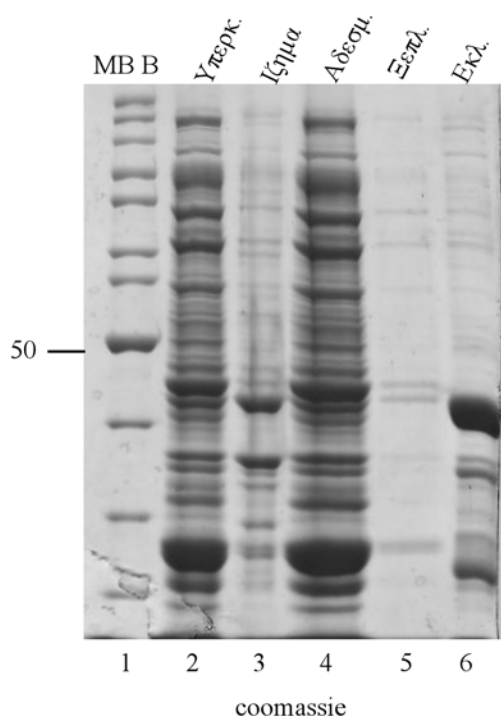
Στην Εικ. 24 φαίνεται ότι η πρωτεΐνη *HisGFP-HIF-1α(244-532)* (διαδρομή 1) κατακρατείται από τα επωασμένα με την *GST-MgcRacGAP(1-138)* σφαιρίδια γλουταθειόνης (διαδρομή 5), σε αντίθεση με τα σφαιρίδια που περιέχουν μόνο την πρωτεΐνη *GST* (διαδρομή 3) όπου εκλούεται όλη σαν αδέσμευτο κλάσμα (διαδρομή 2).

Με την παραπάνω πειραματική διαδικασία επιβεβαιώνεται ότι το τμήμα του DNA του *HIF-1α* που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα στο σύστημα των δύο υβριδίων αλληλεπιδρά άμεσα με την *GST-MgcRacGAP(1-138)* *in vitro*.

4.B.1.1.6. Καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης *GST-MgcRacGAP(1-138)* από στήλη γλουταθειόνης.

Με σκοπό να επιβεβαιώσουμε ότι η αλληλεπίδραση συμβαίνει κι όταν ο HisGFP-HIF-1α(244-532) είναι καθηλωμένος, στην προκειμένη περίπτωση σε σφαιρίδια νικελίου, αλλά και για να ελεγχθεί ότι η GST-MgcRacGAP(1-138) μπορεί να συνδεθεί με τον HIF-1α πλήρους μεγέθους, προχωρήσαμε στον καθαρισμό της GST-MgcRacGAP(1-138) από σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 25 η πρωτεΐνη ήταν διαλυτή (διαδρομή 2) έτσι ώστε ένα σημαντικό κλάσμα να ανακτηθεί από την στήλη γλουταθειόνης (GSH-Sepharose) (διαδρομή 6) μέσω του επιτόπου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST).

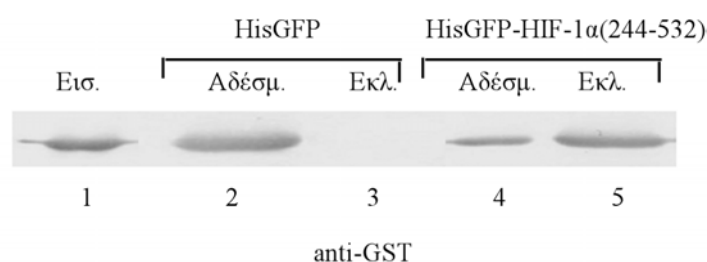


Εικόνα 25: Ανάλυση με SDS PAGE και βαφή με coomassie των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων της GST-MgcRacGAP(1-138). Το υπερκείμενο (Υπερκ., διαδρομή 2) κυττάρων *E. coli* στα οποία είχε γίνει επαγωγή της χημεικής πρωτεΐνης GST-MgcRacGAP(1-138) εισήλθε σε στήλη γλουταθειόνης και ανακτήθηκε το διαλυτό κλάσμα της πρωτεΐνης (Εκλ.: Εκλουόμενο κλάσμα, διαδρομή 6). Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών MB B. Αδέσμ.: Αδέσμευτο κλάσμα, Ξέπλ.: Ξέπλυμα.

Το έκλουσμα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε σε καθαρή μορφή ποσοτικοποιήθηκε σε σχέση με την BSA και βρέθηκε ότι είναι περίπου 1μg/μl.

4.B.1.1.7. Η GST-MgcRacGAP(1-138) συνδέεται *in vitro* με τον HisGFP-HIF-1α(244-532) και τον HisGFP-HIF-1α.

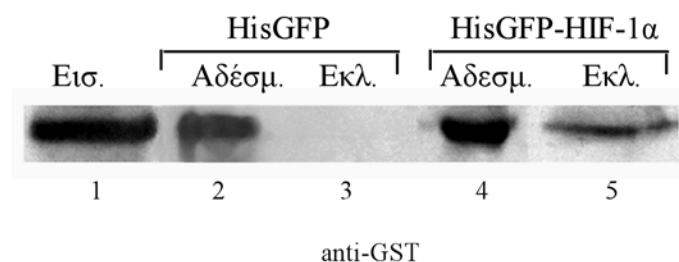
Περίπου 50μg καθαρισμένης πρωτεΐνης GST-MgcRacGAP(1-138) (βλ. Εικ 25) επωάστηκαν με 25μg HisGFP (θετικός μάρτυρας) ή HisGFP-HIF-1α(244-532) πρωτεϊνών αντίστοιχα, καθηλωμένων σε σφαιρίδια νικελίου μέσω του επιτόπου των δέκα ιστιδινών.



Εικόνα 26: Χρωματογραφία αγκιστείας της καθαρισμένης πρωτεΐνης GST-MgcRacGAP(1-138) με σφαιρίδια νικελίου επωασμένα με HisGFP ή HisGFP-HIF-1α(244-532). Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αντι-GST. Το εισαγόμενο κλάσμα (Εισ., διαδρομή 1) αντιπροσωπεύει το 1/10 της ποσότητας της GST-MgcRacGAP(1-138) που χρησιμοποιήθηκε ενώ, το αδέσμευτο κλάσμα (Αδεσμ.) που απεικονίζεται (διαδρομές 2 και 4) αποτελεί επίσης το 1/10 της ποσότητας που δεν κατακρατήθηκε από την στήλη. Εκλ.: το εκλουόμενο κλάσμα.

Στην Εικ. 26 φαίνεται ότι η GST-MgcRacGAP(1-138) (διαδρομή 1) κατακρατείται από τα επωασμένα με τον HisGFP-HIF-1α(244-532) σφαιρίδια νικελίου (διαδρομή 5), σε αντίθεση με τα σφαιρίδια που περιέχουν μόνο την πρωτεΐνη HisGFP (διαδρομή 3) όπου φεύγει όλη σαν αδέσμευτο κλάσμα (διαδρομή 2).

Η ίδια πειραματική διαδικασία και με τις ίδιες ποσότητες πρωτεϊνών επαναλήφθηκε και στην περίπτωση των επωασμένων με τον HisGFP-HIF-1α σφαιριδίων νικελίου.



Εικόνα 27: Χρωματογραφία αχιστείας της καθαρισμένης πρωτεΐνης GST-MgcRacGAP(1-138) με σφαιρίδια νικελίου επωασμένα με HisGFP ή HisGFP-HIF-1α. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αντι-GST. Το εισαγόμενο κλάσμα (Εισ., διαδρομή 1) αντιπροσωπεύει το 1/10 της ποσότητας της GST-MgcRacGAP(1-138) που χρησιμοποιήθηκε ενώ, το αδέσμευτο κλάσμα (Αδέσμ.) που απεικονίζεται (διαδρομές 2 και 4) αποτελεί επίσης το 1/10 της ποσότητας που δεν κατακρατήθηκε από την στήλη. Εκλ.: Εκλ. το εκλούμενο κλάσμα.

Και στην περίπτωση αυτή, η GST-MgcRacGAP(1-138) κατακρατείται μόνο από τα επωασμένα με τον HisGFP-HIF-1α σφαιρίδια νικελίου (Εικ. 27).

Επομένως, ο HIF-1α αλληλεπιδρά *in vitro* με την GST-MgcRacGAP(1-138) και μέσω της περιοχής που είχε χρησιμοποιηθεί σαν «δόλωμα» στο σύστημα των δύο υβριδίων.

Η αλληλεπίδραση HIF-1α / MgcRacGAP(1-138) ανιχνεύθηκε *in vivo* σε κύτταρα σακχαρομύκητα και επιβεβαιώθηκε *in vitro* σε βακτηριακά κύτταρα. Είναι όμως απαραίτητο να αποδειχθεί ότι το σύμπλοκο ανιχνεύεται *in vivo* και σε ανθρώπινα κύτταρα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος, με σκοπό να εξετασθεί αν η πρωτεΐνη HIF-1α συγκατακρημνίζεται με την MgcRacGAP σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

4.B.1.2. Ανίχνευση του συμπλόκου HIF-1α /MgcRacGAP(1-138) *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών

Στα πειράματα που ακολουθούν κύτταρα HeLa και 293T επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες ανθρώπινες πρωτεΐνες. Ολόκληρο το μόριο της ανθρώπινης πρωτεΐνης του HIF-1α βρίσκεται σε σύντηξη με GFP στον

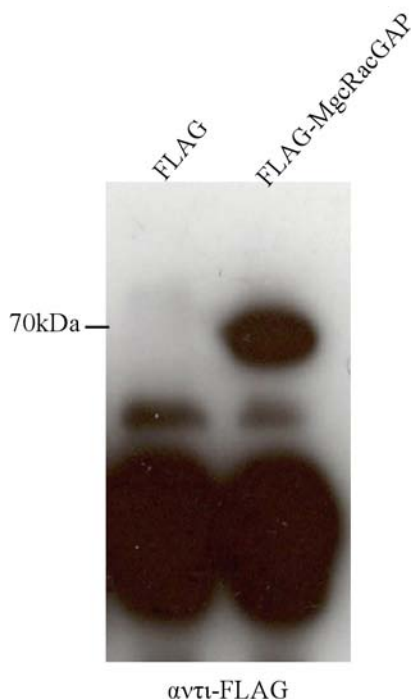
πλασμιδιακό φορέα pEGFP. Αντίστοιχα ολόκληρο το μόριο της ανθρώπινης MgcRacGAP βρίσκεται σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG στον πλασμιδιακό φορέα pME18S-FLAG.

4.B.1.2.1. Ανοσοκατακρήμνιση της FLAG-MgcRacGAP.

Προκειμένου να διεξαχθούν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης του HIF-1α με την MgcRacGAP επιβεβαιώσαμε αρχικά ότι η πρωτεΐνη FLAG- MgcRacGAP εκφράζεται σε κύτταρα HeLa και ανοσοκατακρημνίζεται από το εκχύλισμα των κυττάρων αυτών με ένα αντίσωμα αντι-FLAG.

Έτσι, κύτταρα HeLa τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε τρυβλία στους 37⁰C, επιμολύνθηκαν με ίσες ποσότητες των πλασμιδίων που εκφράζουν για τον επίτοπο FLAG ή την ανθρώπινη πρωτεΐνη FLAG-MgcRacGAP.

Από το ολικό εκχύλισμα των κυττάρων ανοσοκατακρημνίστηκε με αντίσωμα αντι-FLAG, η FLAG-MgcRacGAP (βλ. Εικ. 28, διαδρομή 2). Ο επίτοπος FLAG χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομή 1).

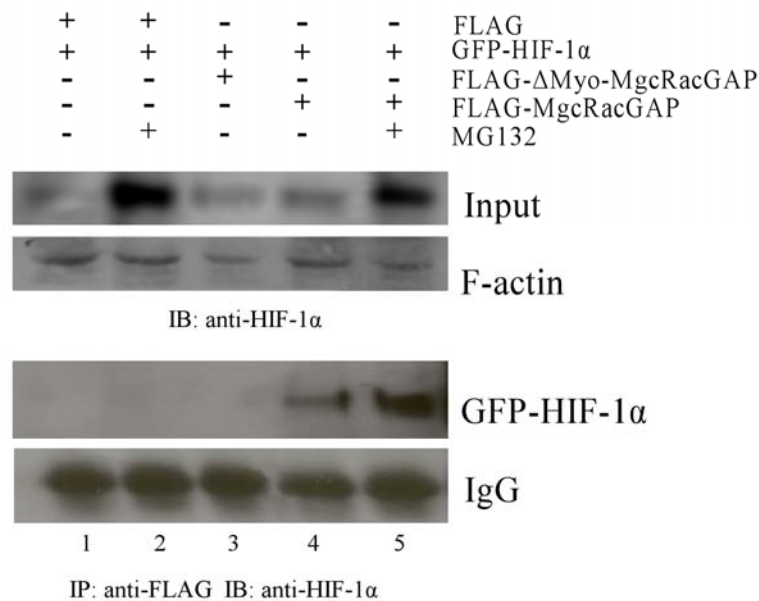


Εικόνα 28: Κύτταρα 293T επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εξέφραζαν τον επίτοπο FLAG (pME18S-FLAG) (διαδρομή 1) ή την πρωτεΐνη FLAG-MgcRacGAP (pME18S-FLAG-MgcRacGAP) (διαδρομή 2). Το ολικό εκχύλισμα των κυττάρων επωάστηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-FLAG και σφαιρίδια πρωτεΐνης G. Η ανοσοανίχνευση έγινε με το αντίσωμα αντι-FLAG. Στη διαδρομή 2, φαίνεται η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη FLAG-MgcRacGAP στο μέγεθος των 70kDa, ενώ ο επίτοπος FLAG χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Η βαριά αλυσίδα του αντισώματος αντι-FLAG χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας ποσοτικού ελέγχου.

Από την Εικ. 28 επιβεβαιώνεται ότι η FLAG-MgcRacGAP εκφράζεται στα κύτταρα και ότι κατακρημνίζεται η πλήρους μεγέθους ανθρώπινη πρωτεΐνη.

4.B.1.2.2. Ανίχνευση του συμπλόκου GFP-HIF-1α / FLAG-MgcRacGAP(1-138) με ανοσοκατακρήμνιση.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος εάν η εξωγενής πρωτεΐνη GFP-HIF-1α συγκατακρημνίζεται με την MgcRacGAP. Τα κύτταρα μεγάλωσαν σε τρυβλία στους 37°C και επιμολύνθηκαν με τα κατάλληλα πλασμίδια για 24 ώρες. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για την μεταλλαγμένη μορφή ΔMyo-MgcRacGAP (βλ. διαδρομή 3). Πρόκειται για μία μεταλλαγμένη μορφή της MgcRacGAP από την οποία λείπουν τα πρώτα 106 αμινοξέα, τα οποία αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής Myo. Επομένως, η μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη δεν φέρει την περιοχή της MgcRacGAP που βρέθηκε από το σύστημα των δύο υβριδίων ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, και είναι κατάλληλη για να ελέγξουμε αν η αλληλεπίδραση είναι ειδική για αυτήν την περιοχή.



Εικόνα 29: Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν: GFP-HIF-1α (pEGFP-HIF-1α) και FLAG (pME18S-FLAG) ή FLAG-ΔMyo-MgcRacGAP ή FLAG- MgcRacGAP, όπως απεικονίζεται. Επάνω μέρος της εικόνας: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα αντι- HIF-1α του 1/10 της ποσότητας του ολικού λύματος των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση. Η ίση περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνη επιβεβαιώθηκε επωάζοντας την μεμβράνη με αντίσωμα για την F-ακτίνη. Κάτω μέρος της εικόνας: Το ολικό λύμα των κυττάρων επώαστηκε με αντίσωμα αντι-FLAG και σφαιρίδια G πρωτεΐνης για την ανοσοκατακρήμνιση. Ακολούθησε ανάλυση SDS-PAGE και η ανοσοανίχνευση έγινε με αντίσωμα αντι-HIF-1α. Η βαριά αλυσίδα του αντισώματος χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας ποσοτικού ελέγχου. Σε δύο περιπτώσεις (διαδρομές 2 και 5) προστέθηκε MG132 στα κύτταρα για 4 ώρες πριν την λύση τους.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 29 ο HIF-1α συγκατακρημνίζεται με την MgcRacGAP και η σύνδεση αυτή είναι ειδική δεδομένου ότι δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη HIF-1α στην περίπτωση του άδειου πλασμιδιακού φορέα που εκφράζει μόνο τον επίτοπο FLAG (διαδρομές 1, 2, 4). Το ειδικό αυτό σήμα ενισχύεται παρουσία του αναστολέα MG132 (βλ. διαδρομή 5). Επιπλέον, φαίνεται ξεκάθαρα ότι το σύμπλοκο δεν δημιουργείται στην περίπτωση της ΔMyo-MgcRacGAP, της μεταλλαγμένης μορφής της MgcRacGAP από την οποία λείπουν τα αμινοξέα 1-106 (βλ. διαδρομή 3). Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν σε κύτταρα HeLa και 293T και έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο HIF-1α συνδέεται με την MgcRacGAP *in vivo* σε ανθρώπινα κύτταρα ενώ αντίθετα η αλληλεπίδραση αυτή δεν συμβαίνει στην περίπτωση της μεταλλαγμένης μορφής της MgcRacGAP, της ΔMyo- MgcRacGAP από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα αμινοξέα 1-106 από το αμινοτελικό της άκρο. Είναι προφανές λοιπόν ότι η συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών HIF-1α και MgcRacGAP σε κύτταρα HeLa και 293T οφείλεται στην περιοχή Myo της MgcRacGAP.

4.B.2. Έλεγχος της λειτουργικότητας της αλληλεπίδρασης HIF-1α /MgcRacGAP.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι το σύμπλοκο δημιουργείται σε κύτταρα θηλαστικών ετέθη το ερώτημα του βιολογικού ρόλου αυτής της αλληλεπίδρασης. Από την στιγμή που δημιουργείται μέσα στα κύτταρα το σύμπλοκο HIF-1α /MgcRacGAP είναι σημαντικό να ανιχνευθεί πώς αυτή η αλληλεπίδραση επηρεάζει τη λειτουργία καθενός από τα συστατικά του. Είναι πιθανό να: Επιδρά η MgcRacGAP στην λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α ή και ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α να επηρεάζει την δράση της MgcRacGAP.

Δεδομένου ότι πρωταρχικός σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η λειτουργία του HIF-1α μέσω των αλληλεπιδράσεών του, μελετήθηκε η επιρροή της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

4.B.2.1 Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.

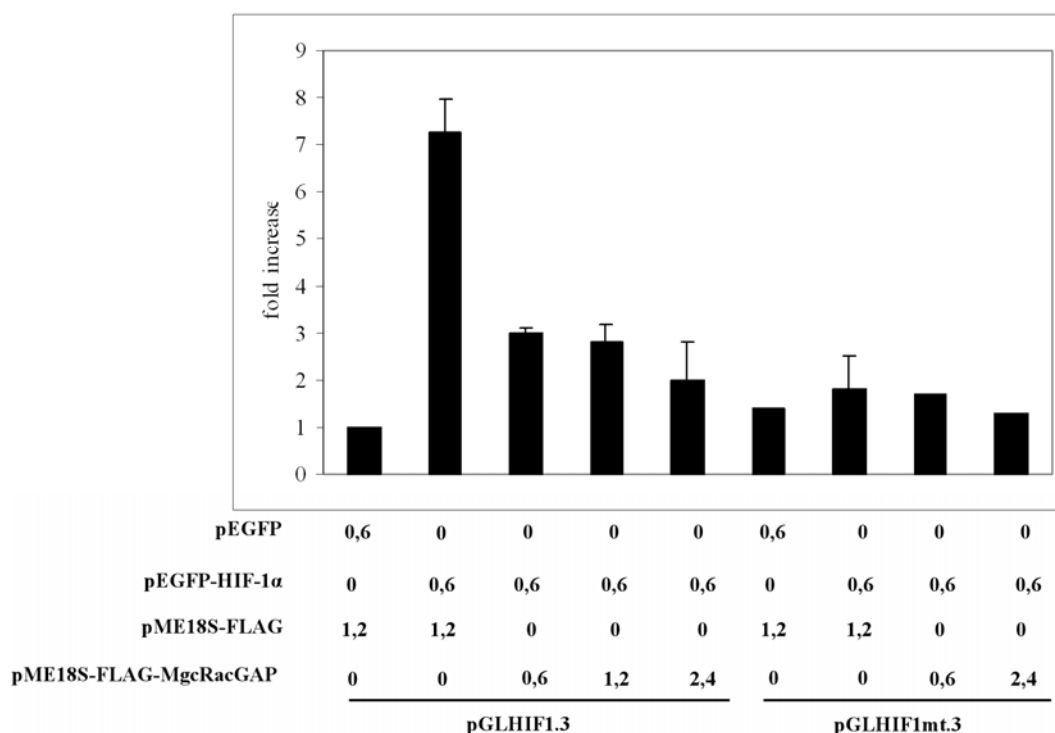
Κύρια λειτουργία του HIF-1α είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του μετά από διμερισμό του με τον ARNT και σύνδεση στο DNA. Για να εξακριβωθεί αν η MgcRacGAP επηρεάζει την δράση του HIF-1α έγιναν πειράματα

μέτρησης της μεταγραφικής του ενεργότητας χρησιμοποιώντας πλασμίδια αναφοράς που περιέχουν HRE στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης.

4.B.2.1.1. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του εξωγενούς HIF-1α σε κύτταρα 293T.

Σε πειράματα που έγιναν σε κύτταρα 293T χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGLHIF1.3, το οποίο περιέχει 3 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα πλασμίδιο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, αλλά με μια μετάλλαξη στα HREs που αποκλείει την πρόσδεση του HIF-1α σε αυτά, το pGLHIF1mt.3.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία των 12 /θέσεων και επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις ανθρώπινες πρωτεΐνες HIF-1α και MgcRacGAP αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα λύθηκαν και έγινε προσδιορισμός της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α στο κυτταρικό εκχύλισμα.



Εικόνα 30: Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 24 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων 293T με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που απεικονίζονται (στο κάτω μέρος του γραφήματος, οι συγκεντρώσεις είναι σε $\mu\text{g DNA}$). Οι τιμές που αναγράφονται, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων τα οποία έχουν γίνει εις διπλούν, έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της β -γαλακτοσιδάσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

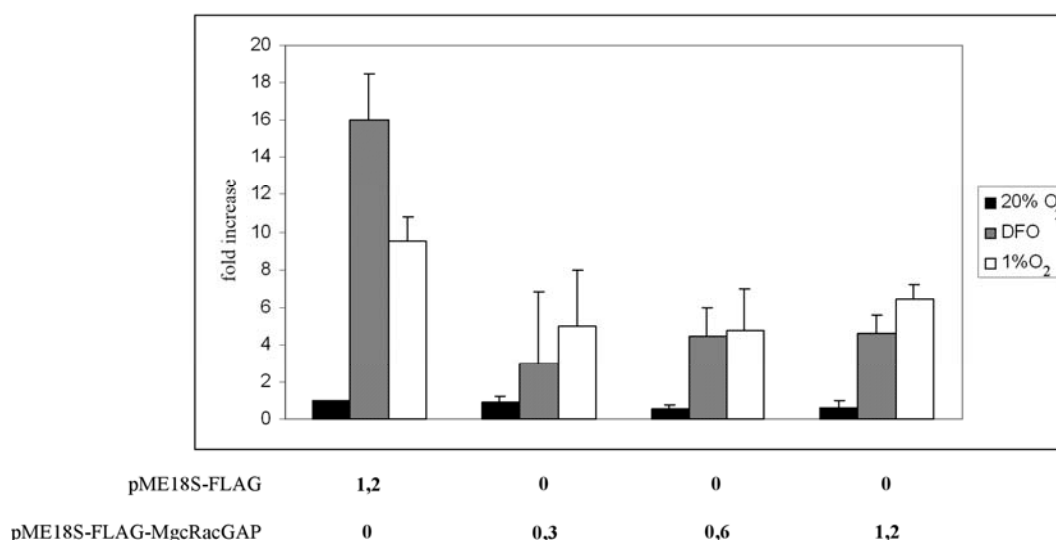
Χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πλασμιδίου που εκφράζει για την MgcRacGAP ενώ, για τον HIF-1 α χρησιμοποιήθηκε μια συνθήκη για την οποία είναι γνωστό ότι επάγει την μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης.

Από την Εικ. 30 φαίνεται ότι η παρουσία του HIF-1 α επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης και αυτό γίνεται μέσω των HREs δεδομένου ότι η επαγωγή δεν παρατηρείται όταν αυτά είναι μεταλλαγμένα. Όταν συγχρόνως με τον HIF-1 α υπερεκφράζεται και η MgcRacGAP η δράση του HIF-1 α αναστέλλεται. Η καταστολή φαίνεται να είναι ήδη πλήρης με την μικρότερη ποσότητα MgcRacGAP που χρησιμοποιήθηκε.

4.B.2.1.2. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1 α σε κύτταρα 293T.

Η MgcRacGAP μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης HIF-1 α που έχει υπερεκφραστεί στα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες υποξίας ή ο επαγωγέας δεσφερριοξαμίνη (DFO) για να ελεγχθεί αν συμβαίνει το ίδιο και με την ενδογενώς παραγόμενη πρωτεΐνη HIF-1 α .

Κύτταρα 293T επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει για την MgcRacGAP και με το πλασμίδιο pGLHIF1.3. Τέσσερις ώρες πριν την λύση τους τα κύτταρα επώαστηκαν με 150 μM DFO ή καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O_2).



Εικόνα 31 : Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 24 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων 293T με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που απεικονίζονται (στο κάτω μέρος του γραφήματος, οι συγκεντρώσεις είναι σε μg DNA) κάτω από τις συνθήκες που αναγράφονται (στο υπόμνημα δεξιά του γραφήματος). Οι τιμές που αναγράφονται, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων τα οποία έχουν γίνει εις διπλούν, έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της β-γαλακτοσιδάσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

Χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις του πλασμιδίου που εκφράζει για την ανθρώπινη MgcRacGAP και με τιμές μικρότερες του 0,6 μg. Από την Εικ. 31 διαπιστώνεται ότι η μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α είναι σημαντικά μειωμένη παρουσία της MgcRacGAP. Η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της λουσιφεράσης σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται κατά περίπου 50% παρουσία της MgcRacGAP και κατά 80% σε συνθήκες επαγωγής του HIF-1α με DFO. Η αναστολή φαίνεται και πάλι να είναι πλήρης με την μικρότερη συγκέντρωση MgcRacGAP που χρησιμοποιήθηκε.

4.B.2.1.3. Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α σε κύτταρα HeLa.

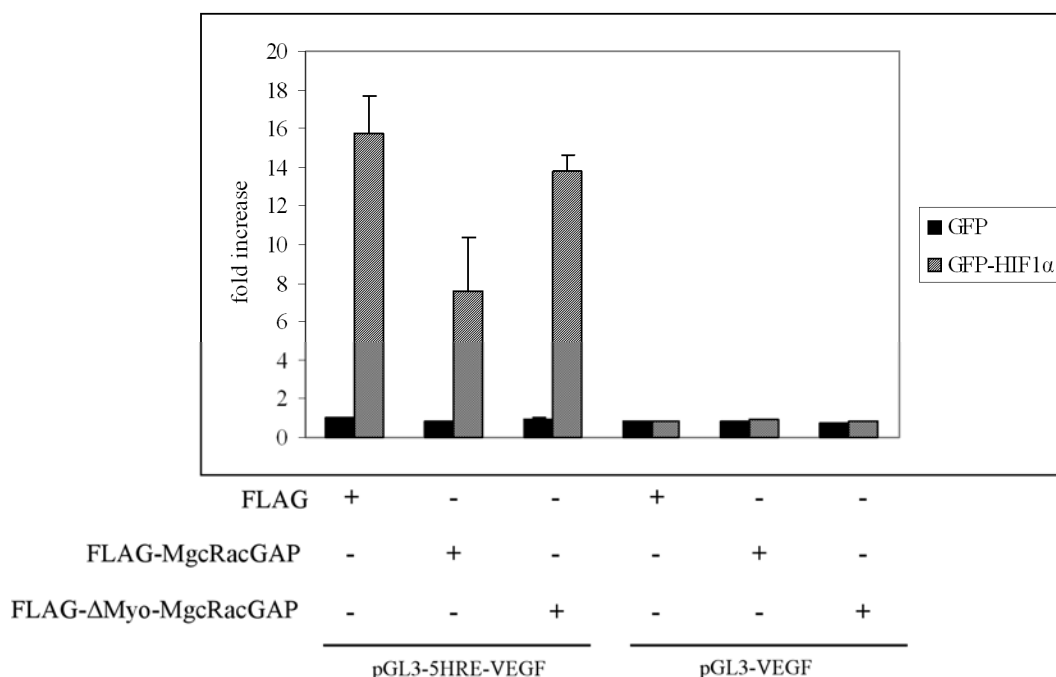
Η ίδια πειραματική διαδικασία έγινε σε κύτταρα HeLa έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η επιρροή της MgcRacGAP στην δράση του HIF-1α και σε ένα διαφορετικό σύστημα κυττάρων.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό πλασμίδιο αναφοράς για την μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης επειδή δίνει υψηλότερες τιμές (έχει HRE προερχόμενα από διαφορετικό υποκιητή). Στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF, το οποίο περιέχει 5 αντίγραφα των HRE του ενισχυτή του γονιδίου του VEGF. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα πλασμίδιο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, αλλά χωρίς τα HRE, το pGL3-VEGF.

Τέλος, σε αυτά τα πειράματα ελέγχθηκε επιπλέον η επίδραση της ΔMyo-MgcRacGAP στην ενεργότητα του HIF-1α προκειμένου να εξετασθεί ο συσχετισμός της φυσικής με την λειτουργική αλληλεπίδραση HIF-1α / MgcRacGAP.

4.B.2.1.3.1 Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του εξωγενούς HIF-1α σε κύτταρα HeLa.

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη GFP-HIF-1α, με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για FLAG ή FLAG-MgcRacGAP ή FLAG-ΔMyo-MgcRacGAP που απεικονίζονται και με το πλασμίδιο pGL3-5HRE-VEGF ή το pGL3-VEGF αντίστοιχα (Εικ. 30). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα λύθηκαν και έγινε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης.

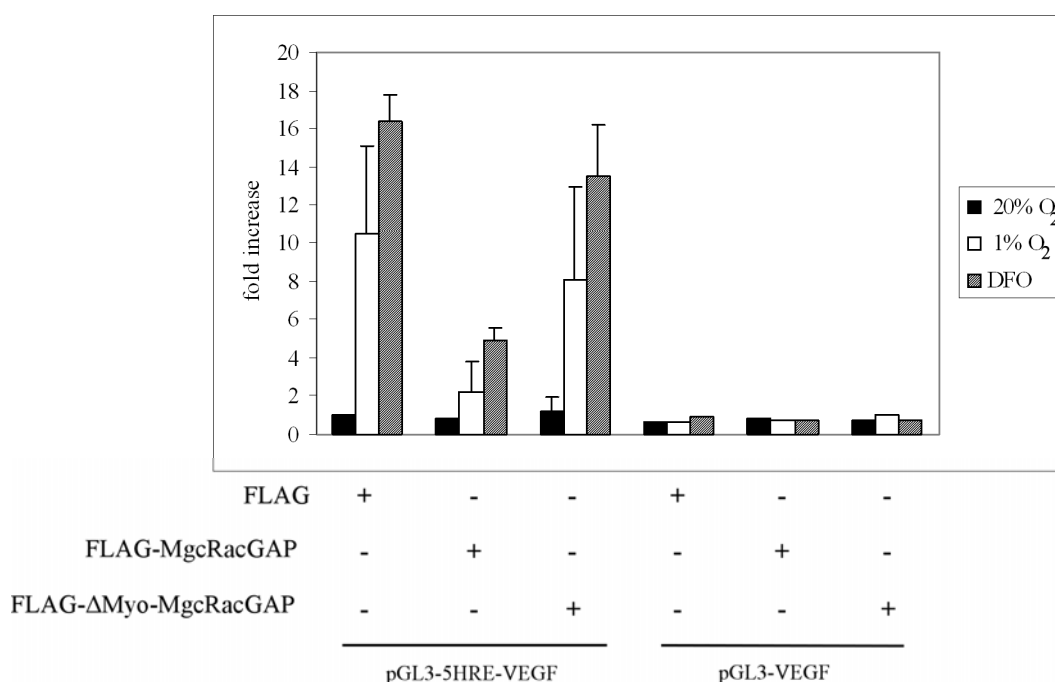


Εικόνα 32: Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 24 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που απεικονίζονται (στο κάτω μέρος του γραφήματος και μέσα στο υπόμνημα). Οι τιμές που αναγράφονται, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων τα οποία έχουν γίνει εις διπλούν, έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της β-γαλακτοσιδάσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

Ο HIF-1α προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και στα κύτταρα HeLa κατά 15 φορές και άρα είναι μεταγραφικά ενεργός, ενώ η είσοδος της MgcRacGAP μειώνει αυτήν την ενεργότητα στο μισό. Αντίθετα η μεταλλαγμένη μορφή ΔMyo-MgcRacGAP δεν φαίνεται να έχει επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Εικ. 32). Αυτό το αποτέλεσμα συνδέεται με προηγούμενα αποτελέσματα με την ΔMyo-MgcRacGAP η οποία δεν ανιχνεύθηκε σε σύμπλοκο με τον HIF-1α σε κύτταρα θηλαστικών.

4.B.2.1.3.2 Έλεγχος της δράσης της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α σε κύτταρα HeLa.

Σε κύτταρα HeLa που υπερέκφραζαν MgcRacGAP προστέθηκαν για τέσσερις ώρες 150μM DFO ή επώαστηκαν για τον ίδιο χρόνο σε 1% O₂.



Εικόνα 33 : Μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 24 ώρες μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που απεικονίζονται (στο κάτω μέρος του γραφήματος), κάτω από τις συνθήκες που αναγράφονται (στο υπόμνημα δεξιά του γραφήματος). Οι τιμές που αναγράφονται, αποτελούν τον μέσο όρο τριών ξεχωριστών πειραμάτων τα οποία έχουν γίνει εις διπλούν, έχουν εξομαλυνθεί με τις τιμές της β-γαλακτοσιδάσης και εκφράζονται σαν φορές αύξησης ως προς τους άδειους πλασμιδιακούς φορείς και τα πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης.

Από την Εικ. 33 και σύμφωνα με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρατηρούμε και πάλι πτώση στην ενεργότητα της λουσιφεράσης κατά περίπου 80% παρουσία της MgcRacGAP. Ενδιαφέρον είναι ότι παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης ΔMyo-MgcRacGAP οι τιμές της ενεργότητας της λουσιφεράσης μένουν σχεδόν ανεπηρέαστες (πτώση μικρότερη από 10%).

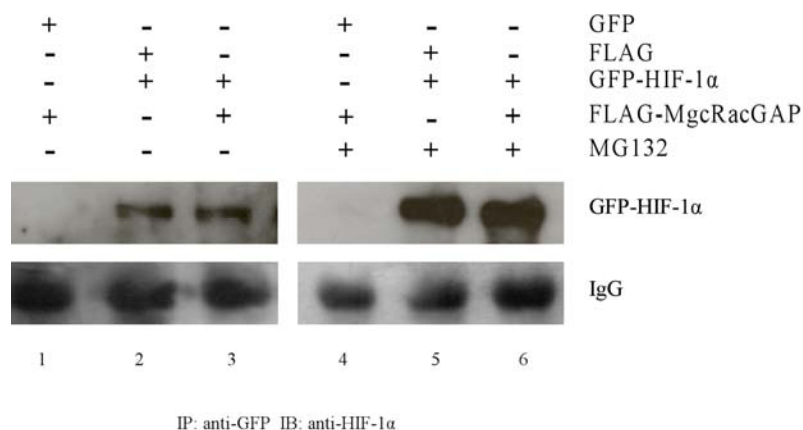
Με όλα τα παραπάνω πειράματα επιβεβαιώθηκε επανειλημμένα ότι η υπερέκφραση της MgcRacGAP προκαλεί μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του

HIF-1α. Το γεγονός όμως ότι το ίδιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση που η περιοχή Myo έχει αφαιρεθεί υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α και συνεπώς εξαρτάται και από την φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

4.B.3. Η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από την δράση της MgcRacGAP δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του.

Για να διερευνηθεί εάν η δράση της MgcRacGAP στην μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α συνοδεύεται και από πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων του, έγινε ανοσοκατακρήμνιση του εξωγενούς HIF-1α με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-GFP σε κύτταρα HeLa. Ήδη από την Εικ. 29 φαίνεται ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α παραμένουν σταθερά παρουσία ή όχι της MgcRacGAP (διαδρομές 1 και 4, αλλά και 2 με 5).

Ειδικότερα, κύτταρα HeLa που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία στους 37⁰C, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που αναγράφονται στην Εικ. 34 για 24 ώρες. Επιπλέον σε κάποια τρυβλία προστέθηκε MG132 για τέσσερις ώρες πριν την λύση. Το λύμα των κυττάρων επώαστηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-GFP και ακολουθήθηκε η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης. Η ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα αντι-HIF-1α επιβεβαίωσε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α δεν μεταβάλλονται και συγκεκριμένα δεν μειώνονται από την δράση της MgcRacGAP (σύγκριση διαδρομών 2 και 3). Επιπλέον η προσθήκη MG132 στα κύτταρα (βλ. διαδρομές 5 και 6) έδωσε αντίστοιχα το ίδιο αποτέλεσμα, δείχνοντας ότι η αναστολή του πρωτεασώματος δεν επηρεάζει τις σχετικές συγκεντρώσεις του HIF-1α (παρουσία ή απουσία της MgcRacGAP) αλλά και ότι το αντίσωμα βρίσκεται σε περίσσεια στην αντίδραση.



Εικόνα 34 : HeLa κύτταρα επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν για FLAG (pME18S-FLAG) ή FLAG-MgcRacGAP (pME18S-FLAG-MgcRacGAP) και GFP (pEGFP-C1) ή GFP-HIF-1α (pEGFP-HIF-1α), όπως απεικονίζεται. Στο λύμα των κυττάρων έγινε επώαση με αντίσωμα αντι-GFP και σφαιρίδια A πρωτεΐνης για την ανοσοκατακρήμνιση. Ακολούθησε ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αντι-HIF-1α. Στο κάτω μέρος της εικόνας χρησιμοποιείται η βαριά αλυσίδα του αντι-GFP αντισώματος σαν μάρτυρας ποσοτικού ελέγχου. Σε τρεις περιπτώσεις (διαδρομές 4, 5, 6) προστέθηκε MG132 για 4 ώρες πριν την λύση των κυττάρων.

Επομένως, η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α που παρατηρείται σε κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η MgcRacGAP δεν οφείλεται σε αντίστοιχη πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων του.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1α είναι ο κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Η επαγωγή του από τα χαμηλά επίπεδα του ενδοκυττάριου οξυγόνου προκαλεί την έκφραση πλήθους γονιδίων που ελέγχουν διάφορες μεταβολικές λειτουργίες με σκοπό το κύτταρο να ανταπεξέλθει στο στρες της υποξίας. Η επαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού και της γλυκόλυσης απεικονίζει την προσπάθεια του κυττάρου να αναπληρώσει τα επίπεδα ενέργειας από άλλες μεταβολικές οδούς ανεξάρτητες από την ύπαρξη οξυγόνου. Επιπλέον, η αύξηση της αγγειογένεσης και της ερυθροποίησης επιτυγχάνουν την όσο το δυνατόν καλύτερη οξυγόνωση των ιστών. Η αντίδραση του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας συνοδεύεται και από την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων των οποίων η βιολογική σημασία στην υποξική απόκριση δεν έχει άμεσα αποσαφηνισθεί, όπως γονίδια που ελέγχουν κυτταροσκελετικές λειτουργίες και τροποποιούν την κινητικότητα, τις κυτταρικές διασυνδέσεις και αλλάζουν γενικά την διαμόρφωση του κυτταροσκελετού.

Ένας έμμεσος τρόπος να διερευνηθεί επιπλέον η επίδραση του HIF-1α στην κυτταρική απόκριση στην υποξία είναι μέσω των φυσικών αλληλεπιδράσεων του με άλλες πρωτεΐνες. Η ανίχνευση τέτοιων αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποκαλύψει νέες δράσεις του HIF-1α αλλά και να εξηγήσει και αρκετές από τις αντιδράσεις του κυττάρου στο υποξικό στρες.

Με απώτερο σκοπό να ανιχνευθούν νέες μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α που θα βοηθήσουν σε μια πλήρη αντίληψη της ρύθμισης και της δράσης του, εφαρμόστηκε το σύστημα των δυο υβριδίων στον *S. cerevisiae*. Πρόκειται για μία μέθοδο που δίνει την δυνατότητα μαζικών σαρώσεων μεγάλων πληθυσμών

πρωτεϊνών, προς ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το σύστημα των δύο υβριδίων ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1990 και από τότε έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές ερευνητικές μελέτες. Οι αλληλεπιδράσεις που προτείνονται με αυτή την τεχνική επιβεβαιώνονται ως επί το πλείστον και με άλλες τεχνικές όπως φαίνεται σε μεγάλο αριθμό βιβλιογραφικών αναφορών.

Οι αλληλεπιδράσεις του HIF-1α που έχουν αποκαλυφθεί με το σύστημα των δύο υβριδίων είναι η FIH-1 που υδροξυλιώνει τον HIF-1α στη Asp-803 [65], η ακετυλοτρανσφεράση ARD1 που τον ακετυλιώνει στη Lys-532 [68], η Jab1 [58], η OS-9 [71], η νεκδίνη [60] και η HDAC7 [57]. Όπως περιγράφεται στην εισαγωγή, πολλές από αυτές έχουν αποκαλύψει νέους τρόπους δράσης και ρύθμισης του HIF-1 με πιο αντιπροσωπευτική την FIH-1 που οδήγησε σε μια πιο ολοκληρωμένη γνώση για το πώς τα κύτταρα «αισθάνονται» τα επίπεδα του ενδοκυττάριου οξυγόνου. Ακόμα και για την περίπτωση της ARD1 όπου υπάρχει διαφωνία ανάμεσα στα μέλη της ερευνητικής κοινότητας για το αν αυτή ακετυλιώνει ή όχι τον HIF-1α, η φυσική αλληλεπίδραση με τον HIF-1α δεν αμφισβητείται.

Σε όλες τις παραπάνω εφαρμογές του συστήματος των δύο υβριδίων έχει χρησιμοποιηθεί σαν δόλωμα η καρβοξυτελική περιοχή του HIF-1α. Συγκεκριμένα πρόκειται για την αμινοξική περιοχή 401-603 η οποία περιλαμβάνει την περιοχή ODD, ή τμήματα των περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής (από τα αμινοξέα 530 έως και 826). Σκοπός μας ήταν να εκφρασθεί ολόκληρο το μόριο του HIF-1α σε κύτταρα σακχαρομύκητα και στην συνέχεια να ανιχνευθούν πιθανές μοριακές αλληλεπιδράσεις του. Κάτι τέτοιο όμως δεν ήταν δυνατό γιατί η πρωτεΐνη που παραγόταν ενεργοποιούσε τη μεταγραφή στα κύτταρα του σακχαρομύκητα κι επομένως εκφράζονταν τα γονίδια αναφοράς απουσία αλληλεπίδρασης. Εφόσον ο HIF-1α διαθέτει στο μόριό του περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής θεωρήθηκε ότι αν αυτές αφαιρεθούν θα μπορούσε το υπόλοιπο μόριο να χρησιμοποιηθεί σαν δόλωμα. Αφαιρώντας το τμήμα του cDNA που κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α που περιέχει τις N-TAD και C-TAD διαπιστώθηκε ότι και πάλι υπήρχε ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς. Το αναπάντεχο αυτό αποτέλεσμα πιθανόν να οφείλεται σε αλληλεπίδραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης-δόλωμα με ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας των bHLH του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, μέσω της περιοχής διμερισμού και αλληλεπίδρασης bHLH-PAS [126].

Τελικά κατασκευάστηκαν δύο πλασμίδια-δολώματα που δεν ενεργοποιούν τα γονίδια αναφοράς και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα της πρωτεΐνης HIF-1α που θα μπορούσε να εκφραστεί σε κύτταρα σακχαρομύκητα χωρίς να ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς. Τα πλασμίδια αυτά είναι το pGHE300 και το pGHS και κωδικοποιούν για την περιοχή bHLH-PAS (1-340) και για την περιοχή μεταξύ της PAS και της ODDD (244-532) αντίστοιχα. Συνολικά, με τις δύο παράλληλες σαρώσεις της cDNA βιβλιοθήκης με το σύστημα των δύο υβριδίων για κάθε ένα πλασμίδιο-δόλωμα, ελέγχθηκε όλη η αμινοτελική περιοχή και το κεντρικό τμήμα (1-532) του HIF-1α.

Η cDNA βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από έμβρυο ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών. Είναι γνωστό ότι ο HIF-1α εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο στάδιο της εμβρυογένεσης κι επομένως η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε είναι κατάλληλη για την εύρεση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι ποντίκια στα οποία έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου του HIF-1α πεθαίνουν κατά την 10^η μέρα της ενδομήτριας ζωής, εμφανίζοντας καρδιαγγειακά και εγκεφαλικά προβλήματα [136] γεγονός που εξασφαλίζει τη δραστικότητα του HIF-1 σε αυτά τα στάδια ανάπτυξης.

Το γεγονός ότι τα δύο παράλληλα συστήματα των δύο υβριδίων που εφαρμόστηκαν για κάθε ένα από τα πλασμίδια-δολώματα έδωσαν διαφορετικό αριθμό αποικιών παρόλο που έγιναν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, ήταν αναμενόμενο. Οι αλληλεπιδράσεις που προέκυψαν με πλασμίδιο-δόλωμα το pGHS ήταν πολύ περισσότερες από αυτές του pGHE300 (280 αποικίες έναντι 60). Αυτό είχε προβλεφθεί εξ αρχής γιατί η περιοχή bHLH-PAS είναι περιοχή διμερισμού με τον ARNT κι επομένως οι αλληλεπιδράσεις που τυχόν θα προέκυπταν από αυτήν την περιοχή θα αναφέρονταν στην δράση και ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α σαν μονομερές. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι μόλις επαχθεί και σταθεροποιηθεί ο HIF-1α διμερίζεται με τον ARNT προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή των γονιδίων στόχων και το χρονικό διάστημα που παραμένει ελεύθερος είναι μικρό. Παρόλα αυτά πιστεύεται ότι μπορεί στην συγκεκριμένη περιοχή bHLH-PAS να “κρύβονται” αλληλεπιδράσεις που έχουν να κάνουν με την σωστή διαμόρφωση του μορίου του HIF-1α ή και με την μεταφορά του στον πυρήνα (δεδομένου ότι έχει βρεθεί ένα πιθανό σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στις θέσεις 17 έως 74).

Από τους κλώνους που προέκυψαν συνολικά από τα δύο συστήματα των δύο υβριδίων και εκφράζουν για πιθανές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες

πρωτεΐνες, έχουν αναλύθηκαν διεξοδικά πέντε. Δύο από αυτούς έχουν προέλθει από το σύστημα των δύο υβριδίων με πλασμίδιο-δόλωμα το pGHE300 και εκφράζουν για δύο πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ Hsp40 [147]. Οι πρωτεΐνες που προέκυψαν από το σύστημα των δύο υβριδίων με πλασμίδιο-δόλωμα το pGHS και που αναλύονται στην παρούσα διατριβή, είναι η HAX-1, η FLNC και η MgcRacGAP των οποίων οι βασικές ιδιότητες περιγράφονται στο τέλος του μέρους Α του κεφαλαίου των αποτελεσμάτων.

Με μία πρώτη θεώρηση φαίνεται ότι πρόκειται για πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό. Για την FLNC είναι απόλυτα εμφανές ότι πρόκειται για μια δομική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού. Ειδικά για την HAX-1 και την MgcRacGAP θεωρήσαμε ότι το γεγονός ότι και οι δύο σχετίζονται με την Rac1 και συμβάλλουν στην μετακίνηση του κυττάρου πιθανόν δεν είναι τυχαίο. Ίσως να υπάρχει μια δομική επικράτεια στο μόριο του HIF-1α η οποία τον συσχετίζει με μόρια που εμπλέκονται σε κυτταροσκελετικές αλλαγές κατά την υποξία και η οποία περιλαμβάνεται στην περιοχή 244-532, πιθανόν μεταξύ των περιοχών PAS και ODD.

Από την άλλη μεριά, δεδομένου ότι και οι δύο αυτές πρωτεΐνες-λείες έχουν πλειοτροπικές δράσεις, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η περίπτωση ο βιολογικός ρόλος της φυσικής αλληλεπίδρασης που ανιχνεύθηκε να μη σχετίζεται με κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η Rac1 αποτελεί εκτός των άλλων υπομονάδα της NADPH οξειδάσης που μετατρέπει το μοριακό οξυγόνο σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και μάλιστα σε ορισμένους τύπους κυττάρων όπως είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα του ενδοθηλίου και τα ουδετερόφιλα, αυτό γίνεται και ενδοκυττάρια [137]. Από την άλλη, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο της εισαγωγής, έχειδειχθεί ότι η υποξία, αλλά και μη υποξικά ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, παράγουν ROS που επάγουν τον HIF-1α. Επιπλέον, η HAX1 είναι μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη η οποία θα μπορούσε να επηρεάζει την εμπλοκή του HIF-1 στις αποπτωτικές διαδικασίες του κυττάρου. Δεν αποκλείεται λοιπόν η HAX-1 και η MgcRacGAP να σχετίζονται με την ρύθμιση του HIF-1α μέσω άλλων ιδιοτήτων τους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι υπόλοιποι κλώνοι που προέκυψαν από τις σαρώσεις μας αποθηκεύθηκαν προκειμένου να διερευνηθούν και ίσως προκύψουν άλλες πιθανές αλληλεπιδράσεις σχετιζόμενες μεταξύ τους ή με τις ήδη υπάρχουσες, οι οποίες θα δώσουν στοιχεία για περαιτέρω λειτουργικούς συσχετισμούς.

Επιλέχθηκε να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGAP, με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, να απομονωθεί το σύμπλοκο από ανθρώπινα κύτταρα και να προσεγγιστεί ο βιολογικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης.

Όπως αναφέρεται στη εισαγωγή, η MgcRacGAP (Male Germ Cell Rac GAP) είναι αρνητικός ρυθμιστής των Rho πρωτεϊνών που ευθύνονται για την μετακίνηση, την μορφολογία, τις διακυτταρικές συνδέσεις, την κυτοκίνηση, την σύσπαση των λείων μυών, την αναδιοργάνωση της ακτίνης κ.α. [111]. Ο πιο καλά μελετημένος ρόλος της είναι κατά την Μ φάση του κυτταρικού κύκλου όπου έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητη για να ολοκληρωθεί η κυτοκίνηση.

Όπως έχει επισημανθεί στη βιβλιογραφία οι GAPs συχνά δρουν και ως διαμεσολαβητές των ενεργοποιημένων Rho GTPασών [114, 115, 138, 139] αλλά ελέγχονται και οι ίδιες από ευρύ φάσμα σημάτων όπως αλληλεπιδράσεις με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες ή και μεμβρανικά λιπίδια, φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση, έλεγχο υποκυτταρικού εντοπισμού κ. ά. [110]. Ειδικά για την MgcRacGAP υπάρχουν τουλάχιστον δύο περιπτώσεις όπου η επιρροή της σε κάποια λειτουργία δεν εξαρτάται από την καταλυτική της δραστηριότητα. Αυτό ισχύει για την εμπλοκή της στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυττάρων του αιμοποιητικού [118] και για τη συμμετοχή της στην κυτοκίνηση σε Β λέμφοκύτταρα [140].

Ολόκληρη η πρωτεΐνη MgcRacGAP αποτελείται από 632 αμινοξέα και η περιοχή που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α σε κύτταρα σακχαρομύκητα (αμινοξέα 1-138) περιλαμβάνει την περιοχή Myo η οποία είναι ομόλογη με περιοχές που ανευρίσκονται σε μόρια μυοσινών. Σ'αυτή την εργασία επιβεβαιώθηκε με πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας ότι η συγκεκριμένη περιοχή συνδέεται *in vitro* με το τμήμα του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκε σαν πλασμίδιο-δόλωμα στο σύστημα των δύο υβριδίων (αμινοξέα 244-532) αλλά και με ολόκληρο το μόριο του βακτηριακά εκφρασμένου HIF-1α. Αποδείχθηκε έτσι ότι ο HIF-1α συνδέεται άμεσα με την MgcRacGAP χωρίς τη συμμετοχή τρίτου μορίου, γεγονός που δεν μπορούσε να αποκλεισθεί για την ανιχνευθείσα αλληλεπίδραση στα κύτταρα *S. cerevisiae*.

Η επιβεβαίωση της *in vivo* αλληλεπίδρασης HIF-1α/MgcRacGAP έγινε σε δύο κυτταρικές ανθρώπινες σειρές (τα κύτταρα 293T είναι επιθηλιακά από νεφρικό καρκίνωμα, και τα HeLa επιθηλιακά τραχηλικού καρκινώματος). Χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους οι οποίες υπερεκφράστηκαν στα κύτταρα.

Δείχθηκε με πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, ότι ο HIF-1α συνδέεται *in vivo* με την MgcRacGAP ενώ αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή της MgcRacGAP από την οποία έχει αφαιρεθεί η περιοχή Myo (ΔMyo-MgcRacGAP). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η αλληλεπίδραση είναι ειδική για αυτή την περιοχή, η οποία είναι απαραίτητη για την σύνδεση των δύο μορίων μεταξύ τους. Για την περιοχή Myo της MgcRacGAP είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι αλληλεπιδρά με τις τουμπουλίνες όπως προαναφέρθηκε, προωθώντας την επαφή της MgcRacGAP με τους μικροσωληνίσκους, γεγονός που επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης. Μάλιστα η δράση αυτή είναι σημαντική για την έναρξη της κυτοκίνησης και τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου προκειμένου το κύτταρο να διαιρεθεί [119]. Επιπλέον η ίδια περιοχή έχει ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα απαλοιφή αυτής της περιοχής ενεργοποίησε την ανάπτυξη και κατέστειλε την διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων ενώ η GAP περιοχή της MgcRacGAP δεν είχε καμία επίδραση στο συγκεκριμένο φαινότυπο [118]. Επιπλέον η Myo περιοχή έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Tat1 (Testis Anion Transporter 1) που είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας ιόντων με 14 επαναλαμβανόμενες έλικες και ενδοκυτταρικό αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Η MgcRacGAP συνδέεται μέσω της Myo περιοχής της με το καρβοξυτελικό άκρο του Tat1 και αυτή η αλληλεπίδραση πιθανολογείται ότι έχει να κάνει με ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών από ιόντα θείου σε σπερματικά κύτταρα [141].

Η μέτρηση της ενεργότητας HRE-κατευθυνόμενης λουσιφεράσης σε κύτταρα θηλαστικών που υπερεκφράζουν HIF-1α και MgcRacGAP έδειξε ότι η MgcRacGAP αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Το ίδιο ισχύει όταν ο ενδογενής HIF-1α επάγεται από υποξία ή τη δεσφερριοξαμίνη όπου η αναστολή βρίσκεται να είναι από 50%, στην περίπτωση που έγινε επαγωγή του HIF-1α από την υποξία, έως και 80%, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε DFO. Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα 293T και HeLa και η αναστολή που παρατηρήθηκε ήταν περίπου η ίδια.

Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι όταν χρησιμοποιείται η μεταλλαγμένη μορφή ΔMyo-MgcRacGAP αντί της πλήρους μεγέθους MgcRacGAP, σε όλες τις περιπτώσεις η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α επηρεάζεται ελάχιστα και η μείωση αυτή δεν ξεπερνά το 10%. Η έλλειψη καταστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α από την ΔMyo-MgcRacGAP, σε συνδυασμό με την επιβεβαιωμένη σε τρία διαφορετικά συστήματα (κύτταρα *S. cerevisiae*, *in vitro*,

κύτταρα θηλαστικών) πληροφορία ότι η περιοχή Myo είναι απαραίτητη για τη φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, υποδεικνύει ότι είναι η αλληλεπίδραση αυτή καθ'εαυτή στην οποία οφείλεται η καταστολή της δράσης του HIF-1α από την MgcRacGAP.

Από την άλλη μεριά, αυτή η έστω και μικρή πτώση της ενεργότητας της λουσιφεράσης παρουσία της ΔMyo-MgcRacGAP ίσως να υποδεικνύει ότι η δράση της περιοχής Myo στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α δεν είναι πλήρης και ότι πιθανόν να χρειάζεται και κάποια άλλη περιοχή της MgcRacGAP που δρα συνεργιστικά. Ίσως ο HIF-1α να συνδέεται ταυτόχρονα και σε μια άλλη περιοχή της MgcRacGAP όπως συμβαίνει με την πρωτεΐνη PRC1 που αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την Myo και την GAP περιοχή της MgcRacGAP [121]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η αλληλεπίδραση της MgcRacGAP με τη STAT3 όπου φαίνεται ότι αυτή συμβαίνει συγχρόνως μέσω των περιοχών Cys και GAP της MgcRacGAP [142]. Για να ελεγχθεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να γίνουν πειράματα μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης και με άλλες μεταλλαγμένες μορφές της MgcRacGAP.

Η παρατηρούμενη πτώση της ενεργότητας του HIF-1 θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε πτώση της συγκέντρωσης του HIF-1 μέσα στο κύτταρο, είτε σε μείωση της δράσης του. Η σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α παρουσία και απουσία MgcRacGAP με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε εκχυλίσματα κυττάρων, αλλά και μετά από ανοσοκατακρήμνιση του HIF-1α δείχνει ότι αυτά δεν διαφέρουν. Δείχθηκε λοιπόν ότι ο HIF-1α συνδέεται με την MgcRacGAP και η αλληλεπίδραση αυτή καταστέλλει την μεταγραφική του ενεργότητα χωρίς παράλληλα να μειώνει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Η σύνδεση των δύο μορίων γίνεται μέσω της περιοχής Myo της MgcRacGAP και της περιοχής 244-532 του HIF-1α και η αναστολή που παρατηρείται είναι αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης. Πιθανόν να εμπλέκεται και κάποια άλλη περιοχή της MgcRacGAP σε αυτήν την αλληλεπίδραση αλλά αυτό είναι κάτι που δεν έχει εξακριβωθεί. Η περιοχή του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκε σαν δόλωμα περιλαμβάνει μεγάλο μέρος της περιοχής PAS B που είναι απαραίτητη για τον διμερισμό του HIF-1α με τον HIF-1β [15]. Εάν η σύνδεση της MgcRacGAP με τον HIF-1α συμβαίνει στην περιοχή PAS B, τότε θα παρεμποδίζεται η σύνδεσή του με τον ARNT. Οι δύο υπομονάδες δεν θα μπορούν τότε να ετεροδιμεριστούν για να συγκροτήσουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, με αποτέλεσμα να μην έχουμε ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η συγκεκριμένη

υπόθεση μπορεί να ελεγχθεί εφ' όσον εντοπιστεί το συγκεκριμένο τμήμα της περιοχής 244-532 του HIF-1α που εμφανίζει αγκιστεία με την MgcRacGAP.

Η MgcRacGAP είναι μια πρωτεΐνη που κατανέμεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα [119], [142]. Για τον HIF-1α είναι γνωστό ότι όταν σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας συσσωρεύεται στον πυρήνα και αυτή η διαδικασία αποτελεί σημείο ελέγχου της δράσης του. [53, 143]. Είναι δυνατόν η συμπλοκοποίησή του με την MgcRacGAP στο κυτταρόπλασμα να επηρεάζει τη μετακίνησή του στον πυρήνα κάτω από συνθήκες υποξίας. Δεν είναι γνωστό εάν η υποκυτταρική κατανομή της MgcRacGAP μεταβάλλεται με την υποξία. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρηθεί ο εντοπισμός των δύο πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες υποξίας ή άλλων ερεθισμάτων που επάγουν τον HIF-1α.

Τέλος, μπορεί η δράση της MgcRacGAP να έχει να κάνει απευθείας με τον έλεγχο της μεταγραφής. Έχειδειχθεί ότι η MgcRacGAP αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 και ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του, προκειμένου να προωθηθεί η διαφοροποίηση λευχαιμικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος από την IL-6 [142]. Στο σύμπλοκο MgcRacGAP/HIF-1α συμμετέχει και η Rac1 και, αν και ο μηχανισμός ενεργοποίησης του STAT3 παραμένει άγνωστος, έχειδειχθεί ότι η δράση GAP της MgcRacGAP είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση. Εν τω μεταξύ έχειδειχθεί ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τον παράγοντα STAT3, η ενεργοποίηση του οποίου αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα του νεφρού. Η αλληλεπίδραση αυτή σε συνεργασία και με άλλους συμπαράγοντες προκαλεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής στον προαγωγέα του γονιδίου του VEGF [144]. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο HIF-1 βρίσκεται στον προαγωγέα του γονιδίου του VEGF σε σύμπλοκο με τον παράγοντα STAT3, τον CBP και τον Ref-1 σε παγκρεατικά κύτταρα και κύτταρα καρκίνου του προστάτη [29]. Επομένως η αλληλεπίδραση HIF-1α /MgcRacGAP θα μπορούσε να ρυθμίζει την συνένωση του HIF-1α με άλλους συνενεργοποιητές της μεταγραφής κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον να ελεγχθεί στα πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 πώς επηρεάζεται η δράση του με την έκφραση μεταλλαγμένων μορφών της MgcRacGAP που δεν έχουν καταλυτική δράση απέναντι στις πρωτεΐνες Rho. Δεν γνωρίζουμε κατά πόσο στο σύμπλοκο MgcRacGAP/HIF-1α συμμετέχει και η Rac1 κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες.

Είναι γνωστό ότι η υποξία προκαλεί μεταβολές στη δομή του κυτταροσκελετού και αυτό έχειδειχθεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως είναι νεφρικά κύτταρα [79], [80], ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος και των πνευμόνων [81], [82] και επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών [83]. Η οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού γίνεται μέσω της οικογένειας των Rho GTPασών και η λειτουργία των Rho έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται σε κυτταροσκελετικές λειτουργίες που σχετίζονται με την υποξία. Συγκεκριμένα, η δημιουργία ινιδίων του στρες (stress fibers) που φαίνεται να προκαλείται στα κύτταρα κατά την υποξία έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών. Από τα μέλη των Rho GTPασών, βρέθηκε με πειράματα μέτρησης της δραστηριότητας τους κατά την υποξία ότι η Rac1 και η RhoA αποκρίνονται σε αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Η αναστολή της Rac1 από τα χαμηλά επίπεδα του οξυγόνου προκαλεί ενεργοποίηση της RhoA που οδηγεί στην δημιουργία ινιδίων του στρες [86, 87].

Παρ'όλα αυτά οι μελέτες που συνδέουν τη λειτουργία του ίδιου του παράγοντα HIF-1α με την λειτουργία των Rho πρωτεϊνών είναι λίγες: έχειδειχθεί ότι η Rac1 ενεργοποιείται κατά την υποξία και ότι η ενεργοποίηση αυτή είναι απαραίτητη για την μετέπειτα ενεργοποίηση του HIF-1α και την λειτουργία της N-TAD περιοχής [88]. Συγκεκριμένα, σε πειράματα μέτρησης της δραστηριότητας της λουσιφεράσης του ενδογενούς HIF-1α, μια αρνητικά επικρατής μορφή της Rac1 καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, ενώ η αντίστοιχη συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή της τον επάγει. Επιπλέον βρέθηκε ότι για την δράση αυτή της Rac1 είναι απαραίτητη η περιοχή N-TAD του HIF-1α. Ούτε η cdc42 ούτε η RhoA δεν έχουν τέτοια δράση στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1, ενώ όταν ελέγχθηκε αν επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α από την επίδραση των τριών αυτών Rho πρωτεϊνών φάνηκε ότι μόνο η Rac1 έχει κάποιο αποτέλεσμα. Η αρνητικά επικρατής μορφή της Rac1 αναστέλλει την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-1α [88]. Τέλος χρησιμοποιώντας αναστολείς για την p38 MAPK ο Hirota και οι συνεργάτες του προτείνουν ότι σε συνθήκες υποξίας η ενεργοποιημένη Rac1 επάγει την δραστηριότητα της p38 MAPK η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον HIF-1α και ενεργοποιεί την λειτουργία των TAD. Οι πληροφορίες αυτές δείχνουν ότι η Rac1 παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του υποξικού μηνύματος αλλά ο τρόπος με τον οποίο αυτό συμβαίνει χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα του νεφρού η RhoA απαιτείται για την έκφραση του

mRNA του HIF-1α και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του [89]. Σε αυτή τη μελέτη, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των Rho πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας και βρέθηκε ότι κατ'αρχή (μία ώρα υποξίας) επάγεται η cdc42, στη συνέχεια (δύο ώρες υποξίας) η Rac1 και τέλος (τέσσερις ώρες υποξίας) η RhoA. Με κυτταρική κλασμάτωση και κυτταρομετρία ροής βρέθηκε ότι οι Rho ήταν προσδεδεμένες σε μεμβράνες του κυττάρου και ενεργές αφού ήταν συνδεδεμένες με GTP [89]. Επιπλέον βρέθηκε ότι το mRNA της RhoA αλλά και της cdc42 σε μικρότερο βαθμό, αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας και ότι η αύξηση αυτή οφείλεται στην παραγωγή ROS, γιατί η χρήση του αναστολέα DPI αναστέλλει αυτή την αύξηση. Τέλος υπερεκφράζοντας στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου μια συνεχώς ενεργή μορφή της RhoA παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA του VEGF και του HIF-1α [89]. Τέλος, μείωση των επιπέδων της Rac1 με πειράματα με siRNA ή με δομικά επικρατείς μεταλλαγμένες μορφές της Rac1, αναστέλλουν την έκφραση του HIF-1α σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές [90], [91]. Ειδικότερα, η υπερέκφραση αρνητικά επικρατών μορφών της Rac1 και της cdc42 στα κύτταρα προκαλεί τη μείωση της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας ενώ παράλληλα αναστέλλει την παραγωγή του [91]. Η ίδια ομάδα συνεργατών είχε προηγουμένως δείξει χρησιμοποιώντας siRNA για την Rac1 σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων του εντέρου ότι η εξάλειψη της έκφρασης της Rac1 μειώνει την έκφραση του HIF-1α και του VEGF [90]. Μάλιστα προτείνουν ότι η δράση αυτή της Rac1 στον HIF-1α ίσως να οφείλεται στην ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και VHL [90].

Τα παραπάνω δείχνουν ότι μπορεί η λειτουργία των Rho πρωτεϊνών (και ιδιαίτερα της Rac1) να είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση του HIF-1α. Η ανασταλτική δράση της MgcRacGAP στη Rac1 θα καταστέλλει έτσι έμμεσα τη δράση του HIF-1. Δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση η αλληλεπίδραση MgcRacGAP/HIF-1α να επηρεάζει επίσης τη δράση της MgcRacGAP αυξάνοντας παραδείγματος χάριν τη δραστηριότητά της απέναντι στη Rac1 (ειδικά εάν αυτή βρίσκεται στο ίδιο σύμπλοκο με τον HIF-1α). Αυτό το ερώτημα μπορεί να απαντηθεί με πειράματα υδρόλυσης του GTP της Rac1 από την MgcRacGAP παρουσία ή απουσία του HIF-1α. Φαίνεται όμως να παίζει σημαντικό ρόλο ο κυτταρικός τύπος και οι συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το κύτταρο.

Αν και ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται και δρά στον πυρήνα επηρεάζεται από κυτταροσκελετικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την υποξία και ειδικότερα έχει βρεθεί ότι αναστέλλεται από όλα τα φάρμακα που διασπούν τις τουμπουλίνες και με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν την δράση των μικροσωληνίσκων. Τέτοιες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία του καρκίνου, είναι η βινκριστίνη (vincristine), η κολχικίνη (colchicine) η δισκοδερμολίδα (discodermolide), το taxotere, η 2ME2 (2-μεθοξυεστραδιόλη) και βρέθηκε ότι ανεξάρτητα από τον μηχανισμό επίδρασή τους στους μικροσωληνίσκους, είχαν την ίδια επίδραση στον HIF-1α [92-94]. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η διάσπαση των μικροσωληνίσκων από την 2ME2 κατά την μετάφραση καταστέλλει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α αλλά και την μεταγραφική της ενεργότητα χωρίς όμως να μεταβάλλει τα επίπεδα mRNA. Η καταστολή αυτή ενισχύεται με αυξανόμενες δόσεις του φαρμάκου. Σε προκαταρκτικά πειράματα προτείνεται ότι αυτό συμβαίνει μέσω της σύνδεσης του mRNA του HIF-1α με τους μικροσωληνίσκους επηρεάζοντας την μετάφρασή του [93]. Το γεγονός ότι όλα τα φάρμακα που αποδιοργανώνουν τους μικροσωληνίσκους καταστέλλουν την δράση του HIF-1α αντικατοπτρίζει την σημασία που έχει η σωστή διαμόρφωση του σκελετού των μικροσωληνίσκων στην δράση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Από την άλλη ίσως να μην είναι σύμπτωση το γεγονός ότι και η MgcRacGAP έχει άμεση σχέση με τους μικροσωληνίσκους για την οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου. Ίσως η σύνδεση HIF-1α /MgcRacGAP να συμβαίνει σε κάποιο στάδιο της εμβρυογένεσης όπου συμβαίνουν αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις όπου γνωρίζουμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες είναι υψίστης σημασίας για το κύτταρο.

Τέλος, όπως περιγράφεται στην εισαγωγή, ο HIF-1 έχει κλινικά σχετισθεί με την μεταστατικότητα καρκινικών όγκων και άρα η σχέση του με τον κυτταροσκελετό έχει ιδιαίτερο ιατρικό ενδιαφέρον. Ένας μοριακός μηχανισμός που έχει ήδη προταθεί για την εμπλοκή του HIF-1α στη μετάσταση περιλαμβάνει μόρια που επηρεάζουν τον κυτταροσκελετό όπως ο παράγοντας HFG (Hepatocyte Growth Factor) που είναι προσδέτης του επαγόμενου από τον HIF-1α, c-Met [145]. Αν και η υποξία δυσκολεύει τις συνθήκες επιβίωσης των κυττάρων στους όγκους, επιδρά θετικά στη δυνατότητα των υποξικών κυττάρων να μεταναστεύουν. Η διαλεύκανση των μηχανισμών που συνδέουν την υποξία με την οργάνωση του κυτταροσκελετού θα βρει σημαντικές εφαρμογές στην καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος.

Συνοπτικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή ανιχνεύθηκε και επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGAP μια πρωτεΐνη που συμβάλλει ως επί το πλείστον σε κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Το σύμπλοκο HIF-1α /MgcRacGAP δημιουργείται σε κύτταρα σακχαρομύκητα και σε κύτταρα θηλαστικών ενώ οι καθαρισμένες από βακτήρια πρωτεΐνες συνδέονται άμεσα μεταξύ τους. Απαραίτητη για αυτή την αλληλεπίδραση είναι η περιοχή Myo της MgcRacGAP που είναι και η περιοχή που βρέθηκε αρχικά ότι συνδέεται ο HIF-1α στα κύτταρα του σακχαρομήκητα. Από πειράματα που έγιναν σε ανθρώπινα κύτταρα βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της MgcRacGAP αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Η αναστολή αυτή οφείλεται στην περιοχή Myo της MgcRacGAP που σημαίνει ότι η αλληλεπίδραση HIF-1α /MgcRacGAP σχετίζεται δομικά και λειτουργικά με την περιοχή αυτή. Η αναστολή αυτή δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη HIF-1α υπάρχει αλλά είναι μεταγραφικά αδρανής. Ο βιολογικός ρόλος της ύπαρξης του συμπλόκου μένει να διερευνηθεί περαιτέρω προκειμένου να εξηγηθεί η σημασία του για την λειτουργικότητα του κυττάρου. Χρειάζεται να διερευνηθεί αν ο HIF-1α έχει κάποια επίδραση στην λειτουργία της MgcRacGAP και να συσχετιστεί με τα αποτελέσματα που ήδη υπάρχουν. Δεν είναι εύκολο να εξηγήσει κανείς την συσχέτιση του HIF-1α με μια πρωτεΐνη με κυτταροσκελετικές δράσεις. Η βιβλιογραφία που συνδέει τον HIF-1α με τον κυτταροσκελετό είναι αρκετά περιορισμένη και μόνο τα τελευταία χρόνια έχει μπει στο στόχαστρο της επιστημονικής κοινότητας. Η διερεύνηση των επιπτώσεων της υποξίας στον κυτταροσκελετό φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για την αποκάλυψη νέων λειτουργιών του HIF-1α και ίσως βοηθήσει στην προσέγγιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων όπως οι μεταστάσεις, οι νεοαγγειογένεση και γενικότερα οι κυτταροσκελετικές αλλαγές που συμβαίνουν σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor-1α) είναι η κύρια πρωτεΐνη-ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Αποτελεί την μία από τις δύο υπομονάδες του παράγοντα HIF-1 που ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων των οποίων τα προϊόντα δρουν αντιπροοπιστικά στο υποξικό στρες.

Η αλληλεπίδρασή του με άλλα κυτταρικά μόρια είναι αναγκαία για την πολύμορφη δράση του στην κυτταρική ομοιοστασία. Για την ανίχνευση νέων μοριακών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες εφαρμόστηκε η τεχνική των δύο υβριδίων. Πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιεί κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και επιτρέπει την γρήγορη σάρωση μεγάλων πληθυσμών πρωτεϊνών προς ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν να αλληλεπιδρούν με το εξεταζόμενο τμήμα του HIF-1α ήταν η HAX-1, η FLNC και η MgcRacGAP.

Επιλέχθηκε να διερευνηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGAP. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των GAPs (GTPase Activating Proteins), που συνδέονται με την GTP-συνδεδεμένη μορφή των Rho πρωτεϊνών και επισπεύδουν την υδρόλυση του GTP, απενεργοποιώντας έτσι τη πρωτεΐνη Rho η οποία καταλήγει στην ανενεργό δεσμευμένη με GDP μορφή της.

Για να επιβεβαιωθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται άμεσα έγιναν κατ' αρχήν πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας. Οι δύο πρωτεΐνες απομονώθηκαν από βακτήρια και επιβεβαιώθηκε ότι ο HIF-1α συνδέεται με την MgcRacGAP *in vitro*.

Στη συνέχεια ήταν αναγκαίο να επιβεβαιωθεί ότι το σύμπλοκο HIF-1α /MgcRacGAP μπορεί να δημιουργείται σε κύτταρα θηλαστικών. Η ανίχνευση του συμπλόκου έγινε *in vivo* σε κύτταρα HeLa και 293T. Ολόκληρο το μόριο της ανθρώπινης πρωτεΐνης HIF-1α βρέθηκε να συμπλοκοποιείται με την πλήρους

μεγέθους ανθρώπινη πρωτεΐνη MgcRacGAP σε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης. Αυτό δεν συνέβη στην περίπτωση της ΔMyo-MgcRacGAP, μιας μεταλλαγμένης μορφής της MgcRacGAP από την οποία λείπει η περιοχή που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τον HIF-1α σε κύτταρα *S. cerevisiae* και *in vitro*.

Προκειμένου να προσεγγιστεί ο βιολογικός ρόλος του συμπλόκου, ελέγχθηκε η επίδραση της MgcRacGAP στην δράση του HIF-1α. Στα ίδια κύτταρα έγινε προσδιορισμός της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1, απουσία και παρουσία υπερεκφρασμένης MgcRacGAP. Σε αυτά τα πειράματα η παρουσία της MgcRacGAP μείωσε μέχρι 80% την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Είναι χαρακτηριστικό ότι η ΔMyo-MgcRacGAP δεν επηρέασε σχεδόν καθόλου (10%) τη δράση του HIF-1α, γεγονός που δείχνει ότι η περιοχή Myo με την οποία η MgcRacGAP αλληλεπιδρά με τον HIF-1α είναι υπεύθυνη για την αναστολή της δράσης του.

Δείχθηκε επιπλέον ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α μέσα στο κύτταρο παρέμεναν σταθερά και δεν επηρεάζονταν από την υπερέκφραση της MgcRacGAP.

Η ανακάλυψη της φυσικής αλληλεπίδρασης του HIF-1α με μία πρωτεΐνη της οποίας η δράση σχετίζεται άμεσα με τον κυτταροσκελετό και η επιβεβαίωσή της σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα, μπορεί να είναι η αρχή για την διερεύνηση άγνωστων μέχρι τώρα λειτουργιών του HIF-1α.

SUMMARY

HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) is the major protein-regulator of the cellular response to hypoxia. It comprises the one of the two subunits of the factor HIF-1 who activates the transcription of genes, the products of which have an opposite effect on hypoxic stress.

Its interaction with other cellular molecules is a prerequisite for its polymorph function in cellular homeostasis. For the identification of new molecular partners of HIF-1 α , the yeast two hybrid screening has been used. It is a method that uses *Saccharomyces cerevisiae* cells for the fast screening of a large number of proteins for the identification of molecular interactions. The proteins that have been shown to interact with the certain part of HIF-1 α were HAX-1, FLNC and MgcRacGAP.

The interaction of HIF-1 α with MgcRacGAP has been chosen to be examined further. This protein belongs to the family of GAPs (GTPase Activating Proteins) that can bind with the GTP-bound form of Rho proteins and stimulate the hydrolysis of GTP, downregulating the Rho protein that results in an inactive GDP-bound state.

To confirm that the two proteins can bind each other directly, pull down assays have been performed. The two proteins have been expressed in bacteria and purified and it has been confirmed that HIF-1 α can bind with MgcRacGAP *in vitro*.

In consequence it was of a great importance to ensure that the complex HIF-1 α /MgcRacGAP exists in mammalian cells. The complex was identified *in vivo* in HeLa and 293T cells. The whole molecule of the human protein HIF-1 α was found in complex with the full length human MgcRacGAP in co-immunoprecipitation experiments. This did not happen in the case of Δ Myo-MgcRacGAP, a mutant form of MgcRacGAP that lacks the domain that was found to interact to HIF-1 α in *S. cerevisiae* and *in vitro*.

In order to approach the biological significance of this complex, the effect of MgcRacGAP in the action of HIF-1 α was examined. The transcriptional activity of HIF-1 α was determined in the absence or the presence of the overexpressed

MgcRacGAP, in the same cells. In these experiments the presence of MgcRacGAP inhibited almost 80% the transcriptional activity of HIF-1. It is interesting that Δ Myo-MgcRacGAP did not affect the function of HIF-1 α almost at all (10%), and that means that the Myo domain with which MgcRacGAP binds to HIF-1 α is responsible for the inhibition of its function.

It has also been revealed that the intracellular levels of HIF-1 α protein are not affected by the overexpression of MgcRacGAP.

The detection of the physical interaction of HIF-1 α with a protein that directly correlates with the cytoskeleton and the confirmation in different cellular systems could be the beginning for the investigation of yet unknown functions of HIF-1 α .

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1999. **15**: p. 551-78.
2. Zhou, J., et al., *Tumor hypoxia and cancer progression*. Cancer Lett, 2005.
3. Brahimi-Horn, M.C. and J. Pouyssegur, *The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway*. Int Rev Cytol, 2005. **242**: p. 157-213.
4. Bardos, J.I. and M. Ashcroft, *Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(2): p. 107-20.
5. Greijer, A.E., et al., *Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)*. J Pathol, 2005. **206**(3): p. 291-304.
6. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 343-54.
7. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
8. Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, and O. Hankinson, *Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1193-5.
9. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 535-40.
10. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. Blood, 2005. **105**(2): p. 659-69.
11. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
12. Jiang, B.H., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 1): p. C1172-80.

13. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem. Pharmacol., 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
14. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression*. FASEB J., 2002. **16**(10): p. 1151-62.
15. Erbel, P.J., et al., *Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15504-9.
16. Huang, Z.J., I. Edery, and M. Rosbash, *PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 259-62.
17. Lindebro, M.C., L. Poellinger, and M.L. Whitelaw, *Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex*. Embo J, 1995. **14**(14): p. 3528-39.
18. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
19. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
20. Ivan, M., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
21. Hoffman, E.C., et al., *Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor*. Science, 1991. **252**(5008): p. 954-8.
22. Hara, S., et al., *Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(4): p. 808-13.
23. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression*. Nature, 2001. **414**(6863): p. 550-4.
24. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.

25. Masson, N., et al., *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation*. Embo J, 2001. **20**(18): p. 5197-206.
26. Berra, E., et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4082-90.
27. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
28. Ohh, M., et al., *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein*. Nat. Cell Biol., 2000. **2**(7): p. 423-7.
29. Gray, M.J., et al., *HIF-1alpha, 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*. Oncogene, 2005. **24**(19): p. 3110-20.
30. Lando, D., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. **295**(5556): p. 858-61.
31. Brahimi-Horn, C. and J. Pouyssegur, *When hypoxia signalling meets the ubiquitin-proteasomal pathway, new targets for cancer therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **53**(2): p. 115-23.
32. Chachami, G., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(5): p. 544-51.
33. Feldser, D., et al., *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 3915-8.
34. Rak, J., et al., *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4575-80.
35. Mazure, N.M., et al., *Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3436-40.

36. Karni, R., et al., *Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42919-25.
37. Triantafyllou, A., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism*. Free Radic Res, 2006. **40**(8): p. 847-56.
38. Zagorska, A. and J. Dulak, *HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(3): p. 563-85.
39. Yuan, Y., et al., *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15911-6.
40. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
41. Genius, J. and J. Fandrey, *Nitric oxide affects the production of reactive oxygen species in hepatoma cells: implications for the process of oxygen sensing*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(6): p. 515-21.
42. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25130-8.
43. Agani, F.H., et al., *The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35863-7.
44. Emerling, B.M., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 4853-62.
45. Vaux, E.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain*. Blood, 2001. **98**(2): p. 296-302.
46. Enomoto, N., et al., *Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and oxygen-regulated gene expression in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(2): p. 346-52.
47. Gao, N., et al., *p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45041-8.

48. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 429-41.
49. Page, E.L., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
50. Goyal, P., et al., *Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1279-88.
51. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
52. Tian, H., et al., *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3320-4.
53. Kallio, P.J., et al., *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6573-86.
54. Gu, J., J. Milligan, and L.E. Huang, *Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3550-4.
55. Zhang, W., T. Tsuchiya, and Y. Yasukochi, *Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia*. J Hum Genet, 1999. **44**(5): p. 293-9.
56. Carrero, P., et al., *Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 402-15.
57. Kato, H., S. Tamamizu-Kato, and F. Shibasaki, *Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41966-74.
58. Bae, M.K., et al., *Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 9-12.
59. Larsen, M., et al., *Interactions between HIF-1 and Jab1: balancing apoptosis and adaptation. Outline of a working hypothesis*. Adv Exp Med Biol, 2005. **566**: p. 203-11.

60. Moon, H.E., et al., *Negative regulation of hypoxia inducible factor-1alpha by necdin*. FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3797-801.
61. Mylonis, I., et al., *Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor 1a*. J Biol Chem, 2006.
62. Huang, L.E., et al., *Leu-574 of HIF-1alpha is essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated degradation pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41750-5.
63. Hirsila, M., et al., *Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30772-80.
64. Mahon, P.C., K. Hirota, and G.L. Semenza, *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2675-86.
65. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
66. Hewitson, K.S., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26351-5.
67. Lancaster, D.E., et al., *Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity*. Biochem J, 2004. **383**(Pt. 3): p. 429-37.
68. Jeong, J.W., et al., *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
69. Brahimi-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
70. Kim, W. and W.G. Kaelin, *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(1): p. 55-60.
71. Baek, J.H., et al., *OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha*. Mol Cell, 2005. **17**(4): p. 503-12.

72. Ravi, R., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
73. Chen, D., et al., *Direct Interactions between HIF-1alpha and Mdm2 Modulate p53 Function*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(16): p. 13595-13598.
74. Nieminen, A.L., et al., *Mdm2 and HIF-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 364-9.
75. Gradin, K., et al., *Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5221-31.
76. Minet, E., et al., *Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction*. FEBS Lett, 1999. **460**(2): p. 251-6.
77. Katschinski, D.M., et al., *Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9262-7.
78. Isaacs, J.S., et al., *Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29936-44.
79. Paller, M.S., *Lateral diffusion of lipids in renal cells: effects of hypoxia and reoxygenation and role of cytoskeleton*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 1): p. C201-8.
80. Sutton, T.A., H.E. Mang, and S.J. Atkinson, *Rho-kinase regulates myosin II activation in MDCK cells during recovery after ATP depletion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(5): p. F810-8.
81. An, S.S., et al., *Hypoxia alters biophysical properties of endothelial cells via p38 MAPK- and Rho kinase-dependent pathways*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(3): p. C521-30.
82. Friedman, J.E., E.J. Chow, and G.G. Haddad, *State of actin filaments is changed by anoxia in cultured rat neocortical neurons*. Neuroscience, 1998. **82**(2): p. 421-7.
83. Park, J.H., et al., *Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1066-74.

84. Wang, Z., et al., *Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells: role of Rho-kinase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(4): p. 465-71.
85. Bailly, K., et al., *RhoA activation by hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle cells is age and site specific*. Circ Res, 2004. **94**(10): p. 1383-91.
86. Wojciak-Stothard, B., L.Y. Tsang, and S.G. Haworth, *Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(4): p. L749-60.
87. Wojciak-Stothard, B., et al., *Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1173-82.
88. Hirota, K. and G.L. Semenza, *Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21166-72.
89. Turcotte, S., R.R. Desrosiers, and R. Beliveau, *HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 11): p. 2247-60.
90. Xue, Y., et al., *Inhibition of endothelial cell proliferation by targeting Rac1 GTPase with small interference RNA in tumor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(4): p. 1309-1315.
91. Xue, Y., et al., *Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation*. Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 2965-72.
92. Mabjeesh, N.J., et al., *2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 363-75.
93. Escuin, D., E.R. Kline, and P. Giannakakou, *Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation and activity by disrupting microtubule function*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 9021-8.
94. Belozarov, V.E. and E.G. Van Meir, *Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(9): p. 901-9.

95. O'Reilly, S., et al., *Phase I and pharmacologic studies of topotecan in patients with impaired hepatic function*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(12): p. 817-24.
96. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
97. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
98. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
99. Semenza, G.L., *Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 17-28.
100. Hockel, M. and P. Vaupel, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 266-76.
101. Unruh, A., et al., *The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3213-20.
102. Rapisarda, A., et al., *Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4316-24.
103. Yeo, E.J., et al., *YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(7): p. 516-25.
104. Kung, A.L., et al., *Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1335-40.
105. Hur, E., et al., *Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(5): p. 975-82.
106. D'Angelo, G., et al., *Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38183-7.
107. Knowles, H.J., et al., *Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1764-8.
108. Yeo, E.J., Y.S. Chun, and J.W. Park, *New anticancer strategies targeting HIF-1*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1061-9.

109. Toure, A., et al., *MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to Drosophila rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6019-23.
110. Bernards, A. and J. Settleman, *GAP control: regulating the regulators of small GTPases*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(7): p. 377-85.
111. Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano, *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 459-86.
112. Matozaki, T., H. Nakanishi, and Y. Takai, *Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades*. Cell Signal, 2000. **12**(8): p. 515-24.
113. Bernards, A., *GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1603**(2): p. 47-82.
114. McCormick, F., *ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator*. Cell, 1989. **56**(1): p. 5-8.
115. Lamarche, N. and A. Hall, *GAPs for rho-related GTPases*. Trends Genet, 1994. **10**(12): p. 436-40.
116. Van de Putte, T., et al., *Mice with a homozygous gene trap vector insertion in mgcRacGAP die during pre-implantation development*. Mech Dev, 2001. **102**(1-2): p. 33-44.
117. Woollorton, E.J., T. Haliotis, and C.R. Mueller, *Identification and characterization of a transcript for a novel Rac GTPase-activating protein in terminally differentiating 3T3-L1 adipocytes*. DNA Cell Biol, 1999. **18**(4): p. 265-73.
118. Kawashima, T., et al., *MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2116-24.
119. Hirose, K., et al., *MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5821-8.
120. Minoshima, Y., et al., *Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis*. Dev Cell, 2003. **4**(4): p. 549-60.
121. Ban, R., et al., *Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16394-402.

122. Lee, J.S., et al., *MgcRacGAP regulates cortical activity through RhoA during cytokinesis*. Exp Cell Res, 2004. **293**(2): p. 275-82.
123. Yoshizaki, H., et al., *Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44756-62.
124. Zhao, W.M. and G. Fang, *MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13158-63.
125. Yuce, O., A. Piekny, and M. Glotzer, *An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA*. J Cell Biol, 2005. **170**(4): p. 571-82.
126. Robinson, K.A., et al., *A network of yeast basic helix-loop-helix interactions*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(22): p. 4460-6.
127. Hollenberg, S.M., et al., *Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3813-22.
128. Nikolakaki, E., et al., *Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40175-82.
129. Suzuki, Y., et al., *HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HSI, a substrate of Src family tyrosine kinases*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2736-44.
130. Gallagher, A.R., et al., *The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4017-22.
131. Radhika, V., et al., *Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49406-13.
132. Vial, E., E. Sahai, and C.J. Marshall, *ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility*. Cancer Cell, 2003. **4**(1): p. 67-79.
133. Shaw, J. and L.A. Kirshenbaum, *HAX-1 represses postmitochondrial caspase-9 activation and cell death during hypoxia-reoxygenation*. Circ Res, 2006. **99**(4): p. 336-8.
134. Xie, Z., et al., *Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(3): p. 914-9.

135. Feng, Y. and C.A. Walsh, *The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1034-8.
136. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 149-62.
137. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
138. Kozma, R., et al., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
139. Paulssen, R.H., et al., *Carboxyl-terminal fragments of phospholipase C-beta1 with intrinsic Gq GTPase-activating protein (GAP) activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26622-9.
140. Yamada, T., M. Hikida, and T. Kurosaki, *Regulation of cytokinesis by mGAP in B lymphocytes is independent of GAP activity*. Exp Cell Res, 2006. **312**(18): p. 3517-3525.
141. Toure, A., et al., *Tat1, a novel sulfate transporter specifically expressed in human male germ cells and potentially linked to rhoGTPase signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20309-15.
142. Tonoizuka, Y., et al., *A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3550-7.
143. Jiang, H.Q., et al., *Pleiotropic effects of intron removal on base modification pattern of yeast tRNAPhe: an in vitro study*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2694-701.
144. Jung, J.E., et al., *STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells*. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1296-8.
145. Bottaro, D.P. and L.A. Liotta, *Cancer: Out of air is not out of action*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 593-5.
146. Λυμπεροπούλου Αγγελική, Λάρισα 2002, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)
147. Καββαδάς Παναγιώτης, Λάρισα 2005, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.).