



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΤΟΥ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤFAR2α ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
HIF1α ΚΑΙ HIF2α**

της
Λεονταρίδου Κωνσταντίνας

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χαχάμη Γεωργία, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Επιβλέπουσα
- Μυλωνής Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
18/07/2017

Λάρισα, Ιούνιος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
TITLE: CLONING OF THE cDNA of TFAP2a DOMAINS AND STUDY OF
THEIR INTERACTIONS WITH THE TRANSCRIPTION FACTORS HIF1 α
AND HIF2 α)

By
[Leontaridou Konstantina]

A three-member examination committee:

- Chachami Georgia, Lecturer in Cellular Biochemistry, Supervisor
- Mylonis Ilias, Assistant Professor in Biochemistry
- Germenis Anastasios, Professor in Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in 18/07/2017

Larisa, June, 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη.....	6
2. Abstract	7
3. Γενικό Μέρος-Εισαγωγή.....	8
3.1 Υποξία	8
3.2 Προσαρμογή Κυττάρων Στην Υποξία	8
3.3 Υποξία Και Παθολογικές Καταστάσεις.....	9
3.4 Η Οικογένεια Των Μεταγραφικών Παραγόντων Επαγόμενων Από Την Υποξία (HIF: Hypoxia Inducible Factor).....	10
3.4.1 Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-1α	10
3.4.1.1 Δομή Του HIF-1α	10
3.4.1.2 Ρύθμιση Του HIF-1α	12
3.4.1.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF1α	13
3.4.1.4 Γονίδια- Στόχοι Του HIF-1α	14
3.4.1.5 Αλληλεπίδραση Με Άλλες Πρωτεΐνες	15
3.4.2 Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-1β.....	15
3.4.3 Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-2α.....	16
3.4.4 Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-3α	16
3.4.5 HIF Και Καρκίνος	17
3.5 Σουμοϋλίωση	19
3.6 Ο Ρόλος Της Σουμοϋλίωσης Στην Υποξία: Προκαταρκτικά Πειράματα.....	20
3.7 Ο Μεταγραφικός Παράγοντας TFAP2a	21
3.7.1 AP2a Και Καρκίνος.....	24
3.7.2 AP2a Και Υποξία	25
3.8 Σκοπός	26
4. Ειδικό Μέρος	
4.1. Υλικά	
4.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια	27
4.1.2 Ενζύμα Και Υλικά Μοριακής Βιολογίας	27
4.1.3 Βακτηριακά Κύτταρα	27
4.1.4 Κυτταρικές Σειρές	27
4.1.5 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	28
4.1.6 Υλικά Κυτταροκαλλιιεργειών	29
4.1.7 Εκκινητές	29
4.1.8 Μάρτυρες Ηλεκτροφόρησης	30

4.1.9 Αντισώματα	32
4.1.10 Παρασκευή Διαλυμάτων.....	32
4.2 Μέθοδοι	
4.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR-polymerase Chain Reaction).....	36
4.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA Σε Πηκτή Αγαρόζης	38
4.2.3 Πέψη Με Ενδονουκλεάσες Περιορισμού.....	38
4.2.4 Απομόνωση DNA Από Πηκτή Αγαρόζης	39
4.2.5 Αντίδραση Λιγάσης	40
4.2.6 Παρασκευή Βακτηρίων Δεκτικών Για Μετασχηματισμό Με Πλασμιδιακό DNA (TOP10)	41
4.2.7 Μετασχηματισμός Βακτηρίων (δεκτικών κυττάρων TOP10)	42
4.2.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA Μικρής Κλίμακας	43
4.2.9 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA Μεσαίας Κλίμακας	44
4.2.10 Αλληλούχιση	45
4.2.11 Κυτταροκαλλιέργειες Ανθρώπινων Καρκινικών Κυτταρικών Σειρών	45
4.2.12 Πάγωμα και Επανέναρξη Καλλιιεργειών	45
4.2.13 Παροδική Διαμόλυνση Ευκαρυωτικών Κυττάρων	46
4.2.14 Παρασκευή Πρωτεϊνικού Κυτταρικού Εκχυλίσματος	47
4.2.15 Ηλεκτροφορητικός Διαχωρισμός Και Ανάλυση Πρωτεϊνών Σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis)	47
4.2.16 Ανοσοαποτύπωση Και Ανοσοανίχνευση Πρωτεϊνών (Western Blotting)	48
4.2.17 Μελέτη Του Υποκυτταρικού Εντοπισμού Πρωτεϊνών Με έμμεσο Ανοσοφθορισμό (Indirect Immunofluorescent)	50
4.2.18 Ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation-IP)	51
4.3 Αποτελέσματα	54
4.3.1 Κλωνοποίηση Επικρατειών Του AP2a Σε Πλασμιδιακό Φορέα pcDNA3.1-HA.....	54
4.3.1.1 Κλωνοποίηση Της Επικράτειας AP2a 1-165aa (wt)	55
4.3.1.2 Κλωνοποίηση Της Επικράτειας AP2a 1-165aa (mut)	59
4.3.1.3 Κλωνοποίηση Της Επικράτειας AP2a 165-437aa	61
4.3.1.4 Κλωνοποίηση Της Επικράτειας AP2a 122-437aa	64
4.3.2 Έλεγχος Της Έκφρασης Των HA-AP2a Επικρατειών Σε Κύτταρα Hela Σε Συνθήκες Νορμοξίας Και Υποξίας	66

4.3.3 Έλεγχος Υποκυτταρικού Εντοπισμού Των Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνικών Επικρατειών Του AP2a Με Ανοσοφθορισμό	69
4.3.4 Ανοσοκατακρήμνιση Ha Σημασμένων Επικρατειών Του AP2a Και Έλεγχος Αλληλεπίδρασής Τους Με Τους HIF	72
5. Συζήτηση	77
6. Βιβλιογραφία	81

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποξία είναι η κατάσταση στην οποία χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ανιχνεύεται από τα κύτταρα ή τους ιστούς και εμφανίζεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το μικροπεριβάλλον ενός όγκου. Η σουμοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία ρυθμίζει την λειτουργία πολλών πρωτεϊνών και φαίνεται να παίζει ρόλο σε πολλά μονοπάτια, όπως αυτό της ισχαιμίας και υποξίας. Σε πειράματα που προηγήθηκαν της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε η μεταβολή των επιπέδων σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε καταστάσεις υποξίας. Ένας παράγοντας, που βρέθηκε να μεταβάλλει το πρότυπο σουμοϋλίωσής του στην υποξία αλλά όχι τα επίπεδα έκφρασης του ήταν ο AP2a. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας παίζει βασικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την ογκογένεση. Καθώς ο AP2a φαίνεται να εμπλέκεται στο μονοπάτι της υποξίας, θελήσαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση περιοχών του AP2a με τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες HIF (hypoxia inducible factors) και την επίδραση της σουμοϋλίωσης στη σύνδεση τους. Για το σκοπό αυτό, κλωνοποιήθηκαν τέσσερις επικράτειες του AP2a (μια αμινοτελική περιοχή χωρίς και με τη επιβεβαιωμένη θέση σουμοϋλίωσης και δύο καρβοξυτελικές επικράτειες) σε πλασμίδια με επίτοπο HA (αιματογλουτινίνη). Όλες οι πρωτεϊνικές επικράτειες εκφράστηκαν σωστά σε κύτταρα HeLa, με υψηλότερο βαθμό έκφρασης των καρβοξυτελικών επικρατειών. Με ανοσοφθορισμό παρατηρήθηκε πως όλες οι πρωτεϊνικές επικράτειες εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά και στο κυτταρόπλασμα σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης εμφανίστηκε αλληλεπίδραση τόσο του HIF-1α όσο και του HIF-2α με τις επικράτειες της καρβοξυτελικής περιοχής, η οποία περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού και σύνδεσης στο DNA της πρωτεΐνης AP2a. Η σουμοϋλίωση που παρατηρείται στην αμινοτελική περιοχή δεν φάνηκε να επιδρά στην αλληλεπίδραση, καθώς και οι δυο αμινοτελικές επικράτειες συνδέθηκαν ασθενώς ή καθόλου με τους παράγοντες HIF. Τα παραπάνω αποτελέσματα θα βοηθήσουν στην μελέτη και την περαιτέρω κατανόηση του ρόλου του AP2a στην κυτταρική προσαρμογή στην υποξία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

υποξία, HIF1α, HIF2α, TFAP2a, σουμοϋλίωση

2. ABSTRACT

Hypoxia is the situation of low oxygen tension in cells and tissues and occurs in pathological conditions, such as the microenvironment of a tumor. Sumoylation is a post-translational modification in proteins that regulates the function of many proteins and appears to play a role in many pathways, such as ischemia and hypoxia. In experiments, that took place prior of this study, the change of the levels in sumoylation of proteins during hypoxia was studied. One protein that its sumoylation levels were modified in hypoxia, but not its expression levels, was AP2a. This transcription factor has a crucial role in regulation in cell differentiation, proliferation, apoptosis and its downregulation can lead to oncogenesis. Since AP2a is affected during hypoxia, we wanted to study the association of AP2a domains with the hypoxia inducible factors (HIFs) and the effect of sumoylation on their binding. For this reason, four AP2a domains (one N-terminal domain with and without the confirmed sumoylation site and two C-terminal domains) were cloned in plasmids with HA epitope (haemagglutinin). All four protein domains were properly expressed in Hela cells, with a higher level of expression of the C-terminal domains. Using immunofluorescence it was observed that all protein domains localized mostly in the nucleus, but also in the cytoplasm, to a greater or lesser extent. Immunoprecipitation experiments showed interaction of both HIF-1 α and HIF-2 α with the C-terminal domains, which includes the dimerization and DNA binding domain of the AP2a protein. The sumoylation in the N-terminal did not show to affect the interaction with the HIF proteins, as these domains were weakly or not at all associated with HIF proteins. The above results will help to study and further understand the role of AP2a in cellular adaptation to hypoxia.

Key words

hypoxia, HIF1 α , HIF2 α , TFAP2a, sumoylation

3.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 ΥΠΟΞΙΑ

Οι όροι υποξία, νορμοξία και υπεροξία χρησιμοποιούνται για να δηλώσουν τη συγκέντρωση του O_2 στα κύτταρα και τους ιστούς. Ως υποξία θεωρούνται τα χαμηλά επίπεδα τάσης οξυγόνου, που συμβαίνουν διακυτταρικά σε πολλούς ιστούς και οι τιμές κυμαίνονται κάτω από 0,5 kPa στις περισσότερες συνθήκες. Ως ανοξία χαρακτηρίζονται επίπεδα κάτω του 1 Pa (10 ppm. O_2) [1]. Οι όροι χρησιμοποιούνται και για τον χαρακτηρισμό των επιπέδων οξυγόνου σε κυτταροκαλλιέργειες (συνήθεις τιμές υποξίας 0,1-1). Η μειωμένη (υποξία) ή η υπερβολική (υπεροξία) συγκέντρωση O_2 , μπορεί να αποβούν μοιραίες για την κυτταρική προσαρμογή και επιβίωση.

3.2 ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ

Σε φυσιολογικά κύτταρα η ενεργειακή πηγή προέρχεται στην πλειονότητά της από το ATP που παράγεται κατά τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης. Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτύξει μια σειρά από προσαρμογές για να επιβιώσουν σε οξεία ή ακόμη και παρατεταμένη υποξία. Τα κύτταρα που υποβάλλονται σε υποξία χρησιμοποιούν την γλυκόλυση ως κύριο μέσο παραγωγής ενέργειας, μια διαδικασία γνωστή και ως φαινόμενο Warburg [2]. Για την προσαρμογή αυτή τα κύτταρα ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολικές προσαρμογές, όπως αυτές που εμπλέκονται στη γλυκόλυση. Επιπλέον, ενισχύεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η αγγειογένεση, ώστε να επιτελείται η καλύτερη οξυγόνωση των ιστών [3]. Είναι επίσης γνωστό πως η έντονη υποξία προκαλεί γενετική αστάθεια και εμφάνιση υψηλού ρυθμού σημειακών μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να εξηγηθούν από την μειωμένη δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα ενεργοποιούν έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγεί σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, αποτρέποντας έτσι τη συσσώρευση των κυττάρων με μεταλλάξεις προκαλούμενες από την υποξία [4].

Οι περισσότερες από αυτές τις διεργασίες λαμβάνουν χώρα πολύ νωρίς, αλλά και μακροπρόθεσμα, όπως η ρύθμιση έκφρασης γονιδίων στόχων της υποξίας. Για παράδειγμα, τέτοια γονίδια είναι: 1) η υδροξυλάση της τυροσίνης, η οποία εμπλέκεται στη σύνθεση της ντοπαμίνης σε κύτταρα τύπου I της καρωτίδας, 2) τα γλυκολυτικά ένζυμα κινάση του φωσφογλυκερικού 1, πυροσταφυλική κινάση m, φωσφοφρουκτοκινάση, αλδολάση A, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, ενολάση 1 και μεταφορείς γλυκόζης Glut-1 και Glut-4, 3) VEGF, PDGF για την επαγωγή αγγειογένεσης και η επαγωγίμη συνθάση του NO, που αυξάνει την αγγειοδιαστολή και 4) ερυθροποιητίνη και υποδοχείς τρανσφερίνης που

ευνοούν την παραγωγή ερυθροκυττάρων (Michiels, 2004). Αυτή η μεταγραφική απόκριση διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα-1 (HIF-1) [5].

Εκτός από την ρύθμιση γονιδίων με HIF-εξαρτώμενο τρόπο, τα κύτταρα μπορούν να αποκριθούν στην υποξία και με έναν HIF-ανεξάρτητο τρόπο. Για παράδειγμα, οι παράγοντες c-Myc, NF-κB, και AP-1 ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ως απόκριση στην υποξία χωρίς την μεσολάβηση των HIF σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένου και του HMG-1.2, είναι απαραίτητοι για την έναρξη της έκφρασης γονιδίων, όπως αυτών των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (hsp16.1) [6]. Επιπλέον, η ρύθμιση του VEGF και η αγγειογένεση ελέγχονται και από τον μεταγραφικό παράγοντα PGC-1α, ο οποίος ενεργοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα ERR-1α σε συγκεκριμένες θέσεις σύνδεσης του υποκινητή των γονιδίων [7]. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στην υποξία μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τους δύο τρόπους, HIF-εξαρτώμενο ή μη.

3.3 ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Η υποξία προκαλείται σε καταστάσεις μειωμένης παροχής αίματος, όπως στη περίπτωση του εγκεφαλικού επεισοδίου (εγκεφαλική ισχαιμία), ή του καρδιακού εμφράγματος (ισχαιμία του μυοκαρδίου). Η υποξία είναι ένα κοινό φαινόμενο, επίσης, σε στερεούς όγκους, επειδή η μειωμένη αγγειακή λειτουργία έχει ως αποτελέσματα την ανεπαρκή παροχή αίματος. Η παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών παρεμποδίζεται από τα παραμορφωμένα αγγεία, με αποτέλεσμα την ενεργειακή απώλεια. Χαμηλές συγκεντρώσεις ATP σε υποξικά κύτταρα όγκου απενεργοποιούν τον αποπτωτικό καταρράκτη και προκαλείται κυτταρικός θάνατος μέσω νέκρωσης [4].

Άλλες αιτίες που προκαλούν υποξία μπορεί να είναι είτε η χαμηλή μερική πίεση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα, όπως σε υψηλά υψόμετρα, νυχτερινή άπνοια, ανεπαρκής πνευμονικός αερισμός, και περιπτώσεις αναιμιών. [8].

Πάνω από 50-60% των όγκων χαρακτηρίζονται από περιοχές με υποξικό ιστό. Η υποξία παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, ξεκινώντας αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του, επηρεάζοντας ογκογονίδια, τον μεταβολισμό και προκαλώντας μετάσταση [9]. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν την δημιουργία νέων αγγείων για την αύξηση της παροχής οξυγόνου στις υποξικές περιοχές του όγκου. Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, αλλά και η μετάσταση των κυττάρων του όγκου ρυθμίζονται και πάλι, κυρίως από τους HIF [10].

3.4 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ (HIF:Hypoxia Inducible Factors)

Η υποξία επάγει έναν αριθμό κυτταρικών αποκρίσεων, όπως την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση και τη γλυκόλυση, είτε μέσω γονιδιακής ρύθμισης είτε με μεταφραστικές τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται από μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, τους HIF παράγοντες (hypoxia-inducible factor, επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες). Η οικογένεια των παραγόντων HIF, αποτελείται από τους HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Οι HIF δρουν ως ετεροδιμερή και αποτελούνται από μια ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο άλφα υπομονάδα και μια σταθερά εκφραζόμενη βήτα υπομονάδα γνωστή και ως ARNT ή HIF1β [11]. Όλες οι α υπομονάδες των HIF όπως και ο ARNT, ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/PER-ARNT- SIM, bHLH/PAS) [12]. Τα μοτίβα bHLH-PAS είναι απαραίτητα για το σχηματισμό ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των α και β υπομονάδων, καθώς και για την πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs) των γονιδίων στόχων. Τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία εντοπίζονται σε περιοχές του υποκινητή ή του ενισχυτή με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' και καθορίζονται από την ικανότητά τους να λειτουργούν ως cis-δραστικά στοιχεία [13].

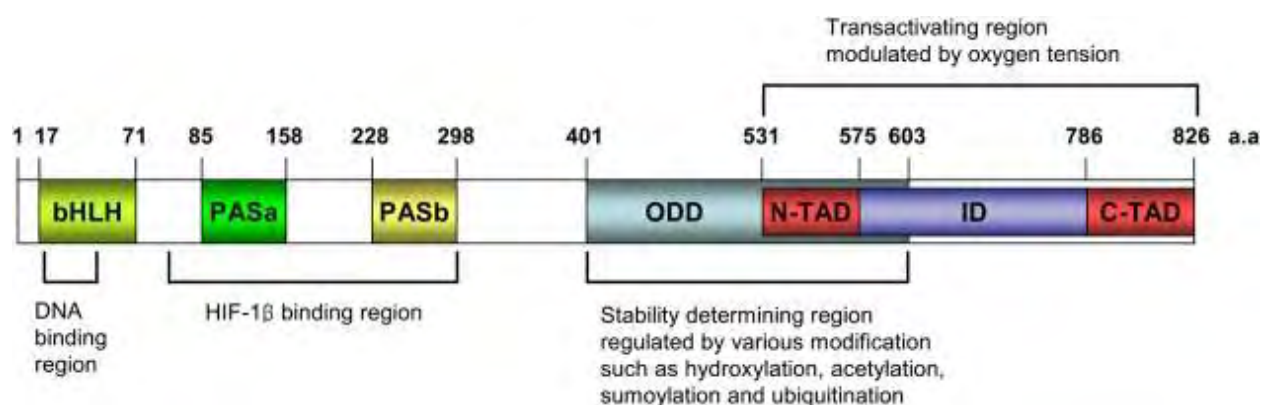
3.4.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1α

3.4.1.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIF-1α

Από την οικογένεια αυτή ο πιο καλά χαρακτηρισμένος παράγοντας είναι ο HIF-1, ο οποίος είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τους HIF-1α και HIF-1β. Ο HIF-1α αποικοδομείται ταχέως κάτω από νορμοξικές συνθήκες μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (εικόνα 2), ενώ η έκφραση του HIF-1β είναι συνεχής. Ο HIF-1α είναι μία πρωτεΐνη 120kDa και αποτελείται από 826 αμινοξέα με αλληλουχία αρκετά συντηρημένη, και μεγάλα ποσοστά ομοιότητας στον άνθρωπο και το ποντίκι. Η ενεργοποίηση της δράσης του παράγοντα HIF-1α τόσο σε υποξικές όσο και φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης ελέγχεται σε πολλά στάδια, όπως τη μεταγραφή, τη σύνθεση της πρωτεΐνης, τη σταθεροποίηση της και την είσοδο της στον πυρήνα, το διμερισμό του με τον ARNT καθώς και την πρόσδεση του σε αλληλουχίες DNA και αλληλεπίδρασή του με λοιπούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Αναλύοντας την αλληλουχία του HIF-1α φαίνεται πως έχει δυο πιθανά σημεία πυρηνικού εντοπισμού το N-NLS και το C-NLS [14]. Επίσης, έχει βρεθεί ένα καρβοξυτελικό σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) στην περιοχή αμινοξέων 632-639 [15]. Από την ανάλυση της

δομής της πρωτεΐνης έχουν χαρακτηριστεί και άλλες περιοχές με συγκεκριμένες λειτουργίες. Ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο υπάρχει μια περιοχή που χαρακτηρίζεται ως βασική και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 17-30. Στη συνέχεια συναντάται η περιοχή HLH (helix loop helix) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 31-71 και η περιοχή PAS(Per Arnt Sim) (αμινοξέα 99-343) που έχει την Α και Β υποπεριοχή στα, αμινοξέα 99-209 και 242-343 αντίστοιχα. Ακόμη, έχουν εντοπιστεί δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Trans Activation Domains, TADs), στο αμινοτελικό (N-TAD) και καρβοξυτελικό (C-TAD) άκρο και συγκεκριμένα στα αμινοξέα 531-575 και 813-826 αντίστοιχα. Η αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής αλληλεπιδρά με μια άλλη περιοχή του παράγοντα την ODD περιοχή (αμινοξέα 401-603) (Oxygen- dependent Degradation Domain, ODDD) [14]. Η αλληλεπίδραση αυτή κατέχει σημαντικό ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Οι προαναφερόμενες περιοχές του παράγοντα HIF-1α φαίνονται στην εικόνα 1 [16]

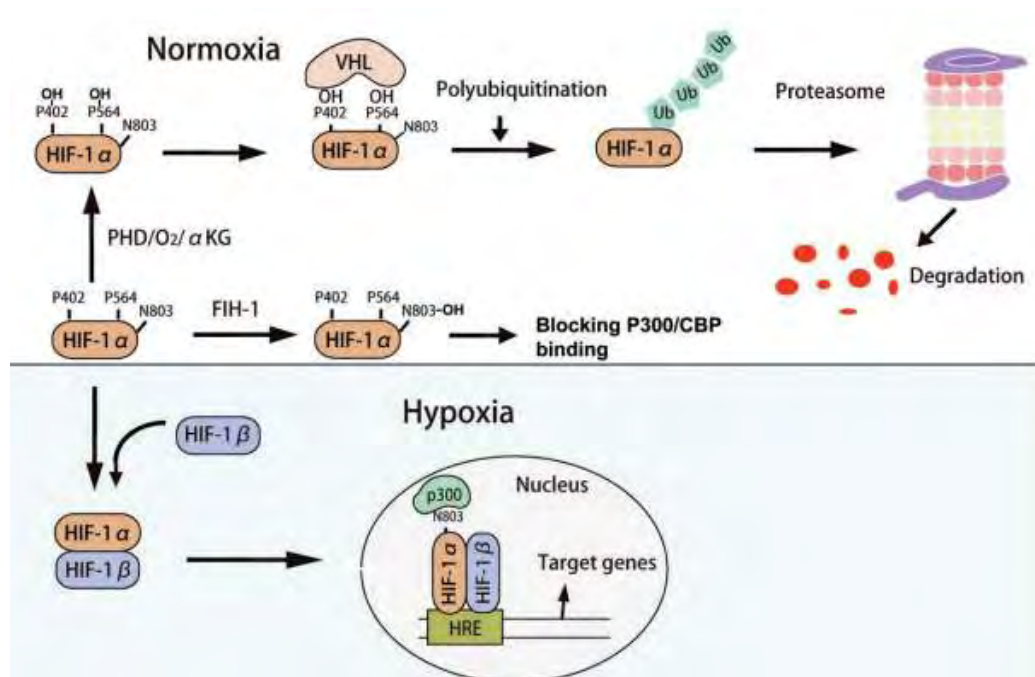


Εικόνα 1: Απεικόνιση της πρωτεΐνης και των δομικών επικρατειών του HIF-1α. (Ανατύπωση από: Soon-Sun Hong et al., Cancer Research and Treatment, 2004; 36(6): 343-353)

3.4.1.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α

Η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α μπορεί να είναι οξυγόνο-εξαρτώμενη ή και μη. Κατά την οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση, σε νορμοξικές συνθήκες, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης (στις θέσεις 402 και 564) από τα ένζυμα υδροξυλάσες προλίνης (PHD), τα οποία για να δράσουν χρειάζονται οξυγόνο, σίδηρο και κετογλουταρικό. Η υδροξυλίωση του HIF-1α απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης OS-9, η οποία λειτουργεί ως ικριωματική μεταξύ του HIF-1α και των PHDs [17]. Η υδροξυλίωση των προλινών έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη σύνδεση της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau (VHL), η οποία είναι μέρος του συμπλέγματος E3 λιγασών ουβικουιτίνης. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε πολυουβικουιτίνωση του HIF-1α και αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου πέφτουν, τότε ο HIF-1α δεν υδροξυλιώνεται, δεν μπορεί να συνδεθεί στον VHL με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2 [17]. Οι PHDs εντοπίζονται σε τρεις ισομορφές και από διάφορα πειράματα έχει βρεθεί πως η απενεργοποίηση της PHD2 συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και κατ' επέκταση των γονιδίων στόχων, προτάσσοντας την ως το βασικό ρυθμιστικό μόριο του HIF-1α και της έκφρασής του σε καταστάσεις νορμοξίας. Εκτός από τον VHL, έχουν βρεθεί κι άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην ουβικιτίνωση και σταθεροποίηση του HIF1α, όπως οι πρωτεΐνες Jab1 και murine double minute 2 (Mdm2).

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη HIF-1α μπορεί να αποικοδομηθεί με ένα μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος από το VHL, την υποξία και τον μηχανισμό ουβικιτίνωσης. Η πρωτεΐνη SHARP1 είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής στον καρκίνο του μαστού και αναφέρθηκε ότι αναστέλλει την επιθετικότητα του μέσω σύνδεσής του με τους παράγοντες HIF-1α και HIF-2α. Ο SHARP1 δρα ως ο παράγοντας που παρουσιάζει τον HIF στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Αξιοσημείωτα, οι αναστολείς της αποακετυλάσης ιστόνης (HDAC) επίσης έχουν αποδειχθεί ότι επάγουν την πρωτεασωματική αποικοδόμηση του HIF-1α σε μηχανισμό ανεξάρτητο από αυτόν του VHL ή του συστήματος ουβικιτίνης. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ (HSP) 70 [18].



Εικόνα 2: Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1 σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. (Ανατύπωση από: Kelly et al., Molecular And Cellular Biology, 2011, 31: 2696–2706)

3.4.1.3 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ HIF1α

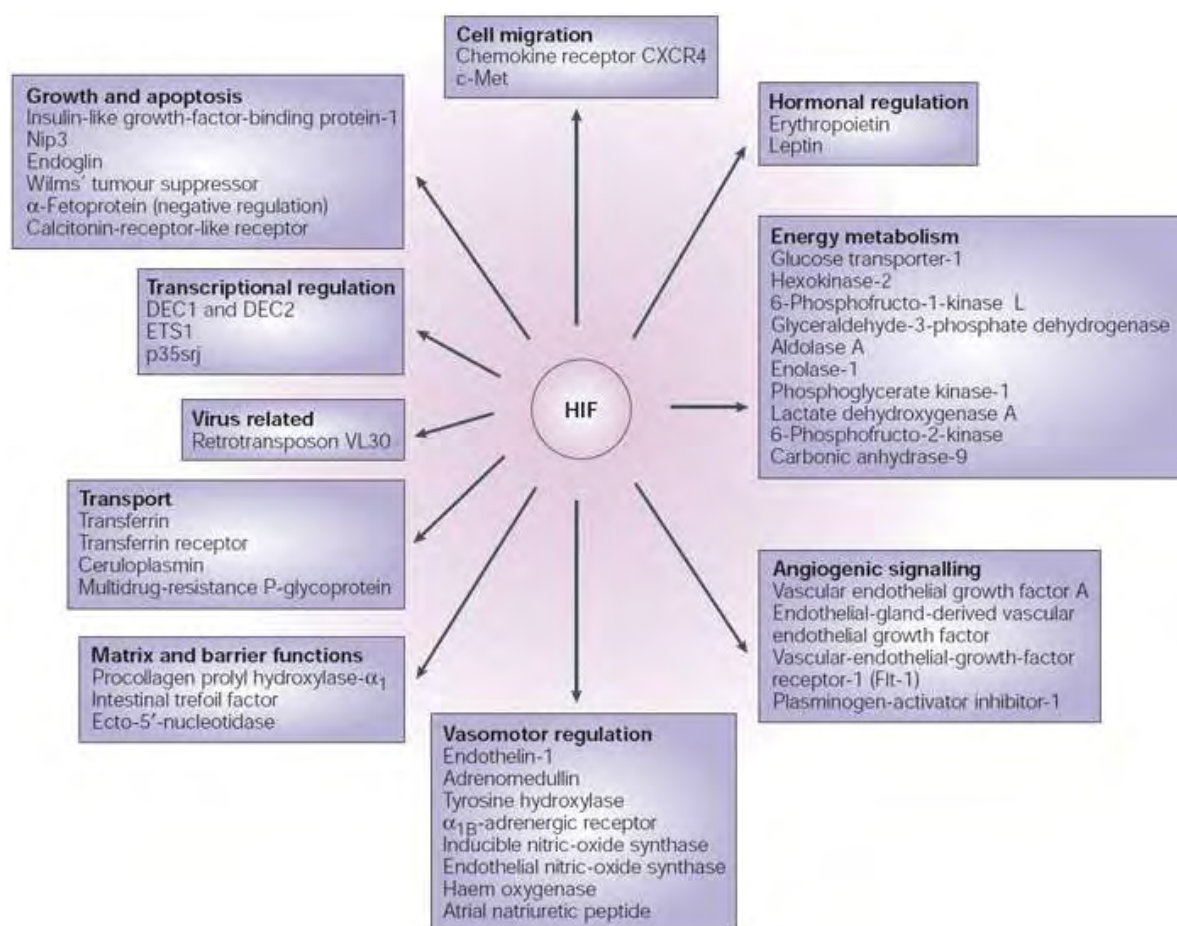
Αντιστρεπτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πραγματοποιούνται στις πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων, ρυθμίζοντας κυτταρικές λειτουργίες. Παραδείγματα τέτοιων τροποποιήσεων αποτελούν οι προσθήκες μικρών χημικών τμημάτων, όπως φωσφορικών, ακετυλικών και μεθυλικών ομάδων, σύζευξη λιπιδίων και σακχάρων και σύνδεση πολυπεπτιδίων, όπως η μικρή πρωτεΐνη ουβικιτίνη και άλλες όμοιες με την ουβικιτίνη πρωτεΐνες (UBLs Ubiquitin Like Proteins)), όπως η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier).

Όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF1α, υπάρχει η υδροξυλίωση, όπως αναφέρθηκε και πρωτότερα, σε δύο κατάλοιπα προλίνης, στις θέσεις 402 και 564, από τις υδροξυλάσες PHDs και οδηγείται προς αποικοδόμηση. Ακόμη, υδροξυλιώνεται και στην ασπαραγίνη της θέσης 803 από την υδροξυλάση FIH-1 (protein Factor Inhibiting HIF-1) παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τον παράγοντα p300 [19]. Εκτός των παραπάνω ο HIF μπορεί να φωσφορυλιωθεί από πολλές κινάσες, όπως για παράδειγμα σε κατάλοιπα σερίνης από τις κινάσες p44/42 MAPK (ERK1/2) στις θέσεις 641 και 643, για την συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα, εμποδίζοντας την εξαγωγή της μέσω της εξπορτίνης CRM1 [20]. Επίσης, φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 247 μέσω της κινάσης καζεΐνης CK1δ, έχοντας σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού του HIF1α με τον ARNT [21]. S-νιτροζυλίωση πραγματοποιείται στη κυστεΐνη της θέσης 800, αυξάνοντας την αλληλεπίδραση με

την p300 και την μεταγραφική του ενεργότητα [22]. Ουβικιτίνωση πραγματοποιείται σε αρκετές λυσίνες στις θέσεις 185, 251, 297, 377, 532, 538 και 547, με κυριότερη θέση την 532 [23]. Η SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) προσδένεται στον HIF-1α και στον HIF-2α επηρεάζοντας τη σταθερότητα και αυξάνοντας την μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως σουμοϋλίωση και θα αναλυθεί παρακάτω [24]. Η SUMO συνδέεται με τον HIF-1α στις λυσίνες των θέσεων 391, 477 και 532 [25] και με τον HIF-2α στη λυσίνη 394 και 497.

3.4.1.4 ΓΟΝΙΔΙΑ- ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ HIF-1α

Ο HIF-1α ενεργοποιεί την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, δρώντας σαν βασικός ρυθμιστής της μειωμένης συγκέντρωσης του οξυγόνου [26]. Περισσότερα από 100 γονίδια-στόχοι του HIF έχουν ταυτοποιηθεί. Τα γονίδια-στόχοι του HIF σχετίζονται άμεσα με αγγειογενετικούς παράγοντες, με παράγοντες μεταβολισμού και επιβίωσης, με μεταφορείς γλυκόζης και γλυκολυτικά ένζυμα [27], όπως φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικά γονίδια-στόχοι του HIF-1α και οι λειτουργίες τους (Ανατύπωση από: Schofield C J et al, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5: 343-354)

3.4.1.5 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Έχουν καταγραφεί αλληλεπιδράσεις του HIF1α με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες., μερικοί από τους οποίους αναφέρονται ενδεικτικά παρακάτω. Η αλληλεπίδραση με την OS-9, για παράδειγμα, οδηγεί σε αποικοδόμηση του HIF1α. Μια άλλη γνωστή πρωτεΐνη, η p53 συνδέεται με τον HIF1α, οδηγώντας τον σε ουβικτινωση και αποικοδόμησή του σε καταστάσεις υποξίας όπως προαναφέρθηκε, ενώ με τη σύνδεση του με το ογκογονίδιο Myc αυξάνεται η σταθεροποίηση του HIF1α, προστατεύοντάς τον από την σύνδεση με τον VHL που α τον οδηγούσε σε αποικοδόμηση [28]. Ακόμη, ο HIF-1α ενεργοποιεί τη μεταγραφή με την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών, P300 και CBP (πρωτεΐνη δέσμευσης στον CREB) [29]. Οι P300 και CBP είναι ομόλογες, πυρηνικές φωσφοπρωτεΐνες, με γενικευμένη έκφραση. Λειτουργούν ως συνενεργοποιητές, συνδέοντας τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές στη βασική μεταγραφική μηχανή. Είναι πιθανό να τροποποιούν την χρωματίνη μέσω της δραστικότητάς τους ως ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης. Η πρωτεΐνη p35srj παρεμποδίζει τον σχηματισμό αυτού του συμπλόκου, με σύνδεση στον HIF1α [30]. Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν είναι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP90, η οποία στην σταθερότητα της πρωτεΐνης, προστατεύοντάς την από αποικοδόμηση [31]. Η πρωτεΐνη RSUME (RWD-containing sumoylation enhancer) ενισχύει την σύνδεση των SUMO-1, -2, -3 με την Ubc9, βελτιώνοντας τον SUMO πολυμερισμό. Αυτή η πρωτεΐνη φαίνεται πως είναι επαγόμενη από την υποξία και συνδέεται στον HIF1α και συμμετέχει στην σουμοϋλίωσή του [32]. Επίσης ο HIF1α αλληλεπιδρά με κινάσες που τον φωσφορυλιώνουν, όπως η ERK και η CK1δ, επιδρώντας στον εντοπισμό του στον πυρήνα και τον ετεροδιμερισμό του. Η αλληλεπίδραση με την MgcRacGAP εμποδίζει επίσης τον ετεροδιμερισμό του. Οι Semenza et al. (2017) παρουσιάζουν συγκεντρωτικά όλους τους γνωστούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον HIF1α ή τον τροποποιούν επηρεάζοντας την μεταγραφική του ενεργότητα, την αποικοδόμησή του ή τον πυρηνικό εντοπισμό του [33].

3.4.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-1β

Ο HIF-1β ή ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) αποτελείται από 789 αμινοξέα και εντοπίζεται σε δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2) [34]. Περιέχει μια επικράτεια bHLH μέσω της οποίας προσδένεται στο DNA, δύο επικράτειες PAS υπεύθυνες για τον διμερισμό του και μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής [35]. Όπως και ο HIF-1α διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) υπεύθυνο για την είσοδο του στον πυρήνα (μέσω του εξαρτώμενου από τις ιμπορτίνες α/β μονοπατιού [36]. Συνδέεται στον HIF1α μέσω της bHLH-PAS περιοχής. Ο ARNT συμμετέχει σε δύο διακριτές σηματοδοτικές οδούς ως απόκριση σε

στρεσογόνες συνθήκες: στην οδό του υποδοχέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) σε συνθήκες έκθεσης σε διοξίνες και στην οδό των HIF σε συνθήκες υποξίας [37].

3.4.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-2α

Ο HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη 870 αμινοξέων, επίσης γνωστή ως EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1) [38] ή HRF (HIF-related factor) [39] ή HLF (HIF-like factor) [40] ή MOP2 (member of PAS family 2) [41]. Ο HIF-2α εμφανίζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας με τον HIF-1α σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Διαθέτει επίσης δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, μια αμινοτελική την N-TAD (αμινοξέα 496-542) και μια καρβοξυτελική την C-TAD (830-870), οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές όπως οι CBP/p300 και είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφική του δράση [42]. Η αμινοτελική επικράτεια είναι υπεύθυνη για την δέσμευση και αλληλεπίδραση του παράγοντα με συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Φέρει επίσης μια ODD περιοχή (366-619 αμινοξέα) και σε συνθήκες νορμοξίας είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του παράγοντα [40]. Η HLH περιοχή του HIF-2α εντοπίζεται στα αμινοξέα 84-347 ενώ υπάρχει και η περιοχή PAS (αμινοξέα 84-300) εκατέρωθεν της οποίας εντοπίζονται οι υποπεριοχές Α (84-154) και Β (230-300) [43].

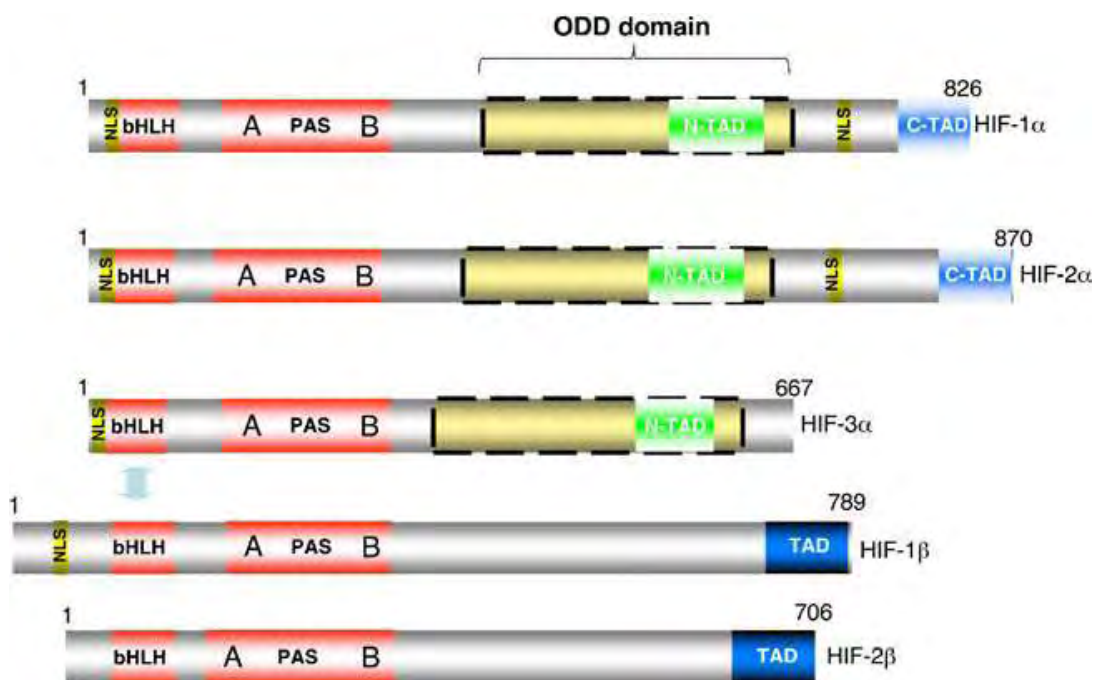
Ο HIF-2α εντοπίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο επιθήλιο του παχέος [44].

Η δράση του HIF-2α και του HIF-1α φαίνεται πως σε κάποια γονίδια είναι παρόμοια, αλλά υπάρχουν και στόχοι γονιδίων που είναι διακριτοί για την κάθε πρωτεΐνη. Για παράδειγμα ο HIF-1α έχει στόχους γλυκολυτικά ένζυμα, όπως η κινάση του φωσφογλυκερικού 1 και η αλδολάση α, ενώ ο HIF-2α έχει τους TGFα, lysyl oxidase, Oct4 and κυκλίνη D1. Ο HIF-2α φαίνεται να έχει μια πιο γενικευμένη δράση στην προώθηση την ογκογένεσης. Καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον HIF-2α παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό ενισχύοντας την μεταγραφική δραστηριότητα του c-Myc, ενώ ο HIF-1α αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου παρεμποδίζοντας την δράση του c-Myc [45].

3.4.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ HIF-3α

Ο HIF-3α είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει 6 ισομορφές και διαφέρει από τους HIF-1α και HIF-2α ως προς τη δομή, με βασικό χαρακτηριστικό της ότι δεν φέρει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD [46]. Η έκφρασή του περιορίζεται σε ιστούς όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και οι νεφροί [47]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως ο HIF-3α ανταγωνίζεται τους HIF-1α και HIF-2α αναστέλλοντας την έκφρασή τους και απενεργοποιώντας

τους [48]. Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται συγκριτικά όλες οι λειτουργικές περιοχές της οικογένειας των HIF παραγόντων.



Εικόνα 4: Οι λειτουργικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF (Ανατύπωση από: Dayan et al., Cancer Microenvironment, 2008, 1:53–68)

3.4.5 HIF ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (εισαγωγή 3.3) η υποξία αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος των όγκων, εξαιτίας της ανισορροπίας μεταξύ της διανομής και της κατανάλωσης οξυγόνου. Η υποξία συνδέεται με την ενεργοποίηση και την υπερέκφραση των παραγόντων HIF στους περισσότερους όγκους [35].

Η δραστηριότητα του HIF-1α ρυθμίζεται από μια ποικιλία μη υποξικών σημάτων, συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποίησης διαφόρων ογκογονικών μονοπατιών (όπως Src, HER-2, Ha-Ras και τα σηματοδοτικά μονοπάτια πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιημένου μιτογόνου) [49]. Ο HIF-1α υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους, και πολλά στοιχεία έχουν δείξει τον ουσιαστικό ρόλο που έχει στην ογκογένεση [50].

Για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, χρειάζεται αυξημένη έκφραση αυξητικών παραγόντων για αυτοκρινή σηματοδότηση. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), αυξητικός παράγοντας 9 των ινοβλαστών (FGF9), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α (TGF-α), αυξητικός παράγοντας β που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGFB), η

ερυθροποιητίνη (EPO), και ενδοθηλίνης 1 (ET-1) ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF σε διαφορετικά καρκινικά κύτταρα [51]. Εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες, ο HIF επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης (ERK). Η καταστολή της DUSP2, μιας ERK-ειδικής φωσφατάσης, από τον HIF-1α παρατείνει την φωσφορυλίωση της ERK, διατηρώντας την ενεργή με αποτέλεσμα την προώθηση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων [52]. Τέλος, κάποιες μελέτες δείχνουν πως η υποξία και ο HIF-1 συμβάλλει στη διαφοροποίηση της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας [53] ενώ κάποιες άλλες δείχνουν πως ότι η HIF-1-μεσολαβούμενη λευχαιμικών κυτταρική διαφοροποίηση είναι ανεξάρτητη της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1 [54]. Οι Samanta et al. (2014) αναφέρουν την συνεισφορά του HIF1α στον καρκίνο, μέσω της έκφρασης των IL-8 και IL-6 και είναι υπεύθυνος για την έναρξη του καρκίνου του μαστού [9, 55].

Μελέτες σε νεφρικό καρκίνο με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης VHL (RCC renal cell carcinomas) έχουν δείξει ότι ο HIF-2α προάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν την κυκλίνη D1, τον παράγοντα μετασχηματισμού α (TGF-α) και τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και καταστέλλοντας παράλληλα τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BNip3 [56]. Ο HIF-2α έχει αποδειχθεί πως επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και σε άλλους τύπους καρκίνου χωρίς ωστόσο να είναι αποσαφηνισμένος ο ρόλος τους. Συγκεκριμένα, εμπλέκεται και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε καρκίνους του πεπτικού συστήματος όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και το ηπατοκαρκίνωμα χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί η ακριβής διαδικασία [57].

Το εάν ο HIF-2α αποτελεί θετικό ή αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι αμφιλεγόμενο και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του HIF-2α *in vivo* προάγει την ογκογένεση είτε μέσω μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι EGFR, IGF1R και ERK/Akt, είτε μέσω της σηματοδότησης COX2/mPGES-1/PGE2 [58], ενώ άλλες μελέτες προτείνουν ότι ο HIF-2α αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [59]. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου συσχέτισε την έκφραση του HIF-2α με κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά της αγγειογένεσης στον όγκο, όπως η αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα και η έκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) [60]. Ο HIF-2α φαίνεται να έχει μεγαλύτερη επίδραση από τον HIF-1α στον έλεγχο της αγγειογένεσης στον παραπάνω τύπο καρκίνου, καθώς μελέτες ξενομοσχευμάτων έδειξαν μεγαλύτερη αναστολή του VEGF κατά την επιλεκτική αποσιώπηση του HIF-2α. Επίσης η ίδια μελέτη υποστηρίζει ότι ο HIF-2 ελέγχει τα γονίδια κυκλίνη G2

(CCNG2) και αγγειοποιητίνη like 4 (ANGPTL4), που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική μετανάστευση αντίστοιχα και συμβάλλουν στην ογκοκατασταλτική του δράση στον καρκίνο του παχέος εντέρου [59]. Ακόμα φαίνεται πως προσφέρει στα κύτταρα του όγκου ανθεκτικότητα στα φάρμακα μέσω καταστολής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 [9].

3.5 ΣΟΥΜΟΥΛΙΩΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω (εισαγωγή 3.3.1.3) η σουμουλίωση ανήκει στις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και είναι η αντιστρεπτή διαδικασία προσθήκης των πρωτεϊνών SUMO με ισοπεπτιδικό δεσμό πάνω σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί τέσσερις SUMO ισομορφές (SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 και SUMO-4), με τις τρεις πρώτες να έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες SUMO φέρουν μόνο 18% ομολογία με την ουβικιτίνη, αλλά έχουν παρόμοια δομή. Η σουμουλίωση ξεκινά με την ένωση της πρωτεΐνης SUMO στο E1 συζευκτικό ένζυμο (SAE1-SAE2 ετεροδιμερές). Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη SUMO μεταφέρεται από το ετεροδιμερές SAE1/2 στο Ubc9 (E2 συζευκτικό ένζυμο) μέσω θειοεστερικού δεσμού μεταξύ καταλοίπων γλυκίνης του C-τελικού άκρου της SUMO πρωτεΐνης και κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του Ubc9. Τέλος, η SUMO συνδέεται με τη δημιουργία ισοπεπτιδικού δεσμού πάνω σε μία λυσίνη της πρωτεΐνης-στόχου με τη βοήθεια E3 λιγασών. Η αναγνώριση των πρωτεϊνών στόχων πραγματοποιείται από τον Ubc9, αναγνωρίζοντας το μοτίβο ψ KXE στην εξωτερική δομή της πρωτεΐνης, όπου ψ : αλειφατικό κατάλοιπο, όπως L/I/V [61].

Η σουμουλίωση είναι μία αντιστρεπτή διαδικασία. Τα ένζυμα που επιτελούν την αποσουμουλίωση πρωτεϊνών ονομάζονται SUMO ισοπεπτιδάσες. Υπάρχουν έξι γνωστές ισοπεπτιδάσες στα θηλαστικά (SENP 1, 2, 3, 5, 6 και 7) και ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης C48. Οι SENP εμφανίζουν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό ανάλογα μετά υποστρώματά τους. Η SENP-1 εντοπίζεται στον πυρήνα, οι SENP-3 και 5 στον πυρηνίσκο, ενώ η SENP-2 σε κυτταρόπλασμα, πυρηνικό πόρο ή και πυρηνικά σωμάτια [62]. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και μια ακόμα SUMO ισοπεπτιδάση, η (USPL1, Ubiquitin specific peptidase like 1), η οποία εντοπίζεται στα σωμάτια Cajal [63].

Περισσότερες από 1000 πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι είναι υποστρώματα για σουμουλίωση, με μόλις το 1/3 από αυτές να είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές. Η σουμουλίωση παίζει ρόλο στην πυρηνο-κυτταροπλασματική μετακίνηση, σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, στη σύνδεση πρωτεϊνών στο DNA, στη σταθερότητα πρωτεϊνών, και σε διεργασίες γονιδιακής οργάνωσης, επιδιόρθωσης και μεταγραφής όσον αφορά τους μεταγραφικούς παράγοντες. Η σουμουλίωση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας, όπως συμβαίνει στην περίπτωση

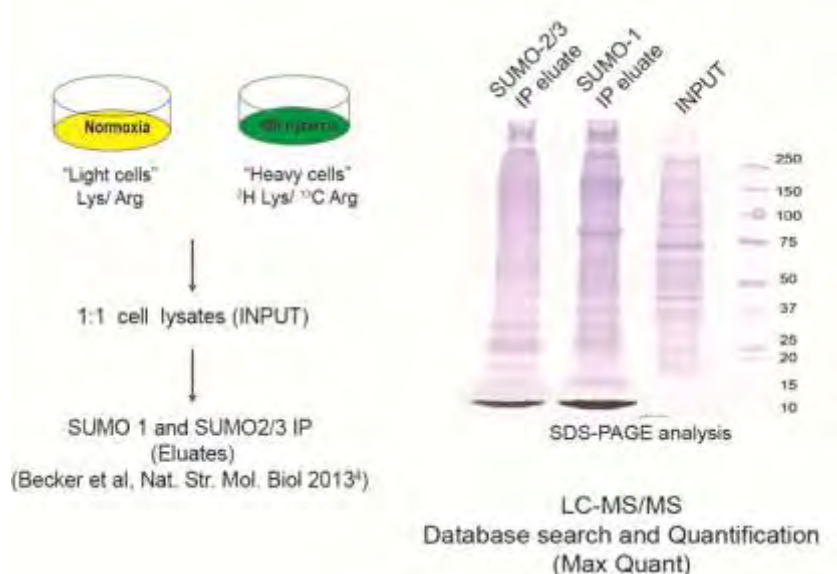
των υποδοχέων στεροειδών, προκαλώντας είτε προσέλκυση μορίων καταστολέων στους υποκινητές, ή επηρεάζοντας σύμπλοκα διαμόρφωσης της χρωματίνης. Παρόλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις, η σουμοϋλίωση μπορεί να αυξήσει τη μεταγραφική ενεργότητα, όπως στην περίπτωση του p53. Ο HIF-1 είναι ένας ακόμη παράγοντας, του οποίου η σταθερότητα και δραστικότητα αυξάνεται από την SUMO-1[64].

3.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΟΥΜΟΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ:

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ (ZMBH-ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΧΑΙΔΕΛΒΕΡΓΗΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΛΑΡΙΣΑΣ)

Η επιβλέπουστος της παρούσας διπλωματικής, Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Ιατρική Λάρισας, θέλοντας να μελετήσει την αλλαγή στα πρότυπα σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας, στα πλαίσια την μεταδιδακτορικής της έρευνας (ZMBH-Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης και Εργαστήριο Βιοχημείας Ιατρική Λάρισας) πραγματοποίησε πειράματα ποσοτικής ανάλυσης όλων των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (SUMO- Screen) σε νορμοξικές και υποξικές συνθήκες. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας στη Χαϊδελβέργη, στο εργαστήριο της F. Melchior, περιελάμβανε την καλλιέργεια κυττάρων σε υποξία και νορμοξία, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό με ραδιενεργά σημασμένα αμινοξέα (Stable Isotopic Labeling by Amino acids in Cell culture-SILAC). Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες επώασης, υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών με αντισώματα έναντι των SUMO-1 και SUMO-2, με πρωτόκολλο του εργαστηρίου ZMBH. Στη συνέχεια τα ολικά εκχυλίσματα της ανοσοκατακρήμνισης και τα εκλούσματα υποβλήθηκαν σε ποσοτική πρωτεομική ανάλυση με LC-MS/MS. Έτσι, έγινε δυνατή η ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών αλλά και των επιπέδων της σουμοϋλίωσης σε νορμοξικές και υποξικές συνθήκες.



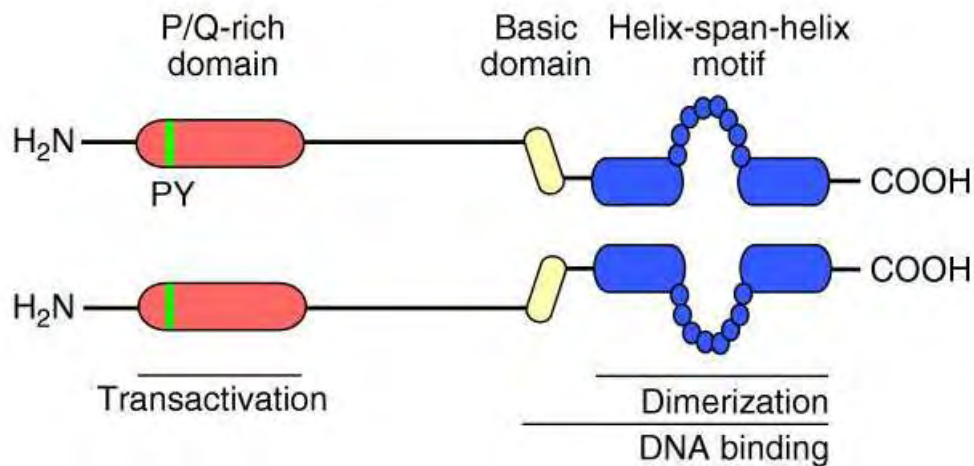
Εικόνα 5: Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (νορμοξία και 1% υποξία) σε θρεπτικό υλικό με ισοτοπικά σημασμένες λυσίνες και αργινίνες, συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες και τα κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνισθήκαν με αντισώματα έναντι των SUMO1 και SUMO2 . Τα εκλούσματα αναλύθηκαν σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, οι ζώνες αποκόπηκαν και οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με LC-MS/MS ανάλυση (αδημοσίευτα δεδομένα Χαχάμη Γ.)

Από την ανάλυση LC-MS/MS προέκυψε ότι σε κάποιες πρωτεΐνες τα επίπεδα έκφρασης δεν μεταβάλλονται κατά την υποξία, αλλά επηρεάζονται τα επίπεδα σουμοϋλίωσής τους σε σχέση με αυτά της νορμοξίας. Μία τέτοια πρωτεΐνη ήταν και ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2a. Ο παράγοντας αυτός εμφάνισε μείωση στα επίπεδα σουμοϋλίωσής του κατά 1,5 φορά στην υποξία σε σχέση με την νορμοξία. Τα πειράματα της κ. Χαχάμη ήταν αφορμή για την περαιτέρω μελέτη του TFAP2a, της σουμοϋλίωσης του και της ρύθμισής του από την υποξία. Περαιτέρω πειράματα επιβεβαίωσαν την μείωση των επιπέδων σουμοϋλίωσης τόσο σε ενδογενή όσο και σε υπερεκφρασμένο HA-AP2a στην υποξία (Γ. Χαχάμη, Α. Μπασαγιάννη, αδημοσίευτα αποτελέσματα [65]). Επιπρόσθετα σε μια προσπάθεια διερεύνησης της σχέσης του TFAP2a με παράγοντες της υποξίας βρέθηκε η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων HIF1α και HIF2α με τον TFAP2a (Γ. Χαχάμη, αδημοσίευτα δεδομένα, [65]).

3.7 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ TFAP2a

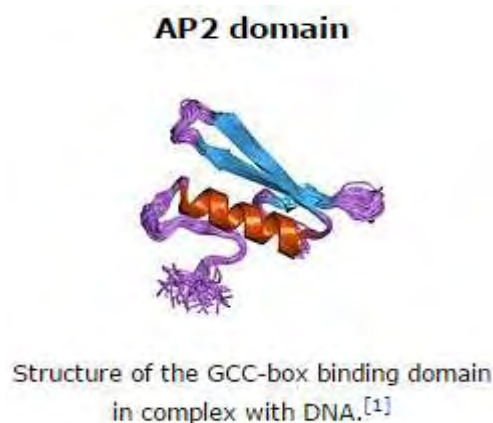
Ο μεταγραφικός παράγοντας, TFAP2a (Transcriptional Factor Activating enhancer binding Protein-2) γνωστός και ως AP2a κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 κοντά στη θέση HLA [66] και παίρνει μέρος σε ένα σύνολο διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής ανάπτυξης, της απόπτωσης και της διαφοροποίησης των ιστών κατά την εμβρυογένεση [67]. Ο TFAP2a ανήκει στην οικογένεια AP-2 μεταγραφικών παραγόντων, η οποία περιλαμβάνει 5 διαφορετικές αλλά στενά σχετιζόμενες πρωτεΐνες 50kDa, τις: AP2a, AP-2b, AP-2c, AP-2d, και AP-2e [68]

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας AP-2 εμφανίζουν μια καλά συντηρημένη περιοχή διμερισμού στο C-άκρο με χαρακτηριστική δομή έλικας-στροφής-έλικας (helix-span-helix) και ακολουθεί μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή πλούσια σε προλίνη και γλουταμίνη στο N-άκρο. Οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή, και μέσω της χαρακτηριστικής δομής helix-span-helix και της βασικής δομής τους συνδέονται στο DNA. Τέλος η περιοχή πλούσια σε προλίνη και γλουταμίνη φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίησή του [69,70].



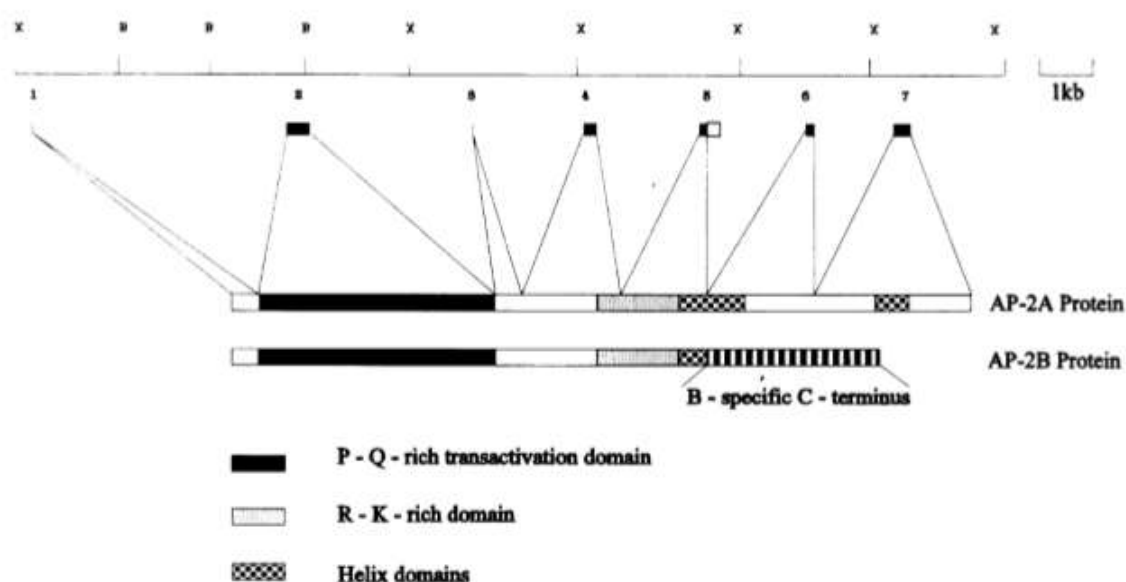
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής ενός AP-2α διμερούς. Απεικονίζεται η χαρακτηριστική περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη και γλουταμίνη (P/Q) (κόκκινο χρώμα, 89 αμινοξέα), η βασική δομή (κίτρινο χρώμα, 20 αμινοξέα) και το μοτίβο έλικας-θηλιάς-έλικας (μπλε χρώμα, 131 αμινοξέα). Το μοτίβο αυτό είναι υπεύθυνο για το διμερισμό των πρωτεϊνών και μαζί με τη βασική δομή είναι υπεύθυνα για τη πρόσδεση του DNA. (Ανατύπωση από: Eckert et al., Genome Biology, 2005, 6:246)

Τα ομοδιμερή και ετεροδιμερή του AP-2 συνδέονται στο DNA και ενεργοποιούν την μεταγραφή μέσω αλληλουχιών πλούσιων σε GC [71]. Έχειδειχθεί πως η AP-2 συνδέεται στην παλινδρομική αλληλουχία 5'-GCCN3GGC-3', η οποία συναντάται σε διάφορους κυτταρικούς και ιικούς ενισχυτές [72]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AP-2 είναι γνωστό πως προκαλούν τόσο φαινόμενα ενεργοποίησης όσο και καταστολής στα γονίδια στόχους τους [73]. Μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, το σχήμα των κυττάρων, την κυτταρική κίνηση και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες της AP-2 οικογένειας [74].



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική δομή της GCC περιοχής της AP-2 μέσω της οποίας συνδέεται στη DNA αλληλουχία (Ανατύπωση από: Allen MD et al., EMBO, 1998, 17(18): 5484-96)

Τα mRNAs των AP-2a και AP-2b κωδικοποιούνται από ένα μόνο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p22.3-pter. Η πρωτεΐνη AP-2b, διαφέρει στο καρβοξυτελικό άκρο της (C-άκρο) από την αρχικά κλωνοποιημένη πρωτεΐνη, AP-2a και έχει χαρακτηριστεί ως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφικής ενεργοποίησης (εικόνα 8) [75]. Ως εκ τούτου, η ενεργότητα του AP-2 εντός του πυρήνα του κυττάρου ρυθμίζεται από διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος που στοχεύουν μεταγραφικά, μετά-μεταγραφικά και μετά-μεταφραστικά τη ρύθμιση του AP-2.



Εικόνα 8: Δομή εξονίων-ιντρονίων του AP-2 γονιδίου και η θέση των εξονίων που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη AP-2A και AP-2B. (Ανατύπωση από: Bauer R et al., Nucleic Acids Research, 1994, 22: 1413-1420)

Η ενεργότητα και δράση των πρωτεϊνών AP-2 μπορεί να ρυθμιστεί σε πολλαπλά επίπεδα: μέσω τροποποιήσεων στο τρόπο πρόσδεσής τους στο DNA, στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους [76]. Οι μηχανισμοί ρύθμισης περιλαμβάνουν μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση από την κινάση A [77,78], οξειδοαναγωγική ρύθμιση [79], σουμοϋλίωση καθώς επίσης και αλληλεπίδραση με διάφορες πρωτεΐνες (βλέπε Πίνακα 1). Οι πρωτεΐνες αυτές είτε ρυθμίζουν την ενεργότητα των AP-2 είτε αλλάζουν την δική τους λειτουργία μέσω της σύνδεσης με τις AP-2 πρωτεΐνες.

Πίνακας 1: Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους AP-2 μεταγραφικούς παράγοντες (Ανατύπωση από:Eckert et al., Genome Biology, 2005, 6:246)

Protein	Description
APC	Adenomatous polyposis coli tumor suppressor
CITED2	Coactivator
CITED4	Coactivator
CDP	CCAAT displacement protein
DEK	Oncoprotein, chromatin remodeling
E1A	Transforming protein of adenovirus
c-Myc	Onco-protein
PARP	PolyADP-ribose polymerase
PAX-6	Transcription factor
PC4	Coactivator
P300/CBP	Coactivator
p53	Tumor suppressor
RAP74	Subunit of transcription factor TFIIIF
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor
SP1	Transcription factor
SV40T	Transforming protein of SV40 virus
UBC9	E2-conjugating enzyme
WWOX	Tumor suppressor
YB-1	Transcription factor
YY1	Transcription factor

Μία σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση του AP2a για την οποία λίγα είναι γνωστά είναι η σουμουλίσωση. Έχει δειχθεί πως ο AP-2a σουμουλώνεται στο καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο περιέχει τη διατηρημένη περιοχή πρόσδεσης του DNA και τις περιοχές διμερισμού (βλ. εικόνα 6). Περαιτέρω in vivo πειράματα σε θηλαστικά κύτταρα έχουν καταδείξει πως η σουμουλίσωση του AP2a συμβαίνει πάνω σε μια συντηρημένη λυσίνη στη θέση 10 και φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του [80].

3.7.1 AP2a ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο AP2a παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, τον πολλαπλασιασμό, και την απόπτωση και φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, το σχήμα των κυττάρων, την κυτταρική επικοινωνία ρυθμίζονται από την AP-2. Ως εκ

τούτου, η απώλεια ή απορρύθμιση της έκφρασης του AP2a μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, και τελικά ογκογένεση, εξέλιξη του όγκου, εισβολή ή μετάσταση. Σε προηγούμενες μελέτες, χαμηλή έκφραση του AP2a ή ακόμη και παντελής έλλειψη του, είχε αναφερθεί σε καρκίνο του μαστού, καρκίνο του παγκρέατος, καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καρκίνο των ωοθηκών, καρκίνο του προστάτη, καρκίνο του στομάχου, μελάνωμα, γλοίωμα, και κάποιους άλλους κακοήθεις όγκους [81,82]. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που η υπερέκφραση του AP2a μπορεί να συντελέσει στην δημιουργία και την ανάπτυξη του όγκου (π.χ. στον καρκίνο τραχήλου). Ο AP2a έχει συσχετιστεί κυρίως και με την εμφάνιση του καρκίνου του ρινοφάρυγγα χωρίς ωστόσο να είναι εξακριβωμένος και πλήρως αποσαφηνισμένος ο ακριβής του ρόλος, η κλινική σημασία ή ο μηχανισμός δράσης του [83]. Σε *in-vitro* πειράματα των Shi et al. (2014) φάνηκε η αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα στα καρκινικά κύτταρα υποδηλώνοντας πως θα μπορούσε ο AP2a να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης για καρκινώματα του ρινοφάρυγγα.

3.7.2 AP2a ΚΑΙ ΥΠΟΞΙΑ

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1, αρκετοί παράγοντες του μονοπατιού της υποξίας, όπως οι p300, CITED2/4 κ.α., αλληλεπιδρούν με τον AP2a. Επιπλέον, σε μελέτη των Shi et al. (2014) ανιχνεύθηκε υψηλή έκφραση του AP2a η οποία συσχετίστηκε με την αύξηση του ρινοφάρυγγικού καρκινώματος, την επιβίωση, αλλά και την έκφραση του HIF-1α στους καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές του ρινοφάρυγγα. Αποσιώπηση του AP2a ανέστειλε τη βιωσιμότητα των κυττάρων καρκινώματος και κατέστειλε την ανάπτυξη του όγκου και της πυκνότητας των μικροαγγείων *in vivo*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση άμεσης αλληλεπίδρασης που παρατηρήθηκε μεταξύ του AP2a και του HIF-1α, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πως ίσως ο AP2a εμπλέκεται στην HIF-1-εξαρτώμενη έκφραση του VEGF [83].

Αντίθετα στην περίπτωση του μελανώματος, όπου ο AP2a φαίνεται να έχει ογκοκατασταλτική δράση, (ενεργοποιώντας την έκφραση των p21Waf1/Cip1 και συνεπώς προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου). ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση του Ap2a με τον HIF2α και όχι με τον HIF1α, και η υπερέκφρασή του προκάλεσε μείωση της κυτταρικής μετάστασης [84].

3.8 ΣΚΟΠΟΣ

Προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου (εισαγωγή 3.5, αδημοσίευτα δεδομένα, Χαχάμη Γ., Μπασαγιάννη Α.) έδειξαν μείωση στη σουμοϋλίωση του ενδογενούς και υπερεκφρασμένου μεταγραφικού παράγοντα AP2a κατά την υποξία. Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω την αλληλεπίδραση του AP2a με παράγοντες υποξίας, προέκυψε η μελέτη αλληλεπίδρασης του AP2a με τους HIF1α και HIF2α.

Πρώτο βήμα της εργασίας αποτελεί η κλωνοποίηση τόσο αμινοτελικών, όσο και καρβοξυτελικών περιοχών του AP2a σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον επίτοπο HA, ένα μικρό πεπτίδιο που δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού των πρωτεϊνών που τον φέρουν.

Αφού ελεγχθούν για την σωστή έκφραση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους οι πλασμιδιακές αυτές κατασκευές θα αποτελέσουν εργαλείο για το δεύτερο σκέλος της διπλωματικής εργασίας που είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των επικρατειών του AP2a με τους παράγοντες HIF. Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης θα ακολουθηθεί ένα ειδικό πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες του AP2a μέσω αντισώματος έναντι του HA, προκειμένου να εντοπιστεί η συγκατακρήμνιση των HIF παραγόντων. Έτσι θα είναι δυνατό να βρεθεί η επικράτεια του AP2a που αλληλεπιδρά με τους HIF. Επιπλέον θα διερευνηθεί η επίδραση της σουμοϋλίωσης του AP2a στη σύνδεσή του με τους HIF, καθώς θα ελεγχθούν για την αλληλεπίδραση δύο πλασμιδιακές κατασκευές με την αμινοτελική επικράτεια του AP2a με ή χωρίς δυνατότητα σουμοϋλίωσης.

Συνοψίζοντας, με την παρούσα εργασία θα προσπαθήσουμε να ανακαλύψουμε περισσότερα δεδομένα που αφορούν στην αλληλεπίδραση των παραγόντων HIF και AP2a, και στο ρόλο που διαδραματίζει ο AP2a στην κυτταρική προσαρμογή στην υποξία και στην ανάπτυξη του καρκίνου.

4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. ΥΛΙΚΑ

4.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (USA) και Panreac AppliChem (USA).

4.1.2 ENZYMA ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα της Kappa DNA πολυμεράσης (Takara-Clontech) (5000 U/ml) και η Vent (New England Biolabs) (2000U/ml).

Πίνακας 2: Συγκέντρωση και εταιρεία προέλευσης των ενδονουκλεασών περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν

Ένζυμα περιορισμού	Συγκέντρωση	Εταιρεία προέλευσης
HindIII, BamHI, BglII	10000U/ml	NEB
XbaI, XhoI, SalI	20000U/ml	NEB
EcoRI	12000U/ml	Minotech
KpnI, SacI	10000U/ml	Fermentas

4.1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

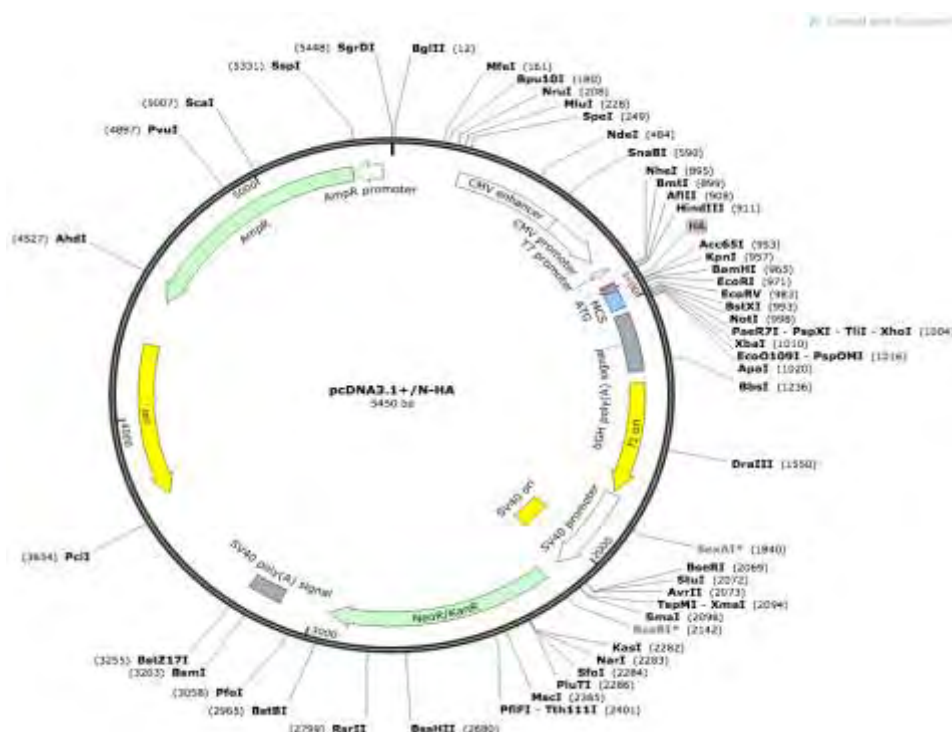
Τα προκαρυωτικά κύτταρα βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των πλασμιδιακών κατασκευών ήταν τα *E. coli* TOP10 της INVITROGEN (με ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη).

4.1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Οι ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα HeLa και HEK293. Τα HeLa είναι καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από καρκινικά ανθρώπινα κύτταρα τραχήλου της μήτρας, ενώ τα HEK293 είναι αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων εμβρυονικών κυττάρων νεφρού, που αρχικά δημιουργήθηκε με επιμόλυνση αυτών των κυττάρων με τμήμα του DNA του αδενοϊού 5.

4.1.5 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των επικρατειών του AP2a είναι ο pcDNA3.1-HA (παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της F. Melchior ZMBH, University of Heidelberg, Germany) και φέρει τον επίτοπο HA, ένα οκταπεπτίδιο (YPYDVPDYA-98-106aa) της ανθρώπινη αιματογλουτινίνης (Human influenza Hemagglutinin) στο αμινοτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. (Y: τυροσίνη, P: προλίνη, D: ασπαραγινικό οξύ, V: βαλίνη, A:αλανίνη). Ο πλασμιδιακός φορέας έχει μέγεθος αλληλουχίας 5450bp και υπάρχει σε τρεις μορφές (A-B-C) κατάλληλες για κάθε πλαίσιο ανάγνωσης. Ο φορέας φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και ο χάρτης πέψεων περιοριστικών ενδονουκλεασών παρουσιάζεται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10: χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1+/N-HA, όπου παρουσιάζονται οι θέσεις πέψεων από ενδονουκλεάσες περιορισμού (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/mammalian_expression_vectors/pcDNA3.1+N-HA/)

Επίσης, για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pcDNA-flag-HIF1α [15] και pcDNA-flag-HIF2α [85]. Το αρχικό πλασμίδιο pcDNA-flag παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της F. Melchior, ZMBH, University of Heidelberg, Germany

και εμφανίζει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

4.1.6 ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (4.6g/L) της BioSera, με 10% (v/v) εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (FBS- Fetal bovine serum) της BioSera και αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (PS- Merck Milipore Biochrom GmbH), με τελική συγκέντρωση στον ορό 100U/ml. Η πενικιλίνη είναι αντιβιοτικό που ανήκει στις β-λακτάμες και εμποδίζει την ανάπτυξη των Gram θετικών βακτηρίων, παρεμβαίνοντας στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ η στρεπτομυκίνη δρα εναντίον των Gram αρνητικών βακτηρίων και μυκοβακτηρίων, εμποδίζοντας την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία από πολυστυρένιο διαστάσεων 60mm x 15mm, με εμβαδόν περιοχής ανάπτυξης 21cm² και όγκο θρεπτικού μέσου 4ml και 100mm x 15mm με εμβαδόν περιοχής ανάπτυξης 55cm² και όγκο θρεπτικού μέσου 8ml.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κατάλληλο θάλαμο επώασης που διατηρεί σταθερή θερμοκρασία 37° C και 5% συγκέντρωση CO₂. Για την ανάπτυξη κυττάρων με υποξικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκε θάλαμος υποξίας InvivoO₂ της Baker Ruskin με 1% O₂. Τα κύτταρα παρέμεναν για 24 ώρες στον θάλαμο υποξίας πριν την συλλογή τους.

4.1.7 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

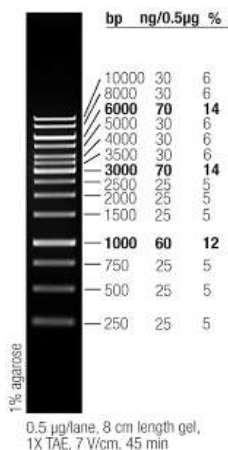
Για τις κλωνοποιήσεις επικρατειών του AP2α σχεδιάστηκαν εκκινητές (από την εταιρεία Eurofins Scientific) για τα επιθυμητά τμήματα που περιελάμβαναν τα πρώτα 165 αμινοξέα και από το αμινοξύ 165 ως το τέλος. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να περιέχουν αλληλουχίες, που αναγνωρίζονται από κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού, στην αρχή και στο τέλος των προς κλωνοποίηση επικρατειών. Αναλυτικότερα, για το τμήμα 1-165 αμινοξέων οι αλληλουχίες πένσης είναι για τα ένζυμα EcoRI στην αρχή και XhoI στο τέλος, ενώ για το τμήμα 165-437 τα BamHI και XhoI αντίστοιχα.

Πίνακας 3: Αλληλουχίες και στοιχεία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμημάτων του AP2a

Κωδική ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή με κατεύθυνση 5'→3'	Tm	GC %
1P FRW EcoRI	TCAGAAATTCATGCTTTGGAAATTG	55.9	33.3%
2L REV XhoI	AGTCTCGAGTCACTTTCTGTG	57.9	47.6%
REV XhoI	TTTCTCGAGTCACGGGTCTTCTAC	62.7	50,00%
FRW BamHI	TTTGGATCCCCGGGTATTAAC	57.9	47.6%

4.1.8 ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

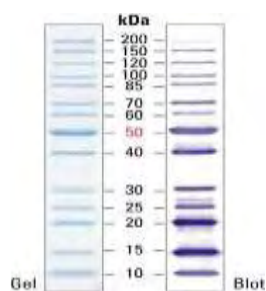
Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας Generuler 1kb DNA ladder της Fermentas (0,5mg/ml), με τον οποίο εμφανίζονται ζώνες στα μοριακά βάρη που φαίνονται στην εικόνα 11. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας, ο οποίος περιείχε τις πρωτεΐνες που φαίνονται στον πίνακα 4, ή ο μάρτυρας PageRuler protein ladder της Fermentas που φαίνεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 11: Μοριακά βάρη που αντιστοιχούν στις ζώνες του μάρτυρα Generuler 1kb DNA ladder της Fermentas (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση: https://www.fishersci.ca/shop/coupon.do?cid=PROD_4073117&fromPage=Browse&selectedCategoryId=104)

Πίνακας 4: Μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που περιέχονται στον μάρτυρα του εργαστηρίου της Βιοχημείας (homemade)

Bovine serum albumin	68kDa
Bovine hemaglobin	64,5kDa
Bovine cAMP protein kinase	40,58kDa
TEV purified	28kDa
Lysozyme chicken egg unite	14,7kDa



Εικόνα 12: ζώνες που αντιστοιχούν στα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που περιέχονται στον μάρτυρα PageRuler protein ladder της Fermentas (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26614>).

4.1.9 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στην ανοσοαποτύπωση ή στον ανοσοφθορισμό φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Λεπτομέρειες των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Αντίσωμα	Εταιρεία προέλευσης	Αραίωση	Οργανισμός προέλευσης
anti-HA	Covance	1:5000(ανοσοαποτύπωση) 1:1000(ανοσοφθορισμός)	ποντίκι
anti-HIF1α	Εργαστήριο Βιοχημείας Λάρισα	1:1000	κουνέλι
anti-HIF2α	Novus	1:1000	κουνέλι
anti-b-actin	Cell Signaling	1:5000	ποντίκι
anti-H3	SantaCruz	1:20000	κουνέλι
Anti-IgG ποντικίου συζευγμένο με HRP	Cell Signaling	1:10000	κατσίκα
Anti-IgG κουνελιού συζευγμένο με HRP	Cell Signaling	1:10000	κατσίκα
Anti-IgG ποντικίου συζευγμένο με Alexa Fluor-488	Molecular probes Invitrogen	1:1000(ανοσοφθορισμός)	κατσίκα

4.1.10 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

- LB ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Για 500ml θρεπτικού προστίθενται τα συστατικά όπως φαίνονται στον πίνακα 6. Για παρασκευή LB άγαρ προστίθεται στο υγρό θρεπτικό και 10gr άγαρ (agar bacteriological grade). Η προσθήκη αντιβιοτικού αμικικιλίνης (100μg/μl) γίνεται με αραίωση 1:1000 στο μέσο (0.1% v/v).

Πίνακας 6: Συστατικά που απαιτούνται για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου LB

Τρυπτόνη (tryptone)	5gr
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	2.5gr
NaCl	2.5gr

- ΤΥΜ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ

Για την παρασκευή θρεπτικού ΤΥΜ προστίθενται τα συστατικά όπως φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συστατικά και συγκεντρώσεις, που απαιτούνται για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου ΤΥΜ

Τρυπτόνη (tryptone)	2% (w/v)
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	0.5% (w/v)
NaCl	0.1M
MgSO ₄	10mM

- TFB-I

Για την παρασκευή του διαλύματος TFB-I, απαραίτητου στην διαδικασία σχηματισμού δεκτικών βακτηριακών κύτταρων, χρησιμοποιούνται τα συστατικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Το pH πρέπει να είναι 7,0 και αποστειρώνεται με φίλτρο.

Πίνακας 8: συστατικά του διαλύματος TFB-I και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους

CH ₃ COOK	30mM
MnCl ₂	50mM
KCl	100mM
CaCl ₂	10mM
Γλυκερόλη	15% (v/v)

- TFB-II

Για την παρασκευή του διαλύματος TFB-II χρησιμοποιούνται τα συστατικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Το pH πρέπει να είναι 7,0 και αποστειρώνεται με φίλτρο.

Πίνακας 9: συστατικά του διαλύματος TFB-II και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους

MOPS	10mM
CaCl ₂	75mM
KCl	10mM
Γλυκερόλη	20% (v/v)

- P₁ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA

Για την παρασκευή του διαλύματος P₁, για απομόνωση βακτηριακού DNA, χρησιμοποιούνται τα συστατικά που φαίνονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: συστατικά και οι συγκεντρώσεις του διαλύματος P₁

Tris-Cl (pH 8)	50mM
EDTA (pH 8)	10mM
RNAαση A	100μg/ml

- P₂ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA

Για την παρασκευή του διαλύματος P₂, για απομόνωση βακτηριακού DNA, χρησιμοποιούνται τα συστατικά που φαίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: συστατικά και οι συγκεντρώσεις του διαλύματος P₂

NaOH	200mM
SDS	1%(w/v)

- P₃ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA

Το διάλυμα P₃ αποτελείται από διάλυμα οξικού καλίου 3M σε pH 5.5

- TAE (Tris-acetate-EDTA)

Για την παρασκευή του διαλύματος 50x TAE, προστίθενται τα συστατικά του πίνακα 12. Χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα κατά την ηλεκτροφόρηση DNA, σε τελική συγκέντρωση 1x.

Πίνακας 12: συστατικά και οι συγκεντρώσεις του διαλύματος TAE 50x (pH 8.2 - 8.4 στους

25°C)

Σύσταση του 50X TAE buffer	συγκεντρώσεις
Tris acetate	2.0 M
EDTA	0.05 M

- PEI (Polyethylenimine)

Το PEI αραιώνεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1mg/ml. Το pH ρυθμίζεται στα 7.0 με 5M HCl.

- 10x SDS Running Buffer (ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ)

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (10x) που χρησιμοποιείται στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται τα συστατικά του πίνακα 11. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1x.

Πίνακας 11: συγκεντρώσεις των ουσιών που απαιτούνται για την παρασκευή του 10x SDS Running Buffer.

Tris	250mM
γλυκίνη	1.92M
SDS	0.5% (w/v)

- SDS Laemmli Loading buffer (διάλυμα φόρτωσης)

Το διάλυμα φόρτωσης που χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη λύματος πρωτεϊνών που προορίζονται για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, περιέχει τα συστατικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 12. Πριν τη χρήση προστίθεται DTT σε συγκέντρωση 10mM.

Πίνακας 12: συγκεντρώσεις των ουσιών που απαιτούνται για την παρασκευή του SDS Laemmli Loading buffer 1x

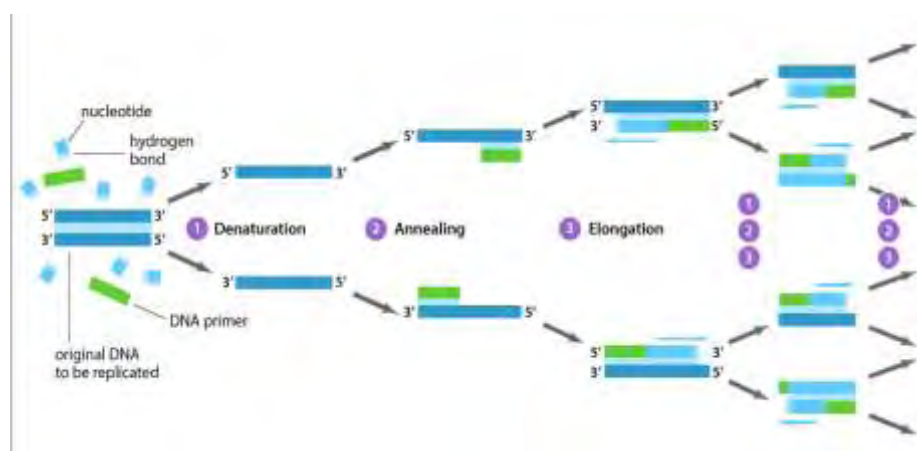
Tris pH 6.8	50mM
SDS	2% (w/v)
bromophenol blue	0.1% (w/v)
Glycerol	10% (v/v)

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR-Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μοριακή τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση τμημάτων DNA *in vitro*, μέσω κατάλληλων συμπληρωματικών ως προς το τμήμα του DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές). Η τεχνική βασίζεται στη χρήση επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων, κατά τους οποίους συμβαίνει διαδοχικά αποδιάταξη του εκμαγείου DNA, υβριδοποίηση των εκκινητών πάνω σε αυτό και επιμήκυνση του νέου DNA τμήματος με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης.

Στη φάση έναρξης εφαρμόζεται θερμοκρασία 94–96°C για ενεργοποίηση της πολυμεράσης και των υπολοίπων συστατικών στο μείγμα. Στη φάση αποδιάταξης αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA, καθώς σπάνε οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των βάσεων του DNA. Στη φάση υβριδοποίησης πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών στις μονές αλυσίδες του DNA ώστε η πολυμεράση να μπορέσει να προστεθεί και να ξεκινήσει την αντιγραφή. Η υβριδοποίηση των εκκινητών γίνεται σε θερμοκρασία που καθορίζεται από την σύσταση των εκκινητών. Στη φάση επιμήκυνσης γίνεται η σύνδεση της DNA πολυμεράσης και έναρξη της ημισυντηρητικής αντιγραφής, με προσθήκη dNTPs με κατεύθυνση 5' προς 3' στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Η ταχύτητα αντιγραφής της κάθε πολυμεράσης καθορίζει την διάρκεια αυτού του βήματος και το είδος της πολυμεράσης καθορίζει την θερμοκρασία δράσης της. Το βήμα αυτό ακολουθεί συνήθως θέρμανση στους 72-78°C για να επιβεβαιωθεί ότι ολοκληρώθηκε κι η αντιγραφή στις αλυσίδες από τον τελευταίο κύκλο αντιγραφής [86].



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων που πραγματοποιούνται κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ώστε να ενισχυθεί ένα τμήμα του DNA πολλές φορές (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_

Για την παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκαν PCR ώστε να ενισχυθούν οι επικράτειες 1-165αα του μεταγραφικού παράγοντα AP2a (πλασμίδιο pcDNA3.1-HA-AP2a wt πλήρους μεγέθους) αγρίου τύπου (wt), μεταλλαγμένου στην λυσίνη της θέσης 10, χάνοντας έτσι την ικανότητα σουμυλίωσής του (mut) (πλασμίδιο pcDNA3.1-HA-AP2a mut), και 165 ως 437αα. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν, έτσι ώστε να φέρουν αλληλουχίες που πέπτονται από συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού, ώστε να είναι δυνατή η κλωνοποίηση σε νέο φορέα έκφρασης. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR φαίνονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συστατικά και συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	1	2
DNA (AP2a αγρίου τύπου-wt ή μετάλλαγμα-mut) 10ngr/μl	5μl	5μl
Εκκινητής 5' άκρου (FRW 1)- 10pmol/μl	1.5μl	1.5μl
Εκκινητής 3' άκρου (RVS 1)- 10pmol/μl	1.5μl	1.5μl
dNTPs 10mM	1μl	1μl
Buffer πολυμεράσης 10x	5μl	5μl
DMSO	-	1.5μl
H ₂ O	35μl	33.5μl
Πολυμεράση (Vent /Kappa-2000U/ml)	1μl	1μl

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στην συσκευή PCR (Eppendorf Mastercycler® gradient Thermal cycler) με τις θερμοκρασίες που φαίνονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες σε κάθε φάση της PCR

Αρχική αποδιάταξη		95 ° C	5 λεπτά
35 κύκλοι	αποδιάταξη	95 ° C	30 δευτερόλεπτα
	Επαναδιάταξη-υβριδισμός εκκινητών	56 ° C	30 δευτερόλεπτα
	Επιμήκυνση	72 ° C	1 λεπτό
Τελική επιμήκυνση		72 ° C	5 λεπτά

4.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα τμήματα DNA που ενισχύθηκαν από την PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) με βρωμιούχο αιθίδιο (αραίωση 1:1000). Τα δείγματα φορτώθηκαν υπό την παρουσία διαλύματος φόρτωσης (5% γλυκερόλη, 0,42% μπλέ της βρωμοφαινόλης και 0,42% κυανόν του ξυλενίου) και η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε σε διάλυμα TAE 1x σε τάση περίπου 90-100Volts για 30 λεπτά. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Fermentas 1kb (βλ. 4.1.8).

4.2.3 ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλινδρομικές αλληλουχίες του DNA και τις διασπούν πάντα στο ίδιο σημείο. Μπορούν να θεωρηθούν σαν «μοριακά ψαλίδια» που κόβουν το DNA. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού απομονώθηκαν αρχικά από βακτήρια ως συστατικά ενός μηχανισμού άμυνας των βακτηρίων ενάντια σε εισβολή ξένου γενετικού υλικού. Χρησιμοποιούνται είτε για την δημιουργία συμπληρωματικών άκρων σε τμήματα DNA και την σύνδεσή τους και για τον έλεγχο κλωνοποίησης τμημάτων.

Για την κλωνοποίηση της επικράτειας του AP2a 122-437 πραγματοποιήθηκε πέψη του AP2a πλήρους μεγέθους (pcDNA3.1-HA-AP2a) με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI (high fidelity, 20U/μl της NEB) -XhoI (20U/μl της NEB). Για την κλωνοποίηση των τμημάτων 1-165 wt, mut και 165-437 χρησιμοποιήθηκε το DNA που ενισχύθηκε μέσω της PCR και πραγματοποιήθηκαν επίσης πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού, που φαίνονται στον πίνακα 15. Πλασμιδιακοί φορείς pcDNA3.1+/N-HA (C για τις κλωνοποιήσεις του AP2a 1-165wt και mut και AP2a 165-437, B για την κλωνοποίηση του AP2a 122-437) υποβλήθηκαν κι αυτοί σε πέψεις με αντίστοιχα ένζυμα με αυτά των ενθεμάτων.

Πίνακας 15: ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των τμημάτων του AP2a και κλωνοποίησή τους

Κλωνοποιήσεις	Ένζυμα περιορισμού
AP2a 1-165wt	EcoRI-XhoI
AP2a 1-165 mut	EcoRI-XhoI

AP2a 165-437	BamHI-XhoI
AP2a 122-437	BamHI-XhoI

Για τις πέψεις κλωνοποίησης έγινε η παρακάτω αντίδραση:

- 5μgr του DNA (αρχικού πλασμιδίου ή από τα τμήματα που ενισχύθηκαν μέσω της PCR όπου χρησιμοποιήθηκαν 20μl)
- 5 μl buffer Cutsmart της New England Biolabs (NEB)
- 0.5μl από κάθε ένζυμο
- H₂O μέχρι τελικό όγκο 50μl

Έγινε επώαση στους 37° C για 3 ώρες.

Επίσης, πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιήθηκαν για έλεγχο των ενθεμάτων μετά την ολοκλήρωση των κλωνοποιήσεων στους πλασμιδιακούς φορείς.

Για τις πέψεις ελέγχου έγινε η παρακάτω αντίδραση:

- 5μl DNA
- 2μl buffer CutSmart (της NEB)
- 0.2μl από κάθε ένζυμο
- H₂O μέχρι τελικό όγκο 20μl

Έγινε επώαση στους 37° C για 1.5 ώρα.

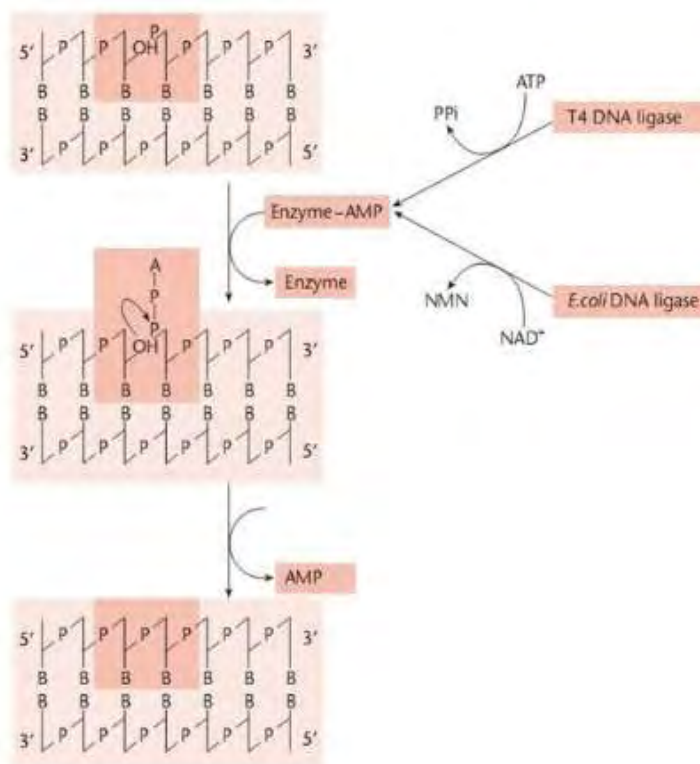
4.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα δείγματα DNA μετά τις πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (δες 4.2). Η πηκτή μετά την ηλεκτροφόρηση τοποθετήθηκε σε συσκευή UV (UV transilluminator της Vilber Lourmat) υπεριώδους φωτός μήκος κύματος 312nm, όπου οι επιθυμητές ζώνες του DNA φθορίζουν λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκεκριμένα μοριακά βάρη. Το κομμάτι αгарόζης που περιέχει το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει αποκόπηκε από την πηκτή αгарόζης, και πραγματοποιείται καθαρισμός του DNA με χρήση kit της BioLine (ISOLATE II PCR AND GEL kit) ή της QIAGEN (QIAquick® gel extraction kit), σύμφωνα με τις οδηγίες των

κατασκευαστών. Η έκλυση του DNA στο τελικό βήμα της απομόνωσης έγινε με 30μl αποστειρωμένου H₂O ή με Tris-Cl (10mM, pH 7.5). Τελικά έγινε η μέτρηση της συγκέντρωσης των απομονωμένων πλασμιδιακών φορέων και των επικρατειών του AP2a με μικροφωτομέτρηση (NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer της Thermo Scientific).

4.2.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

Η αντίδραση λιγάσης είναι η συνένωση τμημάτων DNA με ομοιοπολικούς δεσμούς με σκοπό τη δημιουργία νέων μορίων DNA ή πλασμιδίων. Η DNA λιγάση ενώνει ομοιοπολικά συνεκτικά άκρα που παράγονται από ορισμένα ένζυμα περιορισμού, ή καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ κολλώδων ή λείων (τυφλών) άκρων.



Εικόνα 14: δράση της DNA λιγάσης προς σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://vlab.amrita.edu/?>)

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 είναι ένα πολυπεπτίδιο με ένα M.B. 68.000 Dalton που απαιτούν ATP ως πηγή ενέργειας. Η μέγιστη εμβέλεια του pH δραστηρότητας είναι 7.5-8.0. Η παρουσία ιόντων Mg⁺⁺ απαιτούνται και η βέλτιστη συγκέντρωσή τους είναι 10 mM. Η T4 DNA λιγάσης έχει τη μοναδική ικανότητα να ενώνει κολλώδη και λεία άκρα. Σύνδεση

συνεκτικών άκρων διεξάγεται καλύτερα στους 12°C έως 16°C για να διατηρηθεί μια καλή ισορροπία μεταξύ υβριδισμού των άκρων και της δραστηριότητας του ενζύμου. Εάν η αντίδραση έχει ρυθμιστεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο υβριδισμός των άκρων γίνεται δύσκολα, ενώ οι χαμηλότερες θερμοκρασίες μειώνουν την δραστικότητα της λιγάσης.

Στον πίνακα 16 φαίνεται η αντίδραση λιγάσης, όπου x είναι η συγκέντρωση του πλασμιδιακού φορέα (στην περίπτωσή μας 50ng). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 16°C στην συσκευή της PCR κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Πίνακας 16: Αναλογίες των συστατικών που χρειάζονται για την αντίδραση λιγάσης

	1 (control)	2	3
Πλασμιδιακός φορέας	x	x	x
Επικράτεια του AP2a	-	5x	10x
Buffer λιγάσης	2μl	2μl	2μl
T ₄ λιγάση (της BioLabs, 400,000U/ml)	1μl	1μl	1μl
H ₂ O	ως 20μl	ως 20μl	ως 20μl

Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η Quick-Stick Ligase της BioLine αντί αυτής της BioLabs σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, σύμφωνα με τις οποίες προστίθεται συνολική μάζα 100ngr πλασμιδίου και ενθέματος με διπλάσια συγκέντρωση όμως, του πλασμιδίου. Στη συνέχεια προστίθεται νερό ως 14 μl, ρυθμιστικό διάλυμα buffer 4xQS 5μl και η λιγάση Quick stick της BioLine 1μl. Η αντίδραση επωάζεται στους 25°C για 15 λεπτά.

4.2.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (TOP10)

Σε αυτή την τεχνική γίνεται κατεργασία των βακτηρίων σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων κατιόντων, κυρίως CaCl₂, με αποτέλεσμα οι κυτταρικές μεμβράνες να γίνονται ευκολότερα διαπερατές σε κυκλικό DNA (π.χ. πλασμίδια). Αναλυτικά:

- Μια αποικία βακτηρίων *Escherichia coli* TOP10 strain (βρίσκονται σε διάλυμα αποθήκευσης με γλυκερόλη στους -80° C), εμβολιάστηκε σε 3ml TYM θρεπτικό υλικό στο οποίο έχουν προστεθεί 5μl στρεπτομυκίνης (100μg/μl)

- Ακολούθησε ανάδευση στους 37° C περίπου 16 ώρες (over night)
- Από την καλλιέργεια, που αναπτύχθηκε όλη τη νύχτα, χρησιμοποιούνται 150μl για εμβολιασμό σε 3ml νέου TYM θρεπτικού υλικού, χωρίς αντιβιοτικό και αναδεύτηκαν για περίπου 1 ώρα
- Σε 50ml TYM, χωρίς αντιβιοτικά προστέθηκε 1ml από την αναπτυσσόμενη καλλιέργεια και επώαστηκε στους 37° C με ανακίνηση, μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει την τιμή 0.350-0.400 (μέτρηση στα 600nm)
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 3000rpm (στροφές ανά λεπτό) στους 4°C
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκε σε 25ml TFB-I διάλυμα
- Τα βακτήρια επώαστηκαν 10 λεπτά στον πάγο
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000rpm για 5 λεπτά στους 4°C
- Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκε σε 2ml TFB-II διάλυμα
- Τα βακτήρια επώαστηκαν 60 λεπτά στον πάγο
- και αποθηκεύτηκαν στους -80°C

4.2.7 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ TOP10)

Με την διαδικασία του μετασχηματισμού είναι δυνατή η μεταφορά ξένου DNA σε βακτηριακά κύτταρα δέκτες. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός για την είσοδο των επικρατειών του AP2a που έχουν κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακούς φορείς και την έκφραση των πρωτεϊνών που προκύπτουν από αυτές τις επικράτειες σε βακτήρια. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

- Σε 50μl εναιωρήματος δεκτικών κυττάρων από τους -80°C(δες 4.6) προστέθηκαν 20μl αντιδράσεων λιγάσης.
- Τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά

- Ακολούθησε θερμικό σοκ «Heatshock» με μεταφορά στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα και
- περαιτέρω επώαση των κυττάρων σε πάγο για 2 λεπτά
- Ακολούθησε προσθήκη 1ml LB υγρού θρεπτικού μέσου
- Επώαση στους 37°C με ανακίνηση για 1 ώρα
- Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 4000rpm για 5 λεπτά
- Έγινε αφαίρεση 800μl υπερκειμένου θρεπτικού υλικού και επαναδιάλυση του ιζήματος στο υπόλοιπο θρεπτικό
- Ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλίο με LB άγαρ και αμπικιλίνη
- Τα τρυβλία επώστηκαν σε κλίβανο 37°C μέχρι την επόμενη ημέρα (over night). Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων έγινε παρουσία αμπικιλίνης.

4.2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Επιλέχθηκε ένας αριθμός αποικιών (6-10), από αυτές που αναπτύχθηκαν από τον μετασχηματισμό των βακτηρίων (βλ. 4.2.7) και εμβολιάστηκαν, η κάθε μία ξεχωριστά, σε 3ml LB υγρό θρεπτικό υλικό με αμπικιλίνη (Cooper Pharmaceuticals) σε αραιώση 1:1000 (v/v) και επώστηκαν στους 37°C με ανακίνηση μέχρι την επόμενη ημέρα.

Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (minis) από τις υγρές καλλιέργειες

- Τα 3ml των καλλιεργειών φυγοκεντρήθηκαν διαδοχικά στο ίδιο eppendorf των 1.5ml στα 6000rpm για 6 λεπτά και στο ίζημα που σχηματίστηκε, προστέθηκαν 300μl από το διάλυμα P1 (κρύο). Ακολούθησε vortex, για να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
- Προστέθηκαν 300μl P2 διαλύματος και ακολούθησε ελαφριά ανακίνηση για ανάμιξη των συστατικών και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
- Ακολούθησε προσθήκη 300μl P3 διαλύματος, ανακίνηση και φυγοκέντρωση στα 13,400rpm για 40 λεπτά.

- Έγινε μεταφορά του εναιωρήματος και προσθήκη σε αυτό 600μl ισοπροπανόλης (σε όγκο εναιωρήματος 850μl) και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13,400rpm για 30 λεπτά.
- Αφαιρέθηκε το εναιώρημα και στο ίζημα που σχηματίστηκε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης (70%)
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13,400rpm για 15 λεπτά.
- Αφαιρέθηκε το εναιώρημα και το ίζημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει
- Πραγματοποιήθηκε τέλος προσθήκη 20μl H₂O (απιονισμένου και αποστειρωμένου) και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος.

4.2.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ

Η υγρή καλλιέργεια μίας αποικίας που έδωσε θετικό αποτέλεσμα ύστερα από πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε για νέο εμβολιασμό σε 200ml LB υγρού θρεπτικού υλικού με αμπικιλίνη και ανάπτυξή της μέχρι την επόμενη ημέρα.

Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midi) με kit της Macherey-Nagel (NucleoBond Xtra plasmid purification), σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή, παραλαμβάνοντας τελικά 300μl πλασμιδιακού DNA σε 10mM Tris-Cl pH 7.5. Η απομόνωση στηρίζεται στην αρχή αλκαλικής λύσης. Συνοπτικά, ίζημα βακτηρίων επαναδιαλύεται σε ένα φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA. Ο σκοπός του EDTA είναι να λειτουργήσει ως χηλικός παράγοντας δισθενών κατιόντων μετάλλων όπως Mg²⁺ και Ca²⁺, τα οποία απαιτούνται για τη λειτουργία των ενζύμων DNA αποικοδόμησης (DNAσες) και επίσης χρησιμεύει στη σταθεροποίηση του φωσφορικού σκελετού του DNA.

Το μίγμα επωάζεται με το απορρυπαντικό δωδεκυλο-θειικό νάτριο (SDS) και μία ισχυρή βάση όπως το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Κατά τη διάρκεια της επώασης, το απορρυπαντικό διαταράσσει τις κυτταρικές μεμβράνες και επιτρέπει το αλκαλικό να έρθει σε επαφή και να μετουσιώσει τόσο το χρωμοσωμικό όσο και το πλασμιδιακό DNA.

Τέλος, προστίθεται οξικό κάλιο. Αυτό οξινίζει το διάλυμα και επιτρέπει την αναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, αλλά όχι του χρωμοσωμικού DNA, το οποίο καθιζάνει από το διάλυμα.

Μια άλλη λειτουργία του καλίου είναι να προκαλέσει την καθίζηση του δωδεκυλο-θεικού νατρίου και έτσι την απομάκρυνση του απορρυπαντικού. Η τελική φυγοκέντρωση διεξάγεται, και αυτή τη φορά το ίζημα περιέχει μόνο υπολείμματα και μπορεί να απορριφθεί. Το υπερκείμενο που περιέχει τα πλασμίδια προσεκτικά απομακρύνεται και μπορεί να καθαριστεί περαιτέρω ή να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση, όπως σε ηλεκτροφόρηση πηκτής .

4.2.10 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Οι επικράτειες του AP2a 1-165 wt, 1-165 mut και 165-437, κλωνοποιημένες στους πλασμιδιακούς φορείς, στάλθηκαν για αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην εταιρεία VBC Biotech χρησιμοποιώντας εμπορικούς εκκινητές (T7) ειδικούς για τον φορέα pcDNA3.

4.2.11 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Τα κύτταρα HeLa αναπτύσσονται με χρόνο διπλασιασμού 23 ώρες, ενώ τα HEK293 με χρόνο διπλασιασμού 24-36 ώρες. Μετά από δύο περίπου μέρες ανάπτυξής τους σε θάλαμο επώασης και έχοντας φτάσει σε συγκέντρωση πάνω από 80% της πλήρης ανάπτυξης στο εμβαδόν του χώρου του τρυβλίου, απαιτείται ανακαλλιέργεια. Για την διαδικασία αυτή αφαιρέθηκε όλο το θρεπτικό στο οποίο αναπτύσσονταν τα κύτταρα, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1% (w/v) PBS για να αφαιρεθεί το υπόλοιπο θρεπτικό και τα νεκρά κύτταρα που παρέμειναν στο τρυβλίο. Στη συνέχεια, προστέθηκε τρυψίνη (τρυψίνη-EDTA 1x σε PBS της BioSera), για να ανασηκωθούν τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα στη βάση του τρυβλίου και τοποθετήθηκε στον θάλαμο επώασης στους 37° C για 5 λεπτά. Έπειτα προστέθηκε θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκε μία ποσότητα από το θρεπτικό με τα κύτταρα που έχουν ανασηκωθεί σε νέο τρυβλίο με κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού.

4.2.12 ΠΑΓΩΜΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Οι καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων μπορούν να παγώσουν και να αποθηκευτούν σε υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την αφαίρεση του θρεπτικού ανάπτυξης των κυττάρων και προσθήκη τρυψίνης για να σπάσουν οι δεσμοί που συγκρατούν τα κύτταρα στο τρυβλίο, προσθήκη νέου θρεπτικού και μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα falcon 15ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1000rpm για 5 λεπτά, αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη στο κυτταρικό ίζημα 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) αραιωμένο σε ορό βοοειδούς (fetal bovine serum- ultra low endotoxin της BioSera). Μετά από

διατήρηση των κυττάρων σε πάγο για 1 ώρα και αποθήκευση για ένα βράδυ στους -80°C τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο.

Για την επανέναρξη των κυτταροκαλλιιεργειών τα κύτταρα αποψύχθηκαν με θέρμανση στους 37°C . Στη συνέχεια, προστέθηκαν σταδιακά με μικρές ποσότητες θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό βοοειδούς. Ακολούθησε μεταφορά του θρεπτικού με τα κύτταρα σε κατάλληλου μεγέθους τρυβλίο και επώαση στους 37°C για ανάπτυξη τους.

4.2.13 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την μεταφορά πλασμιδιακού DNA μέσα σε ευκαρυωτικά κύτταρα με σκοπό την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων ως πρωτεΐνες σύντηξης με χαρακτηριστικές αλληλουχίες που είναι εύκολα ανιχνεύσιμες. Η διαμόλυνση έγινε με τη χρήση μη λιπιδιακής κατιοντικής φύσεως πολυμερούς, όπως η πολυαιθυλενιμίνη (PEI). Το PEI είναι ένα οργανικό πολυμερές, το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αμινικές ομάδες που μπορούν να πρωτονιωθούν (Boussif et al., 1995). Σε φυσιολογικό pH, το πολυκατιόν είναι πολύ αποτελεσματικό στην σύνδεση στο DNA και μπορεί να ρυθμίσει την μεταφορά του σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το PEI συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια που συνδέονται στα ανιονικά κατάλοιπα της κυτταρικής επιφανείας και εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο η πρωτονίωση των αμινών οδηγεί σε είσοδο αντίθετων ιόντων και μείωση του οσμωτικού δυναμικού, καταλήγοντας στην διάρρηξη του κυστιδίου και την απελευθέρωση του συμπλέγματος πολυμερούς-DNA στο κυτταρόπλασμα. Όταν το σύμπλεγμα ξεπακεταριστεί είναι ελεύθερο να διαχυθεί στον πυρήνα [87,88].

Για την διαμόλυνση των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς ετοιμάστηκε ένα μίγμα 1.5ml DMEM χωρίς FBS και χωρίς αντιβιοτικά, 15μg DNA για τρυβλία των 10cm και 30μl PEI. Μετά από ανάμιξη το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 4.5ml DMEM με 5% FBS και τέλος το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα από τα οποία είχε αφαιρεθεί το παλιό θρεπτικό υλικό και είχαν ξεπλυθεί με PBS. Μετά το πέρας τεσσάρων ωρών αφαιρέθηκε το θρεπτικό με το PEI και προστέθηκε DMEM με 10% FBS και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω για 24 ώρες σε κατάλληλο θάλαμο επώασης. Ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το πλασμίδιο. Για την επιμόλυνση μικρότερων τρυβλίων (6cm) οι ποσότητες του μίγματος μειώθηκαν στο μισό.

4.2.14 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Για την παρασκευή εκχυλίσματος πρωτεϊνών από κύτταρα αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό τους και ακολούθησε πλύση με κρύο PBS 1x. Στη συνέχεια προστέθηκε 150μl από το διάλυμα λύσης (150mM NaCl, 50mM Hepes-NaOH pH 7.6, 1% (v/v) Triton X-100, 2mM MgCl₂, 2mM PMSF, 0,1%(v/v)AP, 0,1%(v/v) LP, 1% (v/v) NEM 1mM, όπου PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1M, AP: aprotinin 1mg/ml, LP: leupeptin 1mg/ml, NEM: N-Ethylmaleimide) και ακολούθησε απόξεση των κυττάρων και μεταφορά τους στον πάγο, σε eppendorf των 1.5ml, για 15 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση 30 λεπτών σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C προστέθηκε 4xSDS+DTT (100mM). Ακολούθησε βράσιμο των δειγμάτων στους 95°C ώστε να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση ή να χρησιμοποιηθούν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα για ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών.

Εναλλακτικά, προστέθηκε 2xSDS+100 mM DTT κατευθείαν στο τρυβλίο των κυττάρων και ακολούθησε απόξεση των κυττάρων, εφαρμογή υπερήχων (sonication) για 10 δευτερόλεπτα και βρασμός στους 95°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα αναλύθηκαν απευθείας με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

4.2.15 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE: SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)

Η μετακίνηση ηλεκτρισμένων φορτίων μέσα σε ηλεκτρικό φορτίο είναι η βάση στην οποία στηρίζεται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης, ώστε να διαχωριστούν πρωτεΐνες, DNA και RNA. Ο διαχωρισμός των μορίων πραγματοποιείται μέσα σε πήκτωμα, καθώς αυτό λειτουργεί ως μοριακός ηθμός των μορίων που θα διαχωριστούν. Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου σχηματίζεται από τις αλειφατικές αλυσίδες του πολυακρυλαμίδιου και από μόρια N-N μεθυλενόδις-ακρυλαμίδιου (MDA), δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο πλέγμα. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθός τους, επειδή τα μεγαλύτερα καθυστερούν να περάσουν από τους πόρους του πηκτώματος, ενώ τα μικρότερα διέρχονται ευκολότερα. Μεγαλύτεροι πόροι πηκτώματος σχηματίζονται σε μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου και αντίστροφα.

Για να σχηματιστεί το πλέγμα της πηκτής με τον πολυμερισμό του πολυακρυλαμίδιου χρειάζονται δύο παράγοντες, το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και το TEMED(N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο). Το TEMED λειτουργεί ως καταλύτης

σχηματισμού των ελεύθερων ριζών από το APS, που χρησιμοποιούνται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Κατά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, εκτός από τη διάκριση των πρωτεϊνών με βάση τη μάζα, τα μόρια μπορούν να κινηθούν διαφορετικά λόγω του ηλεκτρικού τους φορτίου (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης) ή με βάση άλλες φυσικές ιδιότητές τους. Στην SDS-PAGE οι πρωτεΐνες αναμιγνύονται με αποδιατακτικό διάλυμα SDS, ένα ανιονικό απορρυπαντικό που φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες. Στο μίγμα προστίθενται παράγοντες που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, που σχηματίζονται μεταξύ δύο -SH κυστεϊνών στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών, όπως η μερκαπτοαιθανόλη και η διθειοθρεϊτόλη (DTT). Για να αποδιαταχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες υφίστανται θέρμανση.

Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, καθώς χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικής συγκέντρωσης πηκτώματα. Το πιο αραιό, χαρακτηρίζεται ως πηκτώμα πακεταρίσματος (stacking gel) και χρησιμεύει στην συμπίκνωση των πρωτεϊνών σε μια μικρή ζώνη, πριν περάσουν στο επόμενο πηκτώμα. Το δεύτερο πηκτώμα που βρίσκεται κάτω ακριβώς από το πηκτώμα πακεταρίσματος είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και ονομάζεται πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel). Η SDS-PAGE πραγματοποιείται σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης [89].

Για την παρασκευή πηκτής διαχωρισμού (separating gel) 15% περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο χρειάστηκαν 2.4ml πολυακρυλαμιδίου (από διάλυμα 30% v/v), 1.25ml ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS), 1.35ml νερό, 20μl 10% υπερθειϊκό αμμώνιο (APS), 10μl TEMED (Tetramethylethylenediamine).

Για την πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel), χρειάστηκαν 0.6ml πολυακρυλαμιδίου (από διάλυμα 30% v/v), 1ml ρυθμιστικού διαλύματος επιστοιβαξης (0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS), 2.5ml νερό, 25μl 10% υπερθειϊκό αμμώνιο (APS), 12.5μl TEMED. Οι θέσεις εισαγωγής δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρέθηκε μετά τον πολυμερισμό της πηκτής. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται και ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100-120Volts. Τα δείγματα φορτώθηκαν με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton.

4.2.16 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOTTING)

Παρότι η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών δίνει αρκετές πληροφορίες για τις πρωτεΐνες που

αναλύονται, όπως τα ισοηλεκτρικά σημεία τους ή τα μοριακά βάρη, δεν καθιστά δυνατή την ταυτοποίησή τους. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την αναγνώριση των πρωτεϊνών είναι το ανοσοαποτύπωμα κατά Western.

Η αναλυτική μέθοδος ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιεί τις πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά, μεταφέροντάς τις από το πήκτωμα διαχωρισμού σε μία μεμβράνη, η οποία θα υποβληθεί στη συνέχεια σε κατεργασία με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα, όταν βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης, σε σχέση με το πήκτωμα. Επιπλέον, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί ή και να αποθηκευτεί. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση και να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος της διαδικασίας.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης, μπορεί να ξεκινήσει η ανοσοανίχνευση, μια διαδικασία που εφαρμόζεται τόσο σε αποδιαταγμένες, όσο και σε μη-αποδιαταγμένες πρωτεΐνες. Σημαντικό για την ειδική σύνδεση των αντισωμάτων στις πρωτεΐνες-στόχους της μεμβράνης είναι να αποτραπούν ή να ελαχιστοποιηθούν οι μη-ειδικές συνδέσεις στην μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα (blocking solution) είτε αλβουμίνης ορού βοός (1%-5% δμ. bovine serum albumin, BSA) ή σε άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk).

Κατά τη διαδικασία ανοσοανίχνευσης χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα. Το πρώτο στοχεύει στην πρωτεΐνη-στόχο και καλείται πρωτογενές. Η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. PBS) με κάποιο απορρυπαντικό (π.χ. Tween-20), ή στο διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (blocking solution). Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται, ώστε να αφαιρεθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα και ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος. Η περιοχή αυτή είναι ειδική του ζώου από το οποίο απομονώθηκαν τα αντισώματα. Στο δευτερογενές αντίσωμα βρίσκεται και συνδεδεμένο ομοιοπολικά το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase), που θα χρησιμεύσει στην ανίχνευση μέσω της αντίδρασης της χημειοφωταύγειας [90].

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ: Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκε πάνω από μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανάμεσα σε 2 διηθητικά χαρτιά, τα οποία είχαν εμποτιστεί σε διάλυμα Tris-Βορικού οξέος (125 mM Tris, 0,2% SDS, 0,5 mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας Βορικού οξέος ως 8.5). Η μεταφορά έγινε σε

συσκευή ημί-ξηρής μεταφοράς πρωτεϊνών της Biorad (semi-dry transfer), με σταθερή ηλεκτρική τάση στα 10 Volts για 70 λεπτά. Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκε με χρωστική Ponceau (0.5 % w/v Ponceau S σε οξικό οξύ), για να σημειωθούν οι ζώνες του μάρτυρα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ: Η μεμβράνη στη συνέχεια ξεπλύθηκε με PBS-0.1% (v/v) Tween και για μια ώρα επώαστηκε με διάλυμα κορεσμού (πρωτεΐνες γάλακτος) 5% γάλα σε σκόνη (w/v) σε PBS-0.1% Tween. Ακολούθησε επώαση του αντισώματος καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας με ανακίνηση στους 4°C, 3 πλύσεις 5 λεπτών με PBS-0.1% (v/v) Tween, επώαση δεύτερου αντισώματος για μία ώρα, 3 πλύσεις 5 λεπτών με PBS-0.1% (v/v) Tween και εμφάνιση της μεμβράνης. Το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών έγινε ανίχνευση με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Στη χημειοφωταύγεια εκλύεται φως ως αποτέλεσμα της χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η υπεροξειδάση καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον την οξειδωση της λουμινόλης, κάτω από την επίδραση του H₂O₂, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η μεμβράνη επώαστηκε για ένα λεπτό σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης, στο οποίο προστέθηκαν 30 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software για την λήψη και επεξεργασία του σήματος των πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν.

4.2.17 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΜΜΕΣΟ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ (Indirect Immunofluorence)

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών πρωτεϊνών πραγματοποιείται με την χρήση αντισωμάτων ειδικών για αυτές. Τα αντισώματα μπορεί να είναι συζευγμένα με μια φθορίζουσα ουσία –φθορίζων αντίσωμα (άμεσος ανοσοφθορισμός) ή να αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα που φέρει τη φθορίζουσα ομάδα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Έτσι, εφαρμόζοντας δέσμη φωτός με κατάλληλο μήκος κύματος επιτυγχάνεται η παρατήρηση του φθορισμού με τη χρήση μικροσκοπίου.

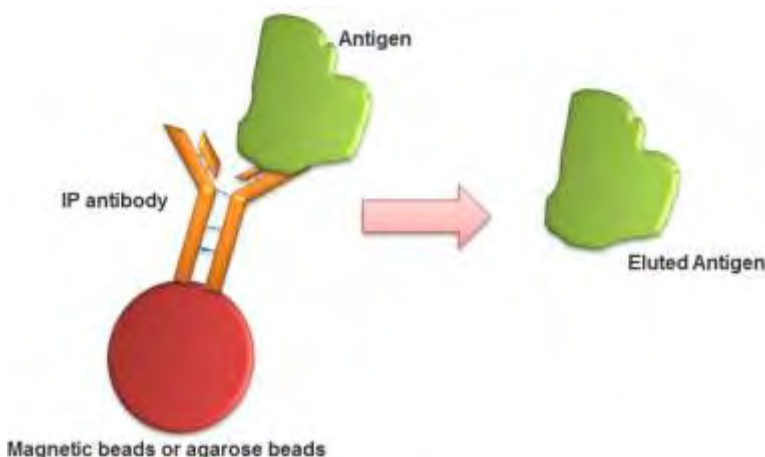
Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνικών επικρατειών του AP2a που εκφράστηκαν, κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες 12mm και διαμολύνθηκαν με τα κλωνοποιημένα πλασμίδια για 24 ώρες (δες 4.13). Οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη 3.7% (v/v) φορμαλδεΰδης σε PBS για 5 λεπτά. Μετά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS δύο φορές και διατηρήθηκαν στους 4°C. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε

η δημιουργία διαπερατών μεμβρανών με προσθήκη ήπιου απορρυπαντικού Triton x-100 0.2% (v/v) σε PBS και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα των κυττάρων με PBS δύο φορές και προσθήκη 3% (w/v) BSA(bovine serum albumin) σε PBS-0.1%(v/v) Tween για μία ώρα, ώστε να μην πραγματοποιηθούν μη ειδικές συνδέσεις του αντισώματος. Το αντίσωμα, anti-HA, σε αραίωση 1:1000 σε 1% (w/v) BSA, προστέθηκε για 1.5 ώρα πάνω στις καλυπτρίδες. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1% (w/v) BSA- PBS-0.1% (v/v) Tween και ακολούθησε επώαση του δεύτερου αντισώματος (Alexa 488, έναντι της IgG ποντικού σε αραίωση 1:1000 σε 1% (w/v) BSA) για μία ώρα. Έπειτα οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 1%(w/v) BSA- PBS-0.1% (v/v) Tween, δύο φορές με PBS και μια με νερό. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα διάλυμα μονιμοποίησης MOWIOL (polyvinylalkohol 4-88 της Sigma-Aldrich Chemistry) που περιέχει τη χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), η οποία δεσμεύεται στην χρωματίνη, καθιστώντας έτσι ορατή τη θέση των πυρήνων.

Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Imager.Z2 με αντικειμενικό φακό Plan-NEOFLUAR 100x και η λήψη των εικόνων έγινε με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Zen Zeiss pro 2011. Η επεξεργασία και ο χρωματισμός των εικόνων έγιναν με το λογισμικό πρόγραμμα Fiji ImageJ.

4.2.18 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ (IMMUNOPRECIPITATION-IP)

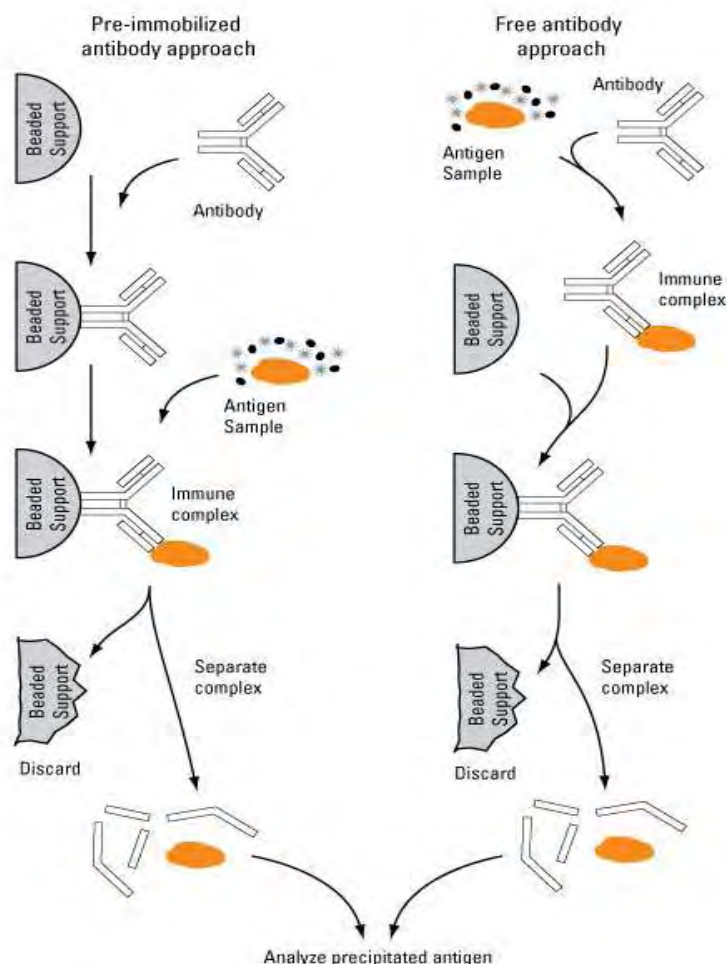
Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία ανοσολογική μέθοδος με βάση τη συγγένεια αντιγόνων, με αντισώματα που είναι ακινητοποιημένα σε στερεό υπόστρωμα, όπως η ρητίνη αгарόζης ή μαγνητικά σφαιρίδια. Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων από κύτταρα ή λύματα ιστών.



Εικόνα 14 : απεικόνιση του αντισώματος ειδικού για το αντιγόνο ακινητοποιημένο στα

σφαιρίδια (ανατύπωση από την ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://www.sinobiological.com/protein-purification-immunoprecipitation-ip.html>).

Αρχικά αναπτύχθηκε ως προσαρμογή της παραδοσιακής χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη, η οποία επιτρέπει στο δείγμα, το διάλυμα πλύσης και τα υπόλοιπα διαλύματα να διέλθουν μέσα από μία στήλη γεμάτη από πορώδη ρητίνη (συνήθως σφαιρίδια αгарόζης). Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη A (πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή των IgG ανοσοσφαιρινών. Σε κάθε βήμα το διάλυμα προστίθεται στα σφαιρίδια, τα οποία αναμιγνύονται και επωάζονται ως μίγμα. Στο τέλος τα σφαιρίδια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στον πυθμένα. Σε αντίθεση με την χρωματογραφία συγγένειας στήλης ο στόχος του IP είναι να απομονώσει αρκετή ποσότητα της πρωτεΐνης για περαιτέρω ανάλυση [91].



Εικόνα 15: διάγραμμα ανοσοκατακρήμνισης με χρήση προ-ακινητοποιημένων ή ελευθέρων αντισωμάτων (ανατύπωση από ηλεκτρονική διεύθυνση:

Σε διαμολυσμένα κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες από τα πλασμίδια που εισάγαμε, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό διάλυμα λύσης (βλ. Μέθοδοι 4.2.14). Συλλέχθηκε δείγμα σε 4x SDS +DTT (input) για περαιτέρω ανάλυση και τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με ανακίνηση για 16 ώρες στους 4°C, με σφαιρίδια προ-δεσμευμένα με αντίσωμα HA (prot A-HA beads slurry της Sigma Aldrich) σε ποσότητα αντίστοιχη με το 1:10 του όγκου των εκχυλισμάτων (30μl ανά δείγμα). Τα σφαιρίδια είχαν προπλυθεί τρεις φορές με προσθήκη 800μl διαλύματος λύσης (σε περίπου 300μl εκχυλίσματος), ανάδευση για 10 λεπτά στους 4°C, και φυγοκέντρωση στα 1000rpm για 5 λεπτά.

Με το πέρας των 16 ωρών πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (1000rpm/5 λεπτά/4°C), αφαίρεση του υπερκειμένου μη δεσμευμένου στα σφαιρίδια κλάσματος (flow through) και προσθήκη διαλύματος λύσης στα σφαιρίδια, ανάδευση για 5 λεπτά και φυγοκέντρωση σε 5000rpm για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ακολούθησε μια ακόμη πλύση, αλλά στο διάλυμα λύσης αυτή την φορά απουσίαζε το απορρυπαντικό Triton x-100. Αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο και στο ίζημα των σφαιριδίων προστέθηκαν 40μl 2xSDS χωρίς DTT για την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 10 λεπτά με ανακίνηση, φυγοκέντρωση σε 1000rpm για 5 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου, χωρίς την λήψη σφαιριδίων. Τα δείγματα input, flow trough και τα εκλούσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

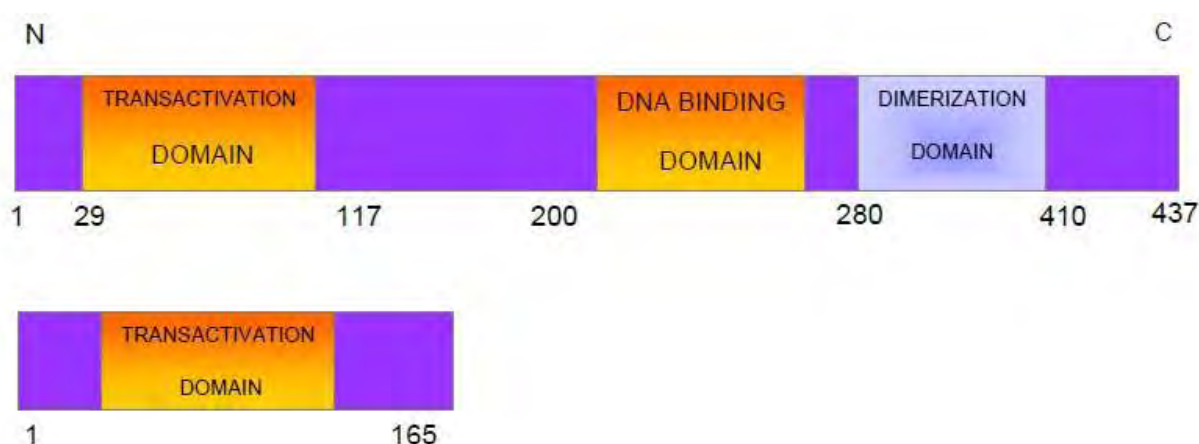
Η ιδέα της μελέτης του μεταγραφικού παράγοντα AP2a και την αλληλεπίδρασή του με παράγοντες της υποξίας προέκυψε από προκαταρκτικά πειράματα, όπου διερευνήθηκε η αλλαγή στα επίπεδα σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας. Στα πειράματα ποσοτικής ανάλυσης σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, τα επίπεδα έκφρασης του σουμοϋλιωμένου AP2a παρουσίαζαν αλλαγές στην υποξία, χωρίς να παρατηρηθεί αλλαγή έκφρασης στα επίπεδα της πρωτεΐνης (αδημοσίευτα δεδομένα Χαχάμη Γ.). Επιπλέον, αναφορές της βιβλιογραφίας [83,84] υποστηρίζουν σύνδεση μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων AP2a και HIF1a, αλλά και συμμετοχή του AP2a σε μονοπάτια της υποξίας. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο έλεγχος της σύνδεσης επικρατειών του AP2a με τον HIF1a και HIF2a. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν επικράτειες (καρβοξυτελικές και αμινοτελικές) του AP2a σε φορέα έκφρασης pcDNA3.1 με επίτοπο HA, που χρησιμεύει στον εντοπισμό των πρωτεϊνών και στην ανοσοκατακρήμνισή τους με HA σημασμένα σφαιρίδια. Για να ανιχνευθεί εάν η σουμοϋλίωση του AP2a παίζει κάποιο ρόλο στη σύνδεση του με τους HIF παράγοντες κλωνοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και η αμινοτελική επικράτεια που δεν διαθέτει την επιβεβαιωμένη θέση σουμοϋλίωσης (Lys 10).

4.3.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΤΟΥ AP2a ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA3.1-HA

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP2a περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης γονιδίων στόχων στο αμινοτελικό άκρο και τις περιοχές διμερισμού και σύνδεσης στο DNA των γονιδίων στόχων στο καρβοξυτελικό άκρο (εικόνα 16). Για να μελετηθεί ποιά περιοχή αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται στην υποξία HIF1a και HIF2a κλωνοποιήθηκαν διάφορες επικράτειες του AP2a σε φορείς έκφρασης pcDNA3.1-HA. Για την κλωνοποίηση των επικρατειών χρησιμοποιήθηκε σαν εκμαγείο το πλασμίδιο pcDNA3.1-HA-AP2a αγρίου τύπου (κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση από την Α. Μπασαγιάννη στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας, από το αρχικό γονίδιο pcDNA3.1-AP2a wt, προσφορά του εργαστηρίου του S. Bhattacharya (University of Oxford)). Οι επικράτειες που κλωνοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν αρχικά αυτή των πρώτων 165 αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου του φυσιολογικού γονιδίου του AP2a (wt), που περιέχει μόνο την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής και χαρακτηρίζεται ως αμινοτελική επικράτεια. Από το pcDNA3.1-HA-AP2a με μετάλλαξη στη λυσίνη στη θέση 10 (mut), η οποία έχει τροποποιηθεί σε αργινίνη και έχει χάσει την ικανότητά της να σουμοϋλιώνεται (pcDNA3.1-HA-AP2a mut-τροποποιήθηκε από το αρχικό

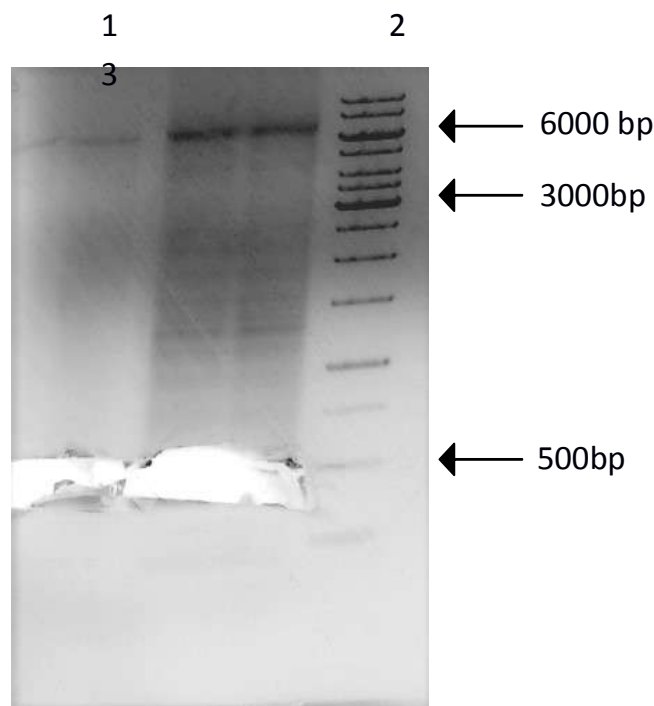
πλασμίδιο pcDNA3.1-AP2a wt με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση από την Dr Χαχάμη Γεωργία, Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Λάρισας) και κλωνοποιήθηκε από την Α. Μπασαγιάννη στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας, προσπαθήσαμε να κλωνοποιήσουμε την αντίστοιχη μεταλλαγμένη αμινοτελική επικράτεια (αντίστοιχα AP2a 1-165 mut). Επίσης από το αρχικό πλασμίδιο κλωνοποιήθηκαν οι επικράτειες από το αμινοξύ 165 ως το τέλος της πρωτεΐνης (437aa) (AP2a 165-437) και από το 122 ως το 437 αμινοξύ (AP2a 122-437), επικράτειες δηλαδή που περιέχουν τις περιοχές διμερισμού και σύνδεσης στο DNA και χαρακτηρίζονται παρακάτω ως καρβοξυτελικές.

4.3.1.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ AP2a 1-165aa (wt)



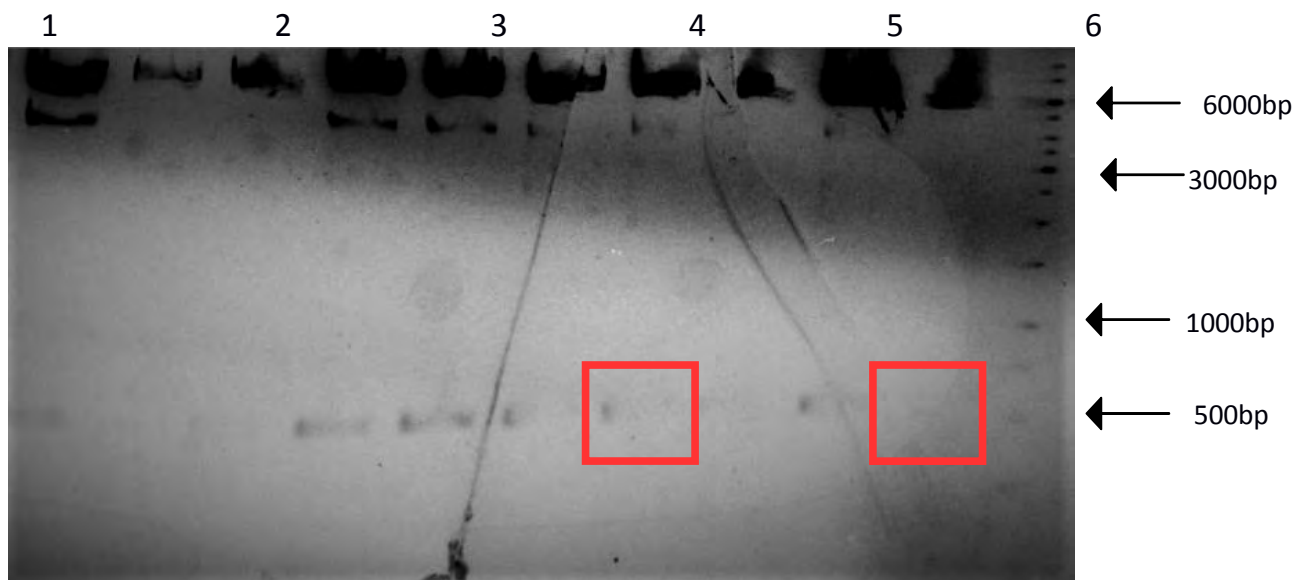
Εικόνα 16: σχηματική απεικόνιση των δομικών επικρατειών του AP2a και της περιοχής της πρώτης επικράτειάς του προς κλωνοποίηση

Για να ενισχυθεί η επικράτεια 1-165 από το πλασμίδιο pcDNA3.1-HA-AP2a (wt) πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές που φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI πριν το πρώτο αμινοξύ και XhoI μετά το 165 (βλ. Μέθοδοι 4.2.3). Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR (βλ. Μέθοδοι 4.2.2) στην εικόνα 17 έδειξε ένα κύριο προϊόν της PCR, το οποίο βρίσκεται κοντά στη ζώνη των 500 ζευγών βάσεων, κοντά δηλαδή στο αναμενόμενο μέγεθος του τμήματος του cDNA της επικράτειας του AP2a (507bp). Οι ζώνες αφαιρέθηκαν από την πηκτή και υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του QIAquick® gel extraction kit της Qiagen.



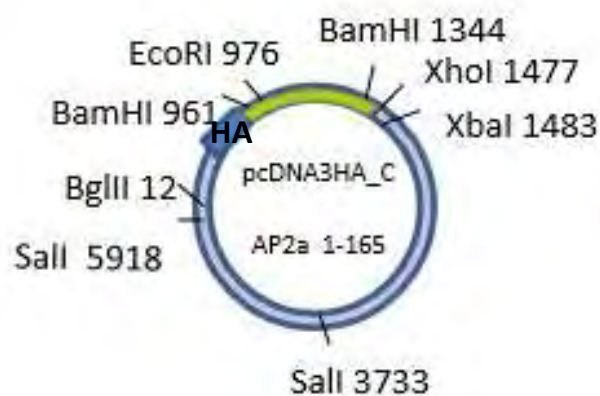
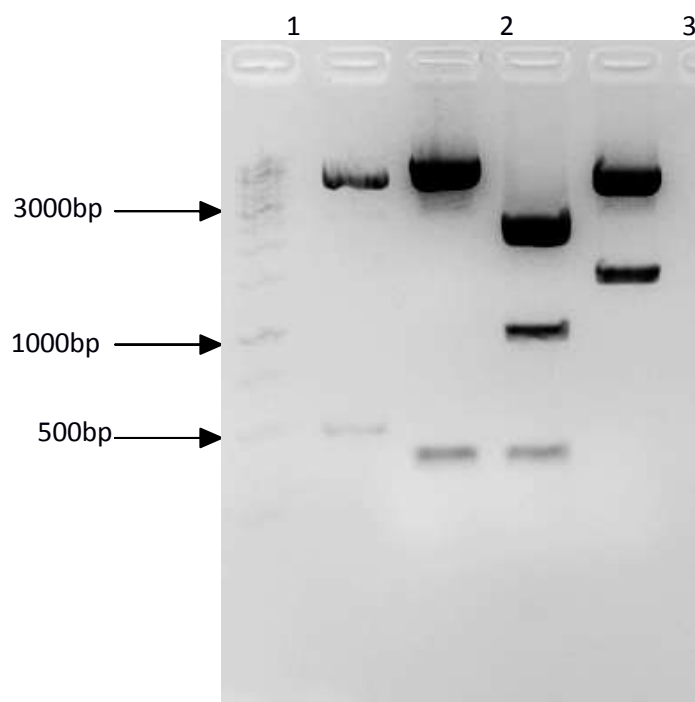
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR της επικράτειας 1-165αα του AP2a wt, απουσία και παρουσία DMSO, από όπου αποκόπηκε η ζώνη στα 507bp (gel extraction). Οι διαδρομές 1 και 2 αντιστοιχούν στα προϊόντα της PCR απουσία και παρουσία DMSO αντίστοιχα. Στο σημείο των 500bp φαίνεται η περιοχή της ζώνης που αποκόπηκε για περαιτέρω επεξεργασία. Στην διαδρομή 3 είναι ο μάρτυρας που δείχνει τα μοριακά βάρη (Generuler 1kb DNA ladder της Fermentas)

Ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pcDNA3.1-HA-C και του ενθέματος με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού, κι έτσι ήταν δυνατή η ενσωμάτωση της επικράτειας 1-165 του AP2a ως ένθεμα στον φορέα με αντίδραση λιγάσης. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης εισήχθη σε δεκτικά προς μετασχηματισμό βακτήρια (βλ. Μέθοδοι 4.2.7) και μετά από δύο ημέρες επιλέχθηκαν αποικίες για να ελεγχθούν για την πρόσληψη του πλασμιδίου με απομόνωση DNA μικρής κλίμακας (βλ. Μέθοδοι 4.2.8). Στη συνέχεια, ακολούθησε έλεγχος με πέψεις για την ύπαρξη του ενθέματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού (εικόνα 18). Αναμένοντας τον εντοπισμό ζωνών στο μέγεθος των 507bp επιλέχθηκαν οι αποικίες που εμφάνιζαν αντίστοιχη ζώνη και χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση μεσαίας κλίμακας DNA, ώστε να λάβουμε πλασμίδιο με την κλωνοποιημένη επικράτεια σε επαρκή συγκέντρωση (εικόνα 18, αποικίες 7 και 10).



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πλασμιδιακών κατασκευών που απομονώθηκαν από 10 διαφορετικές αποικίες και υποβλήθηκαν σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XhoI. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώθηκαν κάποιες από τις οι θετικές αποικίες που δίνει την αναμενόμενη ζώνη στα 507bp και επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο. Στην διαδρομή 11 φαίνεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης.

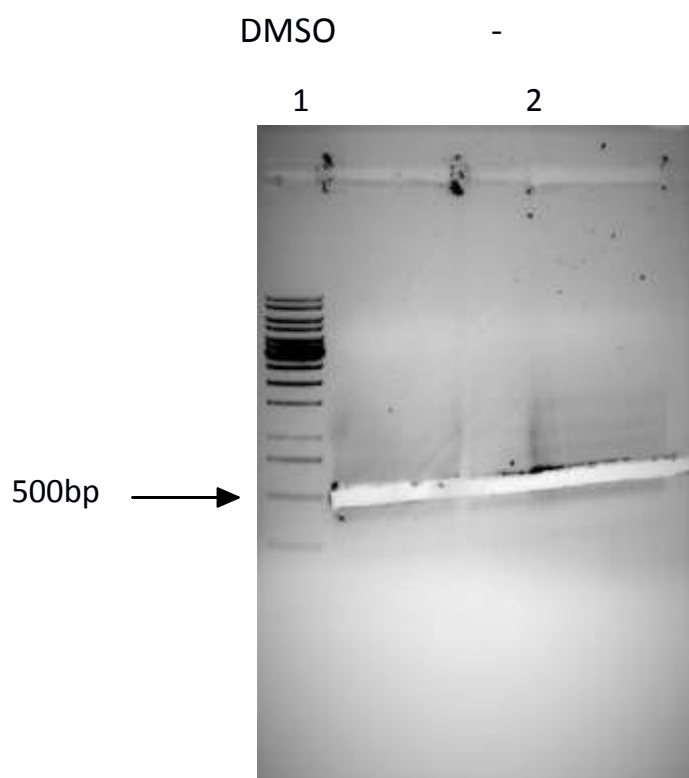
Στο χάρτη του πλασμιδίου στην εικόνα 19 φαίνονται τα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων των τμημάτων που προκύπτουν έπειτα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI-XhoI, BamHI, BamHI-SalI, και BglIII-XbaI. Η ανάλυση της αποικίας 7 έδωσε τα αναμενόμενα τμήματα DNA. Για τον λόγο αυτό μια ποσότητα από την αποικία αυτή στάλθηκε για αλληλούχιση (DNA sequencing) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 1P FRW EcoRI και REV XhoI (βλ. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ 4.1.7) και ελέγχθηκε η ορθότητα των βάσεων με βάση την αλληλουχία του αρχικού γονιδίου του AP2a αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν την ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης που αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο του μεταγράφου. Γι' αυτό επιλέχθηκε για έλεγχο μία διαφορετική αποικία (διαδρομή 10) και αφού τα αποτελέσματα των πέψεων ήταν τα αναμενόμενα, όπως φαίνεται στην εικόνα 19, τότε εστάλη για έλεγχο της αλληλουχίας της, όπου και επιβεβαιώθηκε η σωστή αλληλουχία των βάσεων σε σχέση με το γονίδιο AP2a αγρίου τύπου.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ηλεκτροφόρησης των πέψων με ένζυμα περιορισμού για έλεγχο του ενθέματος της επικράτειας 1-165 του AP2a (επάνω) και χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pcDNA3.1-HA-C- AP2a 1-165 (κάτω), όπου φαίνονται οι θέσεις πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν.

4.3.1.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ AP2a 1-165aa (MUT)

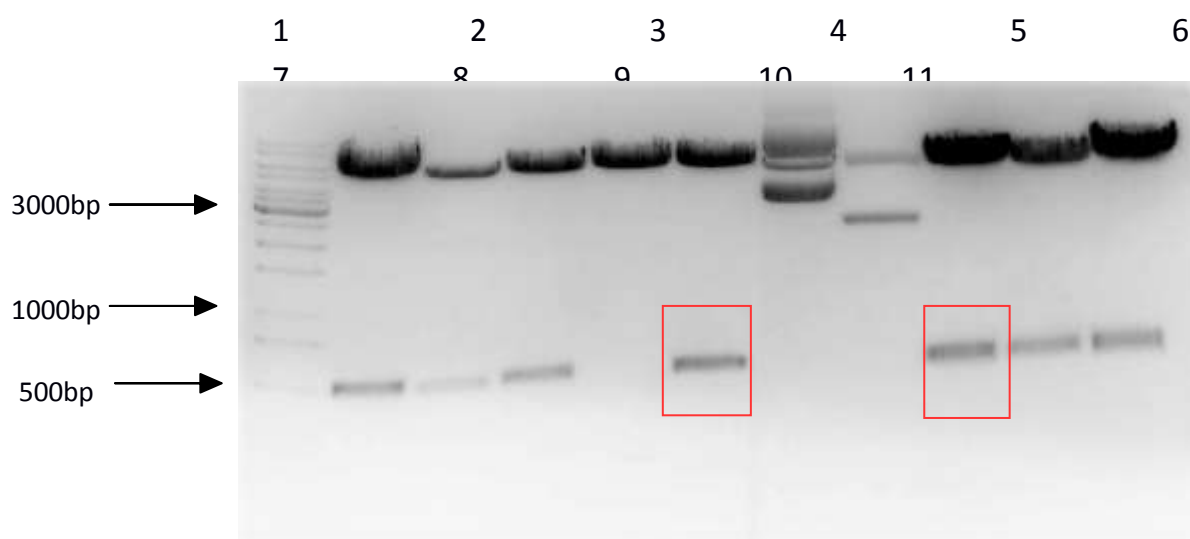
Για την κλωνοποίηση της αμινοτελικής επικράτειας των αμινοξέων 1-165 του AP2a, η οποία δεν έχει την δυνατότητα σουμυλίωσης, χρησιμοποιήθηκε σαν εκμαγείο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης το πλασμίδιο pcDNA3.1-HA-AP2a mut (βλ. λεπτομέρειες παραπάνω) και έγινε ενίσχυση με PCR της ίδιας αμινοτελικής επικράτειας, χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσδίδουν στο νεοσυντιθέμενο τμήμα, άκρα με θέσης κοπής από τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XhoI, για την αρχή και το τέλος της επικράτειας αντίστοιχα. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, έπειτα από πέψη με αυτά τα ένζυμα προέκυψε και αποκόπηκε η ζώνη των 507 ζευγών βάσεων που φαίνεται στην εικόνα 20, για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR της επικράτειας επικράτειας 1-165aa του AP2a mut, απουσία και παρουσία DMSO, από όπου αποκόπηκε η ζώνη στα 507bp (gel extraction). Οι διαδρομές 2 και 3 αντιστοιχούν στα προϊόντα της PCR απουσία και παρουσία DMSO αντίστοιχα. Στην διαδρομή 1 είναι ο μάρτυρας που δείχνει τα μοριακά βάρη (Generuler 1kb DNA ladder της Fermentas)

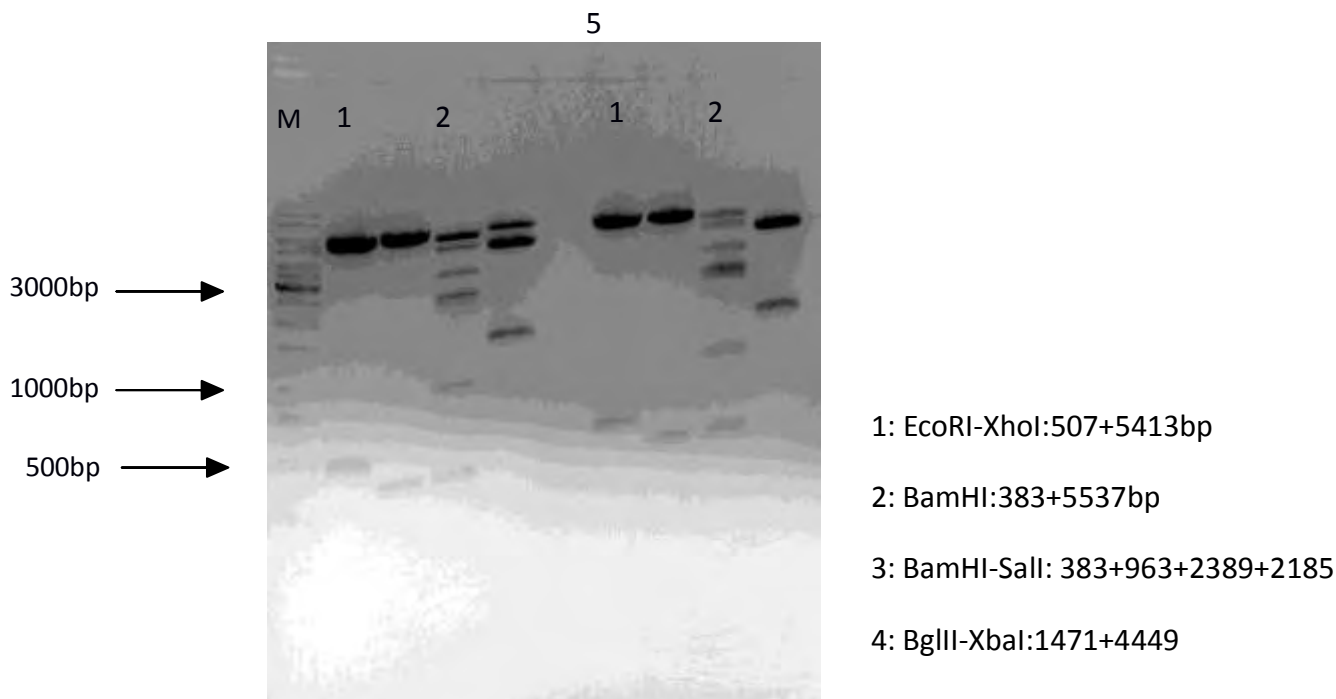
Ακολούθησε η ίδια διαδικασία όπως και στο τμήμα 1-165 wt, με τον καθαρισμό της ζώνης με το kit της QIAGEN, την αντίδραση λιγάσης και τον μετασχηματισμό βακτηρίων (βλ. Μέθοδοι 4.2.7). Αφού απομονώθηκε το DNA των αποικιών, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα

περιορισμού EcoRI και XhoI, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης ενθέματος (εικόνα21). Σε κόκκινα πλαίσια φαίνονται οι θετικές αποικίες με τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών στα 507 και 5413bp.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 10 πλασμιδιακών κατασκευών, που απομονώθηκαν από διαφορετικές αποικίες και υποβλήθηκαν σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XhoI. Στην διαδρομή 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης Gereruler 1kb

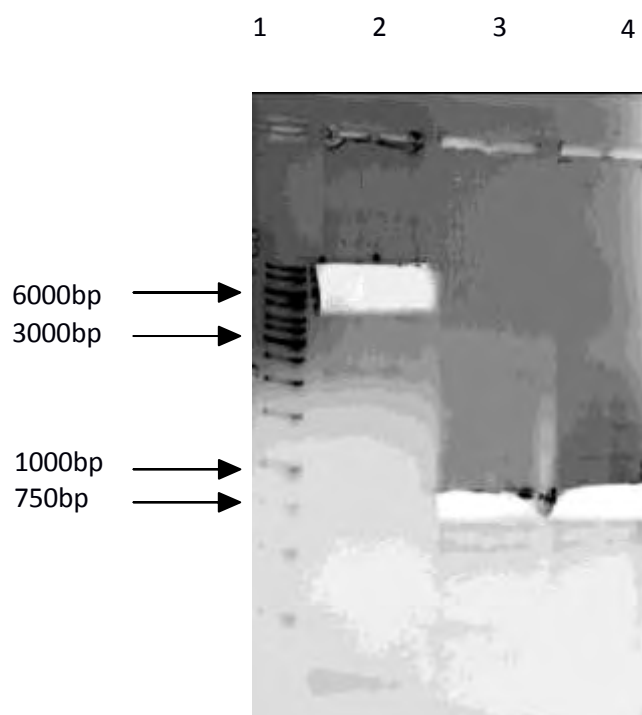
Επιλέχθηκαν δύο αποικίες για έλεγχο με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI-XhoI, BamHI, BamHI-SalI, και BglII-XbaI, όπως φαίνεται στην εικόνα 21 και απομόνωση μεσαίας κλίμακας DNA. Η αποικία 8 στάλθηκε για αλληλούχιση για έλεγχο της ορθότητας των βάσεων με χρήση των εκκινητών 1P FRW EcoRI και REV XhoI και βρέθηκε ότι δεν έφερε καμία καινούρια μετάλλαξη σε σχέση με το αρχικό γονίδιο του μεταλλαγμένου AP2a και ήταν η αποικία που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μεσαίας κλίμακας και περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων πέψης με ένζυμα περιορισμού (δεξιά στήλη) των αποικιών 5 και 8, για έλεγχο του ενθέματος (1-165 mut). Με Μ σημειώνεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης Generuler 1kb.

4.3.1.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ AP2a 165-437aa

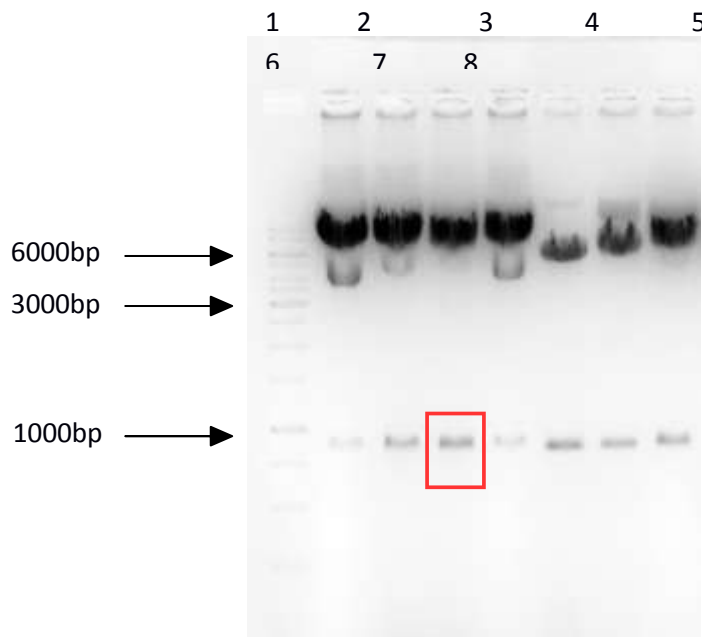
Παρόμοια διαδικασία με τις προηγούμενες κλωνοποιήσεις ακολουθήθηκε και για την κλωνοποίηση της επικράτεια 165-437aa. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκμαγείο το μετάγραφο άγριου τύπου του AP2a, (pcDNA3.1-HA-C- AP2a wt) χρησιμοποιήθηκε για ενίσχυση του τμήματος 165-437aa με εκκινητές που δημιουργούσαν θέσης πέψης των ενζύμων περιορισμού BamHI και XhoI. Το αναμενόμενο μήκος αλληλουχίας του συγκεκριμένου ενθέματος είναι 828bp. Στην εικόνα 22 απεικονίζεται ανάλυση των προϊόντων PCR, όπου φαίνεται μια κύρια ζώνη κοντά στα 800bp. Η ζώνη αυτή απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης και υποβλήθηκε σε καθαρισμό με το kit της Qiagen.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR της επικράτειας 165-437αα του AP2a, απουσία και παρουσία DMSO από όπου αποκόπηκε η ζώνη στα 828bp Στη διαδρομή 1 παρουσιάζεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης DNA (Generular 1kb DNA ladder της Fermentas), στην διαδρομή 2 βρίσκεται ο φορέας έκφρασης pcDNA3.1-HA έπειτα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI, ενώ στις διαδρομές 3 και 4 παρουσιάζονται τα προϊόντα PCR απουσία και παρουσία DMSO αντίστοιχα.

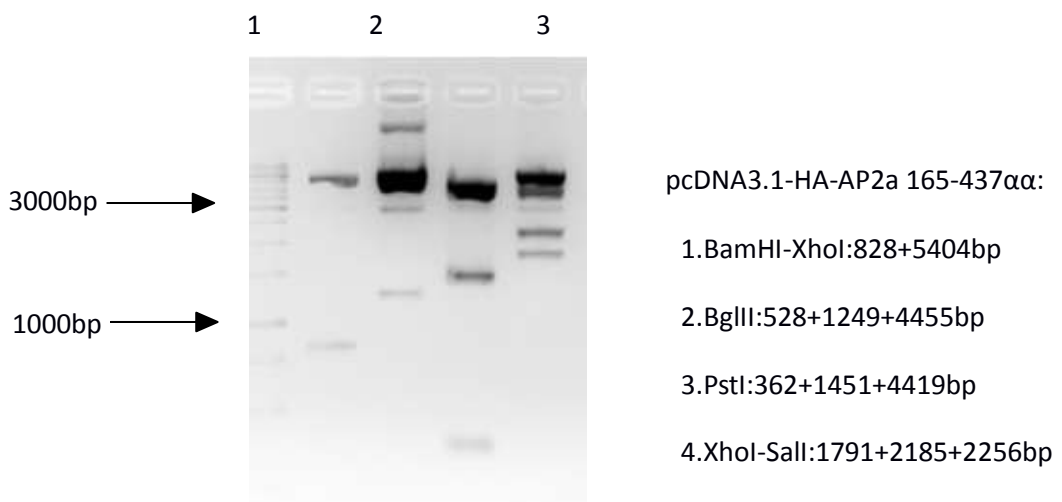
Ταυτόχρονα με τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκε και ο φορέας έκφρασης pcDNA3.1-HA-C, ο οποίος είχε ήδη υποβληθεί για 3 ώρες σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI (εικόνα 22, διαδρομή 2) και απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης. Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη του ενθέματος για την επικράτεια 165-437 με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI. Για την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η λιγάση T4 της TAKARA και το ένθεμα και ο φορέας κλωνοποίησης επωάστηκαν στους 16°C μέχρι την επόμενη μέρα (μέθοδοι 4.2.5). Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων (TOP10) και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας 7 αποικιών.

Ακολούθησε πέψη των πλασμιδίων με τα ένζυμα BamHI και XhoI για έλεγχο ύπαρξης ενθέματος. Η εικόνα 23 παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση των πέψεων αυτών και τις θετικές αποικίες με τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών στα 828 και 5404bp. Η θετική αποικία 3 χρησιμοποιήθηκε για πέψεις ελέγχου ενθέματος με τα ένζυμα περιορισμού που φαίνονται στην εικόνα 24 (δεξιά στήλη).

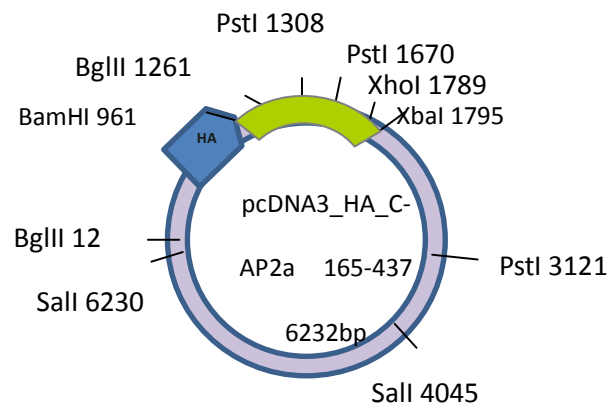


Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 7 πλασμιδιακών κατασκευών, που υποβλήθηκαν σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI (διαδρομές 2-8). Στην διαδρομή 1 παρουσιάζεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης Generuler 1kb, ενώ στη διαδρομή 4 με κόκκινο χρώμα σημειώνεται η θετική αποικία.

Αφού επιβεβαιώθηκαν οι παραπάνω πέψεις, δίνοντας τα αναμενόμενα μεγέθη έγινε αλληλούχιση του ενθέματος, ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της ακολουθίας των βάσεων. Οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων BamHI, XhoI, BglII, PstI και SalI απεικονίζονται στον χάρτη της εικόνας 25.



Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πλασμιδίου (αποικία 3), μετά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού (στήλη δεξιά) για έλεγχο του ενθέματος. Στη διαδρομή 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης της Fermentas Generuler 1 kb



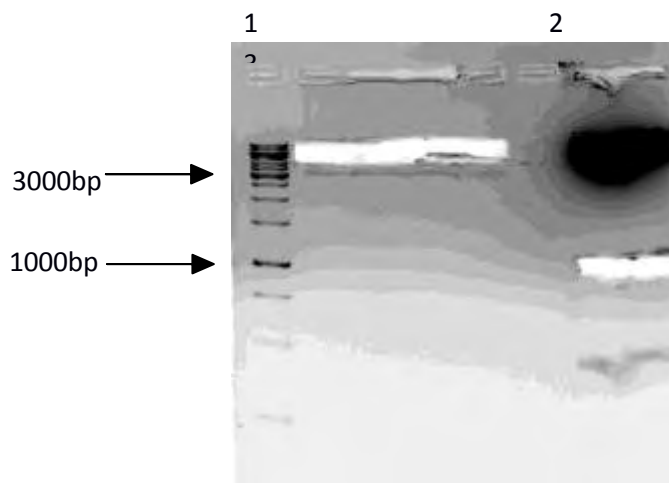
Εικόνα 25: χάρτης πέψης περιοριστικών ενζύμων του πλασμιδίου pcDNA3.1-HA-C- AP2a 165-437, που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της κλωνοποίησης

4.3.1.4 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ AP2a 122-437aa



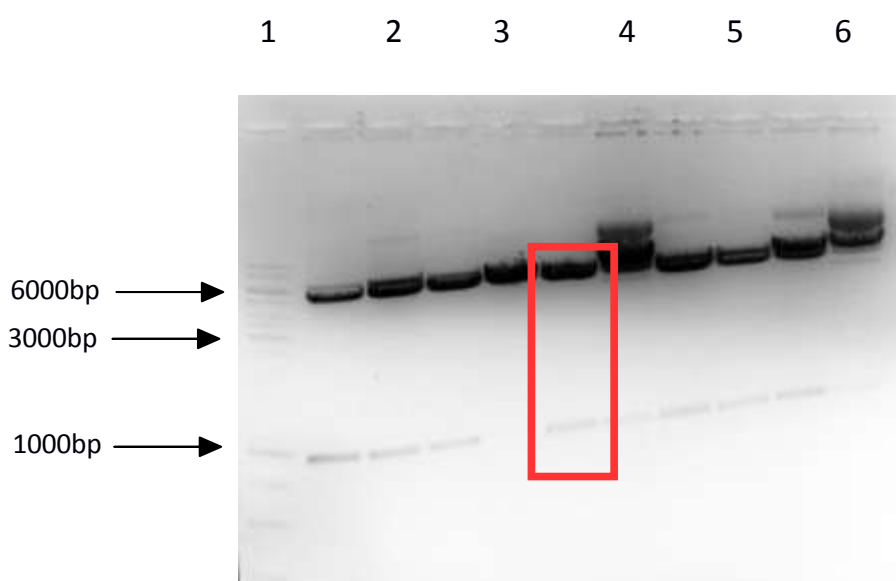
Εικόνα 26: σχηματική απεικόνιση των δομικών επικρατειών του AP2a και της περιοχής της πρώτης επικράτειάς του προς κλωνοποίηση

Για την κλωνοποίηση της καρβοξυτελικής επικράτειας 122-437aa πραγματοποιήθηκε απευθείας πέψη του πλασμιδίου pcDNA3.1-HA-AP2a wt με τα ένζυμα BamHI και XhoI, δίνοντας το επιθυμητό κομμάτι του AP2a μεταξύ 122 και 437aa. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψεων που φαίνεται στην εικόνα 27 δείχνει την ύπαρξη κύριας ζώνης του ενθέματος στα 952bp και του υπόλοιπου φορέα στα 5406bp.



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του άδειου φορέα pcDNA3.1-HA-A (διαδρομή 2) και του φορέα pcDNA3.1-HA-AP2a wt μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI (διαδρομή 3). Στη διαδρομή 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης. Η ζώνη του άδειου φορέα pcDNA3.1-HA, που βρίσκεται κοντά στα 5000bp και η ζώνη του AP2a, που αντιστοιχεί στο τμήμα 122-437 και είναι κοντά στα 900bp, απομονώθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

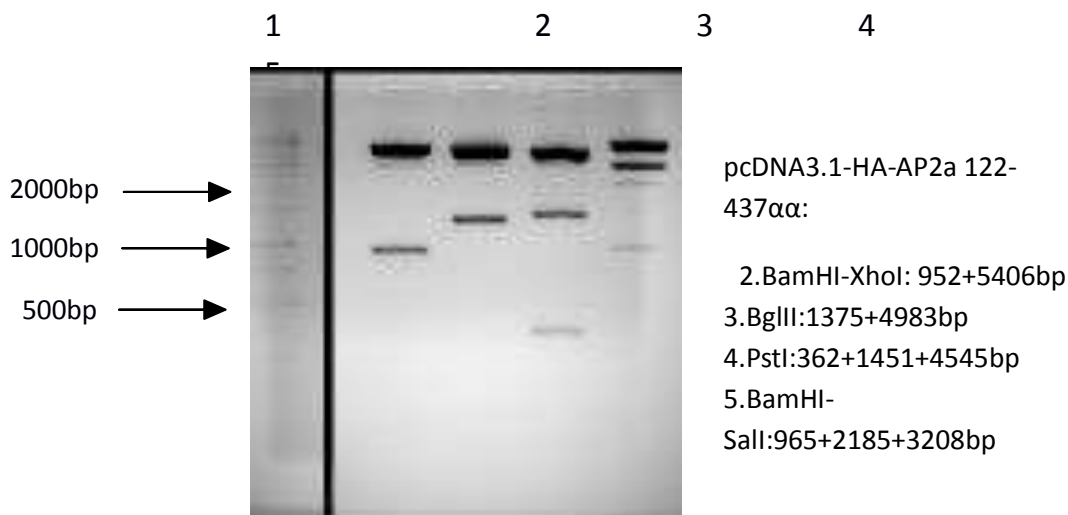
Η ζώνη του άδειου φορέα pcDNA3.1-HA στα 5406bp, μαζί με τη ζώνη του AP2a που αντιστοιχεί στο τμήμα 122-437, αποκόπηκαν, καθαρίστηκαν με το kit της Qiagen και επωάστηκαν σε αντίδραση λιγάσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10 και απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας δέκα αποικιών που επιλέχθηκαν προς έλεγχο. Οι περισσότερες προέκυψαν θετικές, όπως φαίνεται και στην εικόνα 28, από την ύπαρξη ενθέματος στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των 900bp περίπου.



Εικόνα 28: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 10 πλασμιδιακών κατασκευών DNA, που απομονώθηκαν από διαφορετικές αποικίες και υποβλήθηκαν σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού

BamHI και XhoI. Στη διαδρομή 1 βρίσκεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης της Fermentas. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η αποικία που επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση.

Τελικά η αποικία 5 επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση με πέψεις με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού για έλεγχο του ενθέματος, όπως φαίνεται την εικόνα 29. Αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη σωστού ενθέματος, η αποικία χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας για χρήση σε επόμενα πειράματα.

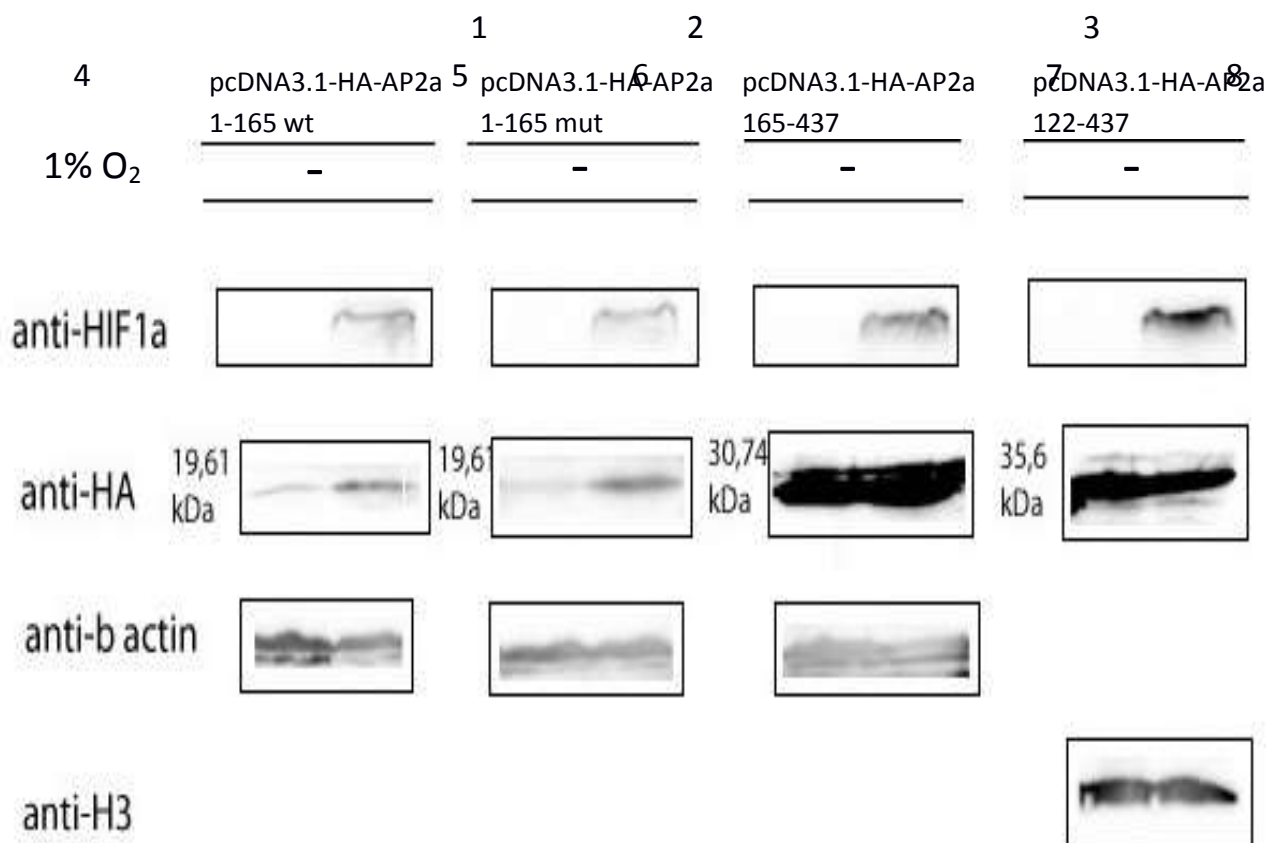


Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πλασμιδίου μετά από πέψη της επικράτειας 122-437αα του AP2a με ένζυμα περιορισμού (στήλη δεξιά) για έλεγχο του ενθέματος. Στη διαδρομή 1 φαίνεται ο μάρτυρας ηλεκτροφόρησης Generuler1 kb

4.3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ HA-AP2a ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΝΟΡΜΟΞΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΞΙΑΣ

Αφού πιστοποιήθηκε η ορθότητα της αλληλουχίας των τεσσάρων γονιδιακών κατασκευών HA-AP2a 1-165αα wt, HA-AP2a 1-165αα mut, HA-AP2a 165-437αα, και HA-AP2a 122-437, επόμενο βήμα ήταν να ερευνήσουμε αρχικά αν οι κατασκευές αυτές μπορούσαν να εκφραστούν ως πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους, καθώς και τα επίπεδα εκφράσής τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα HeLa. Για το σκοπό αυτό επιμολύναμε παροδικά τα κύτταρα HeLa με τις παραπάνω κατασκευές χρησιμοποιώντας ως παράγοντα επιμόλυνσης το λιπόφιλο αντιδραστήριο PEI (μέθοδοι 4.2.13) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA. Το αποτέλεσμα απεικονίζεται στην εικόνα 30 και δείχνει αρχικά πως και οι τέσσερις κατασκευές εκφράζονται σε κύτταρα HeLa, δίνοντας προϊόντα σε αναμενόμενα μεγέθη. Όσον αφορά την κατασκευή HA-AP2a 1-165 wt (διαδρομές 1 και 2) εμφανίζεται πρωτεΐνη κοντά στα 20kDa, που είναι κοντά στο αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης

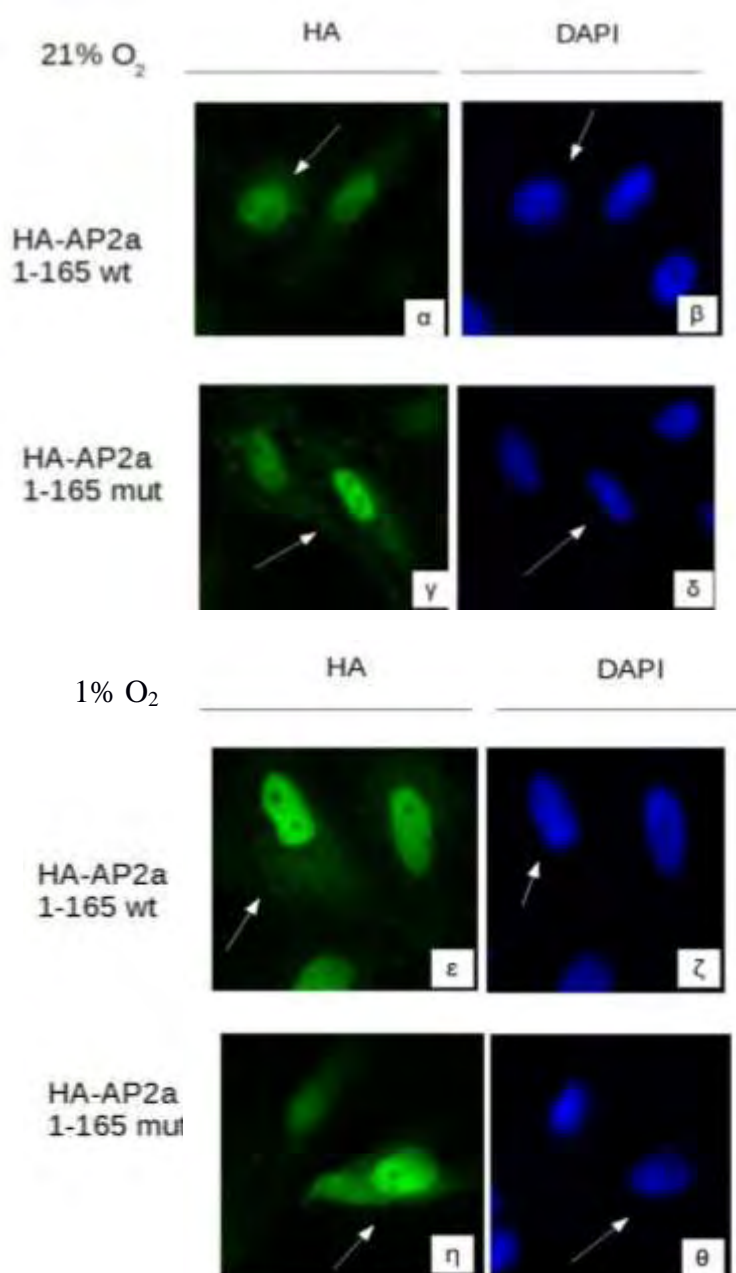
(υπολογισμένο στα 19,61 MB). Στην υποξία ίσως είναι ορατή μια ενίσχυση της έκφρασης (διαδρομή 2), η οποία παρατηρήθηκε και σε άλλες δύο επαναλήψεις του πειράματος (ενδεικτικά φαίνονται εδώ τα αποτελέσματα ενός πειράματος. Για την κατασκευή HA-AP2a 1-165 mut (διαδρομές 3 και 4), εμφανίστηκε πρωτεϊνική ζώνη στο ίδιο ύψος με την HA-AP2a 1-165 wt, των 20 kDa, καθώς έχουν το ίδιο αναμενόμενο μοριακό βάρος. Η ίδια διαφορά στα επίπεδα έκφρασης με ορατή μια ενίσχυση της έκφρασης στην περίπτωση επώασης σε υποξία (διαδρομή 4). Τα εκχυλίσματα κύτταρων που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο HA-AP2a 165-437 (διαδρομές 5 και 6) εμφάνισαν πρωτεϊνική ζώνη κοντά στα 30kDa, και είναι σύμφωνη με την αναμενόμενη τιμή των 30,74 kDa της χημεικής πρωτεΐνης HA-AP2a 165-437. Εδώ δεν φαίνεται διαφορά επιπέδων έκφρασης μεταξύ νορμοξίας και υποξίας. Τέλος, ανάλυση εκχυλισμάτων με την κατασκευή HA-AP2a 122-437 (διαδρομές 7 και 8) εμφάνισε ζώνη λίγο χαμηλότερα από 40kDa (αναμενόμενο μέγεθος χημεικής πρωτεΐνης στα 35,6 kDa). Τα καρβοξυτελικά τμήματα 165-437aa και 122-437aa του AP2a εμφανίζουν πιο δυνατή έκφραση σε σχέση με τα αμινοτελικά τμήματα των κατασκευών των πρώτων 165 αμινοξέων. Για την επιβεβαίωση υποξίας στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η επαγωγή του HIF1α (διαδρομές 2,4,6, 8) και για τον έλεγχο του ισοφορτώματος χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η β-ακτίνη (42kDa), αλλά και η ιστόνη H3 (15kDa), στην περίπτωση του HA-AP2a 122-437.



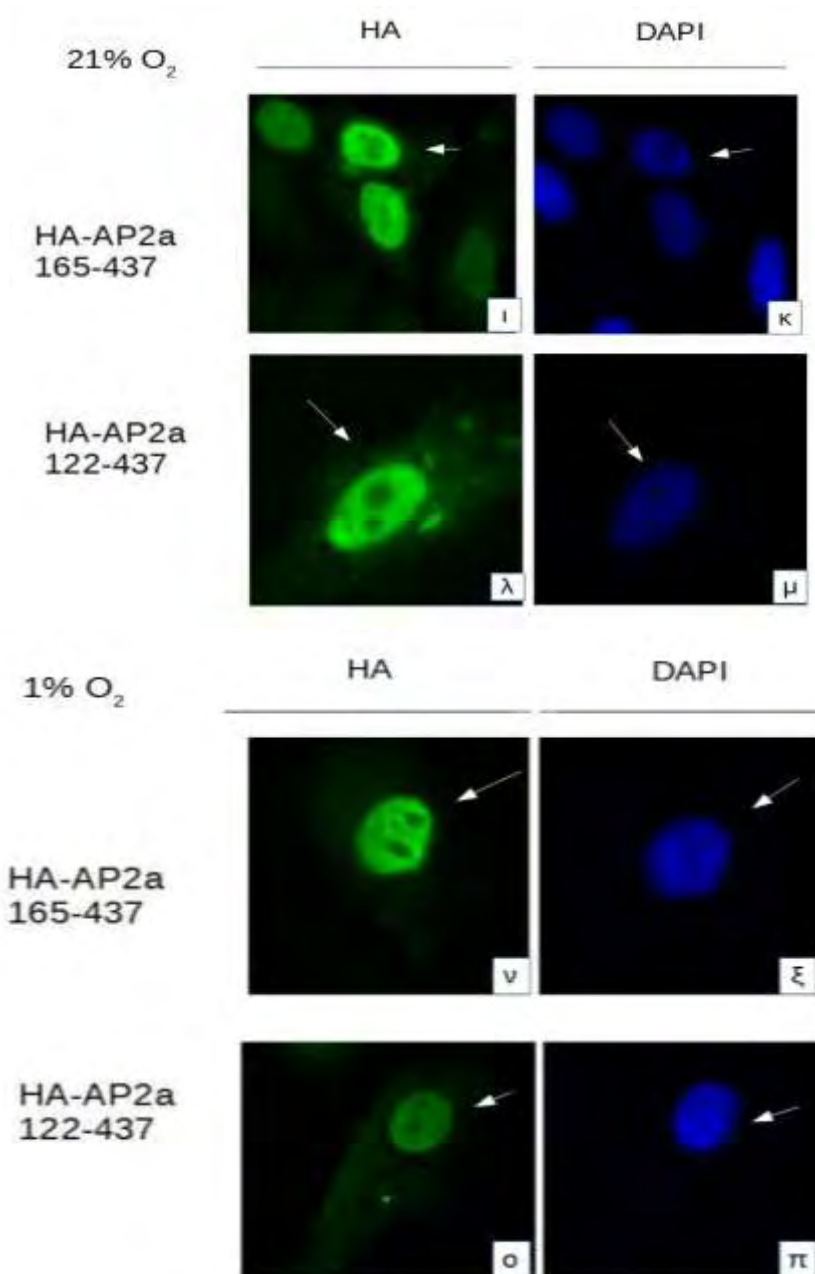
Εικόνα 30: Έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2a 1-165 wt, 1-165 mut, 165-437 και 122-437 σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με: pcDNA-HA-AP2a 1-165 wt (διαδρομές 1-2), pcDNA-HA-AP2a 1-165 mut (διαδρομές 3-4), pcDNA-HA-AP2a 165-437 (διαδρομές 5-6), pcDNA-HA-AP2a 122-437 (διαδρομές 7-8) για 24 ώρες παρουσία 21% ή 1% συγκέντρωση οξυγόνου. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση έναντι του HIF1α (μάρτυρας υποξίας) και του επιτόπου HA. Ως μάρτυρες για το ισοφόρτωμα χρησιμοποιήθηκαν οι β-ακτίνη και ιστόνη H3. Στα αριστερά της κάθε ζώνης εμφανίζονται τα ακριβή μοριακά βάρη των πρωτεϊνών.

4.3.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΤΟΥ AP2a ΜΕ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ

Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν παροδικά με τα κλωνοποιημένα πλασμίδια με PEI για 4 ώρες και ακολούθησε επώαση για άλλες 24 ώρες, σε νορμοξία και υποξία (μέθοδοι 4.2.17). Τα αποτελέσματα ανίχνευσης του υποκυτταρικού εντοπισμού των τεσσάρων επικρατειών του HA-AP2a, παρουσιάζονται στις εικόνες 31 και 32.



Εικόνα 31: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2a 1-165 wt, 1-165 mut, σε κύτταρα HeLa σε νορμοξικές (α-δ) και υποξικές συνθήκες (ε-θ) με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με: pcDNA-HA-AP2a 1-165 wt, pcDNA-HA-AP2a 1-165 mut, για 24 ώρες και επωάστηκαν σε 21% ή 1% συγκέντρωση οξυγόνου. Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε έναντι του επιτόπου HA. Οι πυρήνες των κυττάρων φαίνονται δεξιά, με τη χρωστική DAPI. Με άσπρα βέλη σημειώνονται ενδεικτικά τα κύτταρα που έχουν προσλάβει εξωγενές DNA.



Εικόνα 32: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2a 165-437, 122-437 σε κύτταρα HeLa σε νορμοξικές (ι-μ) και υποξικές συνθήκες (ν-π) με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με: pcDNA-HA-AP2a 165-437, pcDNA-HA-AP2a 122-437. Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε έναντι του

επιτόπου HA. Οι πυρήνες των κυττάρων φαίνονται δεξιά, με χρώση DAPI. Με άσπρα βέλη σημειώνονται ενδεικτικά τα κύτταρα που έχουν προσλάβει εξωγενές DNA.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 31 η πρωτεΐνη HA-AP2a 1-165 wt εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα αλλά και σε κάποιο βαθμό στο κυτταρόπλασμα. Ο υποκυτταρικός αυτός εντοπισμός δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια διαφορά μεταξύ νορμοξίας (α, β) και υποξίας (ε, ζ). Η ύπαρξη της πρωτεΐνης αυτής τόσο στον πυρήνα όσο και έξω από αυτόν ίσως είναι αναμενόμενη, λόγω του μικρού μεγέθους της, μόλις 19,61kDa. Μικρές πρωτεΐνες μπορούν να μετακινούνται, μέσω του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων, μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Παρόμοιος υποκυτταρικός εντοπισμός εμφανίζεται και για την ίδιου μεγέθους μεταλλαγμένη μορφή της επικράτειας HA-AP2a 1-165 mut, τόσο στην νορμοξία (γ, δ) όσο και στην υποξία (η, θ). Κι εδώ ο υποκυτταρικός εντοπισμός δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια διαφορά μεταξύ υποξίας και νορμοξίας.

Στην εικόνα 32 εμφανίζεται ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών HA-AP2a 165-437aa και HA-AP2a 122-437aa σε νορμοξικές (ι, κ) και υποξικές συνθήκες (ν, ξ). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό συγκέντρωση της πρωτεΐνης HA-AP2a 165-437aa στον πυρήνα. Το μέγεθός (30,74kDa) της επιτρέπει την μετακίνηση μέσω των πυρηνικών πόρων εύκολα, όπως και των αμινοτελικών κομματιών και σε αρκετά κύτταρα εντοπίζεται τόσο πυρηνικά όσο και κυτταροπλασματικά. Παρόλα αυτά ήταν σημαντικός ο αριθμός των κυττάρων που εμφάνιζαν πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης μόνο στον πυρήνα, χωρίς εμφανείς διαφορές μεταξύ υποξίας και νορμοξίας.

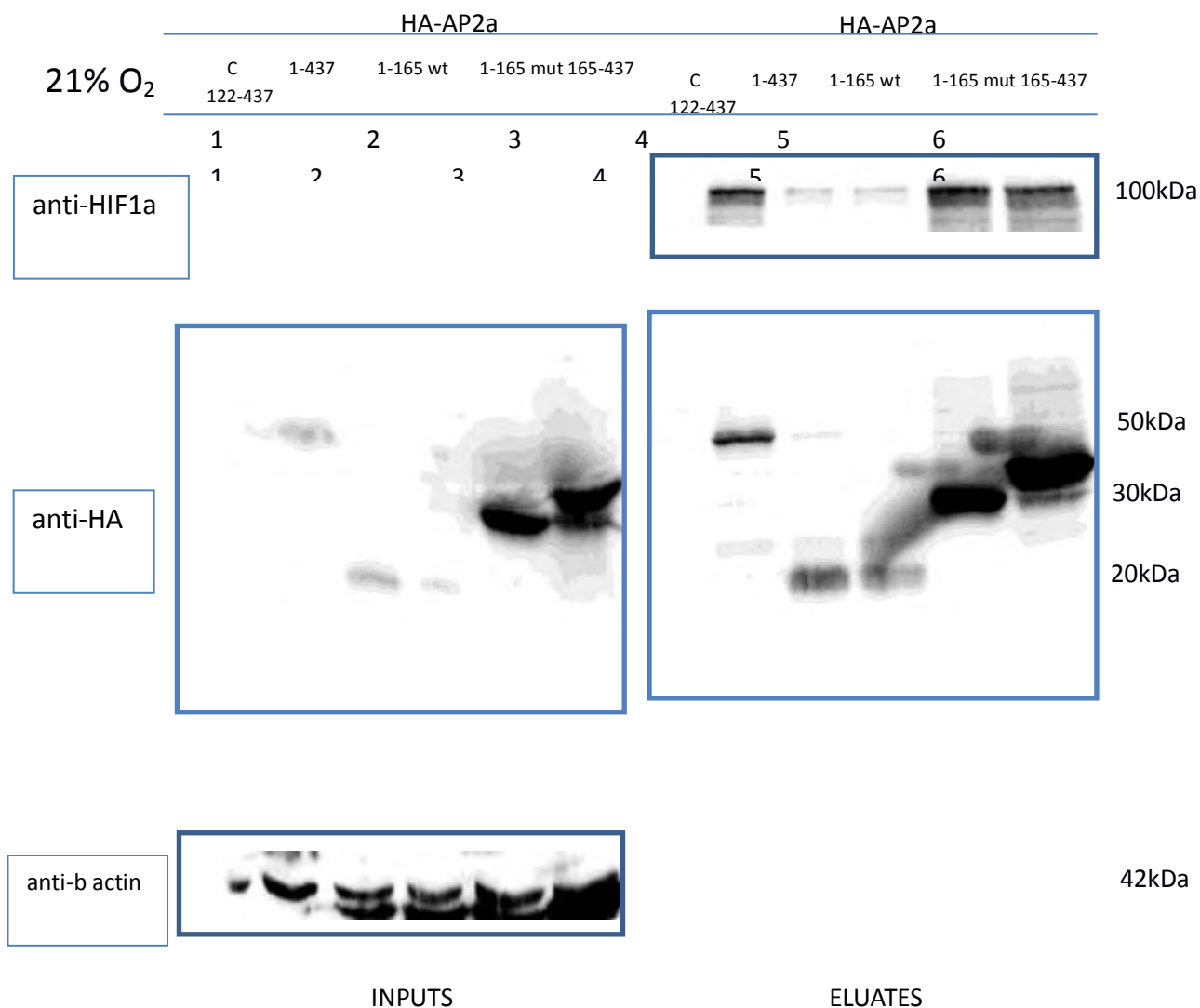
Τέλος, η πρωτεΐνη HA-AP2a 122-437aa, μεγέθους 35,6kDa φαίνεται να διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, χωρίς διαφορά στις υποξικές συνθήκες σε σχέση με την νορμοξία.

Συμπερασματικά, η επώαση των κυττάρων σε διαφορετικές συνθήκες οξυγόνωσης δεν φαίνεται να επιδρά στην ενδοκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνικών επικρατειών του AP2a. Οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε ικανοποιητικά ποσά και εντοπίζονται κυρίως πυρηνικά αλλά και σε ένα βαθμό και κυτταροπλασματικά. Εξαίρεση φαίνεται ίσως να αποτελεί το καρβοξυτελικό κομμάτι του AP2a των 165-437aa που εμφανίζει κυρίως πυρηνικό εντοπισμό.

4.3.4 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΗΑ ΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΩΝ ΤΟΥ AP2a ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟΥΣ HIF

Προκειμένου να μελετηθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων HIF1α και HIF2α με τις διάφορες επικράτειες του AP2a έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των πρωτεϊνικών επικρατειών HA-AP2a 1-165wt, HA-AP2a 1-165 mut, HA-AP2a 165-437 και HA-AP2a 122-437 χρησιμοποιώντας σφαιρίδια συζευγμένα με HA αντίσωμα, τα οποία καθιλώνουν πρωτεΐνες που φέρουν τον επίτοπο αυτό. Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, ώστε να μην διαταραχθούν τα σύμπλοκα πρωτεϊνών που μπορεί να έχουν σχηματιστεί με τις επικράτειες του AP2a.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την συνεπιμόλυνση κυττάρων 293 με πλασμίδιο που εξέφρασε τον HIF1α συζευγμένου με flag επίτοπο (pcDNA3.1-flag-HIF1α υλικά 4.1.5) με έναν από τους παρακάτω φορείς: κενό φορέα κλωνοποίησης pcDNA-HA (αρνητικός μάρτυρας), το πλασμίδιο pcDNA-HA-AP2a πλήρους μεγέθους (θετικός μάρτυρας-προσφορά του εργαστηρίου του S.Bhattacharya), και οι κατασκευές που κλωνοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη pcDNA3.1-HA-AP2a 1-165 wt, pcDNA3.1-HA-AP2a 1-165 mut, pcDNA3.1-HA-AP2a 165-437, pcDNA3.1-HA-AP2a 122-437. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διάλυμα λύσης IP (μέθοδοι 4.2.18) και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα αυτό επωάστηκε με σφαιρίδια που έφεραν το HA αντίσωμα για 16 ώρες. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε δείγμα από το ολικό εκχύλισμα κυττάρων πριν από την ανοσοκατακρήμνιση (input: in), από το αδέσμευτο στη στήλη εκχύλισμα μετά την ανοσοκατακρήμνιση (flow-through: ft) και τέλος από το έκλουσμα, που περιέχει τις πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν και εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια (eluate; el). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), και στη συνέχεια έγινε ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επίτοπου για τον εντοπισμό των HA-AP2a πρωτεϊνών, έναντι των HIF1α για την επιβεβαίωση συγκατακρήμνισής του και έναντι της β-ακτίνης για έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων.

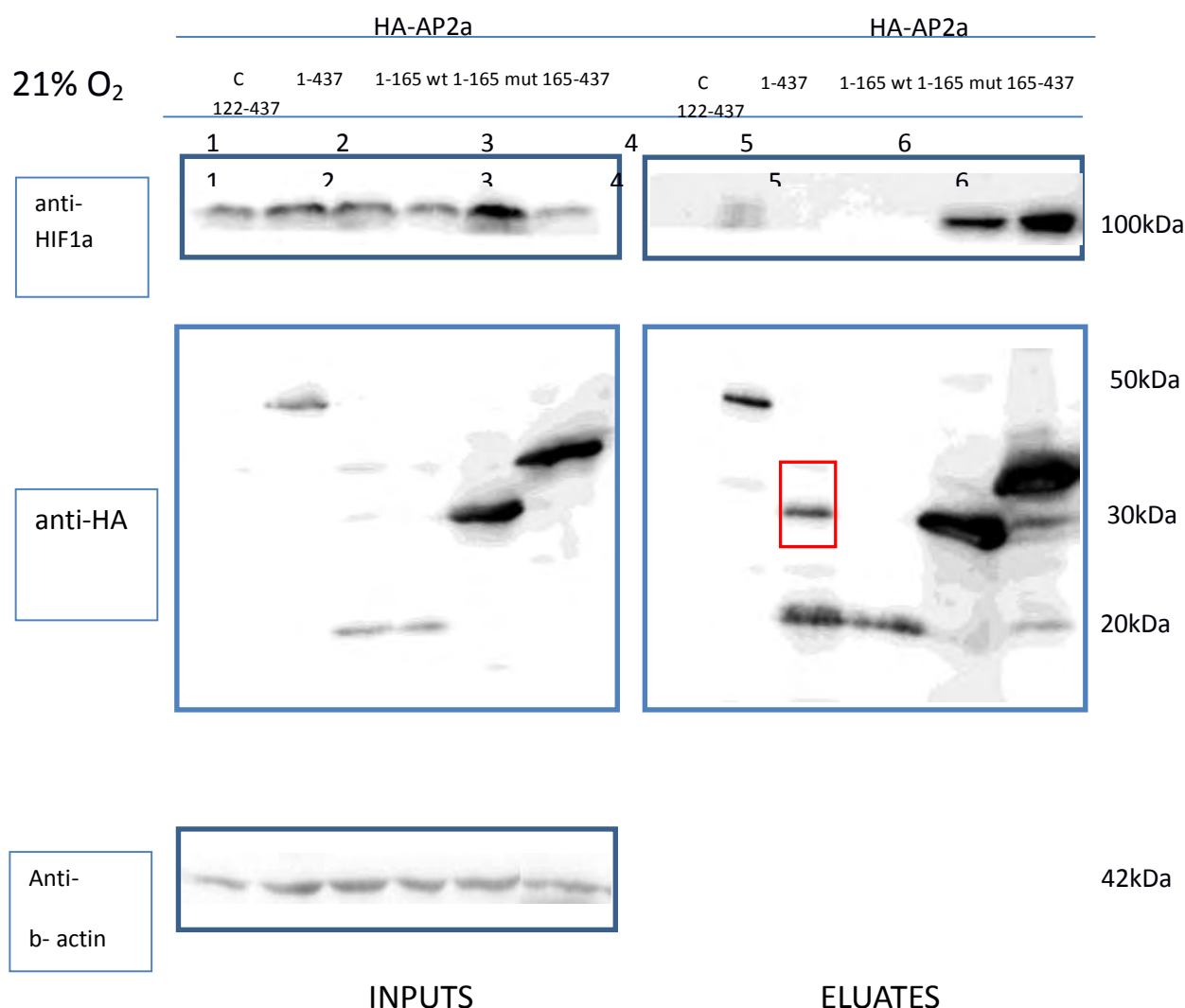


Εικόνα 33: Έλεγχος αλληλεπίδρασης των HA-APa επικρατειών με τον υπερεκφρασμένο flag-HIF1α, μέσω ανοσοκατακρήμνισης κυτταρικών εκχυλισμάτων (πρώτο πείραμα). (Αριστερά): Έλεγχος της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α και του flag-HIF1α στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα σε νορμοξία, με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επιτόπου, και της β-ακτίνης (δείκτης ισοφορτώματος). (Δεξιά): Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και του HIF1α για τον έλεγχο της συγκατακρήμνισής του στα εκλούσματα. Στη διαδρομή 1 σημειώνεται με c (control) ο φορέας pcDNA-HA.

Παρατηρούμε πως τα τμήματα των επικρατειών του AP2α εκφράζονται (διαδρομές 3-6) στα κύτταρα 293 σε νορμοξία, όπως και η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη (διαδρομή 2). Όμως καλύτερα και πιο δυνατά εκφράζονται τα καρβοξυτελικά τμήματα της πρωτεΐνης (διαδρομές 5,6). Στα εκλούσματα κατακρημνίζονται όλες οι πρωτεϊνικές μορφές που φέρουν τον επίτοπο

HA, και πάλι με τις καρβοξυτελικές επικράτειες να έχουν κατακρημνιστεί σε καλύτερο βαθμό, όπως ήταν και αναμενόμενο. Όσον αφορά τον HIF1α φαίνεται να εκφράζεται και να συνκατακρημνίζεται με την πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη και τα καρβοξυτελικά τμήματα του AP2α. Ασθενή σύνδεση παρατηρείται στα αμινοτελικά τμήματα.

Το πείραμα επαναλήφθηκε άλλη μια φορά, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση λιγότερη ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος και για τις περιπτώσεις που η έκφραση των πρωτεϊνών είναι πιο δυνατή (καρβοξυτελικά άκρα του AP2α) μικρότερη συγκέντρωση των πλασμιδίων, με τα οποία έγινε η παροδική διαμόλυνση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 34.

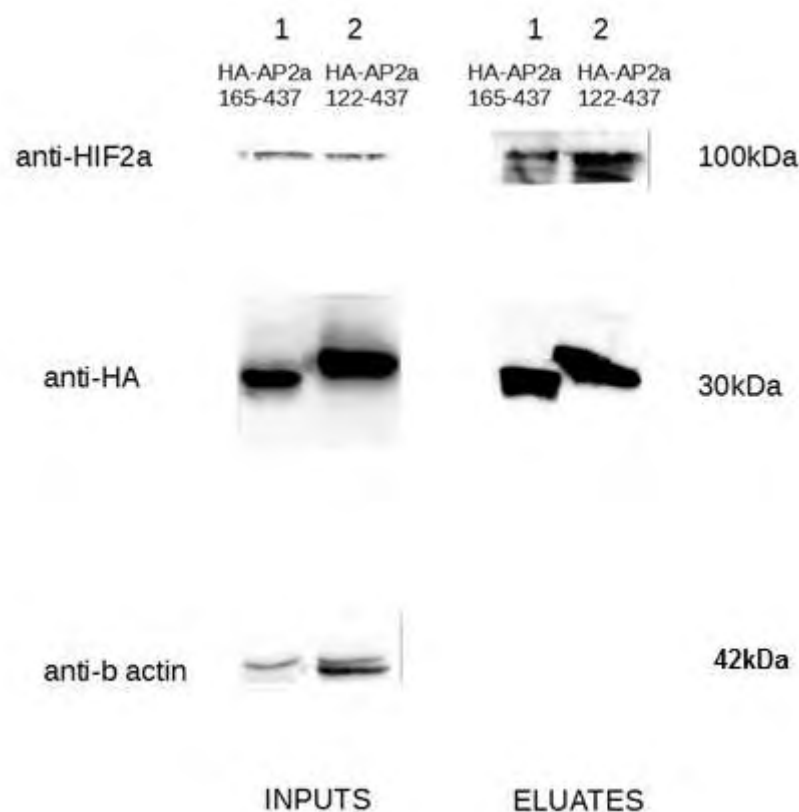


Εικόνα 34: έλεγχος αλληλεπίδρασης των HA-AP2a επικρατειών με τον HIF1α, μέσω ανοσοκατακρήμνισης κυτταρικών εκχυλισμάτων με συζευγμένα σφαιρίδια με HA αντίσωμα (δεύτερο πείραμα). (Αριστερά): Έλεγχος της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α και του flag-HIF1α στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα σε νορμοξία, με SDS-PAGE και

ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επιτόπου, και της β-ακτίνης (δείκτης ισοφορτώματος). (Δεξιά): Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2a που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και του HIF1α για τον έλεγχο της συγκατακρήμνισής του στα εκλούσματα. Στη διαδρομή 1 σημειώνεται με c (control) ο φορέας pcDNA-HA. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται η πιθανή σουμouλίωση του HA-AP2a 1-165 wt (διαδρομή 3 δεξιά).

Παρατηρήσαμε στο σχήμα της εικόνας 34, την έκφραση και των τεσσάρων επικρατειών του AP2a, αλλά και πάλι οι ποσότητες έκφρασης και κατακρήμνισης δεν ήταν ισομοριακές. Όσον αφορά τον flag-HIF1α φαίνεται και πάλι να συγκατακρημνίζεται με τις καρβοξυτελικές επικράτειες HA-AP2a 165-437 και 122-437 και μια πιο ασθενής εμφάνισή του στον πλήρους μεγέθους AP2a, που μπορεί όμως να οφείλεται σε τεχνικό πρόβλημα. Επιπλέον, στο πείραμα αυτό φαίνεται πως δεν κατακρημνίστηκε ο HIF1α με τις πρωτεΐνες των HA-AP2a 1-165 wt και mut (διαδρομές 3,4).

Προκειμένου να μελετηθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης και του μεταγραφικού παράγοντα HIF2α με τις διάφορες επικράτειες του AP2a έγινε ένα πείραμα συνυπερέκφρασης των πρωτεϊνικών επικρατειών HA-AP2a 1-165wt, HA-AP2a 1-165 mut, HA-AP2a 165-437, HA-AP2a 122-437, HA-AP2a πλήρους μεγέθους και του flag-HIF2α. Παρόλο που τεχνικά προβλήματα του πειράματος δεν έδωσαν κατάλληλο αποτέλεσμα για τα αμινοτελικά κομμάτια, οι επικράτειες HA-AP2a 165-437 και HA-AP2a 122-437 φαίνεται πως εκφράστηκαν ικανοποιητικά κατακρημνίστηκαν σε καλή ποσότητα και συγκατακρημνίστηκε μαζί τους ο HIF2α, όπως φαίνεται και στην εικόνα 35.



Εικόνα 35: έλεγχος αλληλεπίδρασης των HA-AP2a επικρατειών με τον HIF2α, μέσω ανοσοκατακρήμνισης κυτταρικών εκχυλισμάτων με συζευγμένα σφαιρίδια με HA αντίσωμα. Έλεγχος της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α και του flag-HIF2α στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα σε νορμοξία, με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επιτόπου, και της β-ακτίνης (δείκτης ισοφορτώματος). (Δεξιά): Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και του HIF2α για τον έλεγχο της συγκατακρήμνισής του στα εκλούσματα. Στα εκλούσματα εντοπίζεται σήμα με το αντίσωμα έναντι του HIF2α (93kDa), ενώ στη μεμβράνη του ολικού εκχυλίσματος εμφανίζεται η ζώνη της β-ακτίνης (42kDa).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υποξία, δηλαδή η μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου, που παρατηρείται στα κύτταρα, οδηγεί σε μια σειρά προσαρμογών για την επιβίωση των κυττάρων στις νέες συνθήκες. Η βασικότερη απόκριση που παρατηρείται είναι η παραγωγή ενέργειας αποκλειστικά μέσω γλυκόλυσης, αντί της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [3]. Για την ρύθμιση των προσαρμογών επάγεται η έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, η οποία μπορεί ή όχι, να εξαρτάται από τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται σε υποξία, τους HIF. Οι οικογένεια των HIF μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει την έκφραση περισσότερων από 100 γονιδίων, που εμπλέκονται σε διεργασίες, όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, η γλυκόλυση και η απόπτωση [5]. Ο HIF1α έχει οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση και σταθεροποιείται μόνο σε συνθήκες υποξίας, επιτρέποντάς του να μεταβεί στον πυρήνα. Εκεί ετεροδιμερίζεται με τον HIF1β και μπορεί ως σύμπλοκο να συνδεθεί στα στοιχεία HREs του υποκινητή επάγοντας την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Για να πραγματοποιηθεί η σύνδεση αυτή αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες. Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης και σταθεροποίησης του HIF1α ρυθμίζεται από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις (φωσφορυλιώσεις, υδροξυλιώσεις) [17]. Η σουμοϋλίωση αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που παρατηρείται και στον HIF1α. Προκύπτει με προσθήκη της πρωτεΐνης SUMO σε κατάλοιπα λυσίνης. Η σουμοϋλίωση φαίνεται να μεταβάλλεται σε πολλές καταστάσεις στρες, όπως το οξειδωτικό, το θερμικό στρες, στην ισχαιμία και την υποξία. Η σουμοϋλίωση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ρύθμιση της ενεργότητας των HIF, αλλά και γενικότερα σε μονοπάτια της υποξίας [62].

Η μελέτη του ρόλου της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών κατά την υποξία ήταν το αντικείμενο της μεταδιδακτορικής έρευνας της κ. Χαχάμη Γεωργίας και επιβλέπουσας της παρούσας εργασίας (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης). Η έρευνα αυτή περιελάμβανε την ποσοτική ανάλυση όλων των ενδογενών, σημασμένων, σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν με ειδικά αντισώματα έναντι των SUMO πρωτεϊνών (SUMO-SILAC Screen) σε νορμοξία και υποξία. Η ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας έδειξε την αλλαγή (μείωση ή αύξηση) των επιπέδων σουμοϋλίωσης πολλών πρωτεϊνών σε υποξία. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως προέκυψαν πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να αλλάζουν τα επίπεδα σουμοϋλίωσης σε υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία χωρίς παράλληλα να αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασης τους, υπονοώντας έναν ρυθμιζόμενο από την υποξία τρόπο σουμοϋλίωσης/αποσουμοϋλίωσης πρωτεϊνών. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες ήταν ο μεταγραφικός παράγοντας AP2a, ο οποίος μείωσε τα επίπεδα σουμοϋλίωσης κατά 1.5 φορές. Τα πειράματα της φασματοσκοπίας μάζας επιβεβαιώθηκαν σε ενδογενή όσο και στον

υπερεκφρασμένο AP2a, ο οποίος κλωνοποιήθηκε με επίτοπο HA, σε πειράματα της Αγγελικής Μπασαγιάννη, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας της, στο εργαστήριο Βιοχημείας, του τμήματος Ιατρικής, στη Λάρισα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στην υποξία. Στόχος μας ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης επικρατειών του μεταγραφικού παράγοντα AP2a με τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες HIF1a και HIF2a, καθώς και ο ρόλος της σουμοϋλίωσης του AP2a σε αυτήν την αλληλεπίδραση. Από την βιβλιογραφία και προηγούμενα πειράματα της κ. Χαχάμη ήταν ήδη γνωστή η αλληλεπίδραση μεταξύ των AP2a και των HIF1a και HIF2a [83, 84]. Όμως αυτό που δεν είχε ακόμα διευκρινιστεί ήταν η περιοχή αλληλεπίδρασης του AP2a, με τους παράγοντες αυτούς της υποξίας, καθώς επίσης και αν η σουμοϋλίωση στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή. Γι' αυτό κλωνοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές επικράτειες του AP2a, σε φορείς έκφρασης με επίτοπο HA. Οι επικράτειες αυτές ήταν τα αμινοτελικά τμήματα των πρώτων 165 αμινοξέων από τον πλήρους μεγέθους AP2a φυσιολογικού γονιδίου, αλλά και της μεταλλαγμένης μορφής (μετάλλαξη στην λυσίνη της θέσης 10, μοναδική θέση σουμοϋλίωσης του AP2a) Εκτός από αυτές τις δύο αμινοτελικές επικράτειες, κλωνοποιήθηκαν ακόμα και τα καρβοξυτελικά τμήματα 165-437 αμινοξέων και 122-437. Η τελευταία επικράτεια ξεκινά αμέσως μετά το τέλος της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης AP2a (εικόνα), ενώ η 165-436 αποτελεί συνέχεια των κλωνοποιημένων αμινοτελικών επικρατειών, πριν την έναρξη της βασικής περιοχής. Και οι 2 καρβοξυτελικές αυτές επικράτειες χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για να φανεί αν η μικρή περιοχή μεταξύ των 122-165aa έχει κάποια επίπτωση στην αλληλεπίδραση.

Αφού επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση όλων των επικρατειών και ελέγχθηκε η ορθότητα τους με αλληλούχιση, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση κυττάρων HeLa, ώστε να μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του επιτόπου HA. Και οι τέσσερις επικράτειες του AP2a εκφράστηκαν στα κύτταρα αυτά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, τόσο σε συνθήκες υποξίας, όσο και σε συνθήκες νορμοξίας. Ισχυρότερο σήμα και συνεπώς καλύτερη έκφραση εμφάνισαν τα καρβοξυτελικά τμήματα 165-437aa και 122-437, χωρίς να παρατηρείται διαφορά μεταξύ νορμοξίας και υποξίας. Τα τμήματα 1-165 wt και mut (μεταλλαγμένη μορφή) εμφάνισαν ασθενέστερη έκφραση σε σχέση με τα καρβοξυτελικά τμήματα. Σε αυτές όμως τις επικράτειες ήταν εμφανής και διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών, υποξίας και νορμοξίας, καθώς παρατηρήθηκε ισχυρότερο σήμα στην υποξία (σε 3 πειράματα).

Θέλοντας να μελετήσουμε και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των τεσσάρων πρωτεϊνικών επικρατειών του AP2α, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa. Καρκινικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια και επωάστηκαν σε νορμοξία και υποξία για 24 ώρες. Κατά τον ανοσοφθορισμό ανιχνεύθηκε ο επίτοπος HA με ειδικό φθορίζον αντίσωμα (Alexa 488nm). Σε τρία πειράματα δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό των επικρατειών μεταξύ υποξίας και νορμοξίας. Οι περισσότερες επικράτειες εντοπίστηκαν κυρίως στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, όμως η επικράτεια 164-437 είχε περισσότερο πυρηνικό εντοπισμό. Λόγω του μικρού μεγέθους των πρωτεϊνών (μικρότερων από 40kDa) είναι ως ένα βαθμό αναμενόμενο να μετακινούνται εύκολα μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μέσω των πόρων του πυρηνικού φακέλου.

Έχοντας στα χέρια μας τις επικράτειες και γνωρίζοντας πως εκφράζονται σωστά σε κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, με σφαιρίδια σημασμένα με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των επικρατειών του AP2α με τους HIF παράγοντες. Διαμολύνθηκαν κύτταρα 293 ταυτόχρονα με πλασμίδιο flag-HIF1α ή flag-HIF2α και πλασμίδιο HA-AP2α πλήρους μεγέθους ή των τεσσάρων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τις τέσσερις επικράτειες του AP2α. Η ανοσοκατακρήμνιση του HA έδειξε την αλληλεπίδραση του AP2α πλήρους μεγέθους με τον HIF1α, επιβεβαιώνοντας την βιβλιογραφία [83,84] και προηγούμενα πειράματα της κ. Χαχάμη, καθώς και την σύνδεση κυρίως στα καρβοξυτελικά τμήματα 165-437 και 122-437. Στο πρώτο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης παρατηρήθηκε ασθενής σύνδεση και με τα αμινοτελικά τμήματα 1-165 wt και mut, το οποίο δεν ήταν ορατό σε επανάληψη του πειράματος. Η απώλεια της δυνατότητας σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης, δεν φαίνεται να αλλάζει κάτι στην αλληλεπίδραση, καθώς εμφανίζουν παρόμοια ασθενή σύνδεση με τον HIF1α. Στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με τον HIF2α, λόγω τεχνικών προβλημάτων δεν ήταν δυνατή η εμφάνιση των αποτελεσμάτων των αμινοτελικών επικρατειών, καθώς δεν υπήρχε αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης στα εκλούσματα. Οι καρβοξυτελικές επικράτειες 165-437 και 122-437 φαίνεται να αλληλεπιδρούν εξίσου ισχυρά με τον HIF2α, όσο και με τον HIF1α. Διαφορά επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο καρβοξυτελικών επικρατειών τόσο στην έκφρασή τους, όσο και στην αλληλεπίδρασή τους με τον παράγοντα HIF, υποδηλώνοντας πως η περιοχή που ορίζεται από την διαφορά των αμινοξέων τους (122-165aa) δεν παίζει κάποιο καθοριστικό ρόλο στην περιοχή σύνδεσης με τους HIF.

Συνοψίζοντας, επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση των τεσσάρων διαφορετικών επικρατειών του AP2α σε φορείς έκφρασης με επίτοπο HA, οι οποίες αποτελούν σημαντικό εργαλείο για το εργαστήριο Βιοχημείας, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε μελλοντικά πειράματα.

Επίσης, επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων HIF1α και HIF2α με τον AP2α, όπως προκύπτει και από την βιβλιογραφία, αλλά και η σύνδεση των καρβοξυτελικών άκρων του AP2α, που φέρουν την περιοχή διμερισμού και σύνδεσης στο DNA με τους HIF. Η σουμοϋλίωση του παράγοντα, όπως επίσης και η περιοχή ενδιάμεσα της επικράτειας ενεργοποίησής του, που εντοπίζονται στον AP2α, δεν φαίνεται να επιδρούν στην σύνδεση του AP2α με τους HIF.

Επειδή ο HIF2α εκφράζεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, θα μπορούσαν ακόμη να επαναληφθούν τα πειράματα με χρήση άλλων κυτταρικών σειρών. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων θα είναι πιο ολοκληρωμένη με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs) και επιβεβαίωση συγκατακρήμνισης των μεταγραφικών παραγόντων HIF και AP2α. Η περαιτέρω μελέτη αλληλεπίδρασης ίσως να δώσει απαντήσεις σε ερωτήματα που δημιουργούνται για τον τρόπο που οι επικράτειες του AP2α συνδέονται με τους παράγοντες HIF και ενεργοποιούν την μεταγραφή, καθώς και για την σύνδεσή τους στα στοιχεία του υποκινητή για την έκφραση των γονιδίων στόχων τους.

Η μελέτη των μεταγραφικών παραγόντων HIF και AP2α και της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους σε συνθήκες υποξίας εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον ιδιαίτερα εξαιτίας του σημαντικού ρόλου που παίζουν στη ρύθμιση του καρκίνου και τη μετάσταση. Θεωρούμε ότι η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης τους στην κυτταρική υποξία και στον καρκίνο μπορεί μελλοντικά να βοηθήσει στην εύρεση και ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων ενάντια σε αυτή την θανατηφόρο νόσο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ebbessen Peter, Pettersen O. Eric, Denekapm Juliana, Littbrand Bo, Keski-Oja Jorna, Schousboe Arne, Sonnewald Ursula, Amellen Oystein, Zachar Vladimir, Hypoxia, Normoxia and Hyperoxia: Terminology for Medical In Vitro Cell Biology, *Acta Oncologica*, 2000, 39(2): 247–248
- [2] Li Jie, Xu Ying, Jiao Huike, Wang Wei, Mei Zhu, Chen Guoqiang, Sumoylation of hypoxia inducible factor-1 α and its significance in cancer, *Science China Life Sciences*, 2014, 57(7): 657–664
- [3] Semenza GL, HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations, *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(9): 3664-71
- [4] Greijer AE, van der Wall E, The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis, *Journal of Clinical Pathology*, 2004, 57:1009–1014
- [5] Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza G, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1995, 92: 5510–5514
- [6] Lee Jihyun, Lee Junho, Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-independent Hypoxia Response of the Small Heat Shock Protein hsp-16.1 gene regulated by chromatin- remodeling Factors in the Nematode *Caenorhabditis elegans*, *The Journal Of Biological Chemistry*, 2013, 288(3):1582-1589
- [7] Arany Zoltan, Foo Shi-Yin, Ma Yanhong, Ruas Jorge L, Bommi-Reddy Archana, Girnun Geoffrey, Cooper Marcus, Laznik Dina, Jessica Chinsomboon, Rangwala Shamin M., Kwan Hyuck Baek, Rosengzeig Anthony, Spiegelman, HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α , 2008, 451(7181): 1008-12
- [8] Pittman RN, Regulation of Tissue Oxygenation, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
- [9] Vadde Ramakrishna, Vemula Sarojamma, Jinka Rajeswari, Merchant Neha, Bramhachari Pallaval Veera, Nagaraju Gangi Purnachandra, Role of hypoxia inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colarectal cancer, *Critical Review in Oncology/ Hematology*, 2017, 113(9): 22-27

- [10] Michiels Carine, Physiological and Pathological Responses to Hypoxia, American Journal of Pathology, 2004, 164 (6): 1875-82
- [11] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza G, Hypoxia- inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92: 5510–5514
- [12] Wang GL, Semenza GL, Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1, The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270: 1230–1237.
- [13] Gregg L, Semenza, Vascular Responses to Hypoxia and Ischemia, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010, 30: 648-652
- [14] Dery MAC, Michaud MD, Richard DE, Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37: 535-540
- [15] Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G, Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK, The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283: 27620–27627
- [16] Soon-Sun Hong, Hyunseung Lee, Kyu-Won Kim, HIF-1 α : a Valid Therapeutic Target for Tumor Therapy, Cancer Research and Treatment, 2004, 36(6): 343-353
- [17] Kelly Timothy J, Souza Amanda L, Clish Clary B, Puigserver Pere, A Hypoxia-Induced Positive Feedback Loop Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 Stability through miR-210 Suppression of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like, Molecular And Cellular Biology, 2011, 31: 2696–2706
- [18] Li J, Xu Y, Jiao HK, Wang W, Mei Z, Chen GQ, Sumoylation of hypoxia inducible factor-1 α and its significance in cancer, Science China Life Sciences, 2014,57: 657–664
- [19] Lando David, Peet Daniel J, Gorman Jeffrey J, Whelan Dean A, Whitelaw Murray L, Bruick Richard K, FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia- inducible factor, Genes & Decelopment 2002, 16: 1466-1471
- [20] Mylonis Ilias, Chachami Georgia, Samiotaki Martina, Simos George, Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1, The Journal Of Biological Chemistry, 2006, 281(44): 33095–3310

- [21] Kalousi Alkmini, Mylonis Ilias, Politou Anastasia, Chachami Georgia, Paraskeva Efrosyni, Somos George, Casein kinase 1 regulates human hypoxia- inducible factor HIF-1, *Journal of Cell Science* 2010, 123(17): 2976-2986
- [22] Yasinka Inna M, Sumbayev Vadim V, S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity, *FEBS Letters*, 2003, 549: 105-109
- [23] Paltoglou S, Roberts BJ, HIF-1 α and EPAS ubiquitination mediated by the VHL tumour suppressor involves flexibility in the ubiquitination mechanism, similar to the other RING E3 ligases, *Oncogene*, 2007, 26: 604-609
- [24] Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S, SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 202-210
- [25] Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications, *Cell Signal*, 2005, 17:,1-9
- [26] Cheeseman MT, Tyrer HE, Williams D, Hough TA, Pathak P, Romero MR, HIF-VEGF pathways are critical for chronic otitis media in Junbo and Jeff mouse mutants, *PLoS Genet*, 2011
- [27] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia- inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions, *Experimental & Molecular Medicine*; 2004, 36: 1-12.
- [28] Doe MR, Ascano J, Kaur M, Cole MD, Myc post-transcriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells, *Cancer Research*, 2012, 72(4):949-957
- [29] Arany Zoltan, Huang Eric L, Eckner Richard, Battacharya Shoumo, Jiang Chian, Goldberg Mark A, Bunn Franklin H, Livingston David M, An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia, *Cell Biology*, 1996, 93:12969-12973
- [30] Bhattacharya Shoumo, Michels Catherine L, Leung Man-Kit, Arany Zoltan P, Kung Andrew L, Livingston David M, Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1 , *Genes and Development*, 1998, 13:64–75
- [31] Ye Liu, Jin Baek, Huafeng Zhang, Diez Roberto, Cole Robert , Semenza Gregg, RACK1 Competes with HSP90 for Binding to HIF-1 α and Is Required for O-Independent and HSP90 Inhibitor-Induced Degradation of HIF-1 α , *Molecular Cell*, 2007, 25(2): 207-217

- [32] Carbia-Nagashima Alberto, Gerez Juan, Perez-Castro Carolina, Paez-Pereda Marcelo, Silberstein Susana, Stalla Gunter K., Holsboer Florian, Arzt Eduardo, RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1 α during Hypoxia, *Cell*, 2007, 131: 309–323
- [33] Semenza GL, A compendium of proteins that interact with HIF-1 α , *Experimental Cell Research*, 2017
- [34] Hankinson O, Why does ARNT2 behave differently from ARNT?, *Toxicological Sciences*, 2008, 103:1–3
- [35] Rankin EB, Giaccia AJ, The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis, *Cell Death & Differentiation*, 2008, 15: 678–85
- [36] Depping R, Steinhoff Amrei, Svindler Susann, Kohler Mathias, Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin α /beta pathway, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1783: 394–404
- [37] Mandl Markus, Depping Reinhard, Hypoxia-Inducible Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) (HIF-1 β): Is It a Rare Exception?, *Molecular Medicine*, 2014, 20:215–220
- [38] Tian H, McKnight S L, Russell D W, Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells, *Genes & Development*, 1997, 11:72–82
- [39] Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W, HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels, *Mechanisms of Development*, 1997, 63: 51–60
- [40] Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y, A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1997, 94:4273–4278
- [41] Hogenesch J B, Chan W K, Jackiw V H, Brown R C, Gu Y Z, Pray-Grant M, Perdew G H, Bradfield C A, Characterization of a Subset of the Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Superfamily That Interacts with Components of the Dioxin Signaling Pathway, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 8581–8593
- [42] Li H, Ko HP, Whitlock JP, Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1 α , *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 21262–7
- [43] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW, Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions, *Experimental & Molecular Medicine*, 2004, 36: 1–12

- [44] Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU, Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs, *FASEB J.* 2003, 17(2): 271-3
- [45] Gordan John D, Thompson Craig B, Simon M Celeste, HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation, *Cancer Cell*, 2007, 12(2): 108–113.
- [46] Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M, Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression, *Cell Cycle*, 2007, 6:2810–2816
- [47] Sheng Li Yang, Chao Wu, Zhi Fan Xiong, Xiefan Fang, Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review), *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(2): 2411-2416
- [48] Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y and Imura N, Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: Suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 287: 808–813
- [49] Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, et al., Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1a, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 22473–81
- [50] Rapisarda A, Melillo G, Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy, *Advances in Cancer Research* 2012, 114:237–67
- [51] Chen TM, Shih YH, Tseng JT, Lai MC, Wu CH, Li YH, Tsai SJ, Sun HS, Overexpression of FGF9 in colon cancer cells is mediated by hypoxia induced translational activation, *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(5): 2932–2944
- [52] Lin SC, Chien CW, Lee JC, Yeh YC, Hsu KF, Lai YY, Lin SC, Tsai SJ, Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemo resistance and malignancy in human cancer cells, *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121:1905–16
- [53] Zhang J, Song LP, Huang Y, Zhao Q, Zhao KW, Chen GQ, Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and its role in the differentiation of myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid, *Haematologica*, 2008, 93: 1480–1487

- [54] Song LP, Zhang J, Wu SF, Huang Y, Zhao Q, Cao JP, Wu YL, Wang LS, Chen GQ, Hypoxia-inducible factor-1 α -induced differentiation of myeloid leukemic cells is its transcriptional activity independent. *Oncogene*, 2008, 27: 519–527
- [55] Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL, Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2014, 111: 5429–5438
- [56] Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ, Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma, *Molecular Cell Biology*, 2005, 25(13): 5675–86.
- [57] Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD, Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2d, with unique DNA binding and transactivation properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 40755–60
- [58] Xue X., Shah YM., Intestinal iron homeostasis and colon tumorigenesis, *Nutrients*, 2013, 28;5(7):2333-51
- [59] Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, Mino-Kenduson M *et al.*, HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer, *International Journal of Cancer*, 2009, 124: 763–771
- [60] Yoshimura R, Matsuyama M, Kawahito Y, et al., The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on urological cancer cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 2004, 13: 789–93
- [61] Flotho Annette, Melchior Frauke, Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease, *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 357-285
- [62] Geiss-Friedlander Ruth, Melchior Frauke, Concepts in sumoylation: a decade on, *Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 947-956
- [63] Schulz S, Chachami G, Kozackiewicz L, Winter U, Stankovic-Valentin N, Haas P, Hofmann K, Urlaub H, Ovaas H, Wittbrodt J, et al., Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Reports*, 2012, 13: 930–938
- [64] Herrmann Joerg, Lerman Lilach O., Lerman Amir, Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation, *Circulation Research*, 2007, 100: 1276-1291

- [65] Μπασαγιάννη Αγγελική, Κλωνοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP2a και μελέτη της σουμοϋλίωσής του σε συνθήκες υποξίας (πτυχιακή εργασία), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2015
- [66] Gaynor RB, Muchardt C, Xia YR, Kliask I, Mohandas T, Sparkes RS, Lusk AJ, *Genomics* 1991, 10: 1100-1102
- [67] Wang HV, Vaupel K, Buettner R, Bosserhoff AK, Moser M, Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP2e, *Developmental Dynamics*, 2004, 231:128
- [68] Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD, Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2d, with unique DNA binding and transactivation properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 40755–60
- [69] Werling U, Schorle H, Transcription factor gene AP-2g essential for early murine development, *Molecular and Cellular Biology*, 2002,22: 3149–56
- [70] Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H, The AP-2 family of transcription factors, *Genome Biology*, 2005, 6: 246
- [71] McPherson LA, Loktev AV, Weigel RJ, Tumor suppressor activity of AP-2a mediated through a direct interaction with p53, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 45028–33
- [72] Williams T, Tjian R, Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2, *Genes & Development*, 1991, 5: 670-682
- [73] Batsche E, Muchardt C, Behrens J, Hurst HC, Cremisi C.R Band, c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2, *Molecular Cell Biology*, 1998,18: 3647–58
- [74] Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM, Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2g transcription factor, *Cancer Research*, 2004,64: 8256–61
- [75] Bauer R, Imhof A, Pscherer A, Kopp H, Moser M, Tainsky MA and Buettner R, The genomic structure of the human AP-2 gene, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 1413-1420
- [76] Pellikainen J, Naukkarinen A, Ropponen K, Rummukainen J, Kataja V, Kellokoski J, Eskelinen M, Kosma VM, Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer, *European Journal of Cancer*, 2004, 40: 1485-1495

- [77] Garcia MA, Campillos M, Marina A, Valdivieso F, Vazquez J, Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Letters*, 1999, 444: 27-31
- [78] Park K, Kim KH, The site of cAMP action in the insulin induction of gene expression of acetyl-CoA carboxylase is AP-2, *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 17811-17819.
- [79] Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Krutmann J, Mitochondrial cytochrome c release mediates ceramide-induced activator protein 2 activation and gene expression in keratinocyte, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 47498-47507
- [80] Eloranta JJ, Hurst HC, Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumolated in vivo, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(34): 30798-804.
- [81] Wang W, Lv L, Pan K, Zhang Y, Zhao JJ, Chen JG, et al., Reduced expression of transcription factor AP-2a is associated with gastric adenocarcinoma prognosis, *PLoS One*, 2011, 6:e24897
- [82] Nordentoft I, Dyrskjød L, Bødker JS, Wild PJ, Hartmann A, Bertz S, Increased expression of transcription factor TFAP2a correlates with chemo-sensitivity in advanced bladder cancer, *BMC Cancer* 2011, 11:135.
- [83] Shi Dingbo, Xie Fangyun, Zhang Yun, Yun Tian, Wangbing Chen, Lingyi Fu, Jingshu Wang, Wei Guo, Tiebang Kang, Wenlin Huang, Wuguo Deng, TFAP2A Regulates Nasopharyngeal Carcinoma Growth and Survival by Targeting HIF-1a Signaling Pathway, *Cancer Prevention Research*, 2014, 7(2)
- [84] Steunou Anne-Lise, Ducoux-Petit Manuelle, Lazar Ikrame, Monsarra Bernard, Erard Monique, Muller Catherine, Clottes Eric, Odile Burlet-Schiltz, Laurence Nieto, Identification of the Hypoxia-inducible Factor 2 α Nuclear Interactome in Melanoma Cells Reveals Master Proteins Involved in Melanoma Development, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2013
- [85] Pangou Evanthia, Befani Vhristina, Mylonis Ilias, Samiotaki Martina, Panayotou Geirge, Simos Geirge, Liakos Panagiotis, HIF-2 α phosphorylation by CK1 δ promotes eruthropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia, *Journal of Cell Science*, 2016

[86]https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php

{87] Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, Müller RH, Rosenecker J, In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers, .Journal of Gene Medicine, 2000, 2 (4): 269–78

[88] Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, Journal of Gene Medicine, 2004, 7(5): 657–663

[89]<http://multimedia.biol.uoa.gr/%CE%97%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CF%8C%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7%20%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B5%CE%B9%CE%BD%CF%8E%CE%BD.pdf>

[90] http://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL189/04_Western_MDE.pdf

[91]<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/immunoprecipitation-ip.html>