



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που ενισχύονται από την φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK 1/2 κινάσες πρωτεϊνών»

«Investigation of new protein-protein interactions enhanced by ERK1/2-mediated phosphorylation of HIF-1α»

Ελένη Κουτσοπούλου του Γεωργίου

Λάρισα, Οκτώβριος 2022

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Μυλωνής Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γενωμικής,
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα	
Πρόλογος-Ευχαριστίες	6
Περίληψη.....	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Υποξία.....	9
1.2 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF	9
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α.....	10
1.3.1 Δομή HIF-1α.....	10
1.3.2 Λειτουργία και ρύθμιση του HIF-1α.....	10
1.4 Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α	11
1.5 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α	12
1.5.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	12
1.5.2 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης.....	12
1.5.3 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες	13
1.5.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α	15
1.6 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες πρωτεϊνών CK1δ και ERK1/2	18
1.6.1 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την CK1δ.....	18
1.6.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2	19
1.7 Ο ρόλος του HIF-1α στον καρκίνο	21
2. Σκοπός	24
3. Υλικά	25
3.1 Βακτηριακά στελέχη.....	25
3.2 Πλασμιδιακοί φορείς	25
3.3 Αντιβιοτικά	26
3.4 Ένζυμα (Ενδονουκλεάσες περιορισμού).....	26
3.5 Αντισώματα	26
3.6 Διαλύματα	27
3.7 Αντιδραστήρια.....	28
3.8 Σφαιρίδια.....	28
3.9 Κυτταρικές σειρές.....	28
3.10 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακά κύτταρα	28
3.11 Μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων	28
4. Μέθοδοι	30
4.1 Πέψεις με ένζυμα περιορισμού	30
4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	30

4.3 Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό	31
4.4 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21 RIL.....	31
4.5 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας	31
4.6.1 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων με IPTG	31
4.6.2. Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων-Λύση.....	32
4.6.3. Καθαρισμός GST-MTDs	32
4.7 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	32
4.8 Χρώση πρωτεϊνών της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue.....	33
4.9 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση ..	34
4.10 Λύση κυττάρων HeLa και λήψη εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων	34
4.11 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	35
4.12 In vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης (pull down assay)	35
4.13 In vitro φωσφορυλίωση	35
4.14 Διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης (IP: immunoprecipitation).....	36
4.15 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	37
4.16 Διαμόλυση.....	37
4.17 Αντίδραση λουσιφεράσης για τη μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε εκχυλίσματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.....	37
4.18 Ανοσοφθορισμός για μελέτη ενδοκυττάρου εντοπισμού	38
Μέρος Α: Μελέτη των μη-γενομικών ρόλων του μη-φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α στο κυτταρόπλασμα.	39
5.1 Έλεγχος των πλασμιδίων που εκφράζουν τις περιοχές HIF-1α 1-347 και HIF-1α 575-826 ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με την GST	39
5.2 Επαγωγή με IPTG των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST – HIF-1α – 1-347 και GST – HIF-1α – 575-826	41
5.3 Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού με in vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης (pull down assay).....	42
5.4 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την κινάση πρωτεϊνών CK1δ στην αλληλεπίδραση του με την τουμπουλίνη μετά από in vitro φωσφορυλίωση και δοκιμή συγκατακρήμνισης	43
5.5 Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και τουμπουλίνης σε κύτταρα.....	44
5.5.1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και τουμπουλίνης με ανοσοφθορισμό	44
5.5.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από τη CK1δ στην κατανομή του μη-τροποποιημένου από τις ERK1/2 GFP- HIF-1α στο κυτταρόπλασμα	45
Μέρος Β: Μελέτη του πυρηνικού ρόλου του HIF-1α σε σχέση με τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2.....	47

5.6.1. Έκφραση διαφορετικών μορφών του HIF-1α σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα HeLa σε συνθήκες υποξίας.....	47
5.6.2 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των μορφών IA/SA και SE του HIF-1α με λουσιφεράση.....	48
5.6.3 Ανοσοκατακρήμνιση των μορφών IA/SA και SE	49
7. Βιβλιογραφία.....	52

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας κυρίου Μυλωνή Ηλία.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κύριο Ηλία Μυλωνή, για την συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας και διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, κύριο Γεώργιο Σίμο που με δέχτηκε στο εργαστήριο ως προπτυχιακή φοιτήτρια.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Αρσένη Χριστίνα για την πολύτιμη καθοδήγηση και προθυμία να με βοηθήσει στην κατανόηση και εκπαίδευση στις συνθήκες λειτουργίας του εργαστηρίου.

Ξεχωριστά, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Γιακουμή Αντώνιο και κυρία Χαχάμη Γεωργία, για το χρόνο που αφιέρωσαν και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, καθώς η βοήθεια, οι συμβουλές και η φιλική τους διάθεση συνέβαλλαν στην ευχάριστη παραμονή μου στο εργαστήριο.

Περίληψη

Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (υποξία), είναι χαρακτηριστικό για φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIFs) είναι οι κύριοι ρυθμιστές απόκρισης στην υποξία και σχετίζονται με την ενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση και ο μεταβολισμός.

Η υπομονάδα HIF-1α είναι η πιο καλά μελετημένη ισομορφή της υπομονάδας α των HIF και ρυθμίζεται είτε με εξαρτώμενους είτε με ανεξάρτητους από το οξυγόνο (O_2) μηχανισμούς. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνει με αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έγινε η ταυτοποίηση δυο διακριτών φωσφορυλίσεων του HIF-1α. Η πρώτη σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση CK1δ στη σερίνη 247, η οποία ρυθμίζει τον ετεροδιμερισμό των υπομονάδων HIF-1α και ARNT του HIF, παρεμποδίζοντας την πραγματοποίησή του και οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α. Η δεύτερη αφορά τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2 στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643, η οποία οδηγεί σε πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α εξαιτίας της κατάργησης του σήματος πυρηνικής εξόδου που αναγνωρίζεται από την εξπορτίνη CRM-1.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τη μελέτη του μη φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 κινάσες HIF-1α στο κυτταρόπλασμα και του φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 κινάσες HIF-1α στο πυρήνα. Έγιναν επίσης πειράματα συγκατακρήμνισης για την χαρτογράφηση των νέων αλληλεπιδράσεων του HIF-1α με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και πειράματα ανοσοφθορισμού για την μελέτη της επίδρασης της φωσφορυλίωσης από τη CK1δ στην κατανομή του μη-τροποποιημένου από τις ERK1/2 GFP- HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση από την CK1δ στην αμινοτελική του επικράτεια ενισχύει την αλληλεπίδραση του κυτταροπλασματικού HIF-1α με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η τουμπουλίνη.

Abstract

Low oxygen availability (hypoxic state) is a common trait of both physiological and pathological conditions such as cancer. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the main transcriptional activators of the cellular response to hypoxia as they control the transcription of genes that are associated with processes like angiogenesis, erythropoiesis and metabolism.

HIF-1 α subunit is the most studied isoform, and it can be regulated in an oxygen-dependent or oxygen-independent manner. The regulation of its function is also controlled by protein interactions and post-transcriptional modifications.

Previous studies at the Laboratory of Biochemistry, at the Faculty of Medicine at University of Thessaly have identified two discrete modifications of HIF-1 α . CK1 δ -dependent phosphorylation of HIF-1 α at Ser247 impairs its association with ARNT and consequently attenuates the activity of HIF-1 during hypoxia. The second phosphorylation is mediated by ERK1/2 kinases that modify HIF-1 α by phosphorylating residues Ser641 and Ser643. This phosphorylation promotes the HIF-1 α nuclear accumulation and HIF-1 transcriptional activity by impairing HIF-1 α nuclear export by CRM-1.

In the present study, immunoprecipitation experiments were performed to study new protein-protein interactions of the non-phosphorylated by ERK1/2 HIF-1 α in the cytoplasm and the phosphorylated by ERK1/2 HIF-1 α inside the nucleus. *In vitro* pull-down experiments were also performed to study the association of HIF-1 α with microtubule proteins in the cytoplasm. Moreover, immunofluorescence experiments were performed to study the effect of CK1 δ phosphorylation on the distribution of the non-phosphorylated by ERK1/2 HIF-1 α in the cytoplasm. Our results have revealed that CK1 δ -mediated phosphorylation increased the association of the N-terminal domain of HIF-1 α with microtubule proteins, which shifts the balance between the mitochondrial and microtubule fractions of HIF-1 α .

1. Εισαγωγή

1.1 Υποξία

Ο ανθρώπινος οργανισμός χρειάζεται οξυγόνο (O_2) για την επιβίωσή του [1]. Η παροχή του είναι αναγκαία για διαδικασίες όπως ο αερόβιος μεταβολισμός και η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) [2]. Γι' αυτό υπάρχουν μηχανισμοί οι οποίοι εξασφαλίζουν την ομοιόσταση του O_2 .

Υπάρχουν όμως καταστάσεις στις οποίες τα επίπεδα διαθεσιμότητας οξυγόνου μειώνονται και επέρχεται υποξία. Τέτοιες καταστάσεις μπορεί να είναι φυσιολογικές, όπως το υψόμετρο [3], ή παθολογικές, όπως ο καρκίνος. Επίσης, η υποξία, έχει βρεθεί πως είναι χαρακτηριστικό κάποιων βιολογικών διεργασιών, όπως είναι η ομαλή διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων και η εμβρυογένεση [4].

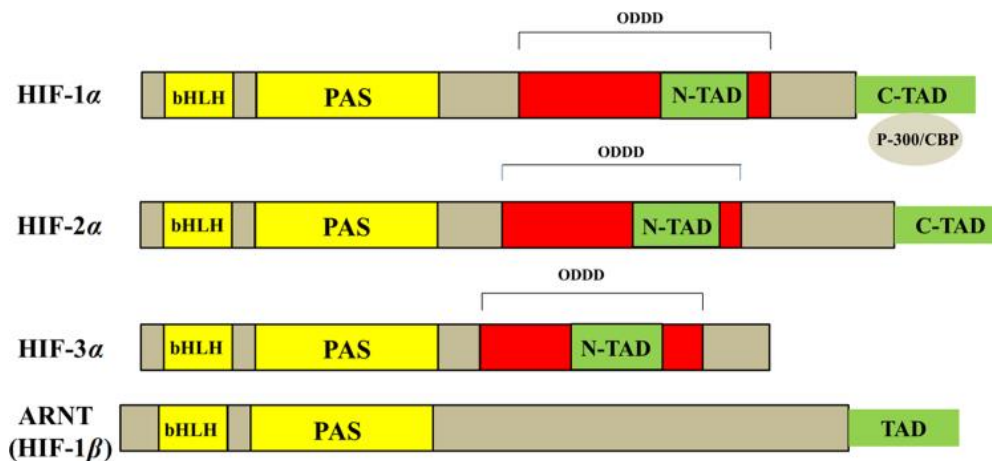
Οι αλλαγές στα επίπεδα οξυγόνου μπορούν να γίνουν αντιληπτές από όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού [5]. Η υποξία μπορεί να είναι είτε οξεία, είτε χρόνια και τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους μπορούν να ανταποκρίνονται κατάλληλα και στις δυο περιπτώσεις. Στην οξεία υποξία, η οποία διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, οι αλλαγές είναι παροδικές και γίνονται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις πρωτεΐνες. Στη χρόνια υποξία, η οποία διαρκεί λεπτά έως ώρες, οι αλλαγές αφορούν στη γονιδιακή έκφραση και τη σύνθεση πρωτεϊνών.

1.2 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors) είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που φέρουν επικράτεια έλικας-θηλειάς-έλικας (helix-loop-helix, bHLH). Αποτελούνται από την υπομονάδα α (HIF- α), η οποία ρυθμίζεται από το οξυγόνο και την σταθερά εκφραζόμενη υπομονάδα β (HIF- β) ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [6].

Στα θηλαστικά, συναντώνται τρεις ισομορφές για την υπομονάδα α , οι οποίες είναι οι: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α (Εικόνα 1). Ο HIF-1 α εκφράζεται σε όλα τα είδη κυττάρων, ενώ οι HIF-2 α και HIF-3 α εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση. Η υπομονάδα HIF-1 α , η οποία είναι η πιο καλά μελετημένη, εμφανίζει υψηλή ομολογία με την υπομονάδα HIF-2 α . Αντιθέτως, η υπομονάδα HIF-3 α είναι αυτή που έχει μελετηθεί λιγότερο και διαφοροποιείται από τις άλλες δύο ισομορφές [7].

Οι ισομορφές της υπομονάδας HIF- α και η υπομονάδα HIF- β διαθέτουν την περιοχή bHLH και δύο περιοχές PAS (Per/Arnt/Sim), την PAS-A και την PAS-B [8]. Μέσω της αμινοτελικής περιοχής bHLH, οι HIF προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία απόκρισης στην υποξία, HRE (Hypoxia Response Elements). Οι περιοχές PAS είναι υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό των υπομονάδων α και β . Στην κεντρική περιοχή των ισομορφών της υπομονάδας HIF- α , έχει αναγνωρισθεί η περιοχή ODDD (oxygen-dependent degradation domain) ενώ στο καρβοξυτελικό τους άκρο οι επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης TAD. Οι HIF-1 α και HIF-2 α διαθέτουν τις N-TAD και C-TAD, ενώ η HIF-3 α περιλαμβάνει μόνο την N-TAD. Η σταθερά εκφραζόμενη υπομονάδα HIF- β διαθέτει την C-TAD. Όλες οι υπομονάδες διαθέτουν, επίσης, τουλάχιστον μια περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS).



Εικόνα 1. Δομικές περιοχές της οικογένειας HIF. Απεικονίζονται οι τρεις ισομορφές της υπομονάδας HIF-α και η σταθερά εκφραζόμενη υπομονάδα ARNT. [9]

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α

Όπως αναφέρθηκε, η ισομορφή HIF-1α είναι η πιο καλά μελετημένη και εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η πρωτεΐνη HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξικά κατάλοιπα και εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα [10].

1.3.1 Δομή HIF-1α

Οι περιοχές που διαθέτει ο HIF-1α απεικονίζονται στην Εικόνα 2 και είναι οι εξής:

- Το αμινοτελικό άκρο, που ανήκει στη περιοχή με αμινοξέα 1-500, περιέχει την περιοχή bHLH (αμινοξέα 31-71) και την περιοχή PAS (αμινοξέα 91-350).
- Το καρβοξυτελικό άκρο, στο οποίο ανήκουν οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADS), η N-TAD (αμινοξέα 531-575) και η C-TAD (αμινοξέα 786-826) και η ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής ID (αμινοξέα 576-785).
- Η ODDD περιοχή (αμινοξέα 401-603), η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α σε φυσιολογικές συνθήκες O₂
- Σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals, NLS): ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-30) και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-754)
- Σήμα πυρηνικής εξαγωγής (Nuclear Export Signal, NES) (αμινοξέα 632-639)



Εικόνα 2. Οι δομικές - λειτουργικές περιοχές της ισομορφής HIF-1α [11]

1.3.2 Λειτουργία και ρύθμιση του HIF-1α

Ο HIF-1 ρυθμίζει γονίδια, προϊόντα των οποίων είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της αγγειογένεσης, της μεταφοράς οξυγόνου, του μεταβολισμού της γλυκόζης αλλά και για το πολλαπλασιασμό και την επιβίωση [12].

Η λειτουργία του HIF-1α ρυθμίζεται με βάση τα επίπεδα οξυγόνου, αλλά ρυθμίζεται και ανεξάρτητα από αυτό. Στα κύτταρα, ο HIF-1α μεταγράφεται συνεχώς και συντίθεται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμιστικά μόρια της μετάφρασης-σύνθεσης πρωτεϊνών.

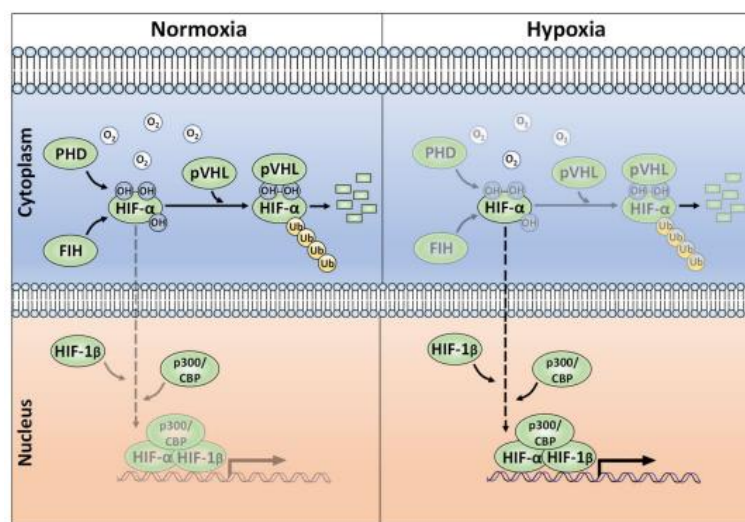
Παρουσία οξυγόνου, η αποικοδόμηση του HIF-1α γίνεται αρκετά γρήγορα, (χρόνος ημιζωής περίπου 5 λεπτά) [9]. Από την άλλη, η έλλειψη οξυγόνου σε συνθήκες υποξίας οδηγεί σε σταθεροποίηση του HIF-1α. Εκτός από την οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση ο HIF-1α ρυθμίζεται και με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες δεν εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια (παράγραφος 1.5.4).

1.4 Εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α

Όταν υπάρχει οξυγόνο, ενώ ο HIF-1α μεταγράφεται και μεταφράζεται συνεχώς, μετά τη σύνθεση του οδηγείται προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζεται από την υδροξυλίωση δύο καταλοίπων προλίνης που βρίσκονται στην επικράτεια ODDD, η οποία οδηγεί στην αναγνώριση από την πρωτεΐνη von Hippel- Lindau (pVHL). Η πρωτεΐνη pVHL, η οποία αποτελεί μέρος του συμπλέγματος E3 λιγάσης-ουβικιτίνης, προσδένεται στα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα προλίνης και οδηγεί στην ουβικιτίνωση της HIF-1α και στην αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα [13] (Εικόνα 3).

Η υδροξυλίωση της υπομονάδας HIF-1α καταλύεται με τη δράση των υδροξυλασών προλίνης (Prolyl Hydroxylase Domain, PHD) που χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, η δράση τους αναστέλλεται, με αποτέλεσμα ο HIF-1α να σταθεροποιείται και να μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με την υπομονάδα HIF-1β. Με τον ετεροδιμερισμό των δύο υπομονάδων, ο HIF-1 δρα πλέον ως μεταγραφικός παράγοντας [9].

Ένας διαφορετικός μηχανισμός ρύθμισης της υπομονάδας HIF-1α που στηρίζεται στην υδροξυλίωση αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση είναι το FIH (factor-inhibiting HIF). Το ένζυμο αυτό, υδροξυλιώνει το κατάλοιπο ασπαραγίνης 803 που ανήκει στην περιοχή C-TAD του HIF-1α. Με την υδροξυλίωση της ασπαραγίνης, εμποδίζεται η πρόσδεση του συμπαραγόντα CBP/p300, το οποίο έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης. Έτσι, εμποδίζεται η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α [14] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ο οξυγονο-εξαρτώμενος μηχανισμός ρύθμισης της υπομονάδας HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε κατάλοιπα προλίνης και ασπαραγίνης από τα ένζυμα PHD και FIH με τελικό αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω ουβικιτίνωσης ή την απώλεια δράσης του, αντίστοιχα. Σε συνθήκες υποξίας, τα ένζυμα αυτά αναστέλλονται (λόγω έλλειψης οξυγόνου) και ο HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και εκδηλώνει τη δράση του. [14]

1.5 Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση της υπομονάδας του HIF-1α

1.5.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Τα επίπεδα του HIF-1α γίνεται να ρυθμιστούν σε επίπεδο σύνθεσης του mRNA σε συνθήκες υποξίας και σε συνθήκες νορμοξίας. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) έχει βρεθεί πως συμμετέχουν στη ρύθμιση του HIF-1α [12]. Στη νορμοξία ο HIF μπορεί να υπερεκφραστεί με αύξηση της μεταγραφής του από τον παράγοντα NF-κΒ (nuclear factor-kappa B) ή από τον μεταγραφικό παράγοντα Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3). Ο παράγοντας NF-κΒ, ο οποίος ενεργοποιείται από τον παράγοντα TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, είναι σημαντικός ρυθμιστής των επιπέδων mRNA του HIF-1α, καθώς αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [15]. Επίσης, έχει βρεθεί πως αναστολή του παράγοντα Stat3, από τη κινάση PKR η οποία στοχεύει τη φωσφορυλίωση του Stat3, προκαλεί αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α [16].

1.5.2 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης

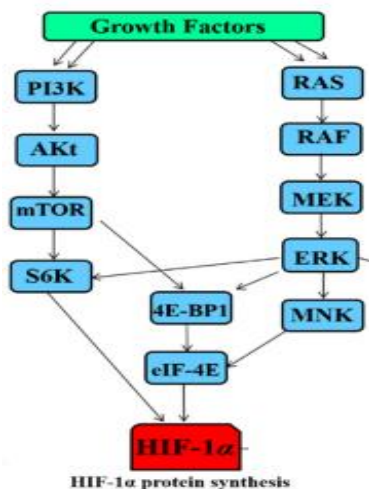
Η ρύθμιση των HIF-1α πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε συνθήκες υποξίας αλλά και σε συνθήκες νορμοξίας, ως απόκριση σε μόρια όπως αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, κυτοκίνες [12].

Σε συνθήκες νορμοξίας, η πρωτεϊνοσύνθεση επάγεται από δύο σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία πυροδοτούνται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 4.

Το ένα μονοπάτι, είναι το μονοπάτι της κινάσης της τριφωσφορικής ινσιτόλης PI3K/Akt/mTOR, το οποίο οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-1α. Η ενεργοποίηση της PI3K γίνεται από αυξητικούς παράγοντες και στη συνέχεια, η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την πρωτεϊνική κινάση B (Akt), η οποία ενεργοποιεί τελικά την κινάση mTOR (mammalian target of rapamycin). Η mTOR φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη 4E-BP1, η οποία προσδέεται κανονικά στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-4E, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη σύνδεσή τους. Η σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη για την αναστολή της μετάφρασης των mRNA που έχουν καλύπτρα, άρα η παρεμπόδιση της σύνδεσης αυτής οδηγεί σε ενισχυμένη πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α [1]. Άλλοι στόχοι της κινάσης mTOR είναι η κινάση p70S6 και η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης 2 (EEF2K) [17]. Το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR ρυθμίζεται από την βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D (καλσιτριόλη), η οποία αναστέλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα και την μεταφραστική δραστικότητα των υπομονάδων HIF-1 και HIF-2 [18]. Επίσης, η πρωτεΐνη PTEN λειτουργεί ως καταστολέας της κινάσης PI3K, με αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση της μετάφρασης του HIF-1α. Τέλος, ένας ακόμη καταστολέας είναι το σύμπλοκο TSC1/2 (tuberous sclerosis complex). Η TSC2 φωσφορυλιώνεται και αναστέλλεται από την Akt, η οποία όπως αναφέρθηκε, ενεργοποιείται από την PI3K. Είτε με την ενεργοποίηση ενός από τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από τα μόρια Ras, PI3K, Akt και mTOR, είτε με την αναστολή της TSC2, το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση της μετάφρασης του HIF-1α.

Το άλλο μονοπάτι, είναι το μονοπάτι των MAPK κινασών που εμπεριέχει τον καταρράκτη των σηματοδοτικών μορίων Ras-Raf-MEK-ERK. Οι κινάσες ERK ενεργοποιούν την πρωτεΐνη 4E-BP1 και τη κινάση S6K, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μετάφρασης, όπως περιεγράφηκε και παραπάνω. Οι ERK φωσφορυλιώνουν επίσης τη κινάση που αλληλεπιδρά με τη MAP

κινάση (MNK), η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα eIF-4E, οδηγώντας και πάλι στην αύξηση του ρυθμού μετάφρασης [9].



Εικόνα 4. Σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt/mTOR και Ras-Raf-MEK-ERK τα οποία οδηγούν στην αύξηση της μετάφρασης και σύνθεσης της πρωτεΐνης HIF-1α [9].

Σε συνθήκες υποξίας, η μετάφραση των HIF συνεχίζεται, καθώς οι HIF χρειάζονται για την αντιμετώπιση του στρες που υφίστανται τα κύτταρα και για την επιβίωσή τους. Ο έλεγχος της μετάφρασης βασίζεται σε σήματα από στοιχεία που βρίσκονται στις 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές του mRNA (UTRs). Ο μηχανισμός πάνω στον οποίο στηρίζεται η μετάφραση σε συνθήκες υποξίας αφορά στοιχεία IRES (internal ribosome entry site), τα οποία βρίσκονται στην 5' UTR περιοχή του mRNA. Τα στοιχεία αυτά επιτρέπουν τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs λειτουργώντας σαν μια μονάδα ριβοσώματος, ανεξάρτητη από το σύμπλοκο eIF4F (cap-binding complex) [19]. Υπάρχουν όμως μελέτες οι οποίες αμφισβητούν την ύπαρξη της δραστηριότητας των στοιχείων IRES σε HIF UTRs και προτείνουν την ύπαρξη ρυθμιστικών non-coding RNAs ή πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA, τα οποία αλληλεπιδρούν με τις UTRs των υπομονάδων των HIF mRNAs [20].

1.5.3 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες

Ο HIF-1α επιτυγχάνει τη σταθερότητα και τη ρύθμιση της δράσης του μέσω της αλληλεπίδρασης με ένα σύνολο πρωτεϊνών, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω:

- HSP90/RACK1

Η πρωτεΐνη HSP90 (heat shock protein 90) είναι πρωτεΐνη μοριακή συνοδός και προστατεύει πρωτεΐνες από λανθασμένη αναδίπλωση και αποικοδόμηση. Έχει βρεθεί πως προσδένεται στην επικράτεια PAS του HIF-1α και πως αναστολείς της HSP90 προκαλούν αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Ο υποδοχέας της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C (RACK1) αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και προωθεί την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα, ανεξάρτητα από VHL σύμπλοκο E3 λιγάσης, με τη πρόσδεσή του στην ελονγκίνη C. Ο RACK1 ανταγωνίζεται με την HSP90 για τη πρόσδεση στην επικράτεια PAS-A [21]. Η πρόσδεση της SSAT1 (Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1) σταθεροποιεί τη σύνδεση HIF-1α - RACK1 - ελονγκίνη C, προωθώντας την αποικοδόμηση [22]. Από την άλλη, η SEPT9_v1 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α για να εμποδίσει την ουβικιτίνωση και άρα την αποικοδόμηση του [23].

- **MgcRacGap**
Η πρωτεΐνη MgcRacGap είναι ρυθμιστής των Rho πρωτεϊνών και των Cdc42 πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Ρυθμίζει επίσης τον HIF-1α με την αλληλεπίδραση στην επικράτεια PAS-B. Η υπερέκφραση της MgcRacGap, αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τον ARNT [24], χωρίς η αναστολή αυτή να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα ή τον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α [25].
- **p53**
Ο μεταγραφικός παράγοντας p53, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο p53, εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην απόπτωση των κυττάρων. Τα επίπεδα του p53 διατηρούνται σε χαμηλό επίπεδο μέσω ουβικιτίνωσης από την πρωτεΐνη MDM2 (murine double minute 2) [26]. Ο p53 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α μέσω της επικράτειας ODDD και στρατολογεί την MDM, που το οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση [27].
- **c-Myc**
Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η απόπτωση. Υπερέκφραση του Myc σταθεροποιεί τον HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και ενισχύει τη συσσώρευσή του σε συνθήκες υποξίας [28].
- **CBP/p300**
Οι p300 και CBP συμμετέχουν σε βιολογικές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση και η ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η επικράτεια TAZ1 των συν-ενεργοποιητών CBP/p300 αλληλεπιδρά με την περιοχή C-TAD του HIF-1α και ελέγχει την μεταγραφική του ενεργότητα. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί αλλαγή στην διαμόρφωση του HIF-1α. Ο παράγοντας HIF-1α υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην περιοχή C-TAD του HIF-1α και παρεμποδίζει την παραπάνω αλληλεπίδραση [29].
- **PSMA7**
Η PSMA7, μια υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος, αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και αναστέλλει τη μεταγραφική του ενεργότητα προωθώντας την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα [30].
- **Μορταλίνη (GRP75)**
Η μορταλίνη ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 (HSP 70) και διαθέτει διάφορες λειτουργίες, όπως απόκριση στην έλλειψη θρεπτικών, επικοινωνία μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων, ενώ θεωρείται ότι προωθεί την καρκινογένεση [31]. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη μορταλίνη εμποδίζει την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες υποξίας όταν το μονοπάτι των ERK1/2 είναι ανενεργό. Η ανασταλτική επικράτεια (inhibitory domain, ID) του HIF-1α διαθέτει μια εξαρτώμενη από τις ERK1/2 περιοχή (ETD), η οποία αλληλεπιδρά με τη μορταλίνη και μπορεί να οδηγήσει τον HIF-1α στα μιτοχόνδρια. Η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη μορταλίνη έχει βρεθεί σε πειράματα αναστολής της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, τα οποία οδηγούν στην κυτταροπλασματική μετατόπιση του HIF-1α, καθώς όταν ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες ERK1/2 εντοπίζεται στον πυρήνα [32].
- **Νουκλεοφοσμίνη (NPM1)**
Η NPM1 είναι μια πρωτεΐνη του πυρηνίσκου, η οποία συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η βιογένεση του ριβοσώματος, και η επεξεργασία του mRNA. Επίσης, θεωρείται μοριακή συνοδός ιστονών και σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη [33]. Με

τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με την νουκλεοφοσμίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του HIF-1α. Έχει βρεθεί πως η παρεμπόδιση της σύνδεσης των HIF-1α και NPM1, αναστέλλει την προσαρμογή του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων και οδηγεί σε απόπτωση σε συνθήκες υποξίας. Το γεγονός αυτό αποκαλύπτει τη σημασία της αλληλεπίδρασης του HIF-1α και της NPM1 για την επιβίωση σε συνθήκες έλλειψης O₂ ή για την εξέλιξη του όγκου [34].

1.5.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α

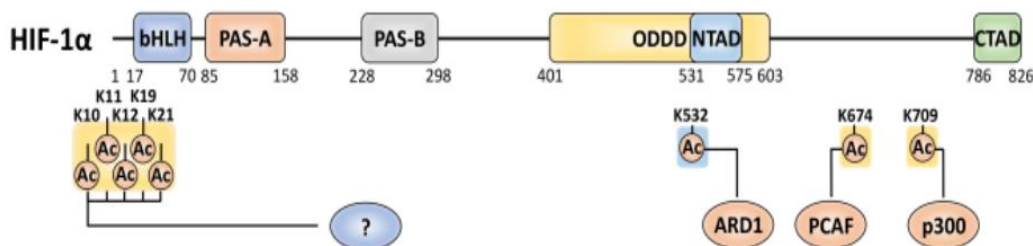
Έκτος από την υδροξυλίωση, η οποία περιεγράφηκε παραπάνω ως ένας τρόπος για την ρύθμιση των υπομονάδων HIF-1α, η σταθερότητα και η δραστικότητα τους ρυθμίζεται και από άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την προσθήκη μιας λειτουργικής ομάδας από ένζυμα. Μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις είναι η ακετυλίωση, η s-νιτροσυλίωση, η σουμουλίωση και η φωσφορυλίωση, η οποία είναι η περισσότερο μελετημένη τροποποίηση του HIF-α [14].

- Ακετυλίωση

Η πιο συνήθης μορφή ακετυλίωσης είναι η μεταφορά μιας ακετυλομάδας (CH₃CO-) σε ένα κατάλοιπο λυσίνης (K) [35]. Η ARD1 είναι μια ακετυλοτρανσφεράση, η οποία στοχεύει τον HIF-1α και ρυθμίζει τη σταθερότητά του. Η ακετυλίωση του HIF-1α γίνεται στην επικράτεια ODDD, στο κατάλοιπο K532 και προωθεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την pVHL σε συνθήκες νορμοξίας, οδηγώντας στην αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Στα ανθρώπινα κύτταρα, έχει βρεθεί πως η δραστικότητα της ακετυλοτρανσφεράσης της λυσίνης ενεργοποιείται μέσω του FKH. Ένας ακόμη παράγοντας που ακετυλιώνει τον HIF-1α είναι ο συν-ενεργοποιητής p300. Ο p300 ακετυλιώνει τον HIF-1α στην λυσίνη 709 και αυξάνει τη σταθερότητά της σε συνθήκες υποξίας με τη παρεμπόδιση της ουβικιτινίωσης.

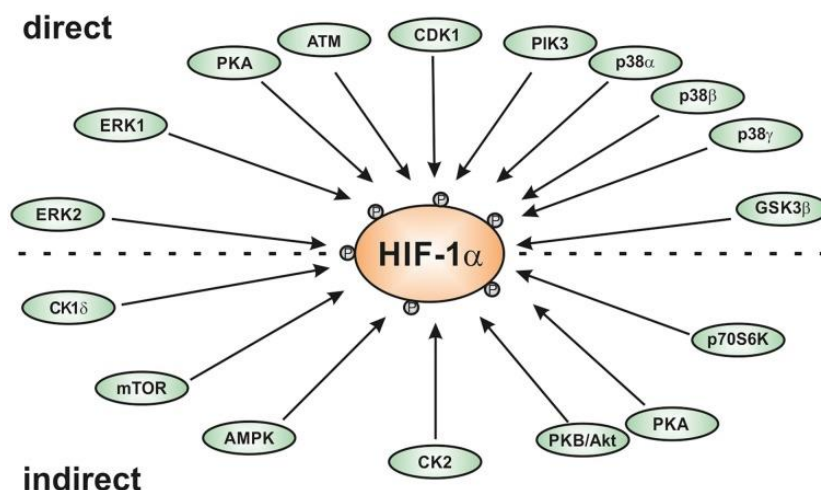
Ανεξάρτητα από το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη pVHL, η ακετυλίωση προκαλεί αλλαγές στον HIF-1α και μέσω της HDAC4 (Histone Deacetylase 4). Η HDAC4 ρυθμίζει την απακετυλίωση του HIF-1α με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητάς του, καθώς εμποδίζει την αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Η HDAC4 ελέγχει επίσης τα επίπεδα του HIF-1α, όπου συμμετέχουν τα κατάλοιπα λυσίνης K10, K11, K12, K19 και K21, τα οποία βρίσκονται στη περιοχή bHLH. Έκτος από την HDAC4, ο παράγοντας PCAF (CBP/p300-associated factor) ρυθμίζει τον HIF-1α μέσω ακετυλίωσης της λυσίνης 674, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση του συμπλόκου CBP/p300 με την περιοχή C-TAD του HIF-1α.

Υπάρχουν επίσης ανταγωνιστές της ακετυλίωσης. Ο SIRT2 ανταγωνίζεται την ακετυλίωση από το p300, και ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την PHD2. Ο SIRT1 ανταγωνίζεται την ακετυλίωση στη λυσίνη 674 από το PCAF, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση CBP/p300 για την απενεργοποίηση του HIF-1α [14].



Εικόνα 5. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην ακετυλίωση και τα κατάλοιπα αμινοξέων που στοχεύουν. Η ακετυλοτρανσφεράση ARD1 ακετυλιώνει το κατάλοιπο λυσίνη 532 οδηγώντας στην αποικοδόμηση του HIF-1α. Το μπλε χρώμα δηλώνει πως η ακετυλίωση αυτή έχει ανασταλτική δράση. Το κίτρινο χρώμα δηλώνει πως η ακετυλίωση έχει ενεργοποιητική δράση, όπως φαίνεται στα κατάλοιπα K10, K11, K12, K19 και K21, K674 και K709. Η ακετυλίωσή τους παρεμποδίζει την αποικοδόμηση του HIF-1α. Το ερωτηματικό ‘?’ αντιπροσωπεύει έναν άγνωστο ρυθμιστή [14].

- **s-Νιτροσυλίωση**
Στην τροποποίηση αυτή, μια ομάδα μονοξειδίου του αζώτου (NO) προσδένεται σε σουλφυδρικές ομάδες κυστεΐνης [36]. Η νιτροσυλίωση της κυστεΐνης 800 του HIF-1α, προκαλεί αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1 μέσω αύξησης της συγγένειας και άρα της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο CREB/p300 [37]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως η προσθήκη μιας ομάδας NO στην κυστεΐνη 800 μπορεί να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση του p300 με τον HIF-1α [38]. Η s-Νιτροσυλίωση φαίνεται να ελέγχει τη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α με την αύξηση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με το σύμπλοκο CREB/p300 [14].
- **Σουμοϋλίωση**
Στη σουμοϋλίωση, οι πρωτεΐνες SUMO (small ubiquitin-like modifier) συνδέονται ομοιοπολικά σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων [39]. Η σουμοϋλίωση καταλύεται από τα ένζυμα E1, E2 και E3, τα οποία είναι εξειδικευμένα για τις SUMO πρωτεΐνες. Η διαδικασία αντιστρέφεται από μια οικογένεια πρωτεασών, τις σουμο ισοπεπτιδάσες. Η κυριότερη οικογένεια αυτών είναι οι SENPs (Sentrin/SUMO-specific proteases), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ωρίμανση των SUMO πρωτεϊνών, την αποδέσμευση των SUMO από τα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα ή από τις πολύ-SUMO αλυσίδες. Σε ήπιες συνθήκες οξειδωτικού στρες (ROS), η SENP3 σταθεροποιείται και προωθεί την μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1 μέσω παρεμπόδισης της σύνδεσης των SUMO2/3 στο p300, το συν-ενεργοποιητή του HIF-1α [40]. Η σύζευξη με τη SUMO-1 πραγματοποιείται στα κατάλοιπα λυσίνης 391 και 477, η επίδραση όμως στο HIF-1α δεν έχει διευκρινιστεί [14].
Μια περίπτωση είναι πως ο HIF-1α ρυθμίζεται θετικά μέσω της τροποποίησης από τη SUMO-1 στα κατάλοιπα Lys391/Lys477, οδηγώντας στη σταθερότητα και στην αυξημένη μεταγραφική του ενεργότητα [41].
Από την άλλη, έχει βρεθεί πως ο HIF-1α ρυθμίζεται και από τις πρωτεΐνες SUMO-2 (in vivo και in vitro) και SUMO-3, και πως η E3 λιγάση SUMO-3 RanBP2/Nup538 προωθεί τη σύνδεση με τον HIF-1α. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η σύνδεση με τις SUMO-1 in vivo και in vitro και βρέθηκε πως η σουμοϋλίωση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α [42].
- **Φωσφορυλίωση**
Μια από τις πιο κοινές και σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση. Στην τροποποίηση αυτή, γίνεται προσθήκη μιας ομάδας -PO₄ σε κατάλοιπα αμινοξέων, όπως η σερίνη (S), η θρεονίνη (T) και η τυροσίνη (Y). Η φωσφορυλίωση ρυθμίζει κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούν τα μονοπάτια τα οποία οδηγούν στη φωσφορυλίωση καταλοίπων των πρωτεϊνών-στόχων [43]. Η τροποποίηση του παράγοντα HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης ρυθμίζει τη σταθερότητα, τη δραστηριότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του όμως διαφέρουν ανάλογα με το σήμα, το κυτταρικό τύπο ή τον ιστό, καθώς επηρεάζονται οι κινάσες οι οποίες συμμετέχουν [11].
Οι κινάσες συμμετέχουν στη ρύθμιση του HIF-1α είτε με άμεσο τρόπο είτε έμμεσα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διαφορετικές κινάσες που παίρνουν μέρος στη ρύθμιση του HIF-1α και δρουν είτε άμεσα είτε έμμεσα [11].

Οι κινάσες GSK3 και PLK3 ρυθμίζουν τον HIF-1α άμεσα και οδηγούν σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα.

- GSK3

Η GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) διαθέτει δύο ισομορφές, την GSK3α και την GSK3β και συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, καθώς διαθέτει πάνω από 100 υποστρώματα [44].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφος 1.5.2), το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR ρυθμίζει τον HIF-1α αυξάνοντας τη μεταγραφή, τη σταθερότητα και τη μετάφρασή του. Η ρύθμιση αυτή δεν είναι άμεση από την Akt, αλλά γίνεται μέσω πρωτεϊνών στόχων της Akt, όπως η mTOR και η GSK3. Η PKB φωσφορυλιώνει τις ισομορφές GSK3α και την GSK3β στα κατάλοιπα σερίνης 21 και 9 αντίστοιχα, οδηγώντας σε αναστολή της δράσης της GSK3. Η ενεργοποίηση της GSK3 ρυθμίζει αρνητικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α [11, 45].

Στις επικράτειες ODDD και N-TAD του HIF-1α έχουν βρεθεί θέσεις φωσφορυλίωσης από την GSK3, οι οποίες φαίνεται να εξαρτώνται από το είδος των κυττάρων. Σε μία μελέτη, οι θέσεις βρέθηκαν στα κατάλοιπα σερίνης 551, 555 και 589, ενώ σε μια άλλη μελέτη βρέθηκαν οι θέσεις T498, S502, S505, T506 και S510. Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης και στις δύο μελέτες ήταν η αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα, μέσω της πρωτεΐνης FBW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7), η οποία λειτουργεί ως υπόστρωμα της λιγάσης της ουβικιτίνης E3. Άρα, η ενεργοποίηση της GSK3 ρυθμίζει αρνητικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α.

Ως ανταγωνιστής της παραπάνω δράσης, λειτουργεί η πρωτεάση USP28 (ubiquitin-specific protease 28), η οποία με την ενεργοποίησή της από την SENP1, προωθεί τη σταθερότητα του HIF [14].

- PLK3

Οι κινάσες Plks ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, κυρίως τη φάση G2 και τη μίτωση. Η PLK3 (Polo-like kinase 3) συμμετέχει ως απόκριση στο στρες και φωσφορυλιώνεται μετά από βλάβη του DNA αλλά και στην ογκογένεση [11, 46]. Φωσφορυλιώνει τον HIF-1α σε δύο κατάλοιπα, στη σερίνη 576 που βρίσκεται στην επικράτεια ODDD και στη σερίνη 657, η οποία βρίσκεται μετά το NES (nuclear export signal). Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, μέσω της pVHL [14].

Οι κινάσες CDK, ATM και PKA ρυθμίζουν τον HIF-1α άμεσα και αυξάνουν τη σταθερότητα και τη μεταγραφική του ενεργότητα.

- CDKs

Οι CDKs (cyclin dependent kinases) συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η CDK1 και η CDK5 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α και αυξάνουν τη σταθερότητά του. Η CDK1 φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη σερίνη 668 και η CDK5 στη σερίνη 687. Η CDK2 αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα [14, 47].

- ATM

Οι κινάσες ATM (ataxia-telangiectasia mutated) ανήκουν στην οικογένεια PIKK (PI3K-like protein kinase) και συμμετέχουν στο μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, συγκεκριμένα στις θραύσεις διπλής αλυσίδας DSBs (DNA double-strand breaks) [48]. Έχει βρεθεί πως οι κινάσες αυτές συμμετέχουν επίσης στην ρύθμιση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, καθώς σε κύτταρα με έλλειψη των ATM παρατηρείται αυξημένη έκφραση του HIF-1, κάτι που εξαρτάται από το οξειδωτικό στρες στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα αυτά [49]. Η ATM στοχεύει τη σερίνη 696 του HIF-1α και αυξάνει τη σταθερότητα και τη μεταγραφική του ενεργότητα [14].

- PKA

Οι PKA (intracellular protein kinase A) ενεργοποιούνται από το cAMP, και ρυθμίζουν τη σταθερότητα του HIF-1α, φωσφορυλιώνοντας 6 διαφορετικά αμινοξέα. Η φωσφορυλίωση στα αμινοξέα T63 και S692 προωθούν τη σταθερότητα και τη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α, εμποδίζοντας την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα [14, 50].

Μεγάλης σημασίας για την ενεργοποίηση του HIF-1 έχουν οι φωσφορυλιώσεις του HIF-1α από τις κινάσες CK1δ και ERK1/2, οι οποίες μελετώνται από το Εργαστήριο Βιοχημείας, και αποτελούν κομμάτι της παρούσας έρευνας θα αναλυθούν στην συνέχεια ξεχωριστά.

1.6 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες πρωτεϊνών CK1δ και ERK1/2

1.6.1 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από την CK1δ

Η οικογένεια των κινασών CK1 (casein kinase 1) στοχεύει κατάλοπα σερίνης/θρεονίνης και διαθέτει 7 ισομορφές (α, β, γ1, γ2, γ3, δ και ε). Οι ισομορφές της κινάσης αυτής αναγνωρίζουν διάφορα υποστρώματα, συμμετέχοντας έτσι σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η επιδιόρθωση βλαβών του DNA, οι κερκίδιοι ρυθμοί και ο πολλαπλασιασμός [51].

Αποτελέσματα μελετών του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έδειξαν πως η CK1δ στοχεύει το κατάλοπο σερίνης 247 στην επικράτεια PAS B του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, προκαλώντας μείωση της συγγένειας του με τον ARNT. Η παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού των δύο υπομονάδων οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1. Μεταλλάξεις κατάργησης της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 247 (Σερίνη -> Αλανίνη, S ->A), έδειξαν αύξηση του ετεροδιμερισμού των υπομονάδων HIF-1α και ARNT και της δραστηριότητας του HIF-1α, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση ή τον πυρηνικό εντοπισμό. Από την άλλη, μεταλλάξεις που μιμούνται τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 247 (Σερίνη -> Ασπαρτικό οξύ, S-> D), οδήγησαν σε παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού και αναστολή της δραστηριότητας του HIF-1α χωρίς να επηρεάζεται η σταθερότητά του ή ο πυρηνικός εντοπισμός [52].

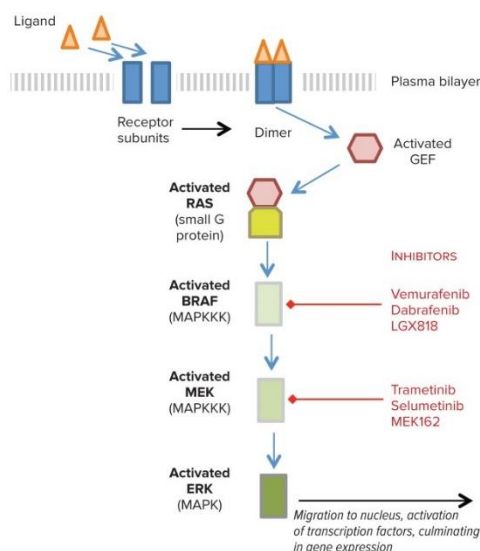
Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου, καθώς προωθεί το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προσφέροντας προσαρμογή στις συνθήκες της υποξίας. Άρα, η δράση της CK1δ θα μπορούσε να αναστείλει αυτή τη διαδικασία. Η προσαρμογή στις συνθήκες της υποξίας οφείλεται στην αλλαγή στο

μεταβολισμό των υδατανθράκων (παράγραφος 1.7). Όμως, ο HIF-1 συμμετέχει και στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αυξάνοντας την σύνθεση λιποσταγονιδίων μέσω της λιπίνης-1, μια διαδικασία σημαντική στην εξέλιξη του όγκου για την αποφυγή της λιποτοξικότητας. Η CK1δ με την αναστολή του HIF-1, επηρεάζει την έκφραση της λιπίνης-1, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τον υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού στην υποξία και άρα προσφέρει προστασία από την εξέλιξη του όγκου [53, 54].

Άρα, η κινάση CK1δ εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό των δύο υπομονάδων του HIF-1 με τη φωσφορυλίωση στη σερίνη 247, οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1.

1.6.2 Φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2

Οι κινάσες ERK1 και ERK2 (ή αλλιώς p44/p42) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και συμμετέχουν στο μονοπάτι MAPK με τον καταρράκτη Ras-Raf-MEK-ERK, όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.5.2. Η RAS είναι μια μικρή G πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει επίσης στο μονοπάτι PI3K. Οι Raf-MEK-ERK είναι πρωτεϊνικές κινάσες. Η RAF ανήκει στις MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) και έχει 3 ισομορφές, τις Raf-1/c-Raf, B-Raf, και A-Raf. Η MEK ανήκει στις MAPKK κινάσες, οι οποίες είναι ειδικές για κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης και έτσι ενεργοποιούν τις ERK, οι οποίες ανήκουν στις MAPK κινάσες. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινάει με τη σύνδεση ενός προσδέτη, όπως κυτοκίνες ή ορμόνες, στον υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης, RTK. Το αποτέλεσμα της σηματοδότησης είναι η μεταφορά των ERK στο πυρήνα για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και άρα τη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 7). Αυξημένη σηματοδότηση του μονοπατιού MAPK παρατηρείται συχνά σε όγκους, άρα η θετική ρύθμιση του HIF από το MAPK μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου [55, 56].



Εικόνα 7. Αναπαράσταση του μονοπατιού MAPK. Στην εικόνα παρουσιάζεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού με τη σύνδεση ενός προσδέτη στον υποδοχέα RTK, η οποία προκαλεί το σχηματισμό ενός διμερούς το οποίο προσελκύει τους παράγοντες GEFs (guanine–nucleotide exchange factors) και αυτοί με τη σειρά τους ενεργοποιούν την RAS επιτρέποντας τη πρόσδεση του GTP. Στη συνέχεια, η RAS ενεργοποιεί την κινάση BRAF, η BRAF ενεργοποιεί την MEK και η MEK ενεργοποιεί την ERK, η οποία μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες. Στην εικόνα φαίνονται επίσης και κάποιοι αναστολείς του μονοπατιού [55].

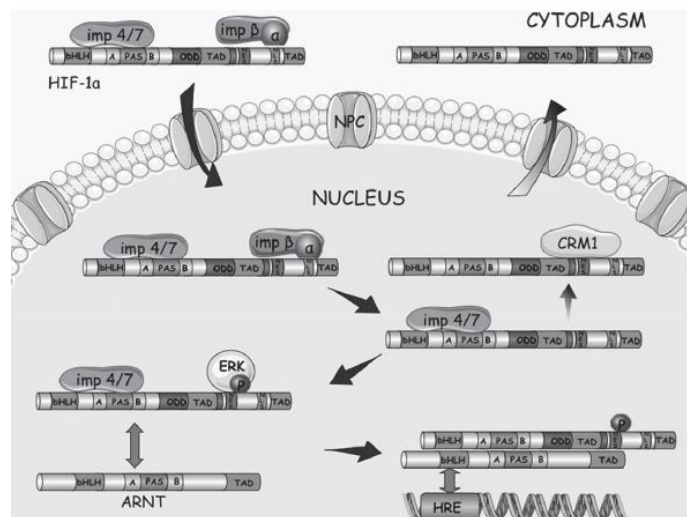
Σε μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο Βιοχημείας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, βρέθηκε πως τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνουν οι ERK 1/2 (p44/p42 MAPK) στον HIF-1α είναι η σερίνη 641 και η σερίνη 643. Επίσης, μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης, με μετατροπή των καταλοίπων αυτών σε αλανίνη ή με προσθήκη ενός αναστολέα της MEK, του PD98059, έδειξαν μείωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α και αναστολή της συσσώρευσής του στον πυρήνα. Από την άλλη, προσθήκη μίας ουσίας (Ierptomycin B), η οποία λειτουργεί ως αναστολέας της εξπορτίνης CRM1, μιας πρωτεΐνης υπεύθυνης για την πυρηνική έξοδο, οδήγησε σε συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α στα κατάλοιπα Ser-641/643 από τις κινάσες MAPK προωθεί την μεταγραφική δραστηριότητα και τη πυρηνική συσσώρευση, καθώς παρεμποδίζει την έξοδο από τον πυρήνα μέσω της CRM1 [57].

Σε επόμενη μελέτη, βρέθηκε ένα υδρόφοβο σήμα πυρηνικής εξόδου (nuclear export signal, NES) στον HIF-1α, ⁶³²MEDIKILI⁶³⁹, το οποίο αλληλεπιδρά με την CRM1. Μεταλλάξεις που μιμούνται τη φωσφορυλίωση (Σερίνη -> Γλουταμινικό, S -> E) στη θέση Ser641, έδειξαν υψηλή συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα και υψηλή μεταγραφική ενεργότητα [58].

Έχει ακόμη βρεθεί πως η φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη μορταλίνη, καθώς η μη τροποποιημένη μορφή του HIF-1α που βρίσκεται εκτός πυρήνα εντοπίζεται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων μέσω της μορταλίνης και προσφέρει προστασία από την απόπτωση (παράγραφος 1.5.3) [32].

Η φωσφορυλίωση από τις ERK, ρυθμίζει επίσης και την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την νουκλεοφοσμίνη (NPM1). Όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.5.3, η αλληλεπίδραση της νουκλεοφοσμίνης με τον HIF-1α είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του HIF-1α [34].

Άρα, οι κινάσες ERK1/2 ρυθμίζουν τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α ανάλογα με την ενεργότητα τους. Όταν το μονοπάτι των ERK είναι ενεργό, φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643, παρεμποδίζοντας το σήμα πυρηνικής εξόδου, το οποίο εξαρτάται από την CRM1 και οδηγούν στην πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α. Αντιθέτως, όταν το μονοπάτι είναι ανενεργό, ο HIF-1α δεν φωσφορυλιώνεται και εξάγεται από τον πυρήνα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ρύθμιση του HIF-1α από την ERK φωσφορυλίωση. Αφού ο HIF-1α σταθεροποιηθεί, αλληλεπιδρά με ιμφορτίνες για τη μεταφορά του στο πυρήνα μέσω του NPC (nuclear pore complexes). Αν το μονοπάτι ERK είναι ανενεργό, τότε η CRM1 θα προσδεθεί στο NES, οδηγώντας τον HIF-1α πίσω στο κυτταρόπλασμα. Αν το μονοπάτι ERK είναι ενεργό, θα φωσφορυλιώσει τον HIF-1α, μπλοκάροντας το σήμα του NES, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, τον

ετεροδιμερισμό του με την υπομονάδα ARNT και την ενεργοποίηση της δράσης του ως μεταγραφικός παράγοντας [59].

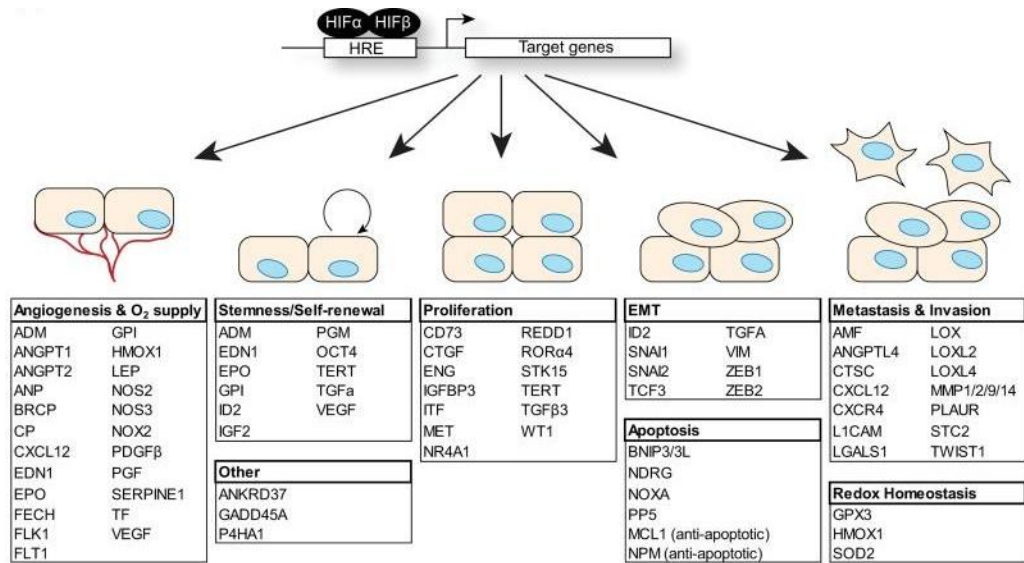
1.7 Ο ρόλος του HIF-1α στον καρκίνο

Στους κακοήθεις όγκους οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανεξέλεγκτη αγγειογένεση, συχνά παρατηρείται ανάπτυξη υποξικού περιβάλλοντος, εξαιτίας μεγάλων απαιτήσεων για ενέργεια και περιορισμένης τροφοδοσίας. Η υποξία με τη σειρά της ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF. Άλλα μονοπάτια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι τα PI3K/AKT/mTOR, MAPK και NFκB, τα οποία συμμετέχουν στο πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση, το μεταβολισμό, τη μετάσταση, καθώς και τη φλεγμονή [60].

Ο καρκίνος διαθέτει κάποια κρίσιμα στάδια, χαρακτηριστικά της εξέλιξής του. Ο HIF-1α ενεργοποιεί τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων που διαμεσολαβούν για την εκδήλωση των γνωρισμάτων που προωθούν την ογκογένεση και συμμετέχουν στα στάδια της εξέλιξής της (Εικόνα 9).

- **Απόπτωση**
Στα καρκινικά κύτταρα το προ-αποπτωτικό γονίδιο BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3), ελέγχεται από την υποξία και η έκφρασή του σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο [61]. Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α προκαλεί την έκφραση του BNIP3 [62]. Έχει βρεθεί, πως αυξημένη έκφραση της BNIP3 συνδέεται με αρνητική πρόγνωση εξέλιξης του όγκου. Η έκφρασή της έχει βρεθεί αυξημένη σε υποξικές περιοχές και σε καρκίνο του μαστού [62].
- **Μεταβολισμός**
Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα μεταβολικό “διακόπτη”, γνωστό ως Warburg effect. Αυτό που συμβαίνει είναι να αναπρογραμματίζεται ο μεταβολισμός και να πραγματοποιείται αναερόβια γλυκόλυση, η οποία προσφέρει ενέργεια και θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα ελέγχει το μεταβολισμό, εξισορροπώντας το O₂ που καταναλώνεται με αυτό που προμηθεύονται τα κύτταρα. Ο HIF-1α ενεργοποιεί τη παραγωγή ενέργειας με τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην μεταφορά της γλυκόζης, όπως το GLUT1 (glucose transporter 1) αλλά και των περισσότερων γονιδίων των ενζύμων της γλυκόλυσης [63].
- **Αγγειογένεση**
Ο παράγοντας VEGF (vascular endothelial growth factor) είναι κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης, η οποία χρειάζεται για την κάλυψη των απαιτήσεων των κυττάρων για ενέργεια και οξυγόνο. Η ενεργοποίηση του HIF-1α οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του VEGF, το οποίο με τη σειρά του προωθεί την αγγειογένεση όταν προσδεθεί στους υποδοχείς του (VEGFR) [64].
- **Μετάσταση**
Η υποξία προωθεί την εισβολή του όγκου στα κύτταρα μέσω του παράγοντα HIF-1α. Ο HIF-1α συμμετέχει στην ενεργοποίηση των γονιδίων MMPs (matrix metalloproteinases), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [65]. Οι πρωτεΐνες MMPs σχετίζονται με την EMT (epithelial-mesenchymal transition), δηλαδή τη μετατροπή των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων σε μεταστατικά μεσεγχυματικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς η μετάσταση σχετίζεται άμεσα με κακή πρόγνωση του καρκίνου. Ο HIF-1α προωθεί τη διαδικασία

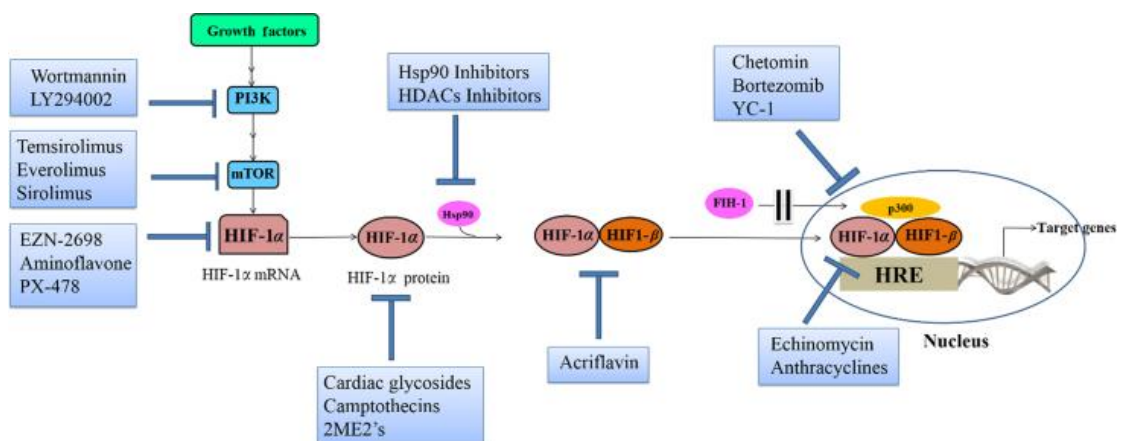
EMT με πολλούς τρόπους, όπως μέσω των μεταγραφικών παραγόντων TWIST, Snail, Slug, SIP1 και ZEB1 [66].



Εικόνα 9. Συμμετοχή των μεταγραφικών παραγόντων HIF στην ρύθμιση διαφόρων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν τελικά στην προώθηση της καρκινογένεσης [67].

Εξαιτίας της σημαντικής επιρροής που έχει ο HIF-1 στην εξέλιξη του όγκου, επόμενο βήμα ήταν η εύρεση μορίων τα οποία δρουν ως αναστολείς και στοχεύουν το μονοπάτι ενεργοποίησής του. Τα μόρια αυτά, διακρίνονται με βάση το στάδιο του μονοπατιού το οποίο θα αναστείλουν. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 10, κατηγοριοποιούνται ως τα εξής [1]:

- Αναστολείς της mRNA έκφρασης του HIF-1α, όπως EZN-2698, Aminoflavone (AF)
- Αναστολείς της μετάφρασης του HIF-1α, όπως Camptothecins (CPTs), 2-Methoxyestradiol (2ME2)
- Αναστολείς της σταθερότητας του HIF-1α, όπως Geldanamycins (GAs), Arigenin (ανήκουν στους αναστολείς της Hsp90)
- Αναστολείς του ετεροδιμερισμού του HIF-1, όπως Acriflavin
- Αναστολείς της σύνδεσης του HIF-1 με το DNA, όπως Anthracyclines
- Αναστολείς της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1, όπως Chetomin
- Αναστολείς του HIF-1, οι οποίοι έχουν δράση σε πολλαπλά στάδια, όπως YC-1, PX-478



Εικόνα 10. Αναστολείς του μονοπατιού ενεργοποίησης του HIF-1α [1].

Η υποξία και, πιο συγκεκριμένα, οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF, εμπλέκονται στην αντίσταση σε θεραπείες κατά του καρκίνου, όπως η χημειοθεραπεία, και σχετίζονται με κακοήθεις και επιθετικούς όγκους και άρα με κακή πρόγνωση. Για αυτό, η εύρεση και ανάπτυξη αναστολέων που στοχεύουν τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες και το μονοπάτι ενεργοποίησής τους, έχει προξενήσει το ενδιαφέρον και την προσπάθεια για την κλινική χρήση τους.

2. Σκοπός

Η φωσφορυλίωση του HIF-1α είναι μία από τις πιο καλά μελετημένες και σημαντικές μετα-μεταφραστικές του τροποποιήσεις. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί από το εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Π.Θ. οι φωσφορυλίωσεις του από τις κινάσες CK1δ και ERK1/2. Η φωσφορυλίωση από την CK1δ στη Ser247 εμποδίζει τον ετεροδιμερισμό των υπομονάδων HIF-1α και ARNT, οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Από την άλλη, η τροποποίηση του HIF-1α από τις ERK1/2 κινάσες ρυθμίζει τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-1α ανάλογα με την ενεργότητα τους, καθώς όταν το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό, φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα Ser641 και Ser643, παρεμποδίζοντας το σήμα πυρηνικής εξόδου, και οδηγούν στην αύξηση της συγκέντρωσης του HIF-1α στο πυρήνα. Η παρούσα διπλωματική εργασία διακρίνεται σε δύο σκέλη, με σκοπό τη διερεύνηση νέων αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης ή μη από τις ERK1/2 μορφής του HIF-1α.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά το πρώτο σκέλος, σκοπός είναι να πραγματοποιηθεί μελέτη των μη-γενομικών ρόλων του μη-φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά, ο σχεδιασμός *in vitro* πειραμάτων θα βοηθήσει στην εύρεση των τμημάτων κατά μήκος του HIF-1α, τα οποία αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων. Επίσης, θα συμβάλουν στην διερεύνηση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης της κινάσης CK1δ στις αλληλεπιδράσεις αυτές. Το επόμενο βήμα θα καθορισθεί ανάλογα με τα αποτελέσματα που θα προκύψουν.

Στο δεύτερο σκέλος, στόχος είναι η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης από τις ERK1/2 μορφής του HIF-1α, με μελέτη του πυρηνικού ρόλου του HIF-1α σε σχέση με αυτή τη φωσφορυλίωση. Για να γίνει αυτό, χρειάζεται να διερευνηθεί η επίδραση της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 κινάσες στην ενεργότητα του HIF-1α. Εφόσον επιβεβαιωθεί η δραστικότητα του φωσφορυλιωμένου HIF-1α, ένα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης, μπορεί να αποκαλύψει τις αλληλεπιδράσεις του με πρωτεΐνες του πυρήνα. Για την ανακάλυψη νέων αλληλεπιδράσεων, τα δείγματα της ανοσοκατακρήμνισης μπορούν να σταλούν για φασματοσκοπία μάζας.

Συνοψίζοντας, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση νέων αλληλεπιδράσεων του HIF-1α οι οποίες σχετίζονται με μη-γενομικές ή πυρηνικές λειτουργίες του HIF-1α.

Εικόνα 12. Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1. (Ανατύπωση από: SnapGene <https://www.snapgene.org>)

3.3 Αντιβιοτικά

Χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη καλλιέργειών βακτηριακών κυττάρων

- Αμπικιλίνη: ανήκει στην οικογένεια πενικιλίνης και χρησιμοποιείται για την επιλογή μετασηματισμένων κυττάρων.
- Χλωραμφαινικόλη: είναι συνθετικό αντιβιοτικό και απομονώνεται από στελέχη *Streptomyces venezuelae*.
- Καναμυκίνη: ανήκει στις αμινογλυκοσίδες και απομονώνεται από στελέχη *Streptomyces kanamyceticus*

3.4 Ένζυμα (Ενδονουκλεάσες περιορισμού)

Χρησιμοποιήθηκαν για διαγνωστικές πέψεις των κομματιών HIF-1α 1-347 και HIF-1α 575-826

- BamHI (New England Biolabs)
- HindIII (New England Biolabs)
- XhoI (New England Biolabs)
- PstI (New England Biolabs)

3.5 Αντισώματα

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Πρωτεΐνη
anti-tubulin	Ποντίκι	1:10000	αναγνωρίζει την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη
anti-GFP	Αίγα	1:5000	αναγνωρίζει την πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein)
anti-GRp75	Κουνέλι	1:1000	αναγνωρίζει τη μορταλίνη
anti-GST	Ποντίκι	1:10000	αναγνωρίζει τη GST
phosphoserine	Ποντίκι	1:400	αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένες σερίνες
anti-HIF-1α	Ποντίκι	1:500	αναγνωρίζει τον HIF-1α
NPM1	Ποντίκι	1:5000	αναγνωρίζει τη νουκλεοφωσμίνη

anti-mouse	Αίγα	1:3000	Δευτερεύων αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP
anti-goat	Ποντίκι	1:3000	Δευτερεύων αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP

3.6 Διαλύματα

Διαλύματα για το καθαρισμό πρωτεΐνης από βακτηριακά κύτταρα

- PBS Tween 1x: PBS 10x, Tween, H₂O
- Διάλυμα Laemmli: 50mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,1% κυανό της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη, 100mM DTT
- Διάλυμα γλουταθειόνης: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8,5 50mM και γλουταθειόνη 10mM

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer): 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, pH 8,3

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE: 40 mM Tris-Cl pH8.5, 20mM -οξικό οξύ, 1mM EDTA
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer): κυανό του ξυλενίου , βρωμοφαινόλη και γλυκερόλη
- Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου

Διαλύματα για τη χρώση πρωτεϊνών πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

- Διάλυμα χρώσης: 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue, 50% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ και ddH₂O
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 20% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ

Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer): 125 mM Tris-Borate (pH 8,5), 0,2% SDS και 0,5 mM DTT
- Διάλυμα χρωστικής Ponceau S: 2% w/v Ponceau, 30% v/v τριχλωρο-οξικό οξύ και 30% v/v σουλφοσαλικυλικό οξύ
- Διάλυμα γάλακτος κορεσμού (blocking): 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας: 100 ml λουμινόλη (0,022 gr/100 ml Tris-HCl pH 8,5 c=0,1M), 100 μl κουμαρικό (0,0112 gr/ 10 ml DMSO) και 30 μl H₂O 30% v/v

Διάλυμα για διαγνωστικές πέψεις

- Διάλυμα cutsmart 10x (New England Biolabs)

Διάλυμα λύσης κυττάρων για την απομόνωση εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων.

- PME Buffer 10x: MES 1M, EGTA 0,25 M, EDTA 0,2 M, DTT 100mM, GTP 100mM, AEBSF 100mM

Διάλυμα για ανοσοκαθίζηση (IP)

- IP Buffer: HEPES 7,5 pH 0,5 M, NaCl 5 M, MgCl 1 M, Triton 10%, GTP 100 mM, AEBSF 100mM

3.7 Αντιδραστήρια

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων

- PEI (polyethylenimine): είναι ένα υψηλά φορτισμένο κατιονικό πολυμερές, το οποίο συνδέεται με ανιονικά υποστρώματα.
- TurboFect: είναι ένα αποστειρωμένο διάλυμα ενός κατιονικού πολυμερούς, το οποίο δημιουργεί σύμπλοκα με το DNA

Για τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας (Promega)

- Διάλυμα Passive Lysis 5x σε αραιώση 1x
- Διάλυμα Luciferase Assay
- Διάλυμα Stop & Glow®

3.8 Σφαιρίδια

- Σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης
- Σφαιρίδια protein-G

3.9 Κυτταρικές σειρές

HeLa S3: ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας (εκφράζουν HIF-1α όχι HIF-2α)

HeLa S3 *HIF1A*^{-/-}: ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας. Έχουν επεξεργαστεί με την τεχνική CRISPR/Cas9 (Υποψήφια διδάκτορας κα Χρ. Αρσένη)

3.10 Θρεπτικά μέσα για βακτηριακά κύτταρα

- Luria broth (LB): 1% w/v Bactone-tryptone, 0,5% w/v yeast extract, 0,5% w/v NaCl

3.11 Μέσα για καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων

- Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων
- Ορός FBS: Ορός εμβρύου βοός, περιέχει αυξητικούς παράγοντες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων

- Διάλυμα P/S: Περιέχει αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη
- Διάλυμα θρυψίνης: οδηγεί στην αποκόλληση των κυττάρων
- PBS 1x: χρησιμοποιείται για πλύση των κυττάρων

4. Μέθοδοι

4.1 Πέψεις με ένζυμο περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες και μπορούν να τεμαχίζουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Για αυτό χρησιμοποιούνται για τεχνικές όπως η απομόνωση και η κλωνοποίηση γονιδίων σε ειδικούς φορείς. Οι αντιδράσεις πέψης χρησιμοποιούνται για να αντληθούν πληροφορίες, όπως ο προσανατολισμός ενός ενθέματος, δηλαδή του τμήματος DNA που κλωνοποιήθηκε.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Αρχικά μετά την επιλογή του ενζύμου περιορισμού, αναμιγνύονται τα εξής αντιδραστήρια:
 - Πλασμιδιακό DNA
 - Διάλυμα Cutsmart 10x
 - Ένζυμο
 - Νερό (H₂O)
2. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 ώρα

4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση τόσο νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) όσο και πρωτεϊνών, βάση της κίνησης φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Ο διαχωρισμός γίνεται κυρίως βάση μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊκών οξέων.

Διαδικασία:

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

1. Προσθήκη 0,6 gr αγαρόζης για πήκτωμα 60 ml που θα έχει περιεκτικότητα αγαρόζης 1%
2. Διαλυτοποίηση της αγαρόζης σε διάλυμα TAE 1x 60 ml και θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων
3. Προσθήκη 7 μl βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση
4. Απόχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έως ότου να πήξει

Προετοιμασία δειγμάτων

1. Στα δείγματα που θα φορτωθούν, προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) 6x σε τελική συγκέντρωση 1x

Ηλεκτροφόρηση

1. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα
2. Φόρτωση δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής
3. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης V=100 Volt
4. Οπτικοποίηση και παρατήρηση με τη συσκευή Uvitec Alliance Cambridge Chemiluminescence Imaging System (Alliance Software)

4.3 Παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό

Προετοιμασία θρεπτικού υλικού

1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού LB με τη προσθήκη άγαρ 2% w/v (V=250 ml για την παρασκευή 10 τρυβλίων)
2. Ανάδευση του διαλύματος και μεταφορά για αποστείρωση
3. Προσθήκη 250 μl αντιβιοτικού αμπικιλίνης (1:1000) και ανάδευση

Προετοιμασία τρυβλίων

1. Προσθήκη του θρεπτικού σε κάθε τρυβλίο (25 ml) με φλόγιστρο αναμμένο
2. Παραμονή των τρυβλίων στον πάγκο μέχρι να πήξει το θρεπτικό υλικό

4.4 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21 RIL

Ο μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.coli με επιθυμητά πλασμίδια μπορεί να γίνει είτε με χημική κατεργασία και θερμικό σοκ των βακτηρίων ή με ηλεκτροδιάτρηση. Ακολουθήθηκε η πρώτη τεχνική:

1. Βακτηριακά κύτταρα E.coli καθίστανται δεκτικά με χημική κατεργασία (υπήρχαν ήδη δεκτικά βακτηριακά κύτταρα E.coli από την υποψήφια διδάκτορα Χρ. Αρσένη)
2. Επώαση βακτηριακών κυττάρων στο πάγο για 30 λεπτά, ώστε να προσλάβουν τον πλασμιδιακό φορέα
3. Θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό, για να δημιουργηθούν πόροι στη μεμβράνη
4. Προσθήκη θρεπτικού υλικού LB (700 μl)
5. Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
6. Φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 3 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου
7. Επίστρωση βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό της επιλογής χλωραμφαινικόλη (Chl)
8. Ολονύχτια επώαση για 16 ώρες στους 37°C.

Το στερεό θρεπτικό υλικό περιέχει ήδη το αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη (Amp).

4.5 Δημιουργία υγρής καλλιέργειας

Για τη προετοιμασία της υγρής καλλιέργειας ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Αποστείρωση κωνικών (100ml)
2. Τρυβλία που είχαν προετοιμαστεί με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη
3. Σε κάθε κωνική γίνεται προσθήκη: Amp (20μl), Chl (20μl), θρεπτικό υλικό LB (20ml), αποικία από τρυβλίο
4. Ολονύχτια ανάδευση 170 rpm, 37°C

4.6.1 Επαγωγή βακτηριακών κυττάρων με IPTG

Το IPTG (ισοπρόπυλο-β,D-θειογαλακτοπυρανοσίδιο) είναι δομικό ανάλογο της λακτόζης. Η δυνατότητά του να μη διασπάται από τη β-γαλακτοζιδάση αλλά να δεσμεύεται και να αδρανοποιεί τον καταστολέα Iac, του επιτρέπει να λειτουργεί ως επαγωγέας του οπερονίου της λακτόζης. Με την αδρανοποίηση του καταστολέα, ο υποκινητής παραμένει ελεύθερος και προσδένεται σε αυτόν η RNA πολυμεράση ξεκινώντας τη μεταγραφή και επομένως τη μετάφραση των γονιδίων.

Διαδικασία:

1. Από κατάλληλο τρυβλίο που περιέχει βακτηριακές αποικίες (BL21-RIL) έγινε συλλογή 3-4 και τελικά τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό (Amp)
 2. Επώαση όλη νύχτα στους 37°C – 1^{ος} εμβολιασμός
 3. Μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από την παραπάνω καλλιέργεια (1:100), ώστε η νέα καλλιέργεια (500 ml LB) να ξεκινήσει από OD=0,05-0,07 – 2^{ος} εμβολιασμός
 4. Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C με 225grm ανάδευση έως ότου η καλλιέργεια φτάσει σε OD=0,4
 5. Προσθήκη 0,1mM IPTG στην καλλιέργεια και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία 23°C
 6. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4000grm (σε ρότορα 45-11-30 f Eppendorf 5417) στους 4°C για 15 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκειμένου θρεπτικού υλικού
 7. Ξέπλυμα του ιζήματος των κυττάρων με απεσταγμένο νερό (dH2O)
 8. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4000grm στους 4°C για 15 λεπτά. Αφαίρεση του υπερκειμένου
 9. Διατήρηση του ιζήματος των κυττάρων στους -20°C O/N
- *Τα κύτταρα στα βήματα 7-10 κρατούνται σε πάγο
- *Πριν τη προσθήκη IPTG και μετά, γίνεται συλλογή δείγματος (-IPTG και +IPTG)

4.6.2. Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων-Λύση

1. Το ίζημα των κυττάρων μετά την επαγωγή επαναιωρείται σε 8ml κατάλληλο διάλυμα PBS Tween 1x.
2. Λύση των κυττάρων με υπερήχους (amplitude 80, 5 φορές ανά 20 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων)
3. Φυγοκέντρηση του παραπάνω εκχυλίσματος μετά τους υπέρηχους στις 1000grm (σε ρότορα 45-11-30 f Eppendorf 5417) για 30 λεπτά
4. Διαχωρισμός διαλυτού από αδιάλυτο κλάσμα

4.6.3. Καθαρισμός GST-MTDs

1. Σε falcon 15ml, 200μl σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (3 πλύσεις, 10 λεπτά η καθεμιά, με το προηγούμενο διάλυμα)
2. Προσθήκη του προηγούμενου εκχυλίσματος (8ml) στα σφαιρίδια της στήλης, επώαση υπό ανακίνηση για 1 ώρα στους 4°C
3. 3 πλύσεις, 10 λεπτά η καθεμιά με το προηγούμενο διάλυμα
4. Αφαίρεση του υγρού από τα beads
5. Έκλυση σε 750μl γλουταθειόνη σε Tris pH=8 (3 διαδοχικές εκλούσεις)
 - Προσθήκη εκλουστικού
 - 5 λεπτά under rotation 4°C
 - φυγοκέντρηση 3000grm 3min
 - παραλαβή εκλούσματος

4.7 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μακρομορίων με βάση τη μετακίνηση των φορτισμένων μορίων εξαιτίας

ηλεκτρικού πεδίου. Ο διαχωρισμός γίνεται βάση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών. Το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS: Sodium dodecyl sulfate) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό και λειτουργεί ως αποδιατακτικό μέσο, εξασφαλίζοντας το αρνητικό φορτίο και καταστρέφοντας σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης. Κατά το συμπολιμερισμό ακρυλαμίδιου και δις-ακρυλαμίδιου σχηματίζεται το πολυακρυλαμίδιο. Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) είναι υπεύθυνο για την έναρξη του πολυμερισμού και το N, N, N, N,-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED) για την επιτάχυνσή του. Το πήκτωμα επιστοίβαξης είναι υπεύθυνο για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών και το πήκτωμα διαχωρισμού είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό τους.

Διαδικασία:

Προετοιμασία πηκτωμάτων ακρυλαμίδης:

1. Τοποθέτηση των τζαμιών, των διαχωριστικών (spacers) και των πλακών σε κατάλληλη συσκευή για την παρασκευή των πηκτωμάτων
2. Προσθήκη 5 ml του πηκτώματος διαχωρισμού 10% w/v ακρυλαμίδης, pH 8,8 ανάμεσα στο τζάμι και την πλάκα
3. Προσθήκη 4 ml πηκτώματος επιστοίβαξης 10% w/v ακρυλαμίδης, pH 6,8, αφού πολυμεριστεί το πήκτωμα διαχωρισμού

Πήκτωμα διαχωρισμού (7,5 cm ύψος και 1 mm πάχος) – 10% w/v		Πήκτωμα επιστοίβαξης (2,5 cm ύψος και 1 mm πάχος) – 10% w/v	
Αποστειρωμένο νερό	2,5 ml	Αποστειρωμένο νερό	2,5 ml
Διάλυμα διαχωρισμού 4X	1,25 ml	Διάλυμα διαχωρισμού 4X	1 ml
40% Ακρυλαμίδη	1,25 ml	40% Ακρυλαμίδη	0,45 ml
10% APS	40 μl	10% APS	30 μl
TEMED	20 μl	TEMED	15 μl

Ηλεκτροφόρηση:

1. Μόλις πήξει, μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου καλύπτεται πλήρως με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running buffer)
2. Φόρτωση 30 μl από το δείγμα και 1 μl μάρτυρα “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder”
3. Πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή ένταση $I = 40 \text{ mA}$.

4.8 Χρώση πρωτεϊνών της πηκτής με Coomassie Brilliant Blue

Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρώση της πηκτής σε διάλυμα Coomassie Brilliant Blue σε μεθανόλη και οξικό οξύ.

1. Χρώση με το διάλυμα Coomassie Brilliant Blue
2. Σταθερή ανάδευση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Προσθήκη διαλύματος αποχρωματισμού και σταθερή ανάδευση για 1 ώρα
4. Απομάκρυνση διαλύματος αποχρωματισμού με επώαση σε νερό για 30 λεπτά

Με το πέρας της διαδικασίας η χρωστική απομακρύνεται από την πηκτή αλλά όχι από τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως μπλε ζώνες.

4.9 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση

Η ανοσοαποτύπωση (Western) περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση, σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια την ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Διαδικασία:

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

1. Αφαίρεση του πηκτώματος ακρυλαμίδης από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθέτησή του σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 1x.
2. Εξισορρόπηση 6 χαρτιών Whatman 3MM και της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης στο ίδιο διάλυμα.
3. Ακολουθεί η τοποθέτηση με τρία χαρτιά Whatman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πηκτώμα ακρυλαμίδης και τέλος άλλα τρία χαρτιά Whatman στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, πάνω στην πλάκα της καθόδου.
4. Τοποθέτηση του πηκτώματος με προσανατολισμό προς τον αρνητικό πόλο (άνοδο) και πραγματοποίηση της ηλεκτρομεταφοράς στα 10 V για 60 λεπτά.
5. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, χρώση της μεμβράνης με το Ponceau.

Ανοσοανίχνευση

1. Πλύσεις της μεμβράνης με νερό
2. Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα BSA για 1 ώρα, για να καλυφθούν μη ειδικές θέσεις
3. Πλύσεις μεμβράνης με PBS Tween
4. Ολονύκτια επώαση με το κατάλληλο αντίσωμα
Επόμενη μέρα
5. Απομάκρυνση αντισώματος και πλύσεις μεμβράνης με PBS Tween
6. Επώαση μεμβράνης με δευτερεύον αντίσωμα για 1 ώρα
7. Απομάκρυνση αντισώματος και προσθήκη διαλύματος οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

4.10 Λύση κυττάρων HeLa και λήψη εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων

Για τη λήψη εκχυλισμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. αφαίρεση DMEM από τα κύτταρα HeLa που έχουν καλλιεργηθεί (8.000.000 κύτταρα / πιάτο)
2. προσθήκη και αφαίρεση PBS για καθαρισμό
3. scrape για λήψη των κυττάρων και μεταφορά σε Eppendorf (200 μl PME buffer και scrape)
4. φυγοκέντρηση (3 λεπτά, 1000 rpm)
5. πιπετάρισμα pellet με PME buffer
6. πιπετάρισμα με σύριγγα
7. χρήση συσκευής homogenizer
8. προσθήκη PME Buffer (800 μl)
9. φυγοκέντρηση 1h, 4°C, 13.3rpm (τελικός όγκος 1 ml)

Σύσταση PME buffer:

- MES (1M)
- EGTA (0,25 M)
- AEBF (100mM)
- MgSO₄ (100mM)
- DTT (1000mM)
- GTP (100mM)

4.11 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος αυτή είναι μια χρωματομετρική ποσοτική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 να προσδέεται σε μόρια πρωτεΐνης υπό όξινες συνθήκες. Μόλις γίνει αυτή η πρόσδεση, επέρχεται η αλλαγή από καφέ χρώμα σε μπλε. Τα μόρια που προσδέεται χρωστική είναι κυρίως αμινοξικά κατάλοιπα, όπως η αργινίνη και η λυσίνη. Το μέγιστο απορρόφησης αλλάζει ανάλογα με τις συνθήκες. Σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνικών συμπλόκων απορροφά στα 595 nm.

Διαδικασία:

1. 5μl από το δείγμα
2. Συμπλήρωση μέχρι 100 μl με νερό
3. 1 ml Bradford
4. Vortex
5. 595 nm φωτομέτρηση
6. Υπολογισμός συγκέντρωσης με $A = 0,0357 \cdot C + 0,0088$
H C είναι σε μg: διαίρεση με τα μl που προστέθηκαν ώστε το αποτέλεσμα να βγει σε μg/μl

4.12 In vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης (pull down assay)

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών in vitro. Στο πείραμα χρησιμοποιούνται σφαιρίδια τα οποία συνδέονται λόγω αγκιστείας με τη πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί «δόλωμα» για την πρωτεΐνη-στόχο.

1. Παρασκευή διαλύματος PBS Tween 1x
2. Σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (4 tubes x 25 μl beads)
Φυγοκέντρηση 1000 rpm – 1 min -> προσθήκη διαλύματος -> 10 min ανάδευση
Φυγοκέντρηση 1000 rpm – 3 min -> αφαίρεση υπερκειμένου με σύριγγα -> προσθήκη διαλύματος -> 10 min ανάδευση
Φυγοκέντρηση 1000 rpm – 3 min -> αφαίρεση υπερκειμένου με σύριγγα -> προσθήκη διαλύματος -> 10 min ανάδευση
3. Προσθήκη δειγμάτων – συγκεκριμένη ποσότητα από το δείγμα (υπολογισμός με τη μέθοδο Bradford) και συμπλήρωση με το διάλυμα
4. 1 ώρα ανάδευση
5. 3 πλύσεις (οι 2 πρώτες με PBS Tween και η 3^η με PME Buffer)

4.13 In vitro φωσφορυλίωση

Η τεχνική αυτή συνήθως χρησιμοποιείται για τη ταυτοποίηση ενός υποστρώματος κινάσης ή τη μέτρηση της δραστηριότητας μιας κινάσης. Οι κινάσες είναι ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά μίας ομάδας φωσφόρου από ένα μόριο ATP σε ένα υπόστρωμα,

δίνοντας ένα φωσφορυλιωμένο προϊόν και ένα μόριο ADP. Με τον εντοπισμό του φωσφορυλιωμένου προϊόντος, μπορεί να βρεθεί η δραστηριότητα της κινάσης.

1. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση υπερκειμένου από τα tubes
2. Σειρά προσθήκης σε κάθε συνθήκη: H₂O, Buffer ενζύμου, ATP (1 mM), ένζυμο CK1δ (στο ένα από τα δυο tubes κάθε συνθήκης)
3. 1 ώρα ανάδευση – 30°C
4. Αφαίρεση υπερκειμένου
5. Προσθήκη PME Buffer (600 μl)
6. Ανάδευση για 10 λεπτά
7. Προσθήκη extracts τουμπουλίνης (300 μl)
8. O/N ανάδευση
9. Φυγοκέντρηση
10. 3 πλύσεις: Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη PME Buffer - Ανάδευση για 10 λεπτά
11. Πλύση με Laemmli 4x: Προσθήκη – 1 λεπτό vortex – 1 λεπτό πάγκο - 1 λεπτό vortex
12. Φυγοκέντρηση 1 λεπτό-20°C-13.3 rpm
13. Αφαίρεση υγρού – Μεταφορά σε άλλο erpendorf
14. Φυγοκέντρηση 1 λεπτό-20°C-13.3 rpm
15. Αφαίρεση υγρού αν έχει μείνει

4.14 Διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης (IP: immunoprecipitation)

Με την ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation) είναι δυνατή η ταυτοποίηση και μελέτη των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων. Χρησιμοποιούνται σφαιρίδια πάνω στα οποία ακινητοποιείται το αντίσωμα και γίνεται επώαση με τα κύτταρα που περιέχουν τη πρωτεΐνη στόχο, ώστε να συνδεθούν.

Σφαιρίδια protein G:

1. Πλύσεις των σφαιριδίων (25 μl) protein G με το IP Buffer (3 πλύσεις, 10 λεπτά η καθεμία)

Κύτταρα:

1. Κύτταρα από υποξία:
Ξέπλυμα με PBS – 150 μl IP Buffer – χρήση scraper – πιπετάρισμα για ανάδευση - μεταφορά σε erpendorf
2. Πάγος για 10 λεπτά
3. Μετά τα 10 λεπτά – φυγοκέντρηση: 12,5 rpm, 15 min, 4°C
4. Μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφορά του υπερκειμένου σε Erpendorf (300 μl)
5. Δείγμα 25 μl και προσθήκη 4x Laemmli (8,33 μl) και DTT (1μl)
6. Δείγμα 2 μl για Bradford, υπολογισμός συγκέντρωσης αντισώματος (anti-GFP) και προσθήκη στο υπερκείμενο
7. 2h ανάδευση
8. Φυγοκέντρηση – 1 λεπτό top speed
9. Μεταφορά στα σφαιρίδια (284,33 μl)
10. 2h ανάδευση
11. Πλύσεις
12. Εκλούσεις:
 - Αφαίρεση υγρού

- Προσθήκη 30 μl Laemmli 2x
- 1min ανάδευση με vortex, 1min επώαση στο πάγκο και πάλι 1min ανάδευση με vortex
- Φυγοκέντρηση top speed 1 min
- Αφαίρεση σφαιριδίων protein G
- Προσθήκη 1,5 μl DTT & 3,5 μl Laemmli

4.15 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ώστε να διατηρηθούν και να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα, όταν έχουν φτάσει σε ένα ποσοστό κορεσμού 80% και μεγαλύτερο. Υπήρχαν έτοιμα καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα HeLa ή HeLa *HIF1A*^{-/-} από την υποψήφια διδάκτορα Χρ. Αρσένη.

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από το πιάτο
2. Προσθήκη PBS 1x και αφαίρεση
3. Προσθήκη θρυψίνης (1 ml)
4. Επώαση για 5 λεπτά
5. Προσθήκη θρεπτικού μέσου (4 ml DMEM) για να γίνει επαναιώρηση των κυττάρων
6. Ποσότητα από το αιώρημα (1 ml) προστίθεται σε νέο πιάτο με θρεπτικό μέσο (8 ml DMEM)

4.16 Διαμόλυνση

Η διαμόλυνση έχει ως στόχο την εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων στα κύτταρα.

Διαδικασία:

Προετοιμασία πιάτων για κάθε συνθήκη που χρειάζεται να μελετηθεί με κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

Την επόμενη μέρα και εφόσον τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί ξεκινάει η διαδικασία της διαμόλυνσης.

1. Σε κάθε συνθήκη προστίθενται DMEM +/- (χωρίς αντιβιοτικά ή FBS), DNA, κατάλληλο αντιδραστήριο (αναλογία DNA:αντιδραστήριο – 1:2)
2. Επώαση για 20 λεπτά
3. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα πιάτα, πλύση με PBS, προσθήκη πλήρους DMEM
4. Μετά την επώαση, προσθήκη κάθε συνθήκης στο αντίστοιχο πιάτο
5. 4 ώρες επώαση στους 37°C και σε 5% CO₂
6. Πλύση με PBS
7. Προσθήκη DMEM +/-
8. Ολονύχτια επώαση στους 37°C και σε 5% CO₂

Οι συγκεντρώσεις DNA και τα θρεπτικά μέσα προσαρμόζονται ανάλογα με αντιδραστήριο που θα χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση (Αποτελέσματα, 5).

4.17 Αντίδραση λουσιφεράσης για τη μέτρηση μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1 σε εκχυλίσματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας γονιδίων. Οι λουσιφεράσες επιλέγονται καθώς είναι οξειδωτικά ένζυμα τα οποία εκπέμπουν φως με το φαινόμενο της βιοφωταύγειας. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η κλωνοποίηση της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου στόχου σε πλασμίδιο (στην παρούσα διπλωματική πέντε επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία του υποκινητή του γονιδίου του *VEGFA*), ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης, και διαμόλυνση των

κυττάρων με πλασμιδιακό DNA λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας. Επίσης, γίνεται διαμόλυνση και με το πλασμιδιακό DNA της λουσιφεράσης της Renilla για να χρησιμοποιηθεί στην κανονικοποίηση των μετρήσεων.

Διαδικασία:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα
2. Τρεις πλύσεις των κυττάρων με 1x PBS και αφαίρεση
3. Προσθήκη 20 μl διαλύματος λύσης σε κάθε πηγαδάκι στο πιάτο 96 θέσεων και ανάδευση για 15 λεπτά
4. Προσθήκη διαλύματος (20 μl) Luciferase Assay και μέτρηση στο λουμινόμετρο
5. Προσθήκη 1x stop & glo (20 μl) και μέτρηση στο λουμινόμετρο
6. Υπολογισμός του λόγου των δύο τιμών

4.18 Ανοσοφθορισμός για μελέτη ενδοκυττάριου εντοπισμού

Με τον ανοσοφθορισμό είναι δυνατή η ανίχνευση αντιγόνων με τη χρήση φθορίζοντων ή συζευγμένων με φθοριοχρώματα αντισωμάτων. Κατά τον ανοσοφθορισμό, τα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος (ανάλογα με το φθορίζον μόριο) και απελευθερώνουν την ενέργεια με τη μορφή φωτονίων σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Διαδικασία:

1. Σε πιάτο 12 θέσεων προστίθενται: μια καλυπτρίδα σε κάθε θέση, θρεπτικό υλικό DMEM και κύτταρα HeLa.
2. Τα κύτταρα (100.000 κύτταρα) επωάζονται όλο το βράδυ σε 37°C και 5% CO₂
3. Την επόμενη μέρα επωάζονται σε συνθήκες υποξίας για 4 ώρες
4. Πλύση με PBS 1x
5. Προσθήκη του διαλύματος μονιμοποίησης, φορμαλδεΐδη (3,7% αραιωμένη με PBS 1x) και επώαση στο σκοτάδι για 5 λεπτά
6. Τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με PBS 1x
7. Προσθήκη Triton 0,1% (500 μl) για την αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών και επώαση για 15 λεπτά στο ψυγείο
8. Προσθήκη 500 μl διαλύματος 3% BSA και επώαση για 1 ώρα στο ψυγείο
9. Αφαίρεση της BSA και προσθήκη 0,15 μl alpha-Tubulin (σε 300 μl 1% BSA)-PBS TWEEN
10. Ολονύκτια επώαση στο ψυγείο
11. Τρεις πλύσεις με PBS Tween την επόμενη ημέρα
12. Προσθήκη anti-mouse IgG (1:500 σε 1% BSA PBS TWEEN) και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα
13. Τρεις πλύσεις με PBS Tween και στη συνέχεια εμβάπτιση των καλυπτρίδων σε H₂O με τη βοήθεια λαβίδας και στέγνωμα σε απορροφητικό χαρτί
14. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με DAPI για 30 λεπτά
15. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

5. Αποτελέσματα

Μέρος Α: Μελέτη των μη-γενομικών ρόλων του μη-φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α στο κυτταρόπλασμα.

5.1 Έλεγχος των πλασμιδίων που εκφράζουν τις περιοχές HIF-1α 1-347 και HIF-1α 575-826 ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με την GST

Προκειμένου να εκφραστούν τα τμήματα 1-347 και 575-826 του HIF-1α ως πρωτεΐνες σύντηξης με την GST τα πλασμίδια που φέρουν το αντίστοιχο cDNA ελέγχθηκαν με διαγνωστικές πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, για την ύπαρξη ενθέματος, τον σωστό προσανατολισμό και τη γραμμικότητα μετά από πέψη σε μοναδική θέση. Για το κάθε πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ένζυμα περιορισμού:

	pGEX-4T1-HIF-1α 1-347	pGEX-4T1-HIF-1α 575-826
Έλεγχος ενθέματος	BamHI	BamHI
Έλεγχος προσανατολισμού	XhoI	PST1
Γραμμικό	HindIII	XhoI

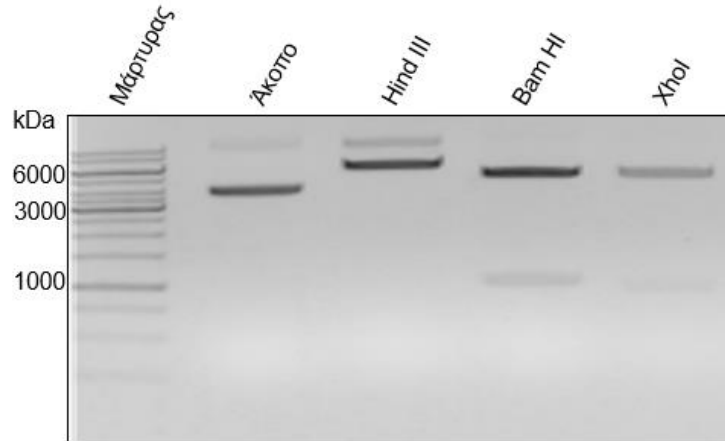
Το διάλυμα πέψης για το κάθε πλασμίδιο παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες

pGEX-4T1-HIF-1α 1-347				
	άκοπο	BamHI	XhoI	HindIII
DNA	1,4 μl	1,4 μl	1,4 μl	1,4 μl
Cutsmart Buffer	-	2 μl	2 μl	2 μl
Ένζυμο	-	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
H ₂ O	18,6 μl	16,4 μl	16,4 μl	16,4 μl

pGEX-4T1-HIF-1α 575-826				
	άκοπο	BamHI	PST1	XhoI
DNA	0,66 μl	0,66 μl	0,66 μl	0,66 μl
Cutsmart Buffer	-	2 μl	2 μl	2 μl
Ένζυμο	-	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
H ₂ O	19,34 μl	17,14 μl	17,14 μl	17,14 μl

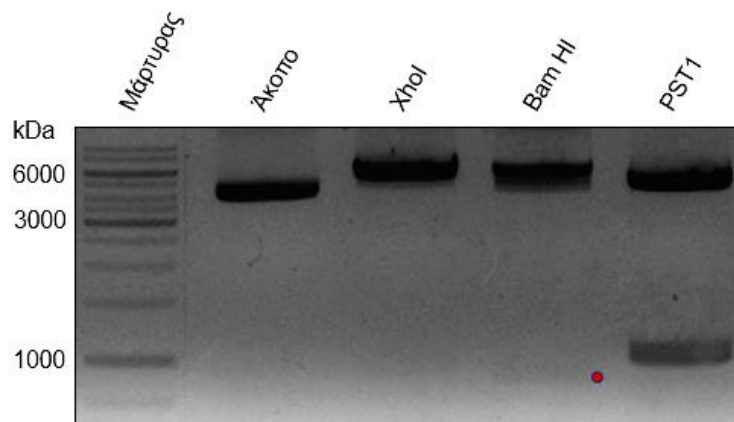
Η επώαση των δειγμάτων έγινε για 1 ώρα στους 37°C. Μόλις ολοκληρώθηκαν οι διαγνωστικές πέψεις, τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση της συσκευής Uvitec Alliance Cambridge Chemiluminescence Imaging System (Alliance Software) και παρουσιάζονται παρακάτω.

pGEX-4T1-HIF-1α 1-347	
Ένζυμο περιορισμού	Τμήματα DNA μετά από πέψη
BamHI	4969 bp / 1041 bp
XhoI	5010 bp / 1000 bp
HindIII	6010 bp



Εικόνα 13. Διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα *Bam*HI, *Xho*I, *Hind*III για το πλασμίδιο *pGEX-4T1-HIF-1α 1-347*.

pGEX-4T1-HIF-1α 575-826	
Ένζυμο περιορισμού	Τμήματα DNA μετά από πέψη
<i>Bam</i> HI	4969 bp / 753 bp
<i>PST</i> 1	4690 bp / 1032 bp
<i>Xho</i> I	5722 bp



Εικόνα 14. Διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα *Bam*HI, *PST*1, *Xho*I για το *pGEX-4T1-HIF-1α 575-826*. Ο κόκκινος κύκλος αντιστοιχεί στη ζώνη των 753 bp που προκύπτει μετά από τη πέψη με το ένζυμο *Bam* HI.

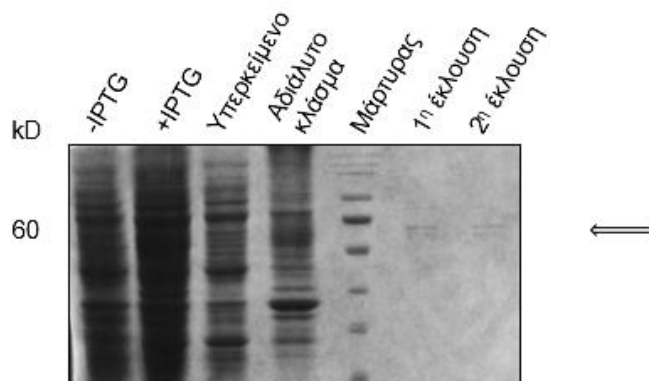
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνες 13 και 14), τα ενθέματα βρίσκονται στο σωστό μοριακό μέγεθος και ο προσανατολισμός τους είναι σωστός σύμφωνα με τα θραύσματα που προκύπτουν από τα ένζυμα περιορισμού (*Xho*I για το *HIF-1α 1-347* και *PST*1 για το *HIF-1α 575-826*).

5.2 Επαγωγή με IPTG των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST – HIF-1α – 1-347 και GST – HIF-1α – 575-826

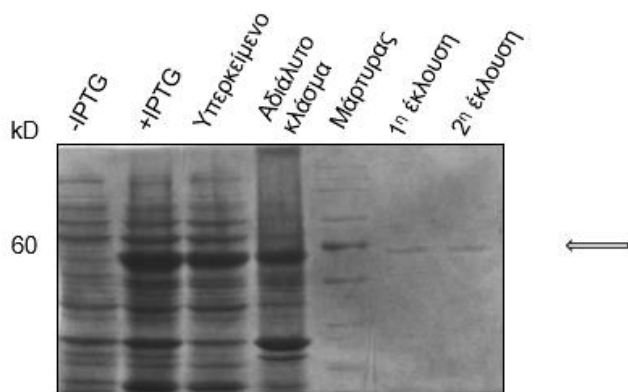
Αφού πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός BL21 RIL κυττάρων *E. coli*, με τα πλασμίδια που έφεραν το cDNA που κωδικοποιεί είτε για το HIF-1α 1-347 ή για το HIF-1α 575-826 σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1, από τις αποικίες εμβολιάστηκαν υγρές καλλιέργειες ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων (4 ml). Από τις υγρές καλλιέργειες, έγινε επαγωγή των βακτηριακών κυττάρων με IPTG με σκοπό την υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αποτελούν την αμινοτελική επικράτεια του HIF-1α (1-347) και μέρος της καρβοξυτελικής του επικράτειας (575-826). Κρατήθηκαν δείγματα της καλλιέργειας πριν και μετά τη προσθήκη του IPTG. Στο τέλος, το ίζημα των κυττάρων φυλάχθηκε στους -20°C.

Η διαδικασία της επαγωγής και ο καθαρισμός για την απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων του HIF-1α, δηλαδή το GST-HIF-1α 1-347 και το GST-HIF-1α 575-826, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Μέθοδοι, 4.6).

Για την ανάλυση των δειγμάτων από το κάθε στάδιο καθαρισμού, αρχικά έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου όπου φορτώθηκαν τα δείγματα με κατάλληλο μάρτυρα με εύρος 10 με 250 kDa και στη συνέχεια έγινε χρώση με Coomassie Brilliant Blue.



Εικόνα 15. Έλεγχος καθαρισμού του ανασυνδυασμένου GST – HIF-1α – 1-347 μετά από επαγωγή με IPTG. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και χρώση με Coomassie Brilliant Blue των κλασμάτων του καθαρισμού του πρωτεϊνικού τμήματος GST – HIF-1α – 1-347. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εμφανίζει φαινόμενο μοριακό βάρος στα ~60 kDa (Βέλος).



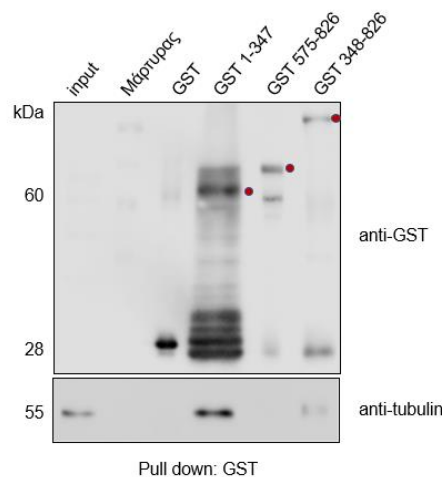
Εικόνα 16. Έλεγχος καθαρισμού του ανασυνδυασμένου GST – HIF-1α – 575-826 μετά από επαγωγή με IPTG. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και Coomassie Brilliant Blue των κλασμάτων του καθαρισμού του πρωτεϊνικού τμήματος GST – HIF-1α – 575-826. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εμφανίζει φαινόμενο μοριακό βάρος στα ~60 kDa (Βέλος).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έγινε υπερέκφραση και των δύο τμημάτων του HIF-1α ως πρωτεϊνών σύντηξης με την GST, εφόσον εντοπίζονται ζώνες στα 60 kDa, όπως φαίνεται στις εικόνες 15 και 16, στις διαδρομές που αντιστοιχούν στην 1^η και στην 2^η έκλουση. Μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία αγχιστείας συλλέχθηκαν με ικανοποιητική καθαρότητα τα επιθυμητά τμήματα του HIF-1α 1-347 και 575-826 (εικόνες 15 και 16, διαδρομές που αντιστοιχούν στην 1^η και στην 2^η έκλουση και επισημαίνονται με τα βέλη).

5.3 Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού με in vitro δοκιμή συγκατακρήμνισης (pull down assay)

Προκειμένου να χαρτογραφηθεί η περιοχή αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την τουμπουλίνη Α των μικροσωληνίσκων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αλληλεπίδρασης (pull down assays) μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του GST-HIF-1α και εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων (Βλ. Μέθοδοι παρ. 10). Η GST χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control, ενώ από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-HIF-1α 348-826, GST – HIF-1α – 1-347 και GST – HIF-1α – 575-826 χρησιμοποιήθηκαν 10 μg από την κάθε μία για να καθηλωθούν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Μετά την καθήλωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών στα σφαιρίδια προστέθηκε από 1 mg εκχυλίσματος κυττάρων HeLa στο κάθε δείγμα.

Μετά από επώαση 16 ωρών σε θερμοκρασία 4°C ακολούθησε η έκλουση των συγκατακρημισμάτων από τα σφαιρίδια. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Western Blot και προσθήκη κατάλληλων αντισωμάτων (anti-GST και anti-tubulin).



Εικόνα 17. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των τμημάτων GST – HIF-1α – 1-347, GST – HIF-1α – 575-826 και GST – HIF-1α – 348-826 με εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa που περιέχουν πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων μετά από πείραμα συγκατακρήμνισης. Ανάλυση των κατακρημισμένων πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και Western blot. Η ζώνη στα 55 kD αντιστοιχεί στη τουμπουλίνη και στα 28 kD στην πρωτεΐνη GST. Η ζώνη στα 60 kD αντιστοιχεί στη περιοχή GST – HIF-1α – 1-347. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-GST (πάνω) και anti-tubulin (κάτω). Οι κόκκινοι κύκλοι δείχνουν την ζώνη που αντιστοιχεί σε κάθε τμήμα του HIF-1α.

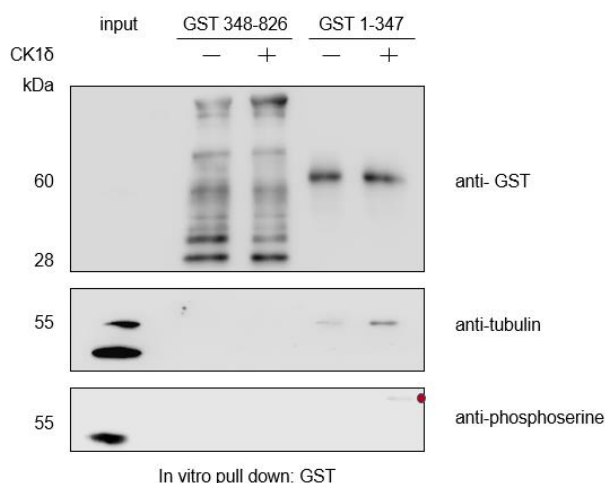
Το αποτέλεσμα (εικόνα 17) έδειξε πως τα τμήματα GST – HIF-1α – 1-347, GST – HIF-1α – 575-826 και GST – HIF-1α – 348-826, καθηλώθηκαν επιτυχώς στα σφαιρίδια και σε περίπου ισομοριακές ποσότητες. Με τη χρήση του αντισώματος έναντι της τουμπουλίνης δείχθηκε ότι το τμήμα GST – HIF-1α – 1-347 που αντιστοιχεί στην αμινοτελική περιοχή του HIF-1α

αλληλεπιδρά ισχυρά με τη τουμπουλίνη (Εικόνα 17, διαδρομή 4), ενώ το GST – HIF-1α – 575-826, δηλαδή η καρβοξυτελική περιοχή δεν αλληλεπιδρά (Εικόνα 17, διαδρομή 5). Η περιοχή GST – HIF-1α – 348-826 εμφανίζει μια πολύ ασθενή αλληλεπίδραση, πιθανόν επειδή περιέχει ένα μικρό κομμάτι της αμινοτελικής περιοχής (Εικόνα 17, διαδρομή 6).

5.4 Επίδραση της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από την κινάση πρωτεϊνών CK1δ στην αλληλεπίδραση του με την τουμπουλίνη μετά από in vitro φωσφορυλίωση και δοκιμή συγκατακρήμνισης

Εφόσον χαρτογραφήθηκε η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την τουμπουλίνη στην αμινοτελική περιοχή του HIF-1α, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η φωσφορυλίωση του από τη CK1δ επηρεάζει την αλληλεπίδραση αυτή. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 10 μg από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST–HIF-1α–348-826 (αρνητικό control) και GST–HIF-1α–1-347 ως υποστρώματα για την κινάση πρωτεϊνών CK1δ σε πείραμα in vitro φωσφορυλίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιεγράφηκε (βλ. Μέθοδοι παρ. 4.13). Μετά το πέρας της φωσφορυλίωσης οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GST–HIF-1α–1-347 και GST–HIF-1α–347-826 (φωσφορυλιωμένες ή μη) καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Μετά την καθήλωση των χιμαιρικών πρωτεϊνών στα σφαιρίδια προστέθηκε από 1 mg εκχυλίσματος κυττάρων HeLa στο κάθε δείγμα. Μετά από επώαση 16 ωρών σε θερμοκρασία 4°C ακολούθησε η έκλυση των συγκατακρημισμάτων από τα σφαιρίδια.

Οι κατακρημισμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων απέναντι σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης (για τον έλεγχο της φωσφορυλίωσης), την τουμπουλίνη και την GST.



Εικόνα 18. Έλεγχος αλληλεπίδρασης των GST–HIF-1α–1-347 και GST–HIF-1α–348-826 με την τουμπουλίνη μετά από in vitro φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση πρωτεϊνών CK1δ. Ανάλυση των κατακρημισμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση (Western blot). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-GST (πάνω), anti-tubulin (κέντρο) και anti-phosphoserine (κάτω). Διακρίνονται οι διαδρομές που αντιστοιχούν στις GST–HIF-1α–348-826 και GST–HIF-1α–1-347 με (+) ή χωρίς (-) φωσφορυλίωση από την CK1δ.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 18) φαίνεται πως τα τμήματα GST – HIF-1α – 1-347 και GST – HIF-1α – 348-826, καθηλώθηκαν επιτυχώς στα σφαιρίδια και σε περίπου ισομοριακές ποσότητες. Ενώ η καρβοξυτελική περιοχή HIF-1α – 348-826 (παρουσία ή απουσία κινάσης) δεν αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη, η φωσφορυλίωση της αμινοτελικής

περιοχής του HIF-1α–1-347 από την κινάση CK1δ ενισχύει σημαντικά την αλληλεπίδραση του αμινοτελικού τμήματος του HIF-1α με την τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων (εικόνα 18, τελευταία διαδρομή). Η φωσφορυλίωση της αμινοτελικής περιοχής του HIF-1α–1-347 από την κινάση CK1δ επιβεβαιώνεται από το τελευταίο blot, όπου φαίνεται η αλληλεπίδραση της με τη φωσφοσερίνη.

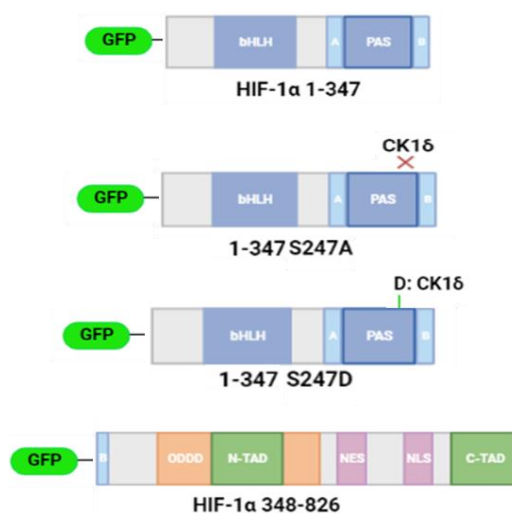
5.5 Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και τουμπουλίνης σε κύτταρα

Εφόσον τα *in vitro* αποτελέσματα έδειξαν ότι ο HIF-1α συνδέεται με την τουμπουλίνη μέσω της αμινο-τελικής του περιοχής και ότι η αλληλεπίδραση αυτή ενισχύεται σημαντικά από τη φωσφορυλίωση από τη CK1δ, θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών συμβαίνει εντός των κυττάρων. Για τη μελέτη του φαινομένου εφαρμόσαμε δύο τεχνικές: ανοσοφθορισμό και ανοσοκαθίζηση μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με διάφορες μορφές του GFP-HIF-1α.

5.5.1. Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και τουμπουλίνης με ανοσοφθορισμό

Για τη μελέτη του συνεντοπισμού τμημάτων του GFP-HIF-1α με την τουμπουλίνη, έγινε, αρχικά, διαμόλυνση κυττάρων HeLa που είχαν επιστρωθεί σε τρυβλία των 12 βοθρίων με τα αντίστοιχα πλασμίδια (1.5 μg από το καθένα) μαζί με το αντιδραστήριο TurboFect σε αναλογία 1:2. Τα διαφορετικά τμήματα του HIF-1α που εκφράστηκαν στα κύτταρα και οι συνθήκες, φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

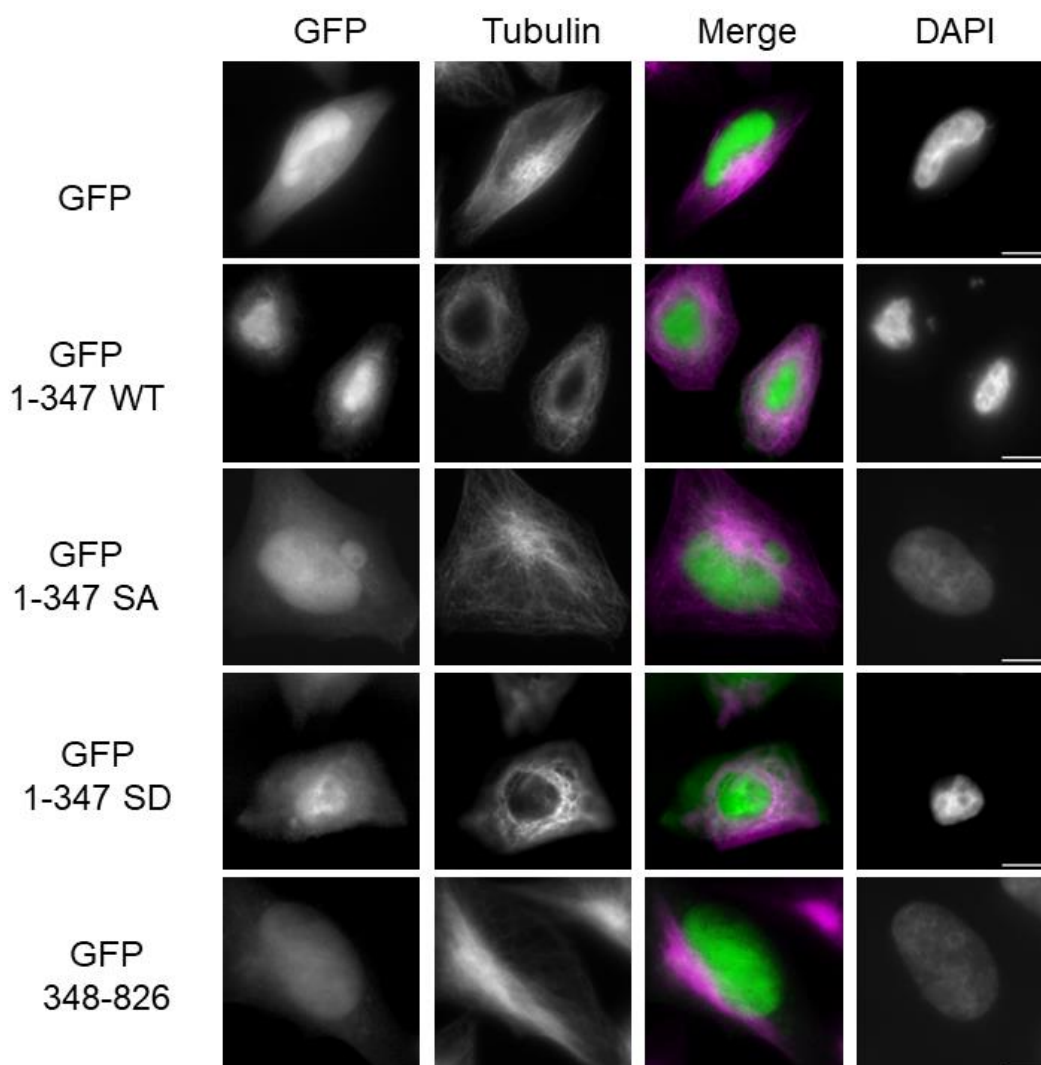
GFP	GFP-1-347 WT	GFP-1-347 SA	GFP-1-347 SD	GFP-348-826
Έκφραση της GFP (Αρνητικό control)	Έκφραση της N-τελικής περιοχής του HIF-1α με τη GFP	Έκφραση της N-τελικής περιοχής του HIF-1α που δε φωσφορυλιώνεται από τη CK1δ με τη GFP	Έκφραση της N-τελικής περιοχής του HIF-1α που μιμείται τη φωσφορυλίωση από τη CK1δ με τη GFP	Έκφραση της C-τελικής περιοχής του HIF-1α με τη GFP (Αρνητικό control)



Εικόνα 19. Τα διαφορετικά τμήματα του GFP-HIF-1α που εκφράστηκαν στα κύτταρα HeLa (Δημιουργήθηκε με το BioRender).

Μετά την διαμόλυνση, προστέθηκε πλήρες θρεπτικό DMEM και μετά από 24 ώρες εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό της τουμπουλίνης και παρατήρηση στο μικροσκόπιο (βλ. Μεθόδους παρ. 4.16 και 4.18).

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανά συνθήκη.



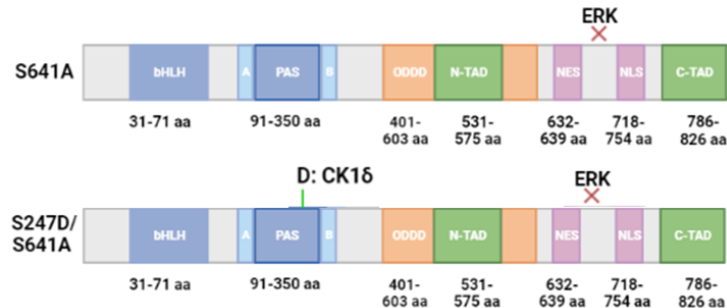
Εικόνα 20. Ανοσοφθορισμός τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP, GFP 1-347 WT, GFP 1-347 SA, GFP 1-347 SD και GFP 348-826. Στην 1η στήλη παρουσιάζεται ο φθορισμός των χιμαιρικών τμημάτων με τη GFP, στη 2η το σήμα του ανοσοφθορισμού της τουμπουλίνης, στην 3η η συνένωση των δύο πρώτων εικόνων και στην 4η ο φθορισμός των πυρήνων με DAPI (scale bars 10 μM).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 20) η GFP που είναι διάχυτη στα κύτταρα και η GFP-HIF-1α-348-826 που εντοπίζεται στον πυρήνα δεν φαίνεται να συνεντοπίζονται με την τουμπουλίνη. Αντίθετα, υπάρχει σημαντικός συνεντοπισμός (εκτός του πυρήνα) με την N-τελική περιοχή 1-347 του HIF-1α, ειδικά με τις μορφές WT και SD που φωσφορυλιώνονται ή μιμούνται την φωσφορυλίωση από την CK1δ (επιβεβαιώνοντας τα *in vitro* αποτελέσματα).

5.5.2 Επίδραση της φωσφορυλίωσης από τη CK1δ στην κατανομή του μη-τροποποιημένου από τις ERK1/2 GFP- HIF-1α στο κυτταρόπλασμα

Από προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου ήταν γνωστό ότι στο κυτταρόπλασμα εντοπίζεται μόνο η μη-φωσφορυλιωμένη από τις ERK1/2 μορφή του HIF-1α και μάλιστα σε σύμπλοκο με την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη μορταλίνη στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων [32]. Καθώς και η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την τουμπουλίνη συμβαίνει εκτός πυρήνα, θελήσαμε να διαλευκάνουμε με ανοσοκατακρήμιση σε τι βαθμό αλληλεπιδρά ο μη-

φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 HIF-1α είτε με τη μορταλίνη ή την τουμπουλίνη. Για το σκοπό αυτό κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που κωδικοποιούν για δύο διαφορετικές μορφές του GFP-HIF-1α. Την GFP-HIF-1α S641A (SA) μορφή που καταργεί τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 και την GFP-HIF-1α S247D / S641A (SDSA) μορφή που καταργεί τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 και ταυτόχρονα μιμείται τη φωσφορυλίωση από την CK1δ (Εικόνα 21).

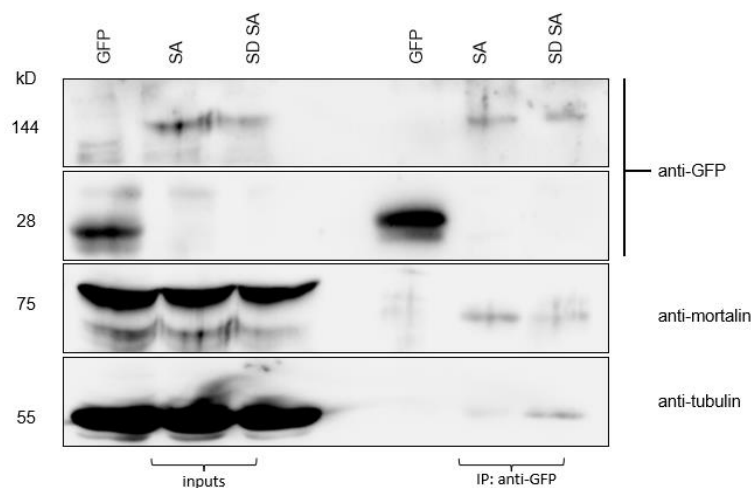


Εικόνα 21. Μορφές του GFP-HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων HeLa. (Δημιουργήθηκε με το BioRender).

Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 10 μg από τα πλασμίδια pEGFP-C1, pEGFP-C1-HIF-1α SA, pEGFP-C1-HIF-1α SDSA σε αναλογία 1:2 με το αντιδραστήριο Turbofect (βλ. Μέθοδοι παρ. 4.16). Μετά την πάροδο 24 ωρών τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση και ανάλυση των κατακρημνισμάτων με ανοσοαποτύπωση.

Για την ανοσοκατακρήμνιση (IP) χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια proteín G στα οποία οι πρωτεΐνες καθιλώνονται μέσω αντισώματος απέναντι στην πρωτεΐνη GFP. Μετά τη μεταφορά των κυτταρικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα που εκφράζουν GFP, GFP-HIF-1α SA και GFP-HIF-1α SD SA στα σφαιρίδια με το αντίσωμα, αναδεύτηκαν για 16 ώρες και μετά από τρεις πλύσεις ακολούθησαν οι εκλούσεις των πρωτεϊνών που καθιλώθηκαν με Laemmli Buffer.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και Western blot. Στο τέλος έγινε ανοσοανίχνευση με τα κατάλληλα αντισώματα (anti-GFP, anti-mortalin και anti-tubulin).



Εικόνα 22. Έλεγχος αλληλεπίδρασης διαφορετικών μορφών του HIF-1α με την τουμπουλίνη και τη μορταλίνη μετά από ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδου και Western blot. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν anti-GFP (πάνω), anti-mortalin (μέση) και anti-tubulin (κάτω).

Στο αποτέλεσμα που εμφανίζεται στην εικόνα 22 φαίνεται πως όλες οι μορφές του HIF-1α SA και SDSA εκφράστηκαν (πάνω εικόνα, inputs) και καθηλώθηκαν στα σφαιρίδια (πάνω εικόνα, IP, anti-GFP blot). Και οι δύο μορφές μπορούν να δεσμεύσουν τη μορταλίνη (μεσαία εικόνα, IP, anti-mortalin blot) και την τουμπουλίνη (κάτω εικόνα, IP, anti-tubulin blot) αλλά με διαφορετική ισχύ η κάθε μια. Η μορφή SA αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη μορταλίνη, ενώ η μορφή SDSA που μιμείται τη φωσφορυλίωση από τη CK1δ σχηματίζει ισχυρότερο σύμπλοκο με την τουμπουλίνη επιβεβαιώνοντας τα *in vitro* αποτελέσματα.

Μέρος Β: Μελέτη του πυρηνικού ρόλου του HIF-1α σε σχέση με τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2.

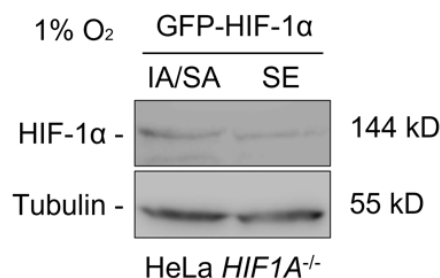
Ο απώτερος στόχος του δεύτερου σκέλους της διπλωματικής αποτελεί μέρος της έρευνας που αφορά την εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων της φωσφορυλιωμένης από τις ERK1/2 μορφής του HIF-1α μετά από φασματοσκοπία μάζας. Για το σκοπό αυτό ήταν απαραίτητο να ελεγχθούν (σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα που δεν εκφράζουν τον ενδογενή HIF-1α) τα επίπεδα έκφρασης των μορφών του HIF-1α που είτε μιμούνται την φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2 (SE μορφή) είτε την καταργούν ταυτόχρονα με κατάργηση του σήματος NES προκειμένου να μην εξέρχονται από τον πυρήνα (IA/SA μορφή) (Εικόνα 23). Επίσης έγινε έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας των δύο μορφών σε συνθήκες υποξίας και έλεγχος ανοσοκαθίζησης προκειμένου τα κατακρημνίσματα να αποσταλούν για φασματοσκοπία μάζας.



Εικόνα 23. Μορφές του HIF-1α που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του HIF-1α σε σχέση με τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2 (Δημιουργήθηκε με το BioRender).

5.6.1. Έκφραση διαφορετικών μορφών του HIF-1α σε σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα HeLa σε συνθήκες υποξίας

Αρχικά θελήσαμε να ελέγξουμε εάν οι μορφές GFP-HIF-1α SE και IA/SA εκφράζονται σε ικανοποιητικό βαθμό σε σταθερά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa τα οποία, όμως, δεν εκφράζουν το ενδογενή HIF-1α μετά από CRISPR/Cas9 (Μέρος της διδακτορικής διατριβής της κας Χρ. Αρσένη). Για το σκοπό αυτό, οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν μέχρι να φθάσουν σε πυκνότητα 80% και υποβλήθηκαν σε υποξικές συνθήκες για 16 ώρες και τα κύτταρα λύθηκαν σε Laemmli Buffer. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.



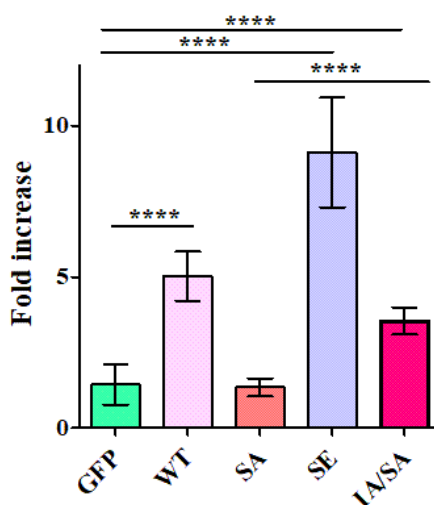
Εικόνα 24. Έλεγχος έκφρασης των μορφών IA/SA και SE του GFP-HIF-1α σε σταθερά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa HIF-1A^{-/-}. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση για HIF-1α και τουμπουλίνη από συνολικά εκχυλίσματα σταθερά επιμολυσμένων κύτταρων HeLa HIF-1A^{-/-} σε υποξία.

Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης (εικόνα 24) έδειξε ότι και οι δύο μορφές του GFP-HIF-1α (IA/SA και SE) εκφράζονται σε ίδια επίπεδα σε συνθήκες υποξίας στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

5.6.2 Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των μορφών IA/SA και SE του HIF-1α με λουσιφεράση

Εφόσον οι δύο μορφές του GFP-HIF-1α (IA/SA και SE) εκφράζονται στις κυτταρικές σειρές που είχαν κατασκευαστεί από την υποψήφια διδάκτορα κα. Χρ. Αρσένη, ακολούθησε ο έλεγχος της μεταγραφικής δραστικότητας των μορφών του GFP-HIF-1α που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά. Έτσι τα κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τους HIF-1α IA/SA και HIF-1α SE (μαζί με κύτταρα που εκφράζουν GFP, HIF-1α WT και HIF-1α SA που είχαν είδη ελεγχθεί σε προηγούμενη μελέτη αλλά προστέθηκαν για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων) διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας και που φέρει στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) και το πλασμίδιο που εκφράζει τη λουσιφεράση της Renilla για την κανονικοποίηση των μετρήσεων.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο (Μέθοδοι, 4.17). Η στατιστική ανάλυση έγινε με το t-Test, ώστε να βρεθεί η επαναληψιμότητα και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 25. Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας των μορφών IA/SA και SE του GFP-HIF-1α σε σταθερά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa HIF-1A^{-/-}. Ανάλυση με λουσιφεράση της μεταγραφικής ενεργότητας των του HIF-1α (όπως εμφανίζονται).

Σύμφωνα με το αποτέλεσμα (εικόνα 25) οι μορφές του HIF-1α που εκφράζονται σταθερά σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον ενδογενή HIF-1α (*HeLa HIF-1A^{-/-}*) είναι λειτουργικές και μάλιστα εμφανίζουν μεταγραφική δράση ανάλογα με την φωσφορυλίωση από τις ERK1/2. Έτσι, η μορφή SE που μιμείται τη φωσφορυλίωση έχει τη μέγιστη ενεργότητα, ενώ οι SA και IA/SA που την καταργούν έχουν πολύ μειωμένη. Η διαφορά μεταξύ τους εξηγείται από το γεγονός ότι η μορφή SA είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματική ενώ η IA/SA είναι πυρηνική καθώς φέρει μεταλλάξεις που καταργούν την ακολουθία NES.

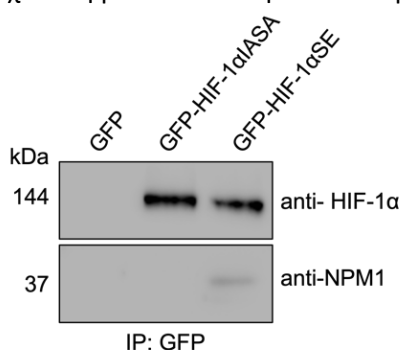
5.6.3 Ανοσοκατακρήμιση των μορφών IA/SA και SE

Τέλος, αφού επιβεβαιώθηκε η μεταγραφική τους δραστικότητα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση των μορφών IA/SA και SE για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων οι οποίες πιθανά να επηρεάζουν τις πυρηνικές τους λειτουργίες.

Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα HeLa *HIF1A*^{-/-} που εκφράζουν σταθερά τις μορφές SE και IA/SA επώαστηκαν σε συνθήκες υποξίας. Μετά την πάροδο 24 ωρών τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση και ανάλυση των κατακρημισμάτων με ανοσοαποτύπωση.

Για την ανοσοκατακρήμιση (IP) χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια protein G στα οποία οι πρωτεΐνες καθλώνονται μέσω αντισώματος απέναντι στην πρωτεΐνη GFP, όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 5.5.2. Μετά τη μεταφορά των κυτταρικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα που εκφράζουν GFP, GFP- HIF-1α IA/SA και GFP-HIF-1α SE στα σφαιρίδια με το αντίσωμα, αναδεύτηκαν για 16 ώρες και μετά από τρεις πλύσεις ακολούθησαν οι εκλούσεις των πρωτεϊνών που καθλώθηκαν με διάλυμα που περιέχει 500 mM NaCl και 200mM γλυκίνης pH2,3.

Για την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση μιας μικρής ποσότητας (1/5 του συνολικού όγκου) από τα κατακρημισματα με SDS-PAGE και Western blot. Στο τέλος έγινε ανοσοανίχνευση με τα κατάλληλα αντισώματα (anti-HIF-1α και NPM1).



Εικόνα 26. Έλεγχος αλληλεπίδρασης διαφορετικών μορφών του HIF-1α με την NPM1 μετά από ανοσοκατακρήμιση. Οι ανοσοκατακρημισμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδου και Western blot. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν anti-HIF-1α (πάνω) και anti-NPM1 (κάτω).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται και στην εικόνα 26, οι μορφές GFP-HIF-1α IA/SA και GFP-HIF-1α SE εκφράζονται και κατακρημνίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό (εικόνα 26, αντίσωμα anti-HIF-1α) ενώ, μόνο η φωσφομιμητική μορφή του HIF-1α αλληλεπιδρά με την πυρηνική πρωτεΐνη νουκλεοφωσμίνη (εικόνα 26, αντίσωμα anti-NPM1). Τα δείγματα πρόκειται να σταλούν για φασματοσκοπία μάζας με σκοπό την ανακάλυψη νέων αλληλεπιδράσεων των παραπάνω μορφών.

6. Συζήτηση

Η υποξία είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου σε κύτταρα και ιστούς και η απόκριση σε αυτή ρυθμίζεται μεταγραφικά, κυρίως, από τους επαγόμενους από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι παράγοντες HIF ελέγχουν διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, με αποτέλεσμα να συνδέονται με την εξέλιξη του καρκίνου [8]. Ενώ η HIF-α υπομονάδα διαθέτει τρεις ισομορφές, η υπομονάδα HIF-1α είναι η πιο καλά μελετημένη και η έκφραση της ρυθμίζεται από τις συνθήκες διαθεσιμότητας οξυγόνου. Από τη άλλη, η υπομονάδα HIF-β ή αλλιώς ARNT, εκφράζεται σταθερά [9]. Η έκφραση και λειτουργία του HIF-1α ρυθμίζεται και από μηχανισμούς ανεξάρτητους από το οξυγόνο. Έχει βρεθεί πως η ρύθμισή του μπορεί να συμβαίνει σε επίπεδο μεταγραφής, σε επίπεδο μετάφρασης, με βάση την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και εξαιτίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [68].

Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια από τις πιο κοινές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν ταυτοποιηθεί δύο διακριτές τροποποιήσεις του HIF-1α μέσω της φωσφορυλίωσης. Η πρώτη αφορά τη φωσφορυλίωση από την κινάση CK1δ στο κατάλοιπο σερίνης 247, στην επικράτεια PAS-B του HIF-1α. Η φωσφορυλίωση από την CK1δ οδηγεί στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού των υπομονάδων HIF-1α και ARNT και στην αναστολή της δράσης του ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας τον HIF-1α αρνητικά [52]. Η δεύτερη φωσφορυλίωση, γίνεται από τις κινάσες ERK1/2 στα κατάλοιπα σερίνης 641 και 643 και προκαλεί την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α καθώς παρεμποδίζουν το σήμα πυρηνικής εξόδου, το οποίο εξαρτάται από την CRM1. Έτσι, ενεργοποιείται η δράση του HIF-1 ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζεται θετικά [57].

Κύριος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να πραγματοποιηθεί μελέτη για την διερεύνηση νέων αλληλεπιδράσεων που επηρεάζονται από τη φωσφορυλίωση του HIF-1α. Η μελέτη που έγινε, διαχωρίστηκε σε δύο μέρη.

- Το πρώτο μέρος αφορούσε τη μελέτη μη-γενομικών ρόλων του μη φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Η μελέτη αποτελούσε συνέχεια παλαιότερων παρατηρήσεων στο εργαστήριο όπου είχε βρεθεί ότι πιθανά η φωσφορυλίωση από τη CK1δ ρυθμίζει την δέσμευση του κυτταροπλασματικού HIF-1α σε πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων [69].
- Το δεύτερο μέρος αφορούσε τη μελέτη του πυρηνικού ρόλου του HIF-1α σε σχέση με τη φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες μορφές του HIF-1α. Στο πρώτο μέρος, χρησιμοποιήθηκαν οι μορφές SA και SDSA, ώστε να βρεθεί η επίδραση της κινάσης CK1δ στις αλληλεπιδράσεις του μη τροποποιημένου από τις ERK1/2 HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Η μορφή S641A (SA) καταργεί τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 και η μορφή S247D / S641A (SDSA) καταργεί τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 και ταυτόχρονα μιμείται τη φωσφορυλίωση από την CK1δ. Στο δεύτερο μέρος, χρησιμοποιήθηκαν οι μορφές SE και IA/SA, με σκοπό τη μελέτη του τροποποιημένου από τις ERK1/2 HIF-1α στον πυρήνα. Η μορφή SE μιμείται την φωσφορυλίωση του από τις ERK1/2, ενώ η μορφή IA/SA την καταργεί με ταυτόχρονη κατάργηση του σήματος NES με σκοπό τη παρεμπόδιση της πυρηνικής εξόδου.

Έτσι στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού ακολουθώντας τη μέθοδο *in vitro* δοκιμής συγκατακρήμνισης. Εφόσον βρέθηκε πως η αμινοτελική περιοχή του HIF-1α αλληλεπιδρά με τη τουμπουλίνη, ακολούθησαν πειράματα *in vitro* φωσφορυλίωσης και *in*

vitro δοκιμής συγκατακρήμνισης, που βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση από τη CK1δ ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την τουμπουλίνη. Επίσης, με πειράματα ανοσοφθορισμού και, κυρίως, ανοσοκατακρήμνισης βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τη CK1δ ρυθμίζει την παρουσία του μη φωσφορυλιωμένου από τις ERK1/2 HIF-1α στους μικροσωληνίσκους ή τα μιτοχόνδρια. Βασιζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου, ο μη φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 HIF-1α εξάγεται από τον πυρήνα [58] και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων μορταλίνη συγκροτώντας ένα αντιαποπτωτικό σύμπλοκο μαζί με τις πρωτεΐνες VDAC1 και HKII [32]. Η παράλληλη, όμως ενεργοποίηση της κινάσης πρωτεϊνών CK1δ μετατοπίζει την ισορροπία της παρουσίας του HIF-1α μεταξύ μιτοχονδρίων και μικροσωληνίσκων. Μία τέτοια διεργασία είναι πιθανόν να συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μίτωσης, καθώς, η CK1δ έχει βρεθεί να συσχετίζεται με μικροσωληνίσκους στην περιοχή της ατράκτου [70] όπου βρίσκεται και ο HIF-1α κατά την μίτωση [Χριστίνα Αρσένη, αδημοσίευτα αποτελέσματα]. Καθώς ο εντοπισμός του HIF-1α σε μικροσωληνίσκους έχει συσχετιστεί με την είσοδο του στον πυρήνα [71], υποθέτουμε ότι η παρουσία του HIF-1α στους μικροσωληνίσκους κατά τη μίτωση εξασφαλίζει την παρουσία του στους δύο θυγατρικούς πυρήνες μετά το πέρας της μίτωσης.

Όσον αφορά τον δεύτερο στόχο της διπλωματικής αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 και το ρόλο της στην παρεμπόδιση της εξαγωγής του HIF-1α από τον πυρήνα [57,58], πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση επηρεάζει σύμπλοκα του HIF-1 με πρωτεΐνες στη χρωματίνη [34]. Για αυτόν το σκοπό, έγινε αρχικά έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των μορφών SE και IA/SA σε κύτταρα που δεν εκφράζουν ενδογενή HIF-1α (HeLa *HIF1A*^{-/-}) ενώ έχουν υποστεί σταθερή επιμόλυνση με τις μορφές SE και IA/SA του GFP-HIF-1α. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας των δύο μορφών σε συνθήκες υποξίας και διαπιστώθηκε η ενεργότητα τους. Η μορφή IA/SA φάνηκε πως έχει αρκετά μειωμένη ενεργότητα, σε αντίθεση με την μορφή SE, η οποία παρουσίασε την μέγιστη ενεργότητα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Εισαγωγή, παράγραφος 1.6.2), η φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2, οδηγεί σε πυρηνική συσσώρευση και έναρξη της δράσης του HIF-1 ως μεταγραφικό παράγοντα, αποδεικνύοντας, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα, πως η μεταγραφική δράση είναι ανάλογη της φωσφορυλίωσης, εφόσον η μορφή η οποία μιμείται τη φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK1/2 είναι αυτή με τη μέγιστη ενεργότητα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση προκειμένου τα κατακρημνίσματα να αποσταλούν για φασματοσκοπία μάζας και να βρεθούν πιθανές αλληλεπιδράσεις.

Συνοψίζοντας, από τις μελέτες αυτές βρέθηκε πως ο HIF-1α βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς την υπομονάδα ARNT και πως αλληλεπιδρά και με τη τουμπουλίνη στους μικροσωληνίσκους, όταν δεν φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες ERK1/2 αλλά είναι παράλληλα φωσφορυλιωμένος από την CK1δ. Από την άλλη, ο φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 HIF-1α, εντοπίζεται στον πυρήνα συνδεδεμένος με τον ARNT, έχοντας αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα.

Μελλοντικά, α) θα πρέπει να μελετηθεί η μετατόπιση του HIF-1α μέσω των μικροσωληνίσκων κατά την διάρκεια της μίτωσης σε συγχρονισμένα κύτταρα με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και β) αναμένονται τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία μάζας και να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη για την ανακάλυψη νέων αλληλεπιδράσεων του φωσφορυλιωμένου από τις κινάσες ERK1/2 HIF-1α και τη σημασία τους στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία.

7. Βιβλιογραφία

1. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378-89.
2. Thomas LW, Ashcroft M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2019 May;76(9):1759-1777.
3. Sarkar S, Banerjee PK, Selvamurthy W. High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol Cell Biochem*. 2003 Nov;253(1-2):287-305.
4. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*. 2012 May 30;31(11):2448-60.
5. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000 Apr;88(4):1474-80.
6. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
7. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):393-402.
8. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*. 2007 Jun;80(2):51-60.
9. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378-89.
10. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α . *J Korean Med Sci*. 2002 Oct;17(5):581-8.
11. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol*. 2016 Feb 23;4:11.
12. Görlach A. Regulation of HIF-1 α at the transcriptional level. *Curr Pharm Des*. 2009;15(33):3844-52.
13. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004 Feb 29;36(1):1-12
14. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, Sée V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 29;22(1):268.
15. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016 Feb;283(3):413-24.
16. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, Pantopoulos K, Simos G, Koromilas AE. eIF2 α Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 α . *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):7820-9.
17. Chen S, Sang N. Hypoxia-Inducible Factor-1: A Critical Player in the Survival Strategy of Stressed Cells. *J Cell Biochem*. 2016 Feb;117(2):267-78.
18. Gkotinakou IM, Kechagia E, Pazaitou-Panayiotou K, Mylonis I, Liakos P, Tsakalof A. Calcitriol Suppresses HIF-1 and HIF-2 Transcriptional Activity by Reducing HIF-1/2 α Protein Levels via a VDR-Independent Mechanism. *Cells*. 2020 Nov 9;9(11):2440.
19. Ivanova IG, Park CV, Kenneth NS. Translating the Hypoxic Response-the Role of HIF Protein Translation in the Cellular Response to Low Oxygen. *Cells*. 2019 Feb 1;8(2):114.
20. Bert AG, Grépin R, Vadas MA, Goodall GJ. Assessing IRES activity in the HIF-1 α and other cellular 5' UTRs. *RNA*. 2006 Jun;12(6):1074-83.

21. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell*. 2007 Jan 26;25(2):207-17.
22. Kim YH, Coon A, Baker AF, Powis G. Antitumor agent PX-12 inhibits HIF-1 α protein levels through an Nrf2/PMF-1-mediated increase in spermidine/spermine acetyl transferase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Aug;68(2):405-13.
23. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabweesh NJ. SEPT9_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2009 Apr 24;284(17):11142-51.
24. Lyberopoulou A, Mylonis I, Papachristos G, Sagris D, Kalousi A, Befani C, Liakos P, Simos G, Georgatsou E. MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization. *Biochim Biophys Acta*. 2013
25. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, Bonanou S, Georgatsou E. MgcRacGAP interacts with HIF-1 α and regulates its transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):995-1006.
26. Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Mol Cancer*. 2013 Aug 14;12(1):93.
27. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*. 2000 Jan 1;14(1):34-44.
28. Doe MR, Ascano JM, Kaur M, Cole MD. Myc posttranscriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells. *Cancer Res*. 2012 Feb 15;72(4):949-57.
29. De Guzman RN, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Interaction of the TAZ1 domain of the CREB-binding protein with the activation domain of CITED2: regulation by competition between intrinsically unstructured ligands for non-identical binding sites. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279(4):3042-9.
30. Cho S, Choi YJ, Kim JM, Jeong ST, Kim JH, Kim SH, Ryu SE. Binding and regulation of HIF-1 α by a subunit of the proteasome complex, PSMA7. *FEBS Lett*. 2001 Jun 1;498(1):62-6.
31. Flachbartová Z, Kovacech B. Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration. *Acta Virol*. 2013;57(1):3-15.
32. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci*. 2017 Jan 15;130(2):466-479.
33. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, Richard DJ. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol*. 2016 Aug 24;17(1):19.
34. Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, Mylonis I. ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Mol Oncol*. 2021 Dec;15(12):3468-3489.
35. Christensen DG, Xie X, Basisty N, Byrnes J, McSweeney S, Schilling B, Wolfe AJ. Post-translational Protein Acetylation: An Elegant Mechanism for Bacteria to Dynamically Regulate Metabolic Functions. *Front Microbiol*. 2019 Jul 12;10:1604.
36. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):150-66.
37. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*. 2007 Apr 13;26(1):63-74.

38. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1 α . *FEBS Lett.* 2007 Apr 17;581(8):1542-8.
39. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 2010 May 13;428(2):133-45.
40. Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, Chen Y, Cang H, Li H, Shi G, Cheng J, Tang X, Yi J. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 deSUMOylation. *EMBO J.* 2009 Sep 16;28(18):2748-62.
41. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, Kim KW. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 5;324(1):394-400
42. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouysségur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 31;360(3):646-52.]
43. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Aug;40(2):271-280.
44. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr;148:114-31.
45. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2007 May;27(9):3253-65.
46. Bahassi el M, Conn CW, Myer DL, Hennigan RF, McGowan CH, Sanchez Y, Stambrook PJ. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene.* 2002 Sep 26;21(43):6633-40.
47. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle.* 2013 Dec 1;12(23):3689-701.
48. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Apr;14(4):197-210.
49. Ousset M, Bouquet F, Fallone F, Biard D, Dray C, Valet P, Salles B, Muller C. Loss of ATM positively regulates the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) through oxidative stress: Role in the physiopathology of the disease. *Cell Cycle.* 2010 Jul 15;9(14):2814-22.
50. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, Kass DL, Cole RN, Van Eyk J, Semenza GL. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci Signal.* 2016 May 31;9(430):ra56.
51. Bischof J, Randoll SJ, Süßner N, Henne-Bruns D, Pinna LA, Knippschild U. CK1 δ kinase activity is modulated by Chk1-mediated phosphorylation. *PLoS One.* 2013 Jul 4;8(7):e68803.
52. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci.* 2010 Sep 1;123(Pt 17):2976-86.
53. Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouysségur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):67-72.
54. Kourti M, Ikonomou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, Lygerou Z, Simos G, Mylonis I. CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cell Signal.* 2015 Jun;27(6):1129-40.
55. McCain J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T.* 2013 Feb;38(2):96-108.

56. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14013-9.
57. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006 Nov 3;281(44):33095-106.
58. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem.* 2008 Oct 10;283(41):27620-27627.
59. Mylonis I, Simos G. The Involvement of the ERK-Hypoxia-Angiogenesis Signaling Axis and HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma. 2012
60. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015 Dec 11;3:83-92.
61. Zhang J, Ney PA. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 2009 Jul;16(7):939-46.
62. Gorbunova AS, Yapryntseva MA, Denisenko TV, Zhivotovsky B. BNIP3 in Lung Cancer: To Kill or Rescue? *Cancers (Basel).* 2020 Nov 16;12(11):3390.
63. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 2008 Sep;8(9):705-13.
64. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):281-90
65. Choi JY, Jang YS, Min SY, Song JY. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *J Breast Cancer.* 2011 Jun;14(2):88-95.
66. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front Oncol.* 2020 Apr 8;10:486.
67. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014 Jan-Feb;49(1):1-15
68. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018 Mar;109(3):560-571.
69. Ελένη Δάτση. «Διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του HIF-1 α που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του και ανάλυση δεδομένων μετά από φασματοσκοπία μαζών ». Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ. Λάρισα, 2021
70. Behrend L, Stöter M, Kurth M, Rutter G, Heukeshoven J, Deppert W, Knippschild U. Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *Eur J Cell Biol.* 2000 Apr;79(4):240-51.
71. Carbonaro M, Escuin D, O'Brate A, Thadani-Mulero M, Giannakakou P. Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1 α protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J Biol Chem.* 2012 Apr 6;287(15):11859-69.