



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
‘ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ’**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα:** «Διερεύνηση του ρολού της αλληλεπίδρασης της Ρεπτίνης 52 με τον HIF-2α στην προσαρμογή της κυτταρικής λειτουργίας στην υποξία»

**ΜΠΟΥΛΟΥΤΣΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ-ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Παναγιώτης Λιάκος, Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας (Επιβλέπων)
- Δημήτρης Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Αντώνης Γιακουντής, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, 2022



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE**

**MASTER PROGRAM IN  
'CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR  
MEDICINE'**

**MASTER THESIS**

**TITLE:** « Investigating the role of Reptin 52 interaction with HIF-2 $\alpha$  in the adaptation of cellular function to hypoxia »

**By  
EVANGELIA- CHRISTINA BOULOUTSOU**

Three-member Examination Committee:

- Panagiotis Liakos, Associate Professor in Medical Biochemistry (Supervisor)
- Dimitris Bogdanos, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases
- Antonis Giakoundis, Assistant Professor of Molecular Biology-Genomics

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

Larissa, 2022

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	8
1.1 Υποξία.....	8
1.2.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF .....	9
1.2.2 Οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α.....	10
1.2.3 HIF 3α.....	11
1.2.4 ARNT ή HIF-1β.....	12
1.2.5 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α και τα γονίδια στόχοι.....	12
1.2.6 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας.....	14
1.2.7 Η ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από το οξυγόνο.....	14
1.2.8 Η ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου.....	15
1.2.9 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	16
1.2.10 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης.....	18
1.2.11 Ρύθμιση σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο.....	19
1.2.12 Φωσφορυλίωση.....	20
1.2.13 Φωσφορυλίωση από την οικογένεια των ERK.....	20
1.2.14 Φωσφορυλίωση από την οικογένεια των κινασών καζεΐνης.....	22
1.2.15 Η ρύθμιση του HIF-2α από την αλληλεπίδρασή του με τη Ρεπτίνη 52.....	23
2.2.1 Η Πρωτεΐνη Ρεπτίνη (REPTIN52).....	24
2.2.2 Ο ρόλος της Ρεπτίνης σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.....	25
Σκοπός Διπλωματικής εργασίας.....	27
3. Υλικά-Μεθόδους.....	28
3.1 Υλικά.....	28
3.1.1 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές.....	28
3.1.2 Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την RT-PCR.....	28
3.1.3 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια.....	28
3.1.4 Υλικά Μοριακής βιολογίας.....	28
3.1.5 Αντισώματα.....	28
3.1.6 Διαλύματα.....	29
3.2 Μέθοδοι.....	32
3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	32
3.2.2 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	32

3.2.3 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα.....	32
3.2.4 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα.....	33
3.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.....	34
3.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	34
3.2.7 Χρώση της γέλης πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	35
3.2.8 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από τη γέλη στη μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση κατά Western blot.....	35
3.2.9 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	36
3.2.10 Αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης με siRNA.....	37
3.2.11 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του.....	38
3.2.12 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητάς του RNA, φασματοφωτομέτρηση RNA.....	39
3.2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR).....	40
3.2.14 Στατιστική ανάλυση.....	43
3.2.15 Volcano plot- deregulogram.....	43
4. Αποτελέσματα.....	45
5. Συζήτηση.....	53
6. Βιβλιογραφία.....	57

## Ευχαριστίες

Η παρακάτω διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», το οποίο υλοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πιο συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Βιοχημείας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, κ. Λιάκου Παναγιώτη, το χρονικό διάστημα Μάρτιος – Οκτώβριος 2022.

Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εξοικειωθώ με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου βιοεπιστημών και για την αμέριστη υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη δική του ουσιαστική συνεισφορά, απέκτησα γνώσεις και εμπειρίες που είμαι βέβαιη πως θα μου φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μετέπειτα ερευνητική μου πορεία.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και πιο συγκεκριμένα τον κ. Δημήτρη Μπόγδανο, Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων του ΠΘ, και τον κ. Αντώνη Γιακουνή, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του ΠΘ, για τις πολύτιμες συμβουλές και τις διορθώσεις τους στο κείμενο. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες και στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Γεώργιο Σίμο, αρχικά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αλλά και για τις συμβουλές του σε οποιοδήποτε πρόβλημα και εάν αντιμετώπισα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα, Κατερίνα Δισερή για την ανιδιοτελής βοήθεια κατά τη διάρκεια όλης της μεταπτυχιακής εργασίας, καθώς και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στον πατέρα μου Κωνσταντίνο, τη μητέρα μου Αγγελική-Μαρία, τον αδερφό μου Φώτη, τον ανιψιό μου Κωνσταντίνο, ο οποίος ήρθε πρόσφατα στην ζωή, και μας γέμισε με φώς, και τους αγαπημένους μου παππούδες Ευαγγελία και Φώτιο καθώς και τους παππούδες μου Γεώργιο και Ελένη. Είναι δίπλα μου καθημερινά, με στηρίζουν σε όλες τις δύσκολες στιγμές και αποφάσεις της σταδιοδρομίας μου. Πάντα θα είμαι περήφανη για σας!!! Γιατί χωρίς εσάς τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό!!! Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στο Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο, για την κατανόηση, την συνεχή ενθάρρυνση, τις επιστημονικές του συμβουλές και την καθημερινή βοήθεια σε όλα τα επίπεδα.

## Περίληψη

Η σταθερή παροχή οξυγόνου ( $O_2$ ) απαιτείται για την διατήρηση της ζωής σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Η χαμηλή συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου χαρακτηρίζεται ως υποξία και είναι υπεύθυνη για μια πληθώρα καταστάσεων (φυσιολογικών και παθολογικών) στον οργανισμό. Οι κύριοι αισθητήρες των μεταβολών του οξυγόνου είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors), οι οποίοι εκφράζονται σε συνθήκες υποξίας και διακρίνονται σε τρεις ισομορφές. Η δράση των HIFs εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου δρουν σε σύμπλοκα ως ετεροδιμερή. Αναλυτικότερα, αποτελούνται από μια  $\alpha$  υπομονάδα, η οποία εκφράζεται μόνο σε συνθήκες υποξίας και  $\beta$  υπομονάδα (ARNT) η οποία εκφράζεται ανεξάρτητα της παρουσίας οξυγόνου. Οι υπομονάδες HIF-1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$  ρυθμίζονται τόσο από την συγκέντρωση του μοριακού οξυγόνου και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όσο και από την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα ο HIF-2 $\alpha$  αλληλεπιδρά με την Ρεπτίνη52, και ως σύμπλοκο μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασης ειδικών γονιδίων-στόχων τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, το πρώτο μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η αναζήτηση των γονιδίων που εμπλέκονται στις συνθήκες αποσιώπησης του HIF-2 $\alpha$  και της Ρεπτίνης σε συνθήκες υποξίας. Και το δεύτερο μέρος επικεντρώνεται στην επιβεβαίωση της *in vitro* αύξησης της έκφρασης των γονιδίων από την ταυτόχρονη απουσία HIF-2 $\alpha$  και Ρεπτίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος.

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν μια σειρά από νέα γονίδια στόχοι του HIF-2 $\alpha$  και της Ρεπτίνη52 των οποίων η έκφραση μειώνεται σε συνθήκες υποξίας και αυξάνεται όταν απουσιάζει ταυτόχρονα ο HIF-2 $\alpha$ / Ρεπτίνης52 σε συνθήκες υποξίας. Τα νέα γονίδια αναδεικνύουν νέους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του HIF-2 $\alpha$  παρουσία της Ρεπτίνης οι οποίοι απαιτούν περαιτέρω μελέτη τόσο των μονοπατιών που εμπλέκεται ξεχωριστά το κάθε γονίδιο όσο και για τον έλεγχο της προσαρμογή της κυτταρικής λειτουργίας στην υποξία.

## Abstract

A constant supply of oxygen ( $O_2$ ) is required to sustain life in all aerobic organisms. Low intracellular oxygen concentration is characterized as "hypoxia" and observed in many physiological as well as pathological processes. The main sensors of oxygen changes are the family of hypoxia-inducible transcription factors HIFs, which are distinguished the three isoforms. HIFs act in the nucleus as heterodimeric complexes and consist of an  $\alpha$  subunit, which is stabilized under hypoxic conditions, and a stably expressed  $\beta$  subunit (ARNT). HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  subunits are affected by both intracellular oxygen concentration, post-translational modifications and interaction with other proteins. More specifically, HIF-2 $\alpha$  interacts with Reptin52, and this complex alterate the expression of specific target genes.

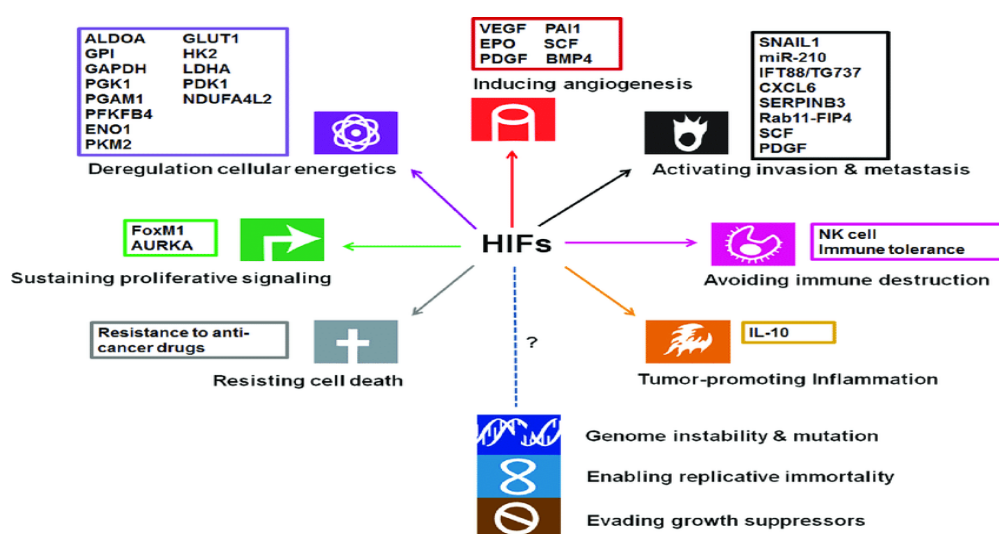
Considering the above data, the first part of this thesis was to identify the involved genes after silencing HIF-2 $\alpha$  and Reptin52 under hypoxia. The second part focuses on confirming "*in vitro*" the increase of genes expression after simultaneous absence of HIF-2 $\alpha$  and Reptin52 in hepatocarcinoma cells.

The results revealed a number of novel HIF-2 $\alpha$  and Reptin52 target genes whose expression is decreased under hypoxia and increased when HIF-2 $\alpha$ /Reptin52 is simultaneously silenced under hypoxia. The new genes highlight new regulatory mechanisms of HIF-2 $\alpha$  in the presence of Reptin52 that require further study both of the pathways involved individually by each gene and to control the adaptation of cellular function to hypoxia.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Υποξία

Για τη διατήρηση της ζωής σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς απαιτείται η σταθερή παροχή οξυγόνου ( $O_2$ ). Τα ανθρώπινα κύτταρα χρειάζονται οξυγόνο για την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μια διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Το οξυγόνο παρέχεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους διάφορους ιστούς και η συγκέντρωσή του σε αυτούς είναι ανάλογη με τις ανάγκες του κάθε οργάνου που διαπερνά (Brahimi-Horn, M. C., et al., 2007). Τα επίπεδα οξυγόνου περιγράφονται με τη χρήση όρων όπως υποξία (0,1-1%  $O_2$ ), νορμοξία (~21%  $O_2$ ) και υπεροξία (>21%  $O_2$ ). Η χαμηλή συγκέντρωση μοριακού οξυγόνου (υποξία) είναι απαραίτητη για φυσιολογικές διεργασίες όπως ανάπτυξη του εμβρύου κατά την κύηση αλλά αποτελεί και δείκτη παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος και η φλεγμονή. Οι οργανισμοί μέσω διαφόρων μηχανισμών ρυθμίζουν την ομοιοστασία της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου οξυγόνου επάγοντας μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται Hypoxia Inducible Factors (HIF) (Kumar, H., et al., 2015). Οι HIFs είναι οι κύριοι αισθητήρες οξυγόνου και μέσω της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης μιας πληθώρας γονιδίων ρυθμίζουν βιολογικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση καθώς και μεταβολικά μονοπάτια. (Εικόνα1) (Suzuki, N., et al., 2017).

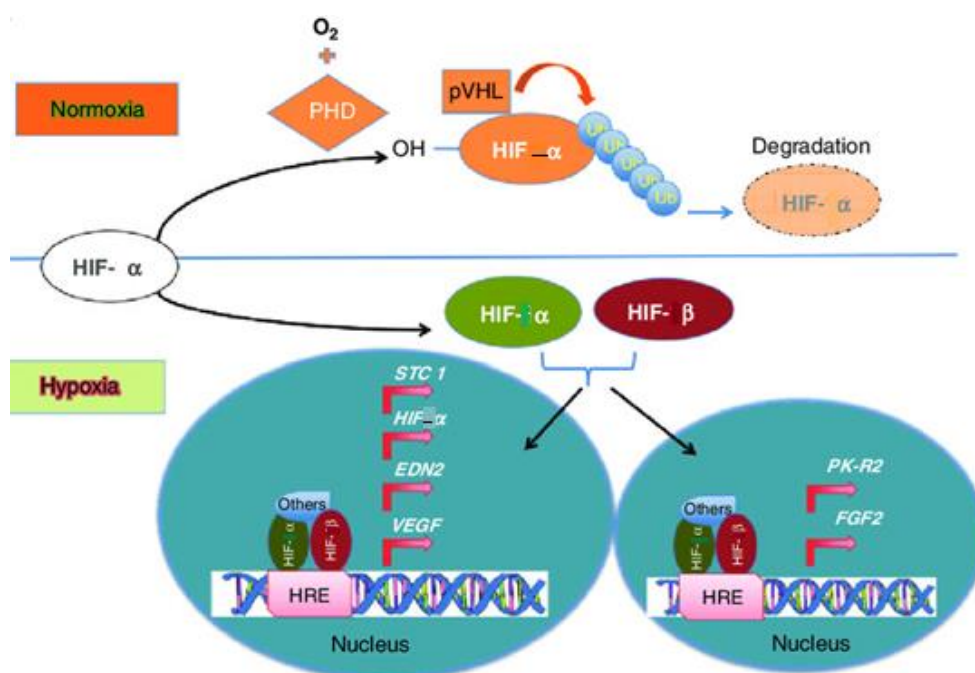


**Εικόνα 1:** Οι HIF συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες ελέγχοντας την ρύθμιση μιας πληθώρας γονιδίων (Chen, C., et al., 2015)



### 1.2.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Η πρωτεϊνική δομή των μεταγραφικών παραγόντων HIF είναι της μορφής έλικας-στροφής-έλικας (bHLH). Οι HIFs δρουν ως ετεροδιμερή και συνίστανται από μια οξυγονοεξαρτώμενη επικράτεια, την  $\alpha$  υπομονάδα, και μια επικράτεια που εκφράζεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη μοριακού οξυγόνου, την  $\beta$  υπομονάδα (Cassavaugh, J., et al., 2011). Σε φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου η  $\alpha$  υπομονάδα δεν εκφράζεται καθώς οι PHDs (Prolyl-Hydroxylase Domain) την υδροξυλιώνουν σε αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης και έτσι οδηγείται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση (Εικόνα 2) (Meidan, R., et al., 2013).

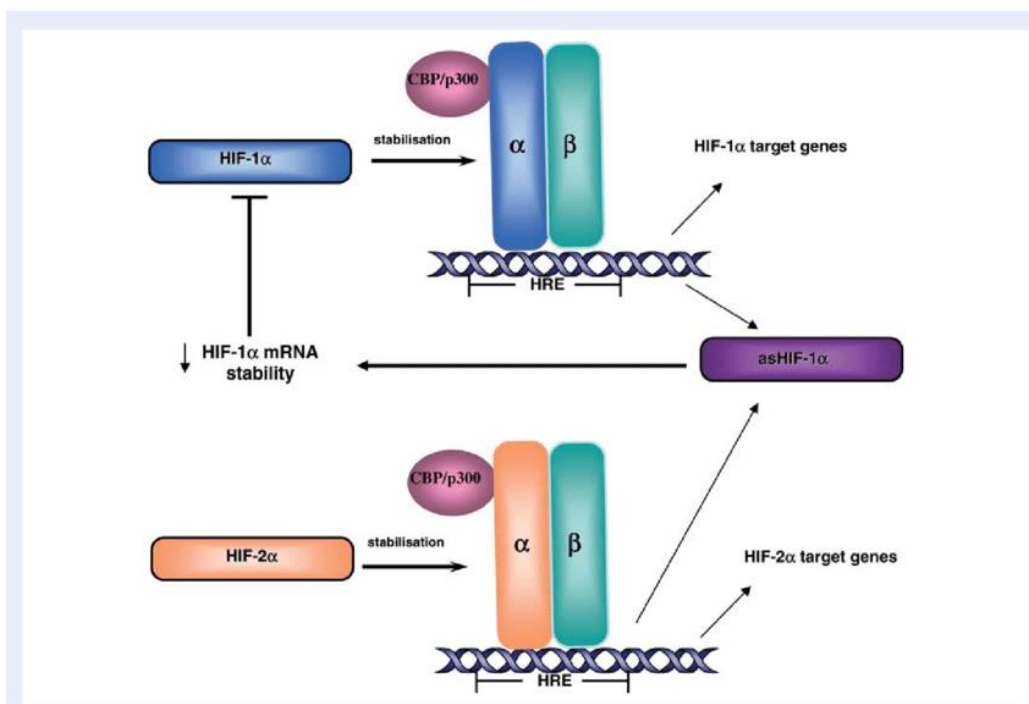


**Εικόνα 2:** Σε συνθήκες νορμοξίας οι HIF οδηγούνται προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα ενώ σε συνθήκες υποξίας δρουν ως ετεροδιμερή που ρυθμίζουν την μεταγραφική ενεργότητα στον πυρήνα (Meidan R., et al 2013)

Την υπομονάδα HIF-1 $\beta$  ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) την κωδικοποιούν δύο γονίδια: ARNT1, ARNT2 και εκφράζεται συνεχώς ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου. Η  $\alpha$  υπομονάδα, στα θηλαστικά κωδικοποιείται από τρία γονίδια: HIF1A, EPAS1 (ή HIF2A), HIF3A. Από τις τρεις ισομορφές της υπομονάδας  $\alpha$ , οι πρωτεΐνες των δύο πρώτων δρουν ως αγωνιστές ενώ η πρωτεΐνη της τρίτης ισομορφής στις περισσότερες φορές δρα ανταγωνιστικά (Pugh, C. W., 2016).

Να υπογραμμιστεί, πως το ετεροδιμερές της υπομονάδας  $\alpha$  και  $\beta$  δημιουργείται σε συνθήκες υποξίας και κατόπιν μετατοπίζεται στο πυρήνα για να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Η σύνδεση του ετεροδιμερούς λαμβάνει χώρα στον υποκινητή ή

στον ενισχυτή του DNA του γονιδίου στόχου, οι οποίοι περιλαμβάνουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'-RCGTG-3' (Hypoxia-Responsive Elements, HREs) (Pringle, K., et al., 2009) (Εικόνα 2,3).



**Εικόνα 3:** Η πρόσδεση του ετεροδιμερούς στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) των γονιδίων-στόχων του (Pringle K., et al., 2009)

### 1.2.2 Οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α

Όπως αναφέρθηκε στο παραπάνω εδάφιο 1.2.1 το γονίδιο EPAS-1 (Endothelial PAS domain protein 1) κωδικοποιεί τον HIF-2α, μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 826 αμινοξέα. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία ο HIF-2α αναφέρεται και ως HIF-like factor (HLF), HIF-related factor (HRF) και MOP2 (member of PAS family 2) (Tian, H., et al., 1998). Εντοπίστηκε πρώτη φορά στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και σε αντίθεση με τον HIF-1α, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο HIF1A, παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-2α εντοπίζεται στο δωδεκαδάκτυλο, στον εγκέφαλο, στους νεφρούς, στην καρδιά, στο ήπαρ και στους πνεύμονες. Μελέτες έχουν δείξει πως σε κυτταρικό επίπεδο ο HIF-1α και ο HIF-2α εκφράζονται παράλληλα σε καρδιακά κύτταρα, σε ηπατικά κύτταρα και σε κύτταρα του ενδοθηλίου, ενώ σε κύτταρα του αναπνευστικού και στους νεφρούς ο HIF-2α εκφράζεται μόνο σε μη παρεγχυματικά κύτταρα. Ωστόσο, πληθώρα δημοσιεύσεων κάνουν λόγο για την ύπαρξη του HIF-2α σε παρεγχυματικά κύτταρα και σε αγγειακά κύτταρα όγκων, γεγονότα που οδηγούν σε

υποθέσεις πως ο HIF-2α ίσως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση (Wiesener, M. S., et al., 2003) (Hu, C. J., et al., 2003). Η πρωτεϊνική δομή του HIF-1α και του HIF-2α συμπεριλαμβάνει τις εξής κοινές επικράτειες:

1. την επικράτεια PAS, η οποία είναι υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό τους με την υπομονάδα ARNT και εμπεριέχει την επικράτεια A και B
2. δύο επικράτειες υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής στην N-TAD (αμινοτελική περιοχή) και στην C- TAD (καρβοξυτελική περιοχή), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δράσης τους καθώς αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Εδώ αξίζει να τονιστεί πως η επικράτεια N-TAD προσδίδει εξειδίκευση στον HIF-2α ως προς τα γονίδια στόχους του
3. μια επικράτεια η οποία εξαρτάται από οξυγόνο και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση του από τις προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs)
4. τέλος, περιέχουν δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού το N-NLS (Nuclear Localization Signal), στο αμινοτελικό άκρο και το C-NLS στο καρβοξυτελικό άκρο (Luo, J. C., et al., 2001)

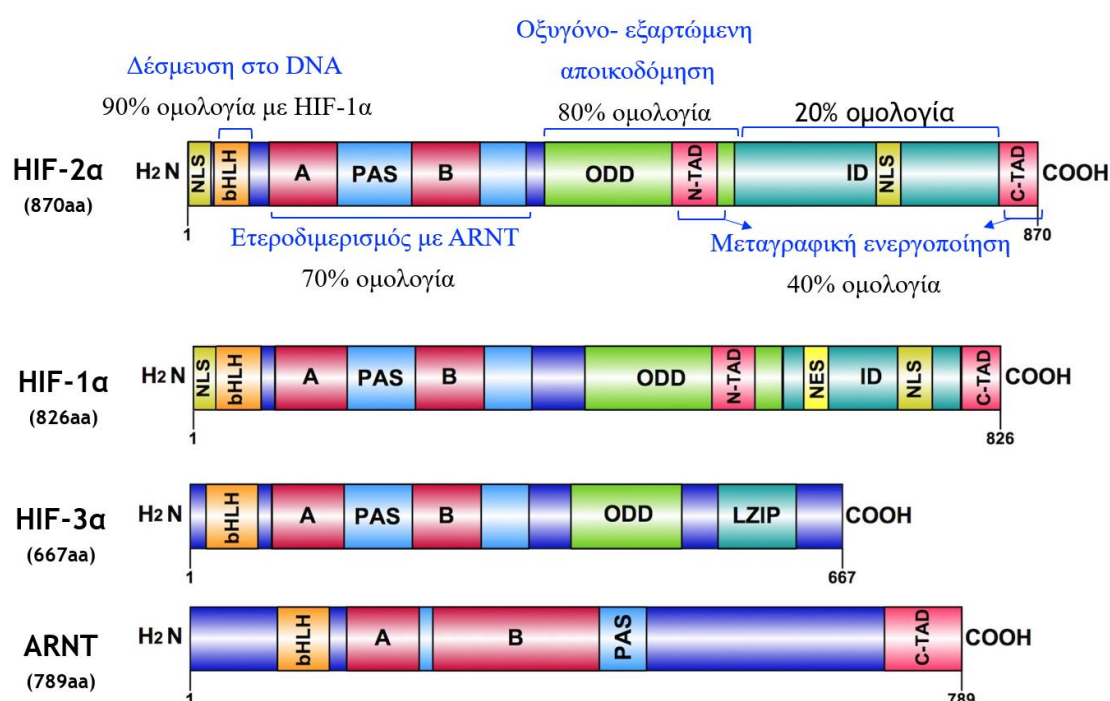
Να τονιστεί πως ο HIF-2α με τον HIF-1α κατόπιν αλληλούχησης παρουσιάζουν υψηλή ομολογία, η οποία ανέρχεται στο 48%. Αναλυτικότερα, το μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας το εμφανίζουν στην επικράτεια bHLH (83%) και στην επικράτεια PAS (70%) (Εικόνα 4).

### **1.2.3 HIF-3α**

Το γονίδιο HIF3A κωδικοποιεί τον HIF-3α. Ο HIF-3α στερείται την περιοχή C-TAD η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, γεγονός που τον διαφοροποιεί από τις άλλες δυο ισομορφές (Maynard, M. A., et al., 2005) (Εικόνα 4). Η έκφρασή του περιορίζεται στην καρδιά, στους πνεύμονες και στους νεφρούς (Yang, S. L., et al., 2015). Η παρούσα βιβλιογραφία υποστηρίζει πως ο HIF-3α στην υποξία δρά ανταγωνιστικά ως προς τον ετεροδιμερισμό με την υπομονάδα ARNT απέναντι στον HIF-1α και στον HIF-2α με επακόλουθο η έκφραση τους να αναστέλλεται (Hara, S., et al., 2001).

## 1.2.4 ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) ή HIF-1β

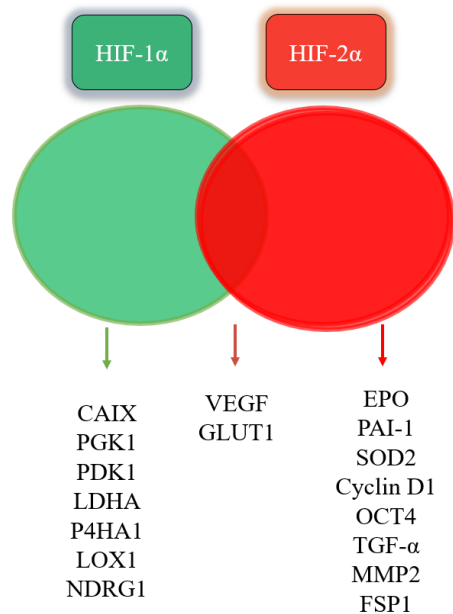
Ο HIF-2α όπως και ο HIF-1α ετεροδιμερίζονται με την ARNT, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους. Η υπομονάδα ARNT είναι ανεξάρτητη του οξυγόνου και εκφράζεται σταθερά. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί την υπομονάδα ARNT ή HIF-β αποτελείται από 789 αμινοξέων και έχει δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2). Κάθε ισομορφή συνίσταται από την επικράτεια bHLH η οποία χρειάζεται για την πρόσδεσή τους στο DNA, από δύο επικράτειες PAS οι οποίες τις επιτρέπουν να διμεριστούν με τους HIFs και τέλος αποτελούνται από μια περιοχή υπεύθυνη για την μεταγραφική τους ενεργότητα (Hara, S., et al., 2001) (Rankin, E. B., et al., 2008) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των μελών της οικογένειας των HIF (Ι. Μ. Γκοτινάκου, Διδακτορική Διατριβή, 2019).

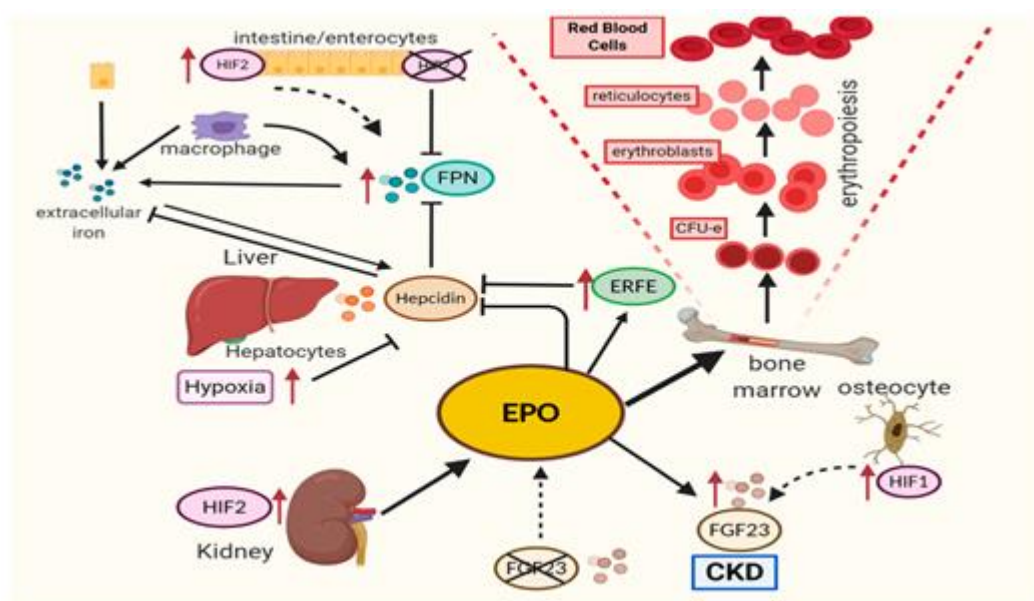
## 1.2.5 Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2 και τα γονίδια στόχου του

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α ο οποίος εκφράζεται σε συνθήκες υπόξιας διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στο κύτταρο μέσω της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης μια πληθώρας γονιδίων τα οποία είτε ρυθμίζονται αποκλειστικά από αυτόν είτε και από τον HIF-1 (Εικόνα 5) (Shen, C., et al., 2013).



**Εικόνα 5:** Διαφορετική και κοινή γονιδιακή ρύθμιση από τους HIF-1 και HIF-2.

Τα γονίδια που ρυθμίζονται αποκλειστικά από τον HIF-2 εμπλέκονται κυρίως σε διεργασίες όπως η διαφοροποίηση, η αντιοξειδωτική άμυνα, η διήθηση, η αγγειογένεση, η αιμοποίηση η ηπατογένεση, η σπερματογένεση και η ερυθροποίηση (Fajersztajn, L., et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα ο HIF-2 ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης της ερυθροποιητίνης (EPO), καθώς με πειράματα αποσιώπησης του, εντοπίστηκε αναιμία στα ποντίκια και χαμηλά επίπεδα της ερυθροποιητίνης (Εικόνα 6) (Befani, C., et al., 2013).



**Εικόνα 6:** Οι πρωτεΐνες της οδού υποξίας μεσολαβούν στη ρύθμιση της ερυθροποίησης. Η EPO, εμπλέκεται στην ερυθροποίηση και ρυθμίζεται από τον HIF2 στους νεφρούς. Δρα στους ερυθροβλάστες στο BM μέσω EPOR και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ειδικά στις όψιμες φάσεις. Εκτός από τον κρίσιμο ρόλο τους στην ανάπτυξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι HIF είναι απαραίτητοι για τον μεταβολισμό του σιδήρου (Watts, D., et al., 2020).

Επίσης, σε άλλα πειράματα αποσιώπισης γονιδίων που εμπλέκονται με την υποξία όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα διμερισμού των HIFs, έδειξαν πως οι συνθήκες υποξίας ο HIF-2 είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη του πλακούντα, του αναπνευστικού, του καρδια-αγγειακού και του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος στα έμβρυα. Επίσης απαλοιφή του γονιδίου του HIF-2α σε οργανισμούς – μοντέλα είχε ως αποτέλεσμα ατελή ανάπτυξη του ήπατος αλλά και εμφάνιση στειρότητας (Rankin, E. B., et al., 2008).

Η υποξία ωστόσο, είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση πολλαπλών παθολογικών καταστάσεων. Πιο συγκεκριμένα, στον καρκίνο έχει βρεθεί πως η παρουσία των HIFs έχει ως αποτέλεσμα την χημειοαντοχή στις φαρμακευτικές θεραπείες και αποτελεί δείκτη για την διάγνωση και την πορεία της νόσου. Τέλος, μέσω πειραμάτων απαλοιφής του γονιδίου του HIF-2α, βρέθηκε αύξηση της έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να προάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική επιβίωση (Menrad, H., et al., 2010).

### **1.2.6 Ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας**

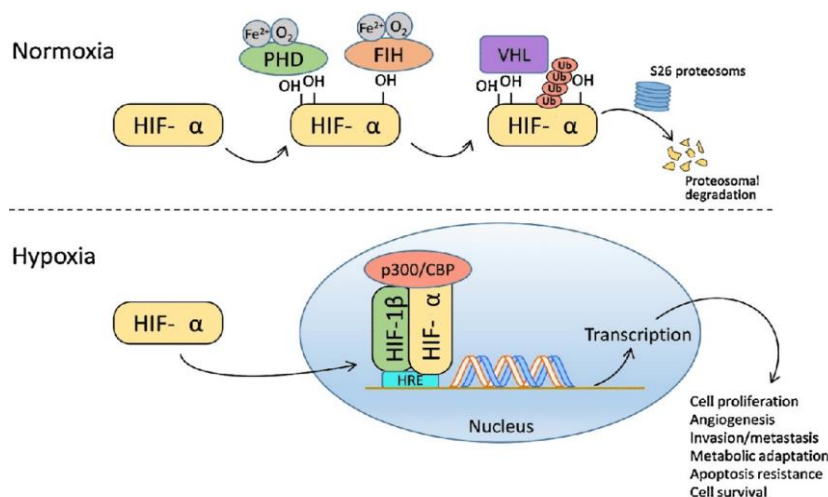
Η ισομορφή του HIF-2α υφίσταται τροποποιήσεις κατά την διάρκεια της μεταγραφής, της μετάφρασης άλλα και μετά την παραγωγή της πρωτεΐνης (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις). Οι παραπάνω μηχανισμοί ρύθμισης είτε είναι ανεξάρτητοι είτε εξαρτώνται από το οξυγόνο και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή πολλαπλών συμπλόκων με διάφορες πρωτεΐνες.

### **1.2.7 Η ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας από το οξυγόνο**

Σε συνθήκες νορμοξίας, οι HIF-α υπομονάδες υφίστανται υδροξυλίωση σε συντηρημένα κατάλοιπα προλίνης. Πιο συγκεκριμένα οι PHDs (Prolyl-Hydroxylase Domain) ενεργοποιούνται από την ύπαρξη οξυγόνου και υδροξυλιώνουν συγκεκριμένα

κατάλοιπα προλίνης. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί πως η ενεργοποίηση των προλυλ-υδροξυλασών προϋποθέτει και την παρουσία του ασκορβικού οξέος και του δισθενή σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Schofield, C. J., et al., 2005).

Η τροποποίηση της υπομονάδας  $\alpha$  από τις προλυλ-υδροξυλάσες έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώρισή της από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL (Von Hippel Lindau) η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η αναγνώριση από την pVHL των HIFs οδηγεί σε ουβικουτινυλίωση και αποικοδόμησή τους από πρωτεάσωμα 26S (Schofield, C. J., et al., 2005). Τέλος, η HIF- $\alpha$  υπομονάδα υφίστανται υδροξυλίωση από τον ανασταλτικό παράγοντα FIH-1 (Factor Inhibiting HIF) σε κατάλοιπο ασπαραγίνης. Έτσι η μεταγραφική ενεργότητα των HIFs μειώνεται καθώς εμποδίζεται η αλληλεπίδραση τους με μεταγραφικούς συνεργοποιητές (Palazon, A., et al., 2014). Σε συνθήκες νορμοξίας, οι υδροξυλάσες PHDs και ο FIH-1 αναστέλλονται (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Η ρύθμιση των HIFs από το οξυγόνο (Lin, S. C., 2014)

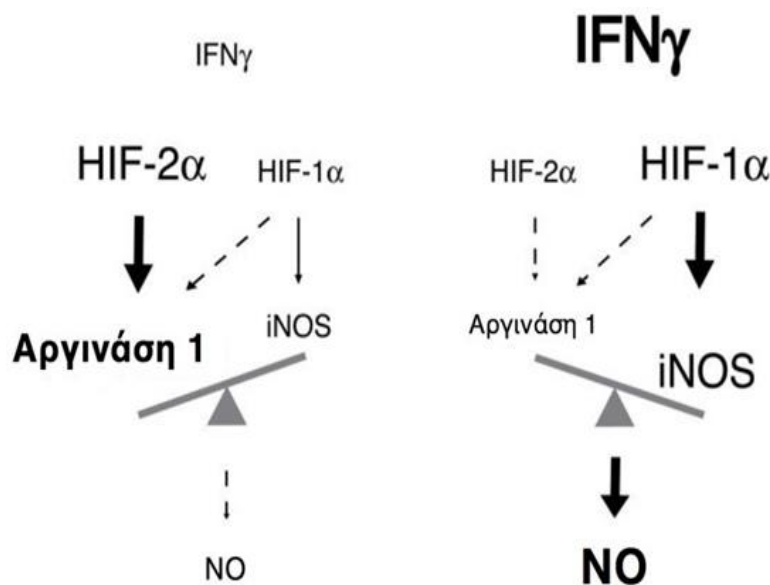
### 1.2.8 Η ρύθμιση της HIF-2 $\alpha$ υπομονάδας ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου

Η ρύθμιση του HIF-2 $\alpha$  τόσο σε επίπεδο μετάφρασης όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο πραγματοποιείται από πολλούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από την ύπαρξη οξυγόνου. Η ρύθμιση σε αυτά τα επίπεδα είναι υπεύθυνη για την σταθεροποίηση της  $\alpha$  υπομονάδας, τον διμερισμό του με την σταθερά εκφραζόμενη υπομονάδα ARNT, την αλληλεπίδραση του με άλλες πρωτεΐνες και τέλος για την πρόσδεση του ως ετεροδιμερές στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία.



### 1.2.9 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Η βιβλιογραφία σχετικά με τη ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο του HIF-2α είναι περιορισμένη. Έχει βρεθεί στα μακροφάγα πως οι ισομορφές HIF-1α και HIF-2α ανταγωνίζονται ώστε να διατηρηθεί η ισορροπία στην συγκέντρωση του NO (μονοξείδιο του αζώτου). Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως όταν τα επίπεδα της ιντερφερόνης-γ είναι χαμηλά, ο HIF-2α εκφράζεται προκειμένου να αυξηθούν τα επίπεδα της Αργινάσης 1 και να μειωθεί η παραγωγή NO. Από την άλλη πλευρά, όταν τα επίπεδα της ιντερφερόνης-γ είναι υψηλά, σηματοδοτείται η έκφραση της HIF1α ισομορφής. Ως συνέπεια, προκύπτει η αύξηση της παραγωγής NO καθώς η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) είναι ενεργή (Εικόνα 8) (Takeda, N., et al., 2010).

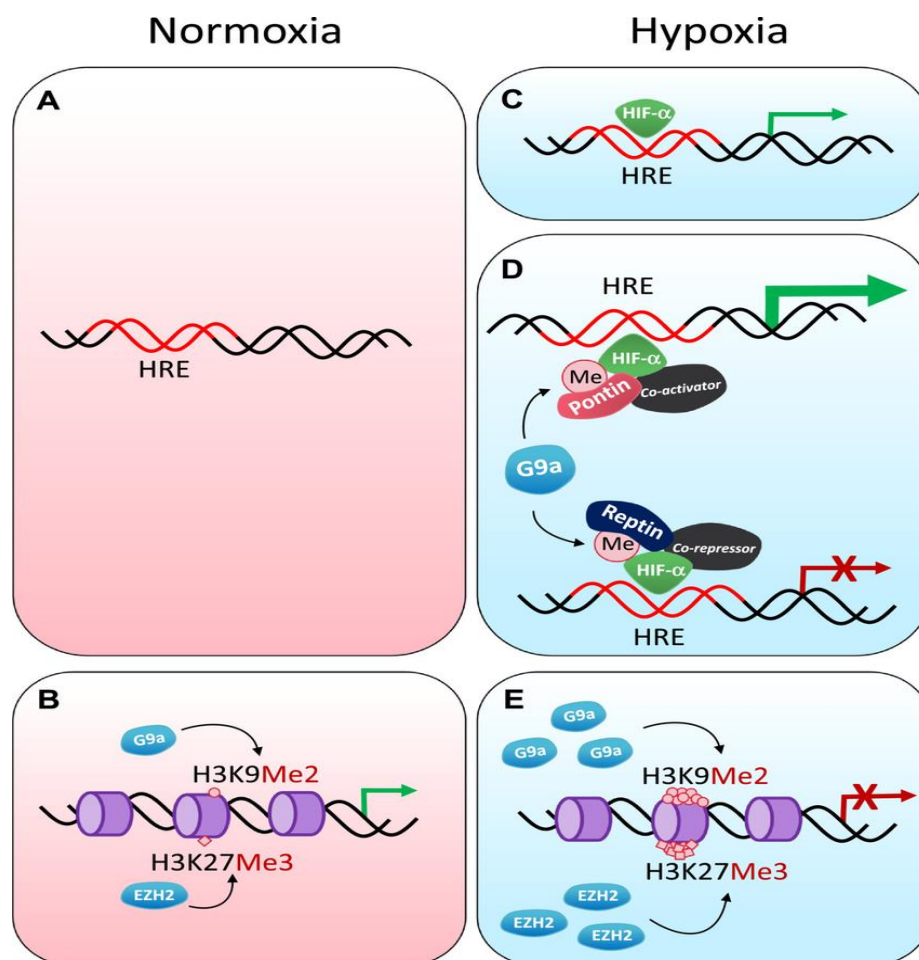


**Εικόνα 8:** Η ισορροπία στην συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) εξαιτίας της παρουσίας των ισομορφών HIF-1α και HIF-2α (Ι. Μ. Γκοτινάκου, Διδακτορική Διατριβή, 2019).

Ο HIF-2α υφίστανται και επιγενετικές τροποποιήσεις σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου καθώς πρέπει να εκφραστούν τα γονίδια στόχοι του για την προσαρμογή των κυττάρων σε υποξία. Αναλυτικότερα, η MBD3 (Methylated CpG binding protein 3) μέσω της προσδεσής της στον υποκινητή του πραγματοποιεί απομεθυλίωση στις νησίδες CpG με αποτέλεσμα το γονίδιο να είναι προσβάσιμο στην πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων (20). Επιπλέον έκφραση πρωτεϊνών άλλων γονιδίων που δρουν ως συνρυθμιστές του HIF-2α μπορεί να ρυθμιστεί με μεθυλίωση από την G9a (nuclear histone lysine methyltransferase) και την EZH2 (histone-lysine N-methyltransferase)



enzyme) στις ιστόνες H3K9 και H3K27 αντίστοιχα για την ενίσχυση ή την αναστολή της δράσης του HIF-2α. Πιο αναλυτικά η G9a μεθυλιώνει τις πρωτεΐνες του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης όπως η Ρεπτίνη 52 και η Ποντίνη στην υποξία. Με αποτέλεσμα η μεθυλιωμένη Ρεπτίνη να ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-α σε ένα υποσύνολο γονιδίων-στόχων. Αντίθετα, με την μεθυλίωση της Ποντίνης ενισχύεται η μεταγραφή γονιδίων-στόχων του HIF-α. Ακόμη, αξίζει να τονιστεί πως η έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών της ιστόνης όπως η G9a και η EZH2 είναι αυξημένη στην υποξία και οδηγεί σε σίγαση γονιδίων μέσω της υπερμεθυλίωσης των ιστονών H3K9 και H3K27 που οι πρωτεΐνες τους καταστέλουν την έκφραση της HIF-α υπομονάδας. Και πως οι HDAC τάξεις I/II (αποακετυλάσες) ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του γονιδίου EPAS1 (Lafleur, V. N., et al., 2014) (Εικόνα 9).



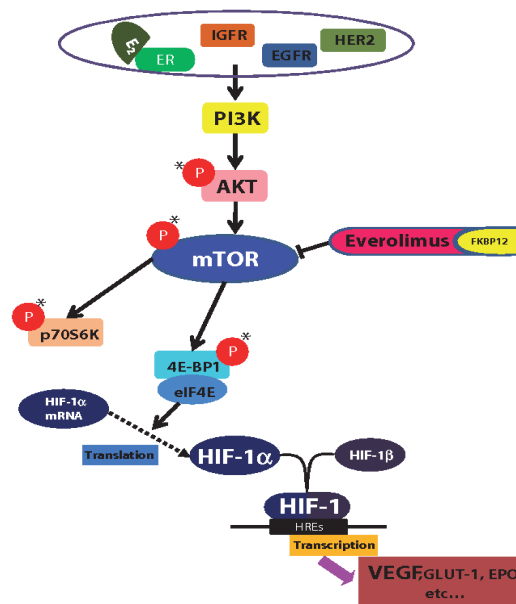
**Εικόνα 9:** Μεταγραφικός έλεγχος σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. (Α) Στη νορμοξία, η πρωτεοσωμική αποικοδόμηση των HIFs αποτρέπει τη δέσμευσή τους στα στοιχεία απόκρισης υποξίας (HRE) και έτσι δε λαμβάνει χώρα η μεταγραφική ενεργοποίηση. (Β) Επιγενετικές τροποποιήσεις (C) Η υπομονάδα HIF-α σταθεροποιείται στην

υποξία και είναι σε θέση να δεσμεύεται σε HREs και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων (D) Η μεταγραφική δραστηριότητα της υπομονάδας HIF-α μπορεί να ρυθμιστεί από συν-ρυθμιστές. (E) Η έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών της ιστόνης είναι αυξημένη στην υποξία και οδηγεί σε σίγαση γονιδίων που εμπλέκονται με την έκφραση της HIF-α υπομονάδας μέσω της υπερμεθυλίωσης των ιστονών H3K9 και H3K27 (Baxter, E., et al., 2014).

Τέλος, σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ρύθμιση των HIFs παρουσιάζει διαφορετική ρύθμιση χωρίς ο ακριβής μηχανισμός να έχει πλήρως διαλευκανθεί. Ωστόσο, για γονιδίου του HIF-1α η μεταγραφική ρύθμιση έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Πιο συγκεκριμένα, η PRMT (Protein methyl-transferase) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση του HIF-1α, καθώς μέσω αποσιώπησης της παρατηρήθηκε τεράστια αύξηση στα επίπεδα μεταγραφής του. Επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ και TNF-α και οι δραστικές μορφές οξυγόνου ROS αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης του HIF-1α (Lafleur, V. N., et al., 2014).

### **1.2.10 Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης**

Οι HIFs υφίστανται ρύθμιση και στο επίπεδο της μετάφρασης. Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση ξεκινά από την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (PI3K) η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Β (AKT) η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την κινάση TOR (Target of Rapamycin). Η κινάση TOR είναι μια άτυπη κινάση Ser/Thr η οποία ανήκει στην οικογένεια των κινασών PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) και αποτελεί μέρος του συμπλόκου mTORC1 (regulatory-associated protein of mTOR) το οποίο ενεργοποιείται ως απάντηση σε συνθήκες stress όπως παραδείγματος χάριν η υποξία. Επίσης η κινάση TOR αποτελεί και μέρος του συμπλόκου mTORC2 (rapamycin-insensitive companion of mTOR) το οποίο δεν επηρεάζεται από την παρουσία ραπαμυκίνης. Το σύμπλοκο mTORC2 μαζί με την AKT2 ελέγχει την μετάφραση του HIF-2α ενώ το σύμπλοκο mTORC1 μαζί με την AKT3 ελέγχει την μετάφραση του HIF-1α (Εικόνα 10) (Gao, W., et al., 2012) (Nayak, B. K., et al., 2013)

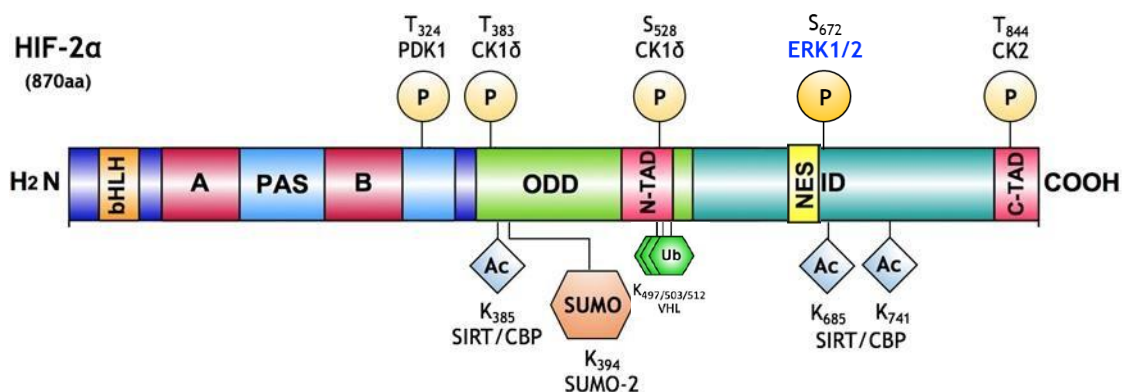


**Εικόνα 10:** Μεταφραστική ρύθμιση του HIF-1α από το σύμπλοκο mTORC1 (mTOR Complex 1) (Miyazawa, M., et al., 2010).

### 1.2.11 Ρύθμιση σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο

Η HIF-2α υπομονάδα μετά την βιοσυνθεσή της υφίστανται τροποποίηση ομοιοπολικές τροποποιήσεις οι οποίες ονομάζονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι πλήρως αντιστρεπτές διαδικασίες και καταλύονται από μια σειρά ενζύμων όπως οι κινάσες οι οποίες πραγματοποιούν φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα Ser383,672/Thr528, οι τρανσφεράσες ουβικουιτίνης οι οποίες καταλύουν ουβικουιτίνωση σε κατάλοιπα Lys497,503,512, οι ακετυλοτρανσφεράσες οι οποίες ακετυλιώνουν σε κατάλοιπα Lys385,685,741 και η σουμοϋλάσες η οποίες σουμοϋλιώνουν σε κατάλοιπα Lys394 (Gradin, K., et al., 2002) (Εικόνα 11).

Όλες αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν τη χρονική διάρκεια της σηματοδότησης που προκαλείται από τον HIF-2α και των υποκυτταρικό του εντοπισμό. Καθώς οι αλλαγές διαρκούν μέχρι ως ότου τα ένζυμα φωσφατάσες, πρωτεάσες και αποακετυλάσες να ενεργοποιηθούν. Και επίσης οι παραπάνω τροποποιήσεις δίνουν την δυνατότητα στον HIF-2α να αποκτά κατάλληλες θέσεις αναγνώρισης ώστε να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες (Gradin, K., et al., 2002) (Alonso, A., et al., 2004).



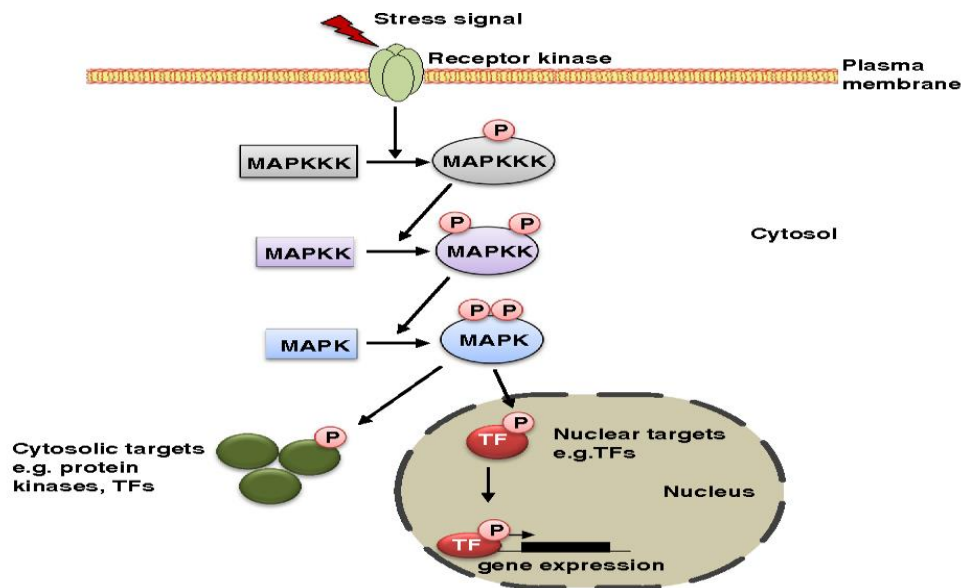
**Εικόνα 11:** Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της HIF-2α υπομονάδας (Ι. Μ. Γκοτινάκου, Διδακτορική Διατριβή, 2019).

### 1.2.12 Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση είναι είναι αναστρέψιμη διαδικασία από τις φωσφατάσες και η πιο γνωστή μετα-μεταφραστική τροποποίηση καθώς σχεδόν όλες οι κυτταρικές πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται από κινάσες. Οι κινάσες ανάλογα με την φύση των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν διακρίνονται σε κινάσες Ser/Thr σε κινάσες Tyr σε κινάσες His και σε κινάσες Asp. Στο κύτταρο εντοπίζονται τρεις δότες φωσφορικών για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση το ATP (Adenosine triphosphate), GTP (Guanosine triphosphate) και το φώσφοενολ-πυροσταφυλικό (PEP).

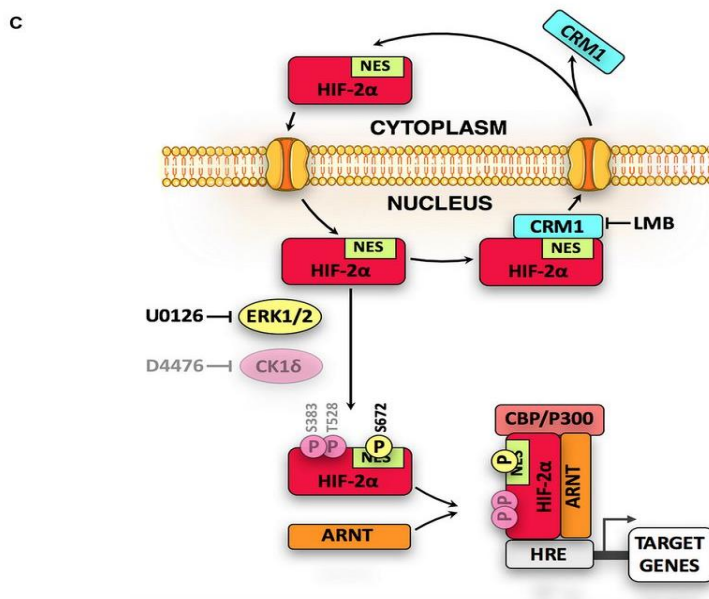
### 1.2.13 Φωσφορυλίωση από την οικογένεια των ERK (Extracellular signal Regulated Kinases)

Οι ERK όπως και όλες οι MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία και την δομή τους φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα Ser/Thr. Τα υποστρώμα τους είναι δυο ειδών, οι κυτταροπλασματικές κινάσες και οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο HIF-2α. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ξεκινάει από την πρόσδεση μιτογόνου στον υποδοχέα κινάσες τυροσίνης (RTKs), η οποία ακολουθείται από ενεργοποίηση της ογκοπρωτεΐνης Ras (GTPάση) και στρατολόγηση στην μεμβράνη της πρώτης κινάσης του μονοπατιού Raf (MAPKKK), κατόπιν η Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση MEK (MAPKK) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση-τελεστή ERK (MAPK) (Εικόνα 12) (Gkotinakou, I. M., et al., 2019).



**Εικόνα 12:** Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK – MAPK (Danquah, A., et al., 2014).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι ERK φωσφορυλιώνουν τον HIF-2α στο κατάλοιπο Ser672 με αποτέλεσμα να αποκρύπτεται η αλληλουχία πυρηνικής εξαγωγής του (Nuclear Export Signal -NES) η οποία πραγματοποιείται μέσω της εξπορτίνης CRM1. Κατόπιν η HIF-2α υπομονάδα σταθεροποιείται, ετεροδιμερίζεται με την υπομονάδα ARNT και το ετεροδιμερές προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης της υποξίας όπου μέσω και άλλων συνεργοποιητών της μεταγραφής επάγει την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Gkoutinakou, I. M., et al., 2019) (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Σχηματική αναπαράσταση της φωσφορυλίωσης του HIF-2α από τις ERK1/2 (Gkoutinaku, I. M., et al., 2019).

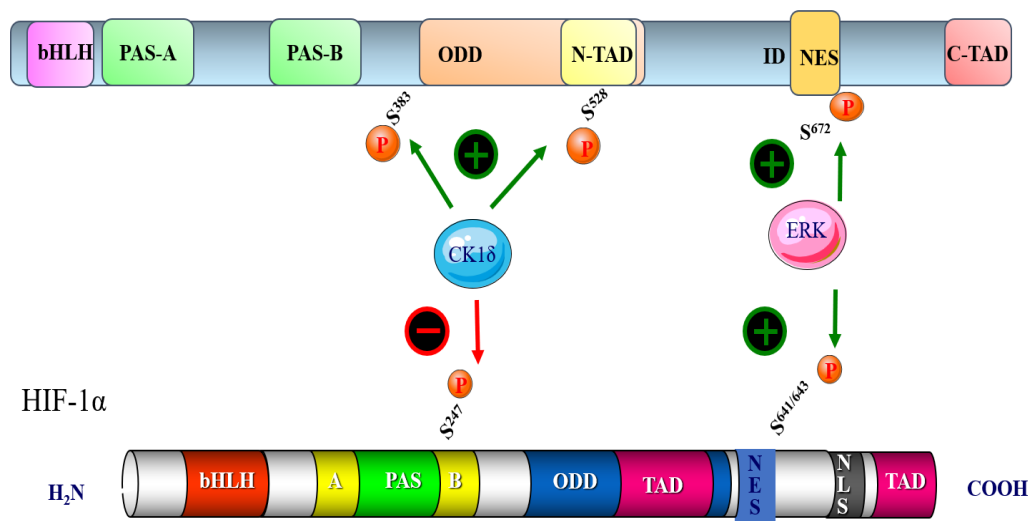
#### 1.2.14 Φωσφορυλίωση του HIF-2α από την οικογένεια των κινασών καζεΐνης (Casein kinase\_CK)

Οι κινάσες καζεΐνης εμφανίζονται στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και συμμετέχουν σε πολλούς οδούς μεταγωγής σήματος. Εμπλέκονται στη σηματοδότηση Wnt/β-catenin, στους κirkάδιους ρυθμούς και ρυθμίζουν τον πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εντοπισμό πολλών μεταγραφικών παραγόντων. Οι CK φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και διακρίνονται σε δυο υποκατηγορίες τις κινάσες καζεΐνης 1 (CK1) και τις κινάσες καζεΐνης 2 (CK2). Η ισομορφή CK1δ φωσφορυλιώνει τον HIF-2α στο κατάλοιπο Thr844. Το αποτέλεσμα από αυτής της φωσφορυλίωσης είναι όμοιο με το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του από τις ERK. Καθώς μετά την τροποποίηση ο HIF-2α εντοπίζεται συσσωρευμένος στον πυρήνα και χαρακτηρίζεται από αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα.

Ωστόσο, έχει δειχθεί πως η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την ισομορφή CK1δ ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική του δράση καθώς παρεμποδίζεται ο διμερισμός του με την ARNT (Εικόνα 14) (Pangou, E., et al., 2016) (Kourti, M., et al., 2015).

HIF-2α

Pangou E et al., J Cell Sci. 2016 I. M. Gkoutinakou et al., J Cell Sci. , 2019



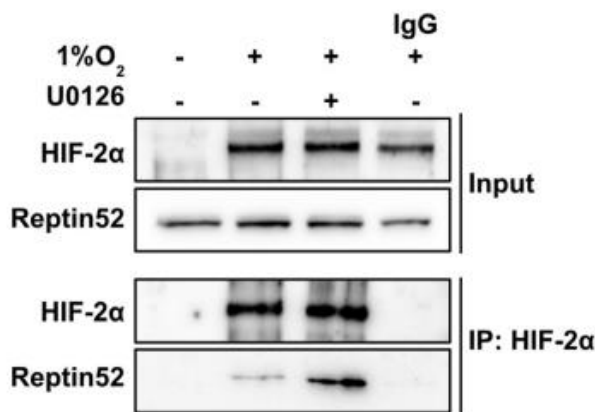
Kalouisi et al., J Cell Sci 2010

Mylonis et al., J Biol Chem 2006, 2008

**Εικόνα 14:** Διαφορικός τρόπος ρύθμισης στις δυο HIF-α υπομονάδες από την φωσφορυλίωση τους από τις CK1δ.

### 1.2.15 Η ρύθμιση του HIF-2α από την αλληλεπίδραση του με τη Ρεπτίνη 52

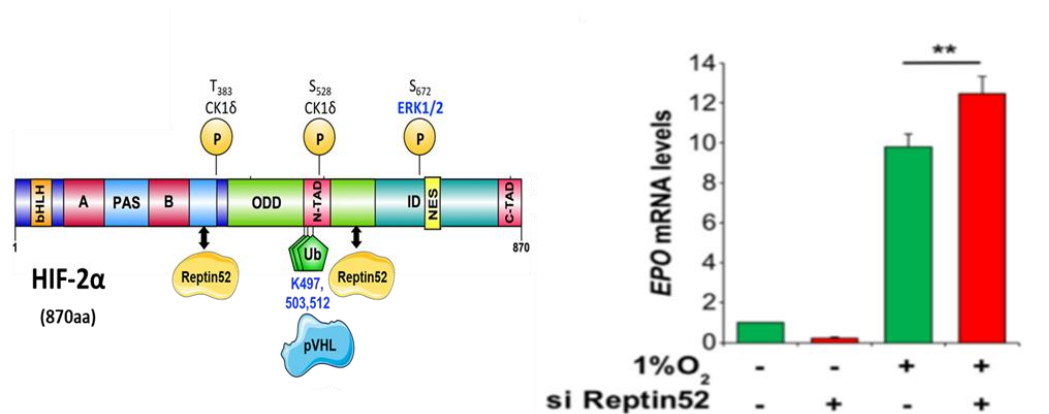
Πρόσφατα δεδομένα στην βιβλιογραφία περιγράφουν πως ο ενδογενής HIF-2α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Ρεπτίνη 52 και πώς αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύεται από την απενεργοποίηση της οδού των ERK (Grigoletto, A., et al., 2010) (Gkoutinakou, I. M., et al., 2021) (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15:** Η απενεργοποίηση της οδού ERK1/2 ενισχύει περαιτέρω την αλληλεπίδραση HIF-2/Ρεπτίνης 52 σε κύτταρα Huh7 (Gkoutinakou, I. M., et al., 2021).

Πιο ειδικά βρέθηκε πως η Ρεπτίνη52 αλληλεπιδρά εκατέρωθεν της

οξυγονοεξαρτώμενης περιοχής με τον HIF-2α (Εικόνα 16 A) και πως αυτή η αλληλεπίδραση μειώνει σημαντικά τα επίπεδα μεταγραφής των εξαρτώμενων γονιδίων από τον HIF-2α όπως το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO) (Gkoutinakou, I. M., et al., 2021) (Εικόνα 16 B).



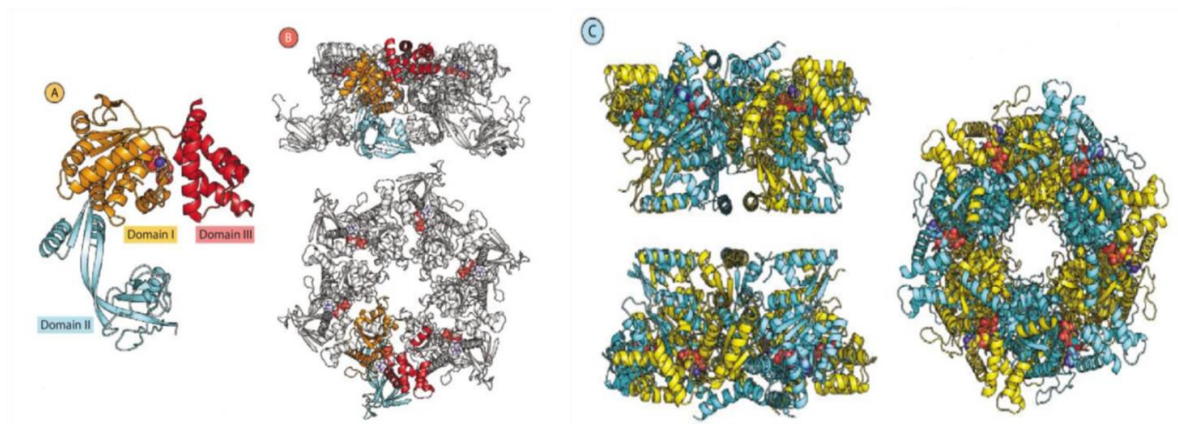
**Εικόνα 16:** A. Η Reptin52 αλληλεπιδρά με τον HIF-2α εκατέρωθεν της ODD. B. Η Reptin52 μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2 και την έκκριση της EPO (Gkoutinakou I-M., et al., 2021).

### 2.2.1 Η Πρωτεΐνη Ρεπτίνη (REPTIN52)

Η Ρεπτίνη, γνωστή και ως Reptin52 (RUVBL2, TIP48, TIP49b, Rvb2) εξαιτίας του μοριακού της βάρους το οποίο ανέρχεται στα 52 kDa, ανήκει στην υπεροικογένεια AAA+ πρωτεϊνών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη δέσμευση και την υδρόλυση του ATP (Makino, Y., et al., 1998). Ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 σε μια ποικιλία ειδών από πολλαπλές ομάδες, με αποτέλεσμα τις διαφορετικές ονομασίες της. Έχει κοινή ομολογία με τη βακτηριακή ελικάση RunB (Kurokawa, Y., et al., 1999) (Gorynia, S., et al., 2011) (Nano, N., et al., 2011) και γι' αυτό τον λόγο θεωρείται πως έχει δράση ελικάσης του DNA. Ωστόσο, η λειτουργία της ως ελικάση παραμένει αμφιλεγόμενη. Είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εντοπίζεται, τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλαπλών λειτουργιών και στη συναρμολόγηση ποικίλων κυτταρικών συμπλόκων μέσω της αλληλεπίδρασης της με μια άλλη AAA+ πρωτεΐνη, την ποντίνη. Σχετικά με την ολιγομερή της κατάσταση, έχει προταθεί πως ανάλογα με τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται, η Ρεπτίνη σχηματίζει ομο-εξαμερή, ετερο-εξαμερή, ακόμη και ετερο-δωδεκαμερή (Εικόνα 17) (Grigoletto, A., et al., 2011) (von Morgen, P., et al.,



2015). Τέλος, κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποσαφηνίζουν τη δομή της Ρεπτίνης η οποία όπως παρουσιάζεται και στη παρακάτω εικόνα αποτελείται από τρεις βασικές επικράτειες, με λειτουργικότητα ΑΤΡάσης, αλλά και υπεύθυνες για την πρόσδεσή της στο DNA και RNA.

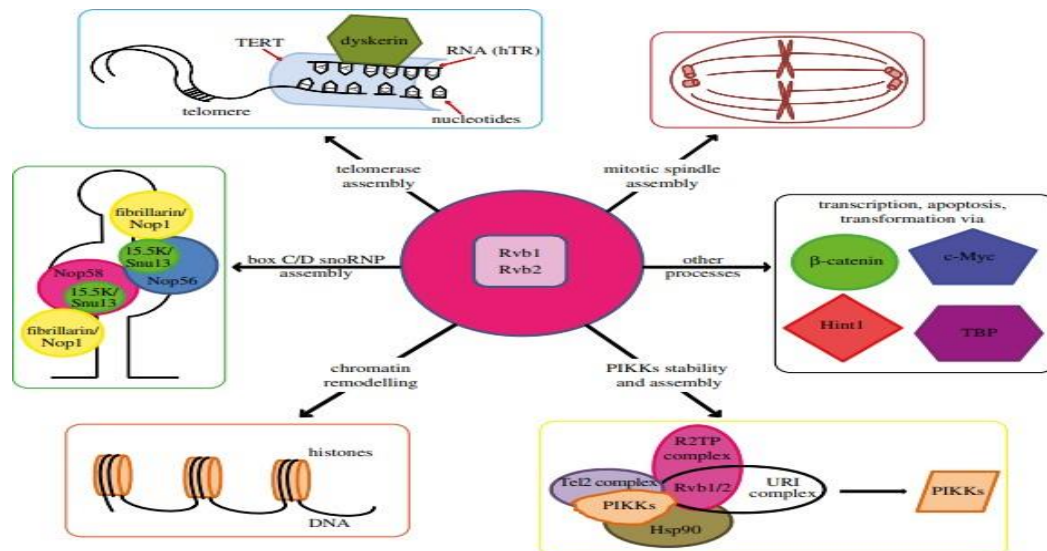


**Εικόνα 17:** **A.** Δομή του μονομερούς Ρεπτίνης **B.** Δομή του εξαμερούς Ρεπτίνης **C.** Δομή του δωδεκαμερούς ποντίνης-Ρεπτίνης (Gorynia, S., et al., 2011).

### 2.2.2 Ο ρόλος της Ρεπτίνης σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες

Οι κυτταρικές λειτουργίες της Ρεπτίνης (Εικόνα 18) περιλαμβάνουν τη μεταγραφική ρύθμιση, καθώς αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες MYC, E2F και β-κατενίνη και ελέγχει την λειτουργία τους. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, επάγεται η κυτταρική αύξηση και επιβίωση των κυττάρων. Δεν αποτελεί έκπληξη, άλλωστε το γεγονός, ότι η Ρεπτίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων πολλών καρκίνων και βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται σε μεγάλο αριθμό τύπων καρκίνου (Venteicher, A. S., et al., 2008) (Yan, T., et al., 2019). Μια άλλη σημαντική κυτταρική λειτουργία της Ρεπτίνης, είναι η συμμετοχή της στο σχηματισμό του πρωτεϊνικού συμπλόκου της αντιγραφής καθώς αποτελεί μέρος του συμπλόκου R2TP (RVB1-RVB2-TAH1-PIH1) αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες PIH1D1 (PIH1 domain-containing protein 1) και την RPAR3 (RNA polymerase II associated protein 3) που το απαρτίζουν (44). Ακόμη, πειραματικά δεδομένα την καταδεικνύουν απαραίτητη για βιογένεση των μικροπυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματίων με box C/D (box C/D snoRNP), των U4 snRNP, των μικροπυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών με box H/ACA (box H/ACA snoRNP) και κατ'επέκταση της τελομεράσης καθώς αλληλεπιδρά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλόκου της, TERT και TERC RNP. Τέλος, η παρουσία της Ρεπτίνης είναι απαραίτητη για την

μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S, πράγμα το οποίο εξακριβώθηκε με την αποσιώπηση του γονιδίου της Ρεπτίνης και την παρατήρηση της καταστολής του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1, κατόπιν κυτταρομετρία ροής (Grigoletto, A., et al., 2010) (Zhao, Y., et al., 2015).



**Εικόνα 18:** Επισκόπηση των βασικών λειτουργιών της Reptin52 (Nano et al., 2013).

## Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ, η ενδογενής Ρεπτίνη52 αλληλεπιδρά με τον HIF-2α εκατέρωθεν της οξυγονο-εξαρτώμενης περιοχής του. Αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύεται όταν το μονοπάτι των κινασών ERK1/2 είναι ανενεργό και έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης διάφορων γονιδίων όπως η EPO (ερυθροποιητίνη).

Προκειμένου να βρεθούν και άλλα γονίδια τα οποία επηρεάζονται από την παρουσία του συμπλόκου Ρεπτίνης/HIF-2α, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του HIF-2α και της Ρεπτίνης 52 σε κυτταρικές καλλιέργειες ηπατοκαρκινώματος (Huh7) και αλληλούχηση του ολικού RNA (RNA-seq). Κατόπιν μέσω της πλατφόρμας metaseqR2 πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση και κατασκευή διαγραμμάτων volcano plot για τον εντοπισμό γονιδίων που αυξορρυθμίζονται και μειορρυθμίζονται με στατιστική σημαντικότητα τόσο απουσία της Ρεπτίνης όσο και του HIF-2α. Τα δύο volcano plot συνδυάστηκαν με το εργαλείο deregulogram προκειμένου να εντοπιστούν τα γονίδια τα οποία η έκφρασή τους επηρεάζεται από την παρουσία του συμπλόκου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, το πρώτο σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αναζήτηση των γονιδίων που εμπλέκονται στις συνθήκες αποσιώπησης του HIF-2α και της Ρεπτίνης σε συνθήκες υποξίας. Και το δεύτερο σκέλος επικεντρώνεται στην επιβεβαίωση της *in vitro* αύξησης της έκφρασης των γονιδίων, απουσία του συμπλόκου HIF-2α και Ρεπτίνης.

### 3. Υλικά-Μεθόδους

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Ευκαρυωτικές Κυτταρικές σειρές:

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7).

##### 3.1.2 Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τη RT-PCR είναι οι ακόλουθες:

APLP2 (Amyloid beta precursor like protein 2)
Forward: 5' <u>GAAGAGCGTCACCTGAACAA</u> 3'
Reverse: 5' <u>GCTCCCTGCCACCTAAATC</u> 3'

ANG-RNASE4 (Ribonuclease 4)
Forward: 5' <u>GACATTCCACCACTGTGATTG</u> 3'
Reverse: 5' <u>GGAGCTCCTGAGTCTAATTGTC</u> 3'

ZNF16 (Zinc finger protein 16)
Forward: 5' <u>CAGGAGTGAAACCGAGCATAG</u> 3'
Reverse: 5' <u>GAGCTGAGTCCAGGCTTTC</u> 3'

NRP1 (Neuropilin-1)
Forward: 5' <u>GATCTTCCTTCCCACATTGCT</u> 3'
Reverse: 5' <u>GATGAATGGACTGTCTCGTCTATG</u> 3'

##### 3.1.3 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια:

- Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά της διάρκειας της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν των εταιρειών Sigma (St. Louis, USA) και Applichem GmbH (Germany).
- Για τα πειράματα χημειοφωταύγειας αλλά και τα υλικά εμφάνισης και στερέωσης των ακτινογραφικών φιλμ χρησιμοποιήθηκαν τα X-Ray developer και X-Ray fixer της εταιρίας Kodak, αντίστοιχα.

##### 3.1.4 Υλικά Μοριακής Βιολογίας:

Επίσης τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μοριακής βιολογίας ήταν από τις εταιρείες New England BioLabs (NEB) Inc και Fermentas.

##### 3.1.5 Αντισώματα:

- Το πολυκλωνικό αντίσωμα από ορό κουνελιού έναντι του HIF-2α ήταν της εταιρίας Abcam, και χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 1:500
- Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Actin ήταν της εταιρίας Cell Signalling και χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 1:5000
- Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της tubulin A ήταν της εταιρίας Cell Signalling και χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 1: 10000
- Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της Western ήταν των εταιριών Cell

Signalling και Santa Cruz, και ήταν έναντι των IgG αλυσίδων κονίκλων, ποντικού ή κατσίκας.

### 3.1.6 Διαλύματα:

#### 1. Phosphate Buffered Saline ή Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1x:

NaCl	138 mM
KCl	2.67 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.47 mM

- Το pH του διαλύματος υπολογίζεται στο 7.4 και δεν απαιτείται ρύθμιση.

#### 2. Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τη λύση των ευκαρυωτικών κυττάρων:

##### • Lysis Buffer:

Tris-HCl pH 7.5	25mM
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1%
PMSF	2mM
DTT	5mM

- Το παραπάνω διάλυμα είχε ως σκοπό τη παραλαβή των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα Huh7.

#### 3. Immuno Precipitation Buffer (IP):

Hepes pH 7.6	25mM
NaCl	150mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1%
PMSF	2mM
DTT	5mM

- Το παραπάνω διάλυμα είχε ως σκοπό τη παραλαβή των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα Huh7, που θα χρησιμοποιούνταν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

#### 4. Πηκτή ακρυλαμίδιου:

Πηκτή διαχωρισμού (separating)		Πηκτή επιστοίβαξης (stacking)	
Tris- HCl pH 8.8	0.375 M	Tris- HCl pH 6.8	0.125M
ακρυλαμίδιο	8-12%	ακρυλαμίδιο	4.5%
EDTA	2mM	EDTA	2mM
SDS	0.1%	SDS	0.1%
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0.04%	Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0.04%
TEMED	0,02%	TEMED	0,04%

#### 5. Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (Running Buffer) 10x

Tris	50 mM
Glycine	1.92 M
SDS	1%

- Το pH του διαλύματος υπολογίζεται στο 8.3 και δεν απαιτείται ρύθμιση. Η τελική αραιώση του διαλύματος ήταν 1X.

#### 6. Transfer Buffer (Tris- Borate 10x), που χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα μεταφοράς των πρωτεϊνών κατά τη τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

Tris	125 mM
DTT	0.5mM
SDS	0.2%

- Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε χρησιμοποιώντας άλας βορικού οξέος στη τιμή 8.5.

#### 7. Διαλύματα χρώσης πηκτής πολυακρυλαμίδιου:

- Coomassie Brilliant Blue G250, με σκοπό τη χρώση του SDS-PAGE

Coomassie Brilliant Blue	0.1%
Οξικό οξύ	10%
Μεθανόλη	50%

- Ponceau red S, με σκοπό τη χρώση της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western blot)

Ponceau S	0.5%
Οξικό οξύ	1%

**8. Διαλύματα λουμινόλης και κουμαρικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας**

Διάλυμα λουμινόλης		Διάλυμα κουμαρικού οξέος	
Tris- HCl pH 8.5	0.1 M	Κουμαρικό οξύ	6.8mM
λουμινόλη	1.25mM	DMSO	100%

**9. Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50×**

Tris	24.2%
Οξικό οξύ	5.71%
EDTA pH 8.6	0.05M

- Με σκοπό τη φόρτωση των δειγμάτων στη γέλη γλυκερόλης παρασκευάσθηκε και διάλυμα (Loading Dye) αποτελούμενο από 5% glycerol, 0.42% bromophenol blue, και 0.42% xylene cyanol.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Huh7 και Hela sp. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), από την Gibco, αποτελούμενο από: εμβρυϊκό ορό βοοειδών σε περιεκτικότητα 10% (Fetal Bovine Serum) καθώς και των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Η επώαση των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο, υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Πάγωμα και επανέναρξη καλλιιεργειών

Η διαδικασία του παγώματος των κυττάρων περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των προσκολλημένων κυττάρων στο τρυβλίο με κρύο PBS.
2. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml τρυψίνης 0.2% τρυψίνης σε PBS
3. Εν συνεχεία το τρυβλίο επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
4. Τέλος, συλλέχθηκαν τα κύτταρα και μεταφέρθηκαν σε ειδικά κρυοφυσάλια των 2 ml παρουσία του κρυοπροστατευτικού DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε τελική αναλογία 10%.

Η διαδικασία επανέναρξης των κυτταροκαλλιιεργειών περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Ξεπάγωμα των παγωμένων στους -80 κύτταρα μέσω θέρμανσης στη θερμοκρασία των 37°C.
2. Προσθήκη εντός των κυττάρων 10 ml DMEM, παρουσία 10% FBS
3. Φυγοκέντρηση αυτών στις 200g, για χρονικό διάστημα 3 λεπτών, ακολουθούμενη από αφαίρεση του υπερκειμένου.
4. Τέλος, επαναιώρηση του ιζήματος σε 10 ml θρεπτικού υλικού, με ταυτόχρονη μεταφορά τους σε φλάσκα και επώαση σε κλίβανο, υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Με σκοπό τη δημιουργία εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Πλύση των κυττάρων σε κρύο PBS.
2. Προσθήκη 150μl διαλύματος λύσης αποτελούμενο από 25mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM PMSF και 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Το παραπάνω διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί αποκόλληση των κυττάρων



από το τρυβλίο. Στο διάλυμα λύσης τα αντιδραστήρια PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (αναστολέας φωσφατασών), προστέθηκαν αμέσως πριν την χρήση του.

3. Τέλος, το κυτταρόλυμα μεταβιβάστηκε σε σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5 ml, ακολούθησε επώαση 10 λεπτών σε πάγο και φυγοκέντρηση αυτού στις 10.000g για χρονικό διάστημα 30 λεπτών, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C).

- ο Τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western blot). Πριν την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε στα διαλύματα Loading Buffer 4X, και ακολούθησε θέρμανση αυτών στους 95°C για χρονικό διάστημα 5 λεπτών.

### **3.2.4 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα**

Με σκοπό τη παρασκευή των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο των κυττάρων,
  2. Προσθήκη 1,5 ml διαλύματος PBS 1x
  3. Απόξεση των κυττάρων αυτών.
  4. Μεταφορά των αποκολλημένων κυττάρων σε σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5 ml
  5. Φυγοκέντρηση στις 12.000g για 12 δευτερόλεπτα.
  6. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και επαναιώρηση του ιζήματος σε 400 μl υποτονικού διαλύματος A.
  7. Στη συνέχεια το εναιώρημα αναδεύεται για 10 δευτερόλεπτα και επωάζεται σε πάγο για 15 λεπτά.
  8. Μετέπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτών στις 12.000g για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και κρατείται (κυτταροπλασματικό εκχύλισμα), ενώ πραγματοποιείται επίσης επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μl υπέρτονου διαλύματος B. Το εναιώρημα αναδεύεται για 10 δευτερόλεπτα και επωάζεται σε πάγο για 20 λεπτά.
  9. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό αποτελεί και το πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών και μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου erpendorf των 1,5 ml και αποθηκεύεται στους -20°C.
- Διάλυμα A: 10 mM Hepes pH 7,5, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0,5 mM DDT, 0,2 mM PMSF

- Διάλυμα B: 20 mM Hepes pH 7,5, 25% γλυκερόλη, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DDT, 0,2 mM PMSF

### 3.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Μία από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους προσδιορισμού της συγκέντρωσης ενός δείγματος σε πρωτεΐνη είναι η μέθοδος Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Η τεχνική αυτή είναι βασισμένη στη δημιουργία έγχρωμου συμπλόκου σε όξινο περιβάλλον, λόγω της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G250.

Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Biorad. Με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πραγματοποιείται ανάμιξη αυτού με H<sub>2</sub>O. Πιο συγκεκριμένα η αναλογία αντιδραστήριο Bradford προς νερό είναι ¼ και ο τελικός όγκος είναι 1ml. Το δείγμα που εμπεριέχει και τις πρωτεΐνες που θέλουμε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση τους φασματοφωτομετρείται στα 595nm. Η τιμή της απορρόφησης ανάγεται σε συγκέντρωση διαμέσου μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς που έχει πραγματοποιηθεί για την πρωτεΐνη αλβουμίνη από βόειο ορό (Bovine Serum Albumine).

### 3.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες, συχνά αποκαλούμενη και ως SDS-PAGE είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Ονομάζεται ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του ανιοντικού απορρυπαντικού (SDS) που χρησιμοποιείται, και καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αντιδράσεις των φυσικών πρωτεϊνών. Επίσης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του ανιοντικού απορρυπαντικού όλες οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο (ανεξαρτήτου του αρχικού τους). Το σύμπλοκο που δημιουργείται από την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη έχει ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, που είναι περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Στο τέλος, στη γέλη εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται από το αρνητικό στο θετικό ηλεκτρόδιο. Για την παρασκευή της γέλης SDS-PAGE χρησιμοποιούνται οι συσκευές της Hoefer και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V. Η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 8-12% ακρυλαμίδιο, και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο απόσπασμα 4 του εδαφίου § 3.1.6.

### 3.2.7 Χρώση της γέλης πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue R-250

Η χρώση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω διαλύματος χρώσης που εμπεριέχει μεθανόλη, οξικό οξύ και τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250. Η γέλη αρχικά εμβαπτίζεται για 15 λεπτά στο

διάλυμα χρώσης με ταυτόχρονη ανάδευση. Μέσω του παραπάνω διαλύματος πραγματοποιείται στερέωση των πρωτεϊνών στη γέλη (χάρη του οξικού οξέος). Η μπλε χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 δεσμεύεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες της γέλης. Ακολουθεί έκπλυση της γέλης μέσω διαλύματος 10% οξικού οξέος, 20% μεθανόλης για 30 λεπτά με συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, με σκοπό τη διατήρηση της γέλης, γίνεται ενυδάτωσή της σε νερό υπό συνεχή ανάδευση.

### **3.2.8 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από την γέλη στη μεμβράνη και ανοσοαποτύπωση κατά Western blot**

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες γίνεται τοποθέτηση της γέλης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8.5, μαζί με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Ακολουθεί μεταφορά στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) με στόχο τη πραγματοποίηση μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη, στηριζόμενοι στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται. Η γέλη πολυακρυλαμίδιου καθώς και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί (εμβαπτισμένο με το διάλυμα μεταφοράς) μέσα στη συσκευή. Για να μην δημιουργηθούν προβλήματα κατά τη μεταφορά γίνεται προσπάθεια αφαίρεσης τυχόν φυσαλίδων. Η μεταφορά πραγματοποιείται για χρονικό διάστημα 60 λεπτών, ασκώντας ηλεκτρικό πεδίο δύναμης 10V. Μετά το τέλος της μεταφοράς και με σκοπό τον έλεγχο αυτής η μεμβράνη εμβαπτίζεται για χρονικό διάστημα 2 λεπτών σε διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ). Μετά το χρονικό διάστημα των 2 λεπτών, πραγματοποιείται έκπλυση αυτής σε H<sub>2</sub>O. Οι εναπομείναντες πρωτεΐνες στη μεμβράνη παίρνουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Αφού ελεγχθεί η επιτυχημένη μεταφορά γίνεται έκπλυση της με διάλυμα PBS-Tween 20, με ταυτόχρονη ανάδευση. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος έκπλυσης η μεμβράνη επώζεται σε διάλυμα κορεσμού (αποτελούμενο από 5% γάλα σε σκόνη και PBS-0,1% Tween 20) για χρονικό διάστημα 60 λεπτών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με σκοπό να επέλθει κορεσμός των θέσεων δέσμευσης των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη, από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποφυγή της δημιουργίας μη ειδικών αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με τη μεμβράνη. Στη συνέχεια ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20. Ακολουθούν 3 επαναλήψεις για χρονικό διάστημα 5 λεπτών και πραγματοποιείται ολονύχτια επώαση με το διαφορετικό κάθε φορά πρώτο αντίσωμα. Για κάθε αντίσωμα υπάρχουν και οι κατάλληλες αραιώσεις, οι οποίες και πραγματοποιούνται σε διάλυμα PBS-0,1% Tween 20,

παρουσία 5% γάλακτος σε σκόνη, με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση εν ψυχρώ (4°C). Έπειτα εκπλένεται η μεμβράνη με διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 (ακολουθούν 3 επαναλήψεις για χρονικό διάστημα 5 λεπτών). Μετά τη τελευταία πλύση αφαιρείται το διάλυμα PBS-0,1% Tween 20 και πραγματοποιείται επώαση με το κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Και για το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις οι οποίες πραγματοποιούνται σε διάλυμα με 5% γάλα σε σκόνη και PBS- 0,1 % Tween 20. Ο χρόνος επώασης του δεύτερου αντισώματος είναι 60 λεπτά υπό ταυτόχρονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS- 0,1 % Tween 20 (ακολουθούν 3 επαναλήψεις για χρονικό διάστημα 5 λεπτών).

Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Πιο συγκεκριμένα ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για χρονικό διάστημα 1 λεπτού σε 10ml διαλύματος εμπορικού kit Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (Millipore Corporation). Μέσω αυτού του βήματος πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ της συζευγμένης με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάσης που έχει δημιουργήσει ρίζες υπεροξειδίου και του ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικού οξέος δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Οι ρίζες κουμαρικού οξέος οξειδώνουν τη λουμινόλη και τη μετατρέπουν σε 3 αμινο-φθαλκικό. Η παραγόμενη αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτεινού σήματος. Στη παρούσα τεχνική χρησιμοποιήθηκε το kit Immobilon Crescendo HRP Substrate. Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε μέσω της συσκευής Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System, ενώ έγινε κα ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω του λογισμικού προγράμματος Alliance Software.

### **3.2.9 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων**

Με σκοπό την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα θηλαστικών και έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων πραγματοποιείται η μέθοδος της παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, με στόχο την επίτευξη του παραπάνω βήματος έγινε χρήση του μη λιπιδικού αντιδραστηρίου διαμόλυνσης PEI (Thermo Scientific), που περιλαμβάνει ένα διάλυμα κατιονικών πολυμερών σε νερό. Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) είναι ένα κατιονικό πολυμερές που διαμορφώνει σταθερά, συμπαγή και θετικά φορτισμένα σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά προστατεύουν το DNA από αποικοδόμηση, ενώ ταυτόχρονα προσκολλώνται στην κυτταρική επιφάνεια διευκολύνοντας έτσι την παροχή γονιδίων

στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Με σκοπό την παροδική διαμόλυνση ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Πρώτο βήμα ήταν η προετοιμασία του συμπλόκου μέσω ανάμιξης του DNA προς το μέσο διαμόλυνσης που χρησιμοποιείται σε αναλογία 1:2. Η ανάμιξη έγινε σε θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία αντιβιοτικών και εμβρυϊκού ορού FBS σε σωλήνα τύπου erppendorf των 1,5 ml. Η χρησιμοποιούμενη μάζα του πλασμιδιακού DNA ήταν 10 µg για τρυβλία των 10 cm<sup>2</sup>.
2. Ακολούθησε επώαση του πλασμιδιακού DNA και του μέσου διαμόλυνσης για χρονικό διάστημα 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Απώτερος στόχος ήταν ο σχηματισμός συμπλόκων.
3. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του θρεπτικού μέσου DMEM (-/-) στα τρυβλία.
4. Έγινε διασπορά του μείγματος πλασμιδιακού DNA-μέσου διαμόλυνσης πάνω από τα κύτταρα και ακολούθησε επώαση αυτών για χρονικό διάστημα 150 λεπτών υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, σε επωαστικό κλίβανο 5% CO<sub>2</sub>. Ακολούθως της επώασης πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με πλήρες (DMEM, 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης).
5. Τέλος τα κύτταρα επώαστηκαν για χρονικό διάστημα 16 ωρών υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C σε επωαστικό κλίβανο 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.10 Αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης με siRNA

Η αποσιώπηση ή «RNA σίγηση» (RNA interference- RNAi) αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό κυτταρικής μετά- μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων. Πιο αναλυτικά τα πρόδρομα δίκλωνα μόρια RNA (double- stranded RNA-dsRNA) που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς το μέγεθος και τη προέλευση βρίσκουν και αναγνωρίζουν συμπληρωματικά τους μονόκλωνα μόρια mRNA οδηγώντας τα στην αποικοδόμησή. Τα νέα μικρότερα κομμάτια δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν. Με σκοπό λοιπόν την αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α και του HIF-1α πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων Huh7. Η διαμόλυνση έγινε μέσω της χρήσης του αντίστοιχου ολιγοριβονουκλεοτιδίου, μέσω της χρήσης του λιπιδιακού αντιδραστηρίου διαμόλυνσης Lipofectamine 2000 RNAi MAX (Invitrogen). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο αποτελεί ένα διάλυμα λιποσωμάτων το οποίο περικλείει το υδατικό διάλυμα του πλασμιδιακού DNA και προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια διευκολύνοντας έτσι την εισαγωγή γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Σαν συνθήκη αναφοράς, πραγματοποιήθηκε

διαμόλυνση κυττάρων Huh7 με το ολιγοριβονουκλεοτίδιο AllStars-siRNA της εταιρίας Qiagen το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία των λιποσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται ανάμιξη 50 μl DMEM απουσία FBS και αντιβιοτικών με τα siRNA. Η ανάμιξη πραγματοποιείται σε σωλήνα τύπου erppendorf των 1,5 ml.
2. Σε έναν δεύτερο σωλήνα πραγματοποιείται ανάμιξη 50 μl DMEM (απουσία FBS και αντιβιοτικών) με 1.5 μl από το αντιδραστήριο Lipofectamine 2000 RNAi MAX. Ακολουθεί ανακίνηση αυτών και επώαση για χρονικό διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Στο επόμενο βήμα ακολουθεί συνένωση των δυο σωλήνων και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 20 λεπτών. Μέσω αυτού του σταδίου δημιουργούνται τα λιποσώματα που εσωκλείουν το siRNA έναντι του HIF-1α και του HIF-2α.
4. Ακολουθεί προσθήκη αυτών σε τρυβλία που εμπεριέχουν 400 μl DMEM (απουσία FBS και αντιβιοτικών).
5. Έγινε διασπορά του μείγματος λιποσωμάτων και μέσου διαμόλυνσης και ακολούθησε επώαση αυτών για χρονικό διάστημα 4 ωρών υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, σε επωαστικό κλίβανο 5% CO<sub>2</sub>. Ακολούθως της επώασης πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% FBS και αντιβιοτικά (DMEM, 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης).
6. Τέλος τα κύτταρα επώαστηκαν για χρονικό διάστημα 16 ωρών υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C σε επωαστικό κλίβανο 5% CO<sub>2</sub>. Την επόμενη μέρα επεξεργάζονται κατάλληλα αναλόγως της πειραματικής διαδικασίας που έπεται.

### **3.2.11 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του**

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε μέσω της χρήσης του αντιδραστηρίου NucleoZOL, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που πρότεινε η εταιρία. Το NucleoZOL αποτελεί φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Πραγματοποιείται απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και έκπλυση των κυττάρων με PBS 1X.
2. Ακολουθεί προσθήκη 400 μl NucleoZOL και ομογενοποίηση του μίγματος.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 160 μl H<sub>2</sub>O που είναι ελεύθερο ριβονουκλεασών και γίνεται

διαχωρισμός των δύο φάσεων (υδατική και φαινολική), όπου είναι ευδιάκριτες.

4. Το μίγμα υπόκειται σε ισχυρή ανάδευση μέσω vortex για χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων και επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 5-15 λεπτών.
5. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για χρονικό διάστημα 15 λεπτών στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μέσω αυτού του βήματος γίνονται ευδιάκριτες οι τρεις φάσεις, υπερκείμενη υδατική (που εμπεριέχει το RNA), ενδιάμεση (που εμπεριέχει το DNA) φαινολική (που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες).
6. ~500 μl υδατικής φάσης μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου erpendorf των 1,5ml, ενώ προστίθενται και διάλυμα 100% ισοπροπανόλη σε ίση αναλογία με το διάλυμα της υδατικής φάσης. Ακολουθεί επώαση για χρονικό διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για χρονικό διάστημα 10 λεπτών στις 13000 rpm.
7. Μέσω αυτού του σταδίου πραγματοποιείται κατακρήμνιση του RNA. Το προκύπτον ίζημα πλένεται με 400 μl 75% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για χρονικό διάστημα τριών λεπτών στις 13.000 rpm.
8. Κατόπιν, πραγματοποιείται αφαίρεση αιθανόλης, φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων και αφαίρεση των υπολειμμάτων αιθανόλης.
9. Τέλος, ακολουθεί επαναιώρηση του RNA σε τελικό όγκο 30 μl μέσω της χρήσης H<sub>2</sub>O ελεύθερου. Τα δείγματα διατηρούνται στους -80 °C.

### **3.2.12 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA, Φασματοφωτομέτρηση RNA**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), του εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πιο αναλυτικά, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης σε δύο μήκη κύματος στα 260nm (A<sub>260</sub>) και 280nm (A<sub>280</sub>). Με σκοπό το προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA γίνεται αναγωγή της τιμής απορρόφησης στα 260 nm σε δείγμα RNA 40μg/ml, όπου έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 280nm γίνεται έλεγχος τυχόν προσμίξεων από πρωτεΐνες. Ο λόγος των τιμών A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> είναι χαρακτηριστικός και της καθαρότητας του εκάστοτε δείγματος. Εάν ο λόγος κυμαίνεται μεταξύ του 1,7 έως 2, υποδηλώνει δείγμα υψηλής καθαρότητας. Για την μέτρηση των δειγμάτων RNA έγινε αραιώση (1/10) αυτών με καθαρό νερό, απαλλαγμένου από νουκλεάσες.

Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε καθαρό νερό.

### **3.2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time, RT-PCR)**

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης μας επιτρέπει να αντιγράψουμε επιλεκτικά ειδικές αλληλουχίες DNA χρησιμοποιώντας ειδικά συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) (Polymerase Chain Reaction, PCR), χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού οργανισμού. Η μέθοδος πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων (θερμοανθεκτικές πολυμεράσες), επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το προϊόν που ενισχύεται είναι συγκεκριμένο, ενώ ταυτόχρονα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου Real Time (RT-PCR) αποτελεί παραλλαγή της PCR. Μέσω της RT-PCR πραγματοποιείται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Πιο αναλυτικά, το mRNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο και μέσω αυτού παράγονται αντίγραφα cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Ακολουθεί σύνθεση του επόμενου κλώνου και επανάληψη της διαδικασίας έως ότου ολοκληρωθεί η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

- **Σύνθεση του cDNA**

Όπως αναφέρθηκε και στη προηγούμενη παράγραφο η σύνθεση του cDNA βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ως εκμάγειο mRNA, συνθέτοντας cDNA. Η RNA πολυμεράση (απομονωμένη από ρετροϊούς) με τη βοήθεια κατάλληλων εκκινητών συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο με τη βοήθεια τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Οι προκήπτουσες RNA αλυσίδες κόπτονται σε πολλά σημεία μέσω της δράσης RNάσης. Η DNA πολυμεράση δημιουργεί μέσω σύνθεσης το συμπληρωματικό κλώνο DNA και μια λιγάση ενώνει τα κομμάτια με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα δίκλωνο μόριο cDNA. Στην παρούσα εργασία, η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). Για την αντίδραση χρησιμοποιείται ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω:

- 10 µl δείγματος RNA 1 µg
- 2 µl RT Buffer (10x)
- 0,8 µl dNTPs Mix (100 mM)
- 2 µl τυχαίων εκκινητών
- 1 µl αντίστροφης μεταγραφάσης



- 4,2 μl H<sub>2</sub>O

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο, ενώ ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση εκκινητών)
- 37°C για 120 λεπτά (αντίστροφη μεταγραφή)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C – ψύξη

Μετά το τέλος της αντίδρασης στα δείγματα προστίθενται 80μl ddH<sub>2</sub>O (δix απεσταγμένο νερό) και συντηρούνται στους -20°C.

- **Real-Time PCR**

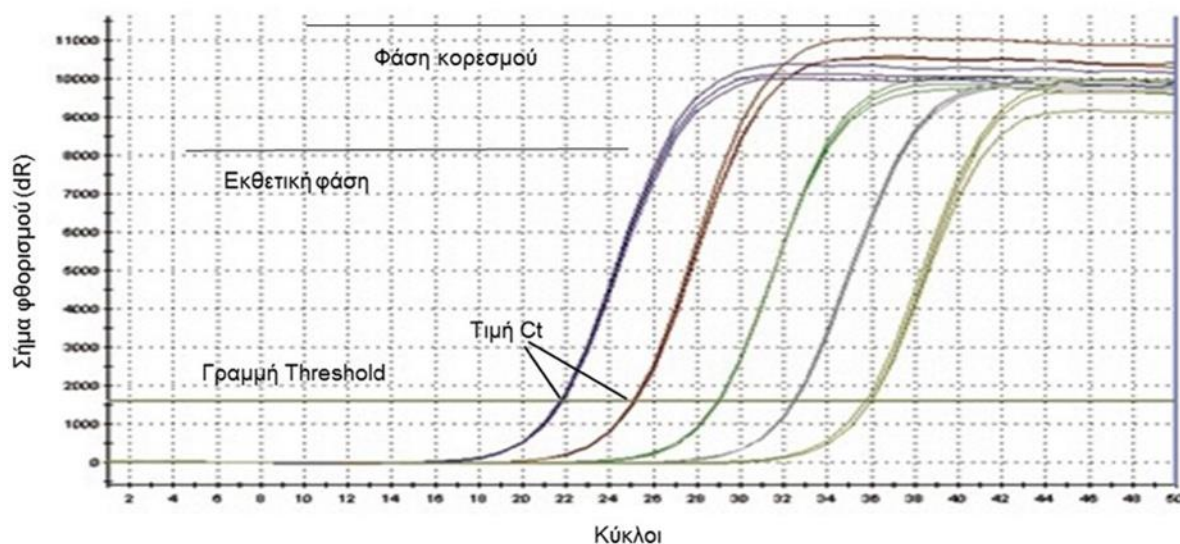
Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) μας επιτρέπει την ενίσχυση ενός τμήματος DNA με στόχο την ποσοτικοποίησή του. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης της διπλής έλικας, πρόσδεσης των ειδικών εκκινητών και επιμήκυνση πρωταρχικών τμημάτων από την DNA πολυμεράση. Μέσω της φθορίζουσα χρωστικής η οποία προσδένεται μη ειδικά στα νεοσυντιθέμενα DNA και της μέτρησης του φθορισμού γίνεται ποσοτικοποίηση του σήματος. Για την ανάλυση της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο SYBR Green mix της εταιρίας Applied Biosystems, το οποίο αποτελείται από την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, dNTPs και σταθεροποιητές.

Το μείγμα για κάθε γονίδιο που θέλουμε να ενισχύσουμε περιέχει το SYBR Green Mix και τους ειδικούς για το γονίδιο εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε συγκέντρωση 10 pmol/μl τον καθένα. Σε 9 μl μείγματος προσθέτουμε 1 μl cDNA. Η κάθε συνθήκη επαναλαμβάνεται δύο φορές και ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται μείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης (NRT) και μείγμα με H<sub>2</sub>O αντί για cDNA (NTC).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 95°C για 180 δευτερόλεπτα προκειμένου να ενεργοποιηθεί η χρωστική SYBR Green, στους 95°C για 3 δευτερόλεπτα με σκοπό την ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης, στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα ώστε να αποδιαταχτεί το δίκλωνο cDNA, στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα για να προσδεθούν οι εκκινητές και να ξεκινήσει η επιμήκυνση. Ακολούθησε επανάληψη των βημάτων για 39 φορές. Και τέλος η θερμοκρασία ήταν από 60-90°C προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση και να αποδιαταχτούν τα προϊόντα.

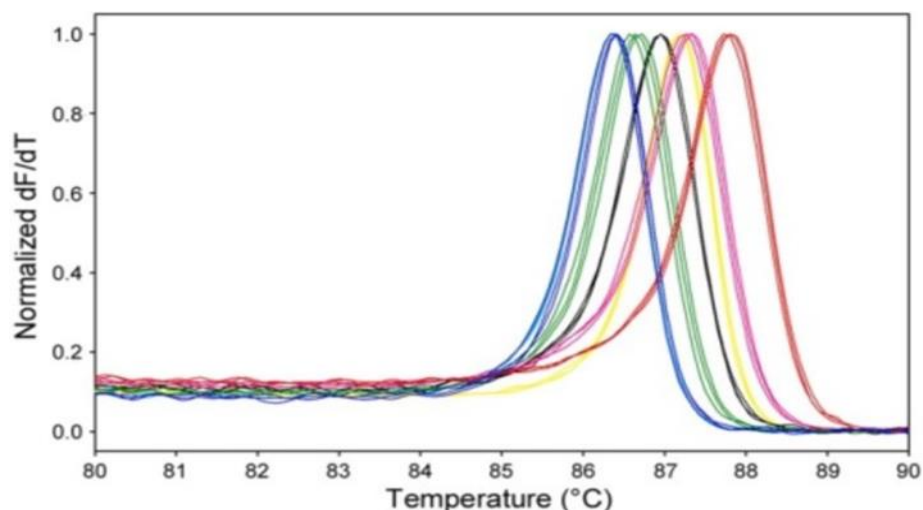
Μέσω του διαγράμματος της καμπύλης ενίσχυσης η οποία περιλαμβάνει τρεις φάσεις, την

λανθάνουσα, την εκθετική και την στατική φάση γίνεται αντιληπτή η αύξηση των δίκλωνων μορίων DNA σε πραγματικό χρόνο. Ωστόσο οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιούνται στην εκθετική φάση της αντίδρασης.



**Εικόνα 19:** Καμπύλη ενίσχυσης cDNA δειγμάτων με ποσοτική Real-Time PCR. Ανατύπωση από: [www.bioline.com](http://www.bioline.com)

Η θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του DNA έχει αποδιαταχθεί (σημείο  $T_m$ ) είναι χαρακτηριστικό του κάθε προϊόντος καθώς επηρεάζεται, από το μήκος και το περιεχόμενό τους σε γουανίνη και κυτοσίνη. Επίσης, καθώς οι κλώνοι αποδιατάσσονται η χρωστική SYBR Green αποδεσμεύεται με αποτέλεσμα ο φθορισμός να μειώνεται, γεγονός που συμβάλλει στην ποιοτική ανάλυση των προϊόντων (Εικόνα 19). Ακόμη, μέσω της καμπύλης τήξης γίνεται έλεγχος για την ειδικότητα και την καθαρότητα των προϊόντων αλλά και των εκκινητών, καθώς αποκαλύπτει την πιθανότητα διμερισμού τους ή επιμόλυνση με ξένο DNA (Εικόνα 20).



**Εικόνα 20:** Καμπύλη τήξης με χρήση της χρωστικής SYBR Green (Huggett, J., et al., 2005).

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης όπου ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ριβοσωμική υπομονάδα 18S. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λόγο των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα που αντιστοιχεί σε κάθε συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά των κύκλων ( $\Delta C_t$ ) του γονιδίου στόχου (APLP2, ANG-RNASE 4, ZNF16, NRP1) και του γονιδίου αναφοράς 18S και στη συνέχεια από το  $\Delta C_t$  κάθε δείγματος αφαιρείται το  $\Delta C_t$  του δείγματος αναφοράς (18S) και με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίζονται οι αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς. Για το υπολογισμό αυτού του λόγου έχει εφαρμοσθεί το μαθηματικό μοντέλο του  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  το οποίο δεν περιλαμβάνει εξομάλυνση των αποδόσεων. Οι λόγοι έκφρασης υπολογίζονται από την εξίσωση:  $R = 2 - (\Delta C_t \text{ δείγμα} - \Delta C_t \text{ μάρτυρας})$ .

### 3.2.14 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism version 5.04. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση (SEM). Τα στατιστικά σημαντικά όρια είναι  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$  και  $*p < 0.05$ .

### 3.2.15 Volcano plot- Deregulogram

Η χρήση του διαγράμματος volcano plot είναι μια διαγραμματική απεικόνιση των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων τόσο με στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.05$ ) όσο και με τρόπο αισθητό (εύρος αλλαγής  $> +1$  και εύρος αλλαγής  $< -1$ ). Τα γονίδια που παρουσιάζουν θετική τιμή εύρους αλλαγής από την καθορισμένη, στον άξονα των  $x$ , αντικατοπτρίζουν αυξημένη έκφραση

σε σχέση με το μάρτυρα ενώ αυτά που παρουσιάζουν αρνητική τιμή εύρους σε σχέση με την καθορισμένη δείχνουν μειωμένη έκφραση. Στον άξονα των γ'γ απεικονίζεται η ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της τιμής  $p$  [ $-\log_{10}(p\text{value})$ ]. Αυτό συνεπάγεται πως όσο υψηλότερη είναι η τιμή τόσο μεγαλύτερη είναι και η στατιστική σημαντικότητα. Μέσω της χρήσης του διαγράμματος volcano plot για κάθε γονίδιο πραγματοποιείται συσχετισμός της στατιστικής σημαντικότητας και του εύρους αλλαγής. Από όλα τα παραπάνω εξάγονται πληροφορίες συνολικά για τα απορρυθμισμένα γονίδια της εκάστοτε πειραματικής συνθήκης.

Το εργαλείο deregulogram μας δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης των απορρυθμισμένων γονιδίων όχι μόνο για μία συνθήκη έναντι ενός μάρτυρα αλλά και μεταξύ δύο διαφορετικών πειραματικών συνθηκών. Κατά αυτό το τρόπο εξάγονται πληροφορίες για τα κοινά απορρυθμισμένα γονίδια (αυξορυθμιζόμενα ή μειορυθμιζόμενα) και στις δύο διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Εξάγονται επίσης πληροφορίες για γονίδια που αυξορυθμίζονται στην πρώτη και μειορυθμίζονται στη δεύτερη ή αντίστροφα (Fanidis, D., et al., 2021).

## 4. Αποτελέσματα

Μετά την αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του HIF-2α και για την Ρεπτίνη σε καλλιέργεια των κυττάρων ηπατοκαρκινώματος σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας, ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA και πραγματοποίηση αλληλούχησης (RNA-seq). Τέλος τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επεξεργάστηκαν με βιοπληροφορική ανάλυση και έγινε απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε volcano plot.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη τόσο του διαγράμματος volcano plot, το οποίο αναπαριστούσε τα γονίδια που αυξορρυθμίζονται και μειορρυθμίζονται με στατιστική σημαντικότητα απουσία του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας έναντι της υποξίας, τόσο και μελέτη του volcano plot που παρουσίαζε τα αυξορρυθμιζόμενα και μειορρυθμιζόμενα γονίδια με στατιστική σημαντικότητα απουσία Ρεπτίνης σε συνθήκες υποξίας έναντι της υποξίας. Στην συνέχεια μέσω του εργαλείου deregulogram, προέκυψε η λίστα γονιδίων των οποίων έκφραση αυξάνεται όταν απουσιάζει ο HIF-2α και η Ρεπτίνη ταυτόχρονα (**Εικόνα 21**).

ΑΥΞΟΡΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ
SERPINE1 (Plasminogen activator inhibitor 1)
SGCB (Beta-sarcoglycan)
APLP2 (Amyloid beta precursor like protein 2)
FAM53B (Protein FAM53B)
MASP1 (Mannan-binding lectin serine protease 1)
ANG-RNASE 4 (Ribonuclease 4)
ZNF16 (Zinc finger protein 16)
SCAMP3 (Secretory carrier-associated membrane protein 3)
MICOS13 (MICOS complex subunit MIC13)
HOXA7 (Homeobox protein Hox-A7)
NRP1 (Neuropilin-1)

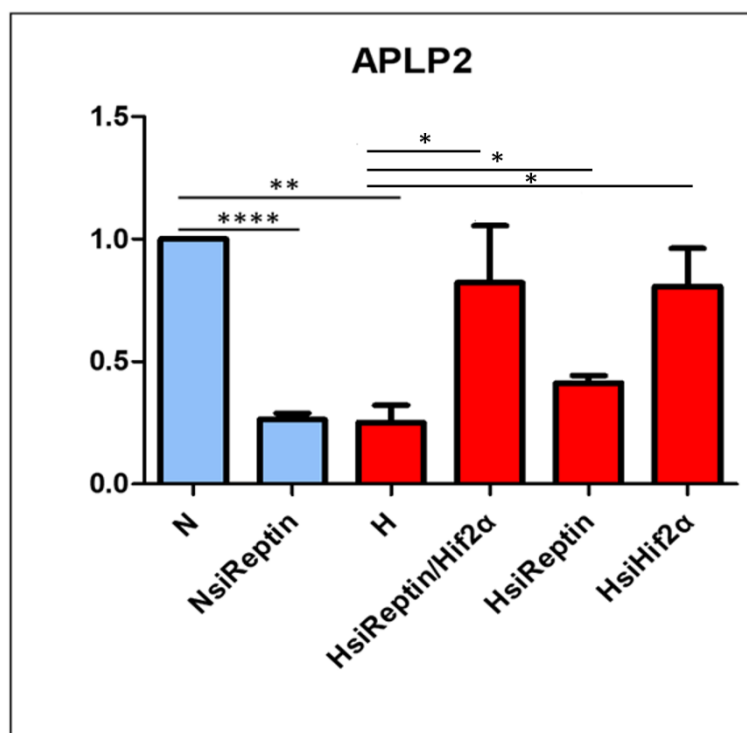
**Εικόνα 21:** Η λίστα των κοινών αυξορρυθμιζόμενων γονιδίων απουσία του HIF-2α, Ρεπτίνης, η οποία προέκυψε από το εργαλείο deregulogram.

Το ενδιαφέρον μας σε αυτή την μελέτη εστιάστηκε στα παραπάνω γονίδια (Εικόνα 21), καθώς για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία φαίνεται πως η παρουσία του HIF-2α

αλληλεπιδρώντας με την Ρεπτίνη αναστέλλει την έκφραση γονιδίων. Ωστόσο τα γονίδια, τα οποία προκάλεσαν ιδιαίτερα το ενδιαφέρον μας, ήταν: το γονίδιο της APLP2 (Amyloid beta precursor like protein 2), της ANG-RNASE 4 (Ribonuclease 4), του ZNF16 (Zinc finger protein 16) και της NRP1 (Neuropilin-1).

Πιο συγκεκριμένα πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι τα μέλη της οικογένειας γονιδίων της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP), APLP1 (Amyloid beta precursor like protein 1) και APLP2, είναι σημαντικά για το σχηματισμό, τη διατήρηση και την πλαστικότητα των συνάψεων. Παρόλα αυτά, ο συγκεκριμένος ρόλος τους εντός του ΚΝΣ και του ΠΝΣ εξακολουθεί να είναι ελάχιστα κατανοητός (Kang, H., et al., 2017). Ωστόσο έχει αποδειχτεί πως η σταδιακή μείωση της παροχής οξυγόνου στον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια της γήρανσης ή της υποξίας εκδηλώθηκε ως παράγοντας που συμβάλλει στην υπερέκφραση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και των ομολόγων της και τη μείωση της αποικοδόμησης του πρόδρομου πεπτιδίου του β-αμυλοειδούς (Αβ)-42. Η συσσώρευση του Αβ σε συνδυασμό με την υποξία μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και τελικά θάνατο νευρωνικών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη, κατόπιν πειραμάτων RT-qPCR, δείχτηκε ότι σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του γονιδίου μειώνεται ενώ όταν απουσιάζουν ταυτόχρονα ο HIF-2α/Ρεπτίνη, η έκφραση επανέρχεται. Ακόμη, όταν απουσιάζει μόνο η Ρεπτίνη παρατηρείται πως η έκφραση επανέρχεται μερικώς και όταν απουσιάζει μόνο ο HIF-2α, η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται. Αξίζει να τονιστεί, πως σε συνθήκες νορμοξίας, η Ρεπτίνη είναι απαραίτητη για την έκφραση του γονιδίου **(Εικόνα 22)**.



**Εικόνα 22:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου APLP2 με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση τόσο του γονιδίου του HIF-2α όσο και της Ρεπτινής αλλά και των δύο ταυτόχρονα. Κατόπιν υποβλήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%O<sub>2</sub>) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 24 τιμών από 4 πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05).

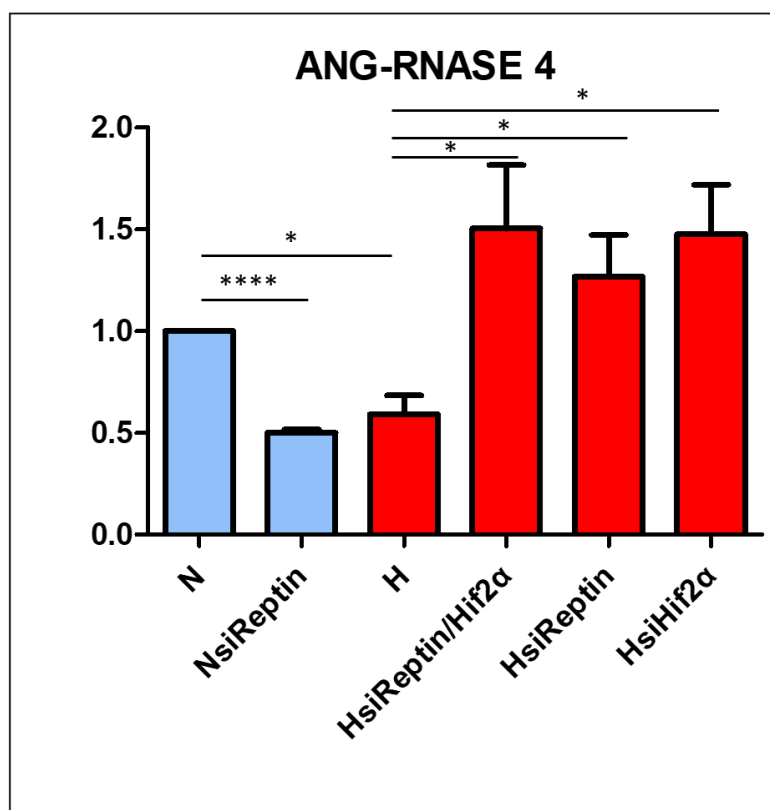
Το επόμενο γονίδιο το οποίο μας απασχόλησε στην παρούσα μελέτη ήταν της ANG-RNase 4. Η αγγειογενίνη (ANG) ή RNase 5, ένα μέλος 14-kDa της υπεροικογένειας της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης (RNase), είναι ένας από τους πιο ισχυρούς αγγειογόνους παράγοντες *in vivo*, καθώς ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η RNase 4, ένα άλλο μέλος της υπεροικογένειας παγκρεατικής RNase, μοιράζεται την ίδια περιοχή προαγωγέα με την ANG και μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης (RNase) έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών καθώς περιλαμβάνει πρωτεΐνες ικανές για ποικίλες δραστηριότητες. Ο κοινός γονιδιακός τύπος RNase 4 και RNase 5 είναι διατηρημένος μεταξύ ανθρώπων, ποντικών και αρουραίων. Πιο συγκεκριμένα ο γενετικός τύπος περιλαμβάνει δύο μη κωδικοποιητικά εξόνια ακολουθούμενα από δύο ξεχωριστά εξόνια που κωδικοποιούν για την RNase 4 και την RNase 5. Η μεταγραφή ελέγχεται με διαφορετικό μάτισμα και είναι ιστοειδική μέσω των προαγωγέων που βρίσκονται στο 5' σε καθένα από τα μη κωδικοποιητικά εξόνια. Ο προαγωγέας 1, 5' προς το εξόνιο I, είναι γενικά ενεργός, ενώ ο προαγωγέας 2, 5' προς το εξόνιο II, είναι ενεργός μόνο σε ηπατικά κύτταρα (Kimberly, D. D., et al.,

2006).

Έχει διερευνηθεί εκτενώς η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της περιοχής του προαγωγέα ANG και έχει βρεθεί πως η υποξία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης (CNV), η οποία είναι η κύρια αιτία απώλειας όρασης στις ανεπτυγμένες χώρες. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων από το χοριοειδές μέσω της μεμβράνης του Bruch προς τον αμφιβληστροειδή, η οποία προκαλείται μέσω παραγόντων που επάγονται από την υποξία (HIFs) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και της ερυθροποιητίνης (EPO). Η υποξία μπορεί να εμφανιστεί δευτεροπαθώς σε πολλές ασθένειες στον αμφιβληστροειδή, όπως η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (AMD), η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ισχαιμική απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς και η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας (ROP) (Kairan, L., et al., 2016).

Μελετώντας το γονίδιο της RNase 4 σε συνθήκες υποξίας, με πειράματα RT-qPCR, βρήκαμε για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία, πως η έκφραση του γονιδίου μειώνεται. Επίσης όταν απουσιάζουν ταυτόχρονα ο HIF-2α και η Ρεπτίνη παρατηρείται πως η έκφραση του γονιδίου επανέρχεται. Ακόμη, όταν απουσιάζει μόνο η Ρεπτίνη ή μόνο ο HIF-2, τα επίπεδα μεταγραφής επίσης επανέρχονται. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αντίθετο αποτέλεσμα στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου από την αποσιώπηση του γονιδίου της Ρεπτίνης σε νορμοξία και σε υποξία, καθώς στη νορμοξία η Ρεπτίνη φαίνεται να είναι απαραίτητη για την έκφραση του **(Εικόνα 23)**.



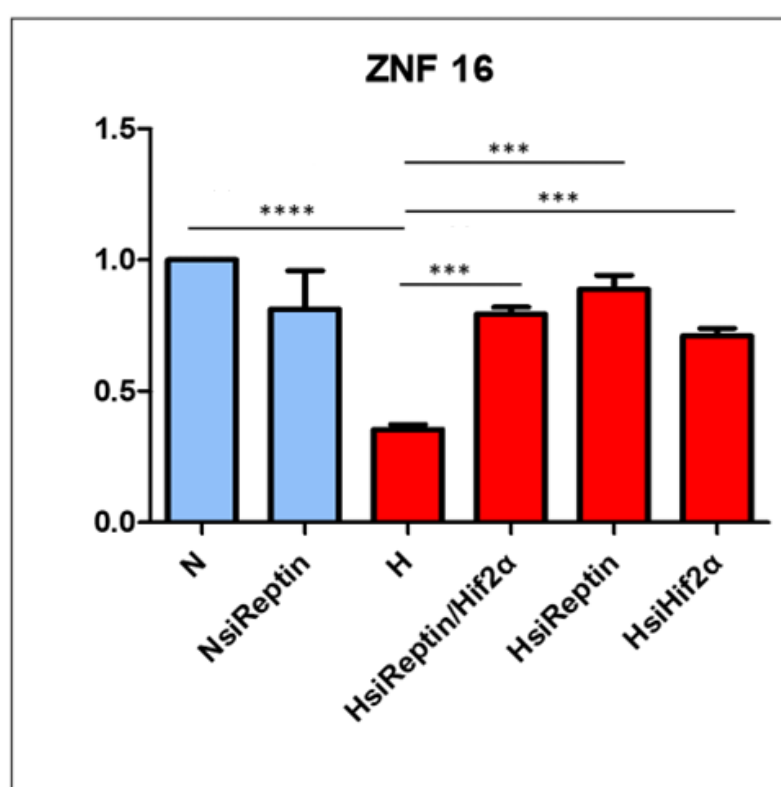


**Εικόνα 23:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ANG-RNase 4 με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση τόσο του γονιδίου του HIF-2α όσο και της Ρεπτίνης αλλά και των δύο ταυτόχρονα. Κατόπιν υποβλήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%O<sub>2</sub>) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 24 τιμών από 4 πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05).

Στην συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 16 (ZNF16), γνωστό και ως HZF1. Η ZNF16 εντοπίζεται στον πυρήνα και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στην ερυθροειδή και μεγακαρυοκυτταρική διαφοροποίηση των HSPC (αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα/προγονικά κύτταρα) μέσω της ρύθμισης του καταρράκτη c-Kit/c-Raf/MEK/ERK/c-Jun/HEY1. Πιο συγκεκριμένα, η ZNF16 συνδέεται με τον προαγωγέα γονιδίου c-KIT και αναστέλλει την έκφρασή του στην ερυθροειδή και μεγακαρυοκυτταρική διαφοροποίηση των κυττάρων. Η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου c-KIT, εμποδίζει τη δραστηριότητα της οδού c-Raf/MEK/ERK/c-Jun και μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του HEY1, ενός κεντρικού ρυθμιστή της ερυθροειδούς και μεγακαρυοκυτταρικής διαφοροποίησης (Chen, J., et al., 2014). Επίσης η πρωτεΐνη ZNF16 φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς κατέχει σημαντικό ρόλο στην μετάβαση από την φάση S σε G2/M. Πιο αναλυτικά η ZNF16 αλληλεπιδρά με αναστολέα της εξαρτώμενης

από κυκλίνη κινάσης (CDK), ο οποίος αλληλεπιδρά με την κυκλίνη A1 (INCA1), και αναστέλλει την έκφραση της INCA1.

Μελετώντας το γονίδιο του ZNF16 σε συνθήκες υποξίας, με πειράματα RT-qPCR, βρήκαμε για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία, πως η έκφραση του γονιδίου μειώνεται. Επίσης όταν απουσιάζουν ταυτόχρονα ο HIF-2α και η Ρεπτίνη παρατηρείται πως η έκφραση του γονιδίου επανέρχεται. Ακόμη, όταν απουσιάζει μόνο η Ρεπτίνη ή μόνο ο HIF-2, τα επίπεδα μεταγραφής επίσης επανέρχονται. Ωστόσο, σε νορμοξία φαίνεται πως η Ρεπτίνη δεν είναι απαραίτητη για την έκφραση του (Εικόνα 24).



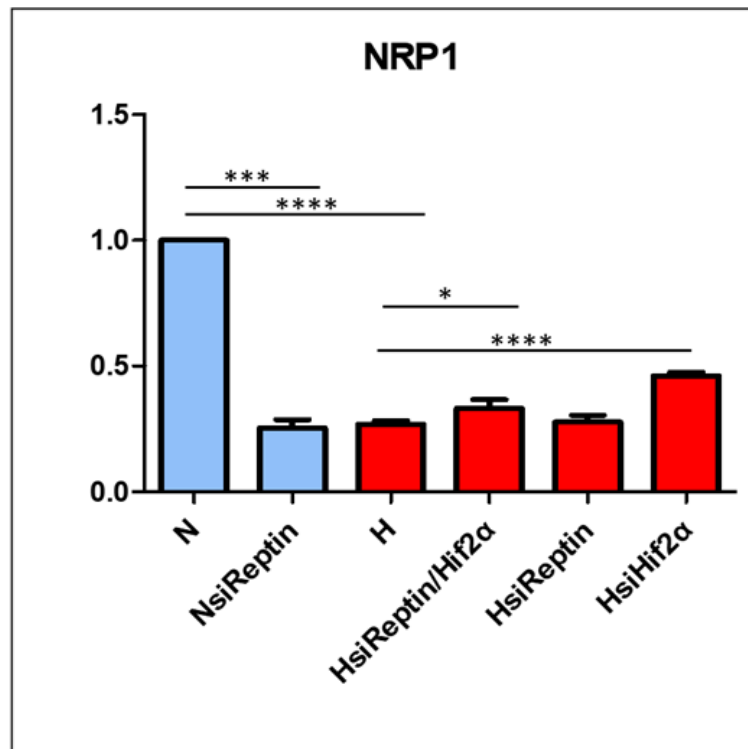
**Εικόνα 24:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου ZNF16 με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση τόσο του γονιδίου του HIF-2α όσο και της Ρεπτίνης αλλά και των δύο ταυτόχρονα. Κατόπιν υποβλήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%O<sub>2</sub>) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 24 τιμών από 4 πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05).

Το τελευταίο γονίδιο το οποίο προκάλεσε το ενδιαφέρον μας, ήταν αυτό που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη νευροπυλίνη-1 (Nrp1). Η οικογένεια νευροπυλινών είναι μια κατηγορία μονών διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των νευροπυλίνης1 (NRP1) και νευροπυλίνης2 (NRP2), οι οποίοι λειτουργούν ως συν-υποδοχείς του VEGFA-165 και του

VEGFC και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην προώθηση του πολλαπλασιασμού, της εισβολής και της μετάστασης του όγκου. Η NRP1 αναγνωρίστηκε αρχικά ως υποδοχέας για τις σηματοδότησες κατηγορίας 3 που ελέγχει την νευρωνική καθοδήγηση και την ανάπτυξη των νευραξόνων (Kolodkin A. L., et al., 1997). Εκτός από τον καθοριστικό ρόλο στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, η Nrp1 εκφράζεται σε μια ποικιλία μη νευρικών κυττάρων και μπορεί να ρυθμίσει πολλαπλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες (Gerhardt, H., et al., 2004) (Hayashi, M., et al., 2012) (Liang, W. C., et al. 2007) (Soker, S., et al., 1998). Τα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η αποσιώπηση της Nrp1 καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου αναστέλλοντας την αγγειογένεση ή μειώνοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων (Hong, T. M., et al., 2007) (Liang, W. C., et al., 2007).

Η Nrp1 εκφράζεται επίσης ευρέως σε λεμφοειδή και μυελοειδή κύτταρα (Bruder, D., et al., 2004) (Fantin, A., et al., 2010). Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν εντοπίσει έναν ρυθμιστικό ρόλο αυτού του μορίου στις ανοσολογικές αποκρίσεις, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη χημειοταξία και την παραγωγή κυτοκινών των Τ κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DCs) (Delgoffe, G., et al., 2013) (Bruder, D., et al., 2004) (Romeo, P. H., et al., 2002). Άλλες μελέτες, επίσης, έχουν περιγράψει το Nrp1 ως δείκτη προ-αγγειογενών και προ-αρτηριογόνων μακροφάγων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Fantin, A., et al., 2010). Ωστόσο, η λειτουργική συνάφεια αυτού του μορίου στα μακροφάγα δεν είναι γνωστή. Επιπρόσθετα η Nrp1 ελέγχει την είσοδο των TAM (μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο) σε υποξικές καταστάσεις ως απόκριση στην σύνδεση της Semaphorin 3A (56).

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη αποδείχτηκε, με πειράματα RT-qPCR, πως σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του γονιδίου NRP1 μειώνεται. Επίσης όταν απουσιάζουν ταυτόχρονα ο HIF-2α και η Ρεπτίνη παρατηρείται πως η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται ελάχιστα. Ακόμη, όταν απουσιάζει μόνο ο HIF-2, φαίνεται η έκφραση του γονιδίου να αυξάνεται. Αξίζει να σημειωθεί, πως όταν απουσιάζει η Ρεπτίνη η έκφραση του γονιδίου δείχνει να μην επηρεάζεται σε συνθήκες υποξίας, σε αντίθεση με την έκφρασή του σε συνθήκες νορμοξίας (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25:** Μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου NRP1 με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση τόσο του γονιδίου του HIF-2α όσο και της Ρεπτίνης αλλά και των δύο ταυτόχρονα. Κατόπιν υποβλήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (1%O<sub>2</sub>) για 8 ώρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 24 τιμών από 4 πειράματα. Οι μπάρες υποδηλώνουν το τυπικό σφάλμα και οι αστερίσκοι τη στατιστική σημαντικότητα (\*P<0,05)

## 5. Συζήτηση

Η παρουσία του μοριακού οξυγόνου είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ζωής των αερόβιων οργανισμών. Η απουσία οξυγόνου (υποξία) οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις με σοβαρές συνέπειες για τους οργανισμούς. Ωστόσο οι οργανισμοί προκειμένου να ανταπεξέλθουν σε αυτές τις καταστάσεις ανέπτυξαν μέσω της εξέλιξης ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς για διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου και κατ' επέκταση της ζωής. Οι κύριοι ρυθμιστές των επιπέδων οξυγόνου είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors), οι οποίοι διακρίνονται σε δύο ισομορφές τον HIF-1, HIF-2 και εκφράζονται ιστοειδικά. Οι HIFs δρουν στον πυρήνα ως ετεροδιμερή σύμπλοκα και αποτελούνται από μια α υπομονάδα, η οποία σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και από μια σταθερά εκφραζόμενη β υπομονάδα (ARNT). Οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-2α επηρεάζονται τόσο από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση οξυγόνου όσο και από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αξίζει να σημειωθεί, πως η HIF-2α υπομονάδα υφίσταται μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων οι οποίες δεν εξαρτώνται από το οξυγόνο, γεγονός που την διαφοροποιεί από την HIF-1α υπομονάδα. Οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες HIFs διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στο κυττάρο καθώς ρυθμίζουν βιολογικές διεργασίες όπως πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η ερυθροποίηση και η αγγειογένεση, καθώς και μεταβολικά μονοπάτια.

Η ρύθμιση των παραπάνω διεργασιών πραγματοποιείται είτε αποκλειστικά από τους HIFs, επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων-στόχων, είτε από την αλληλεπίδραση των HIFs με άλλες πρωτεΐνες, όπως η Ρεπτίνη 52 η οποία αλληλεπιδρά με τον HIF-2α, και ως σύμπλοκο ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων τους στο ηπατοκαρκίνωμα. Η πρωτεΐνη Reptin52 (RUVBL2) είναι μια υψηλά συντηρημένη ΑΤΡάση 52kDa η οποία εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Όταν εντοπίζεται στον πυρήνα παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ενώ όταν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα προάγει τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων της APLP2 (Amyloid beta precursor like protein 2), της ANG-RNase 4, του ZNF16 (κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 16) και της νευροπιλίνης-1 (Nrp1), καθώς για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία γίνεται αναφορά για μείωση των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου παρουσία του HIF-2α

αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη Ρεπτίνη.

Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με την βιβλιογραφία το γονίδιο που κωδικοποιεί για την APLP2 εμπλέκεται στην ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης και της ινσουλίνης. Επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης και της συναπτικής πλαστικότητας των νευρικών κυττάρων χωρίς όμως ο ρόλος του να είναι πλήρως κατανοητός. Ο ρόλος της υποξίας στην υπερέκφραση του πεπτιδίου αβ, προκάλεσε το ενδιαφέρον μας για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη APLP2. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε συνθήκες υποξίας η μειωμένη έκφραση του γονιδίου οφείλεται τόσο στην ταυτόχρονη παρουσία του HIF2-α και της Ρεπτίνης όσο και από την παρουσία μόνο του HIF2-α. Ενώ η παρουσία της Ρεπτίνης από μόνη της δεν διαφαίνεται να επηράζει την έκφραση του σε συνθήκες υποξίας. Επομένως συμπεραίνουμε πως ίσως το σύμπλοκο HIF-2α/Ρεπτίνη θα μπορούσε να έχει νευροπροστατευτικό ρόλο στην AD.

Το επόμενο γονίδιο που προκάλεσε το ενδιαφέρον μας για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του ήταν αυτό που κωδικοποιεί για την ANG-RNase 4. Πρόκειται για ένα ιδιαίτερο γονίδιο καθώς περιλαμβάνει δύο μη κωδικοποιητικά εξόνια ακολουθούμενα από δύο ξεχωριστά εξόνια που κωδικοποιούν για την RNase 4 και την RNase 5. Η μεταγραφή ελέγχεται με διαφορεικό μάτισμα και είναι ιστοειδική μέσω των προαγωγέων που βρίσκονται στο 5' άκρο σε καθένα από τα μη κωδικοποιητικά εξόνια. Στην βιβλιογραφία υπάρχει εκτενής αναφορά για την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της περιοχής προαγωγέα ANG και έχει βρεθεί πως η υποξία και η έκφραση του HIF-1α προάγει την ανάπτυξη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης (CNV), η οποία είναι η κύρια αιτία απώλειας όρασης στις ανεπτυγμένες χώρες. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για τον ρόλο ούτε του HIF-1α ούτε του HIF-2α στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την RNase 4. Για πρώτη φορά σε αυτή την μελέτη δείξαμε πως σε συνθήκες υποξίας, σε κύτταρα Huh7, παρουσία του HIF-2α η έκφραση του γονιδίου μειώνεται. Ακόμη όταν απουσιάζει ταυτόχρονα ο HIF-2α/Ρεπτίνη αλλά και ξεχωριστά η κάθε μια πρωτεΐνη σε συνθήκες υποξίας τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου αυξάνονται. Ωστόσο, αντίθετο φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου από την απουσία της Ρεπτίνης σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Γεγονός, που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ίσως η Ρεπτίνη σε νορμοξία να αλληλεπιδρά με κάποιον άλλο παράγοντα που την κρατά σε καταστολή και δεν μπορεί να επιτελέσει την δράση της.

Ένα ακόμη γονίδιο, που μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ήταν αυτό κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 16 (ZNF16). Ένα ιδιαίτερα σημαντικό γονίδιο καθώς η

πρωτεΐνη που κωδικοποιεί δρά ως μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πιο αναλυτικά η ZNF16 αλληλεπιδρά με αναστολέα της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης (CDK), ο οποίος αλληλεπιδρά με την κυκλίνη A1 (INCA1), και αναστέλλει την έκφραση της INCA1 και κατά συνέπεια την μετάβαση από την φάση S στην G2/M. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει κάποια αναφορά για την συμπεριφορά του ZNF16 σε συνθήκες υποξίας. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε μέσω πειραμάτων RT-qPCR πως σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του γονιδίου μειώνεται και όταν απουσιάζει ταυτόχρονα αλλά και ξεχωριστά ο HIF-2α και η Ρεπτίνη η έκφραση του επανέρχεται. Συνεπώς τόσο ο HIF-2 όσο και Ρεπτίνη έχουν ισοδύναμους ρόλους στην έκφραση του γονιδίου. Γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ίσως η ταυτόχρονη παρουσία HIF-2α/Ρεπτίνης θα μπορούσε να συμβάλλει στην μετάβαση από την φάση S στην G2/M. Πράγμα το οποίο, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο την παύση του κυτταρικού κύκλου και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Τελευταίο γονίδιο, αλλά εξίσου σημαντικό, ήταν το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη νευροπιλίνη (NRP1). Πρόκειται για ένα σημαντικό γονίδιο στην διαδικασία της αγγειογένεσης, καθώς η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί δρα ως συν-υποδοχέας με τον VEGFR2 και τον προ-αγγειογενετικό παράγοντα VEGFA-165. Έτσι ρυθμίζει θετικά την αγγειογένεση του όγκου προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την επιβίωση, τη μετανάστευση, την εισβολή και την πρόληψη της απόπτωσης. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι συν-υποδοχέας NRP1 μπορεί να στοχευθεί άμεσα ή έμμεσα με διάφορες μεθόδους για την πρόληψη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης του όγκου. Αυτά αποκαλύπτουν ότι ο NRP1 είναι πολλά υποσχόμενος για πιθανό αντικαρκινικό θεραπευτικό στόχο. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε πως σε συνθήκες υποξίας η έκφραση του γονιδίου μειώνεται. Ακόμη όταν απουσιάζουν ταυτόχρονα ο HIF-2α/ Ρεπτίνη, η έκφραση του αυξάνεται ελάχιστα. Απουσία της Ρεπτίνης σε συνθήκες υποξίας, παρατηρήσαμε πως η έκφραση του δεν επηρεάζεται ενώ όταν απουσιάζει ο HIF-2 η έκφραση του αυξάνεται. Συνεπώς η παρουσία του HIF-2 παίζει κυρίαρχο ρόλο στην έκφραση του γονιδίου. Άρα, ίσως, θεραπεία Anti-VEGFs σε συνδυασμό με υποξία είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική κατά της αγγειογένεσης του όγκου. Καθώς το NRP1 ενεργοποιεί, όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, μονοπάτια που προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση και τα κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα.

Συμπερασματικά, η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που η έκφρασή τους μειώνεται από την ταυτόχρονη παρουσία HIF-2α/Ρεπτίνης εισάγουν νέα δεδομένα. Τα δεδομένα

αυτά χρειάζονται εκτενέστερη μελέτη ώστε να κατανοηθούν οι βιολογικοί ρόλοι τους οποίους η αλληλεπίδραση HIF-2/Ρεπτίνης έρχεται να ρυθμίσει. Επιπλέον αναμένεται να αναζητηθούν και να κατανοηθούν καλύτερα οι μοριακοί μηχανισμοί του HIF-2, η διαφορική ρύθμιση του από τον HIF-1, ο ρόλος της Ρεπτίνης και η απόκριση και η ομοιοστασία των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα αποτελέσματα της διπλωματικής μου εργασίας, θέτουν νέα ερωτήματα για την περαιτέρω μελέτη τόσο των μονοπατιών που εμπλέκεται ξεχωριστά το κάθε γονίδιο, που η έκφραση του μειώνεται από την ταυτόχρονη παρουσία HIF-2/Ρεπτίνης, όσο και για τον έλεγχο της προσαρμογή της κυτταρικής λειτουργίας στην υποξία παρουσία του συμπλόκου σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, η νόσος AD και η χοριοειδική νεοαγγείωση.



## 6. Βιβλιογραφία

- Γκοτινάκου, Ι. Μ., (2019) Διδακτορική Διατριβή, Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών δράσης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, a., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome, *Cell* 117(6):699-711.
- Baxter, E., Windloch, K., Gannon, F., Lee, J. S. (2014) Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci.* 4:45.
- Befani, C., Mylonis, I., Gkotinakou, I. M., Georgoulas, P., Hu, C. J., Simos, G., Liakos, P. (2013) Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 45(11):2359-68.
- Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J. (2007) Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581(19):3582-91.
- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., Hansen, W. (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 34(3):623-630.
- Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., Deschoemaeker, S., Ginderachter, J. A. V., Tamagnone, L., Mazzone, M. (2013) Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer Cell*.24(6):695-709
- Cassavaugh, J., Lounsbury, K. M. (2011) Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem.* 112(3):735–44.
- Chen, C., Lou, T., (2017) Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 8(28):46691-46703.
- Chen, J., Li, X. B., Su, R., Song, L., Wang, F., Zhang, J. W. (2014) ZNF16 (HZF1) promotes erythropoiesis and megakaryocytopoiesis via regulation of the c-KIT gene. *Biochem J.* 458(1):171-83.
- Danquah, A., Zelicourt, A., Colcombet, J., Hirt, H. (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv.* 32(1):40-52.

- Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis.
- Delgoffe, G. M., Woo, S. R., Turnis, M. E., Gravano, D. M., Guy, C., Overacre, A. E., Bettini, M. L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., Workman, C. J., Vignali, D. A. (2013) Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*. 501(7466):252-6.
- Dyer, K. D., Rosenberg, H. F. (2005) The mouse RNase 4 and RNase 5/ang 1 locus utilizes dual promoters for tissue-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 33(3): 1077–1086.
- Fajersztajn, L., Veras, M. M. (2017) Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Res.* 109(17):1377-1385.
- Fanidis, D., Moulos, P. (2021) Integrative, normalization-insusceptible statistical analysis of RNA-Seq data, with improved differential expression and unbiased downstream functional analysis. *Brief Bioinform.* 22(3):bbaa156
- Fantin, A., Maden, C. H., Ruhrberg, C. (2009) Neuropilin ligands in vascular and neuronal patterning. *Biochem Soc Trans.* 37(Pt 6):1228-32.
- Gao, W., Zeng Hong Li, J., Yu Wai Chan, J., Kuen Ho, W., Wong, T. S. (2012) mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. *ISRN Otolaryngol.* 953089.
- Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., Betsholtz, C. (2004) Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn.* 231(3):503-9.
- Gkoutinakou, I. M., Befani, C., Samiotaki, M., Panayotou, G., Liakos, P. (2021) Novel HIF-2 $\alpha$  interaction with Reptin52 impairs HIF-2 transcriptional activity and EPO secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 11;557:143-150.
- Gkoutinakou, I. M., Befani, C., Simos, G., Liakos, P. (2019) ERK1/2 phosphorylates HIF-2 $\alpha$  and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling. *J Cell Sci.* 1;132(7).
- Gorynia, S., Bandejas, T. M., Pinho, F. G., McVey, C. E., Vonnrhein, C., Round, A., Svergun, D. I., Donner, P., Matias, P. M., Carrondo, M. A. (2011) Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol.* 176(3):279-91.

- Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa, K. (2002) The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem.* 277(26):23508-14.
- Grigoletto, A., Lestienne, P., Rosenbaum, J. (2011) The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1815, 147–157.
- Han, K., Müller, I. C., Hülsmann, S. (2017) Amyloid-precursor Like Proteins APLP1 and APLP2 Are Dispensable for Normal Development of the Neonatal Respiratory Network. *Front Mol Neurosci.* 10:189.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N. (2001) Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 287(4):808-13.
- Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., Takayanagi, H. (2012) Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 485(7396):69-74.
- Hong, T. M., Chen, Y. L., Wu, Y. Y., Yuan, A., Chao, Y. C., Chung, Y. C., Wu, M. H., Yang, S. C., Pan, S. H., Shih, J. Y., Chan, W. K., Yang, P. C. (2007) Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 13(16):4759-68.
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., Simon, M. C. (2003) Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol.* (24):9361–74.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6(4):279-84
- Kairan, L., Chenqi, L., Xiaobo, Z., Panpan, Y., Yidong, Z., Jiliang, H., Ke, Y. (2016) Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 $\alpha$  signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1862(9):1594-607.
- Kimberly, D. D., Rosenberg, H. F., (2006) The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Mol Divers.* 10(4):585-97.
- Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., Ginty, D. D. (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90(4):753-62.
- Kourti, M., Ikonomou, G., Giakoumakis, N. N., Rapsomaniki, M. A., Landegren, U.,

- Siniosoglou, S., Lygerou, Z., Simos, G.,a and Mylonis, I., (2015) CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cell Signal*. 27(6):1129-40.
- Kumar, H., Choi, D. K. (2015) Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm*. 584758.
  - Kurokawa, Y., Kanemaki, M., Makino, Y., Tamura, T. A. (1999) A notable example of an evolutionary conserved gene: studies on a putative DNA helicase TIP49. *DNA Seq*. 10(1):37-42
  - Lafleur, V. N., Richard, S., Richard, D. E. (2014) Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1. *Mol Biol Cell*. 25(6):925-35.
  - Lai, K., Luo, C., Zhang, X., Ye, P., Zhang, Y., He, J., Yao, K. (2016) Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 $\alpha$  signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1862(9):1594-607
  - Liang, W. C., Dennis, M. S., Stawicki, S., Chanther, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A. W., Wu, X., Ferrara, N., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Watts, R. J., Wu, Y. (2007) Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol*. 366(3):815-29
  - Lin, S. C., Liao, W. L., Lee, J. C., Tsai, S. J. (2014) Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)*. 239(7):779-792.
  - Luo, J. C., Shibuya, M. (2001) A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$ ). *Oncogene*. 20(12):1435-44.
  - Makino, Y., Mimori, T., Koike, C., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Inoue, S., et al. (1998). TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 245, 819–823.
  - Miyazawa, M., Yasuda, M., Fujita, M., Hirabayashi, K., Hirasawa, T., Kajiwara, H., Muramatsu, T., Miyazaki, S., Harasawa, M., Matsui, N., Ogane, N., Murakami, M., Mikami, M., Yanase, T., Osamura, R. Y. (2010) Granulosa cell tumor with activated mTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway. *J Obstet Gynaecol Res*. 36(2):448-53.

- Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A., Ohh, M. (2015) Human HIF-3 $\alpha$ 4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J.* 19(11):1396-406.
- Meidan, R., Klipper, E., Zalman, Y., Ronit, Y. (2013) The role of hypoxia-induced genes in ovarian angiogenesis, *Research Front.* p. 343–350.
- Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N., Brüne B. (2010) Roles of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) versus HIF-2 $\alpha$  in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology.* 51(6):2183-92.
- Nano, N., Houry, W. A. (2013). Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368:20110399.
- Nayak, B. K., Feliers, D., Sudarshan, S., Friedrichs, W. E., Day, R. T., New, D. D., et al. (2013) Stabilization of HIF-2 $\alpha$  through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene.* 32(26):3147-55.
- Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., Johnson, R. S. (2014) HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41(4):518-28.
- Pangou, E., Befani, C., Mylonis, I., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G, et al. (2016) HIF-2 $\alpha$  phosphorylation by CK1 $\delta$  promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci.* 129(22):4213-26.
- Pringle, K. G., Kind, K. L., Sferruzzi-Perri, A. N., Thompson, J. G., Roberts, C. T. (2010) Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update.* 16(4):415-31.
- Pugh, C. W. (2016) Modulation of the hypoxic response. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC. p. 259–71.
- Rankin, E. B., Giaccia, A. J. (2008) The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15(4):678-85
- Romeo, P. H., Lemarchandel, V., Tordjman, R. (2002) Neuropilin-1 in the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 515:49-54.
- Schofield, C. J., Ratcliffe, P. J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. Vol. 338, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* p. 617– 26
- Shen, C., Kaelin, W. G., Jr. (2013) The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma.

Semin Cancer Biol. 23(1):18-25.

- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 92(6):735-45.
- Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., Yamamoto, M. (2017) Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Exp Cell Res*. 15;356(2):182–6.
- Takeda, N., O'Dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. W., Weidemann, A., Stockmann, C., et al. (2010) Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev*. 24(5):491-501.
- Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W, McKnight, S. L. (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*. 12(21):3320–4.
- Venteicher, A. S., Meng, Z., Mason, P. J., Veenstra, T. D., Artandi, S. E. (2008) Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*. 132(6):945.
- von Morgen, P., Hořejší, Z., Macurek, L. (2015) Substrate recognition and function of the R2TP complex in response to cellular stress. *Front Genet*. 0(FEB):69.
- Watts, D., Gaete, D., Rodriguez, D., Hoogewijs, D., Rauner, M., Sormendi, S., Wielockx, B. (2020) Hypoxia Pathway Proteins are Master Regulators of Erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 21(21):8131.
- Wiesener, M. S., Jurgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Horstrup, J. H., Warnecke, C., et al. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 17(2):271–3.
- Yan, T., Liu, F., Gao, J., Lu, H., Cai, J., Zhao, X., et al. (2019) Multilevel regulation of RUVBL2 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*. 27;19:249.
- Yang, S. L., Wu, C., Xiong, Z. F., Fang, X. (2015) Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function. *Mol Med Rep*. 12(2):2411- 6.
- Zhao, Y., Zhang, C., Yue, X., Li, X., Liu, J., Yu, H., et al. (2015). Pontin, a new mutant p53-binding protein, promotes gain-of-function of mutant p53. *Cell Death Differ*. 22,

1824–1836.