



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Βιοχημείας Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ
ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ
ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ HIF-1 α -ΜΟΡΤΑΛΙΝΗΣ»**

υπό

ΑΓΓΕΛΟΥ ΥΦΑΝΤΗ

Βιοχημικού-Βιοτεχνολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2023

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με την υποστήριξη υποτροφιών προς τον κ. Άγγελο Υφαντή, προερχόμενες τόσο από ιδιωτικούς, όσο και από κρατικούς φορείς:

1. Ίδρυμα Μποδοσάκη, στο πλαίσιο του 46ου Τακτικού Προγράμματος Υποτροφιών Έτους 2018-2019

BODOSSAKI
FOUNDATION



2. ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. (Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 6244)



3. ΙΚΥ (Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών), στη σφαίρα συγχρηματοδότησης από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας- Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας»



Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning
Co-financed by Greece and the European Union



© 2023 ΑΓΓΕΛΟΣ ΥΦΑΝΤΗΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** **Γεώργιος Σίμος**
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Ηλίας Μυλωνής**
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Γρηγόριος Αμούτζιας**
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη
Μικροβιολογία
- 4^{ος} Εξεταστής** **Ευφροσύνη Παρασκευά**
Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** **Ελένη Γεωργιάτσου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** **Παναγιώτης Λιάκος**
Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **Γεωργία Χαχάμη**
Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο. Αισθάνομαι ότι είναι καθήκον μου να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους οι οποίοι συνεισέφεραν και βοήθησαν στη προσπάθεια μου να διεκπεραιώσω αυτήν τη διατριβή και νιώθω μεγάλη χαρά και τιμή που μου δίνεται αυτή η ευκαιρία.

Αρχικά θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα μου, και διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο που μου έδωσε την ευκαιρία από την πρώτη στιγμή στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών να ενταχθώ στο εργαστήριο Βιοχημείας και έπειτα να συνεχίσω υπό την επίβλεψή του για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Η αμέριστη αγάπη του και αφοσίωση στην έρευνα, η τυπικότητα, η πειθαρχία, η μεθοδικότητα, η επιμέλεια και η εργατικότητα του αποτελούν έμπνευση για μένα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή του, την επιμονή του, τη στήριξη, τις συμβουλές, τη συνεχή καθοδήγηση, την προσπάθεια που κατέβαλλε στο να διευρύνω τους γνωστικούς μου ορίζοντες και την εργαστηριακή μου εμπειρία, καθώς και στο να πιστέψω στον εαυτό μου και στις δυνάμεις μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία ο οποίος συνεπίβλεψε την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η βοήθεια που μου προσέφερε στο πλαίσιο του εργαστηριακού χώρου ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμη για την διεξαγωγή και επιτυχή διεκπεραίωσή των πειραματικών διαδικασιών του διδακτορικού μου. Η υπομονή, η επιμονή, το ένστικτο και η μεθοδικότητά του συνδυαστικά με τον ευχάριστο και αισιόδοξο χαρακτήρα του, αποτέλεσαν θεμέλιο λίθο για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία κ. Αμούτζια Γρηγόριο από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που συμμετείχε στην τριμελή μου επιτροπή και ήταν πρόθυμος να εμπλουτίσει το γνωστικό μου υπόβαθρο με την εκμάθηση υπολογιστικών μεθοδολογιών. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας, καθώς με τις συμβουλές και τις πολύτιμες γνώσεις τους με βοήθησαν ώστε να βελτιστοποιήσω την έρευνα μου και συνεπώς και τη διδακτορική μου διατριβή. Επίσης, ως μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, αφιέρωσαν σημαντικό χρόνο στη διόρθωση τόσο του κειμένου της διατριβής μου όσο και της προφορικής μου παρουσίασης.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους κρατικούς και ιδιωτικούς φορείς που με υποστήριξαν οικονομικά μέσω προσωπικών υποτροφιών και χωρίς την αρωγή των οποίων δεν θα ήταν εφικτή η περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Μποδοσάκη, το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.), καθώς και το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για την ζωτικής σημασίας βοήθεια που προσέφεραν, σε όλα τα χρόνια εκπόνησης του διδακτορικού μου.

Επιπλέον, θα ήταν μεγάλη παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω, όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, δηλαδή τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές, τους υποψήφιους διδάκτορες, τους μεταπτυχιακούς και τους προπτυχιακούς φοιτητές για όλη την όμορφη αλληλεπίδραση και συνεργασία. Ο χαρούμενος, αισιόδοξος και φιλικός τους χαρακτήρας αποτέλεσαν μεγίστης σημασίας στήριγμα σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας.

Σε αυτή την παράγραφο θα ήθελα μέσα από όλη μου τη καρδιά, να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου: στη μητέρα μου Θεανώ Μαραγκοπούλου και στα αδέρφια μου Μαρία και Κυριάκο Γκινίδη. Η άνευ ορίων στήριξη τους, η ακλόνητη πίστη τους στις δυνάμεις μου, η χαρά και η αισιοδοξία τους από την αρχή των προπτυχιακών μου σπουδών ως την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής, ήταν εφόδια χωρίς τα οποία δεν θα είχα φτάσει στο τέλος αυτού του δύσκολου αλλά και ταυτόχρονα όμορφου ακαδημαϊκού αγώνα. Ευχαριστώ επίσης όλους τους φίλους και τις φίλες μου στην Νέα Αγχιάλο και στη Λάρισα, που αποτέλεσαν τον δικό μου υποστηρικτικό κλοιό και που πίστεψαν στη προσπάθεια μου να ολοκληρώσω το διδακτορικό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα, την αγαπητή μου γιαγιά Μαραγκοπούλου Σμαράγδα η οποία αποτέλεσε και αποτελεί ένα τόσο υψηλό πρότυπο στα μάτια μου και για την οποία τα λόγια που μπορώ να εκφράσω είναι εξαιρετικά λίγα στο πλαίσιο μιας παραγράφου. Η στήριξη και η αγάπη που μου προσέφερε σε όλη την πορεία της ζωής μου, καθώς και η αισιοδοξία της στα δύσκολα, σφυρηλάτησαν τις ηθικές αξίες και τον προσωπικό μου χαρακτήρα. Για αυτό, ακόμα και στις δύσκολες αυτές ώρες που ξέρω ότι μένουν να διανύσεις, γιαγιά μου, αυτόν τον αγώνα μου, σου τον αφιερώνω με όλη μου την αγάπη.

Άγγελος Υφαντής

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Άγγελος Υφαντής

Υπηκοότητα: Ελληνική Ημερομηνία γέννησης: Φύλο: Άντρας



europass

- Αριθμός τηλεφώνου:
- Ηλεκτρονική διεύθυνση:
- LinkedIn:
- Εργασία:

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων (Υπηρεσία Βιβλιοθήκης & Πληροφόρησης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Πρακτική Άσκηση στο πλαίσιο των προπτυχιακών σπουδών (Βιοχημικός)

Αχιλλοπούλειο Γενικό Νοσοκομείο (Επιβλέπων: Δρ. Τογκουσίδης Ηλίας, Βιοχημικός) [01/07/2014 – 31/08/2014]

Πόλη: Βόλος

Χώρα: Ελλάδα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής [18/12/2017 – 1/6/2023]

Διεύθυνση: Λάρισα (Ελλάδα)

Τελικός βαθμός: Άριστα

Διδακτορική διατριβή: Η επίδραση της υποξίας στους μηχανισμούς επιβίωσης και απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων: ο ρόλος του συμπλόκου HIF-1α-μορταλίνης (Επιβλέπων: Δρ. Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας)

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης "Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής"

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής [11/2016 – 11/2017]

Διεύθυνση: Λάρισα (Ελλάδα)

Τελικός βαθμός: 10/10 (Άριστα)

Διπλωματική εργασία: Η επίδραση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 στους μηχανισμούς απόπτωσης και σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες (Επιβλέπων: Δρ. Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας)

Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας [10/2012 – 11/2016]

Διεύθυνση: Λάρισα (Ελλάδα)

Τελικός βαθμός: 9,03/10 (Άριστα)

Πτυχιακή εργασία: Μελέτη της επίδρασης τριτερπενοειδών ενώσεων στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων (Επιβλέπουσα: Δρ. Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας)

ΔΙΚΤΥΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ ΜΕΛΟΥΣ

Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ) από το 2018

ΚΟΙΝΩΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΙΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

Ενεργό μέλος της ομάδας οργάνωσης εθελοντικής αμοδοσίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας σε συνεργασία με το Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (Γ.Ν.Λ)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

[Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators](#)

[2023]

Yfantis, A.; Mylonis, I.; Chachami, G.; Nikolaidis, M.; Amoutzias, G.D.; Paraskeva, E.; Simos, G. Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators. Cells 2023, 12, 798. <https://doi.org/10.3390/cells12050798>

Direct interaction between mortalin and HIF-1 α at the mitochondria inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax

[2023]

Yfantis, A., Mylonis, I. and Simos, G. (2023), Direct interaction between mortalin and HIF-1 α at the mitochondria inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax. FEBS J. Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1111/febs.16762>

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

72ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)

[Πάτρα, Ελλάδα, 02/12/2022 – 04/12/2022]

Angelos Yfantis, Ilias Mylonis, George Simos, Direct interaction between mortalin and HIF-1 α , at the mitochondria, inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax (Προφορική ανακοίνωση)

1ο Ιπποκράτειο Συνέδριο

[Λάρισα, Ελλάδα, 02/09/2022 – 04/09/2022]

Άγγελος Υφαντής, Ηλίας Μυλωνής, Γεώργιος Σίμος, Δομική και λειτουργική ανάλυση του μιτοχονδριακού συμπλόκου HIF-1 α /Μορταλίνης (Προφορική ανακοίνωση)

IUBMB Focused Meeting/FEBS Workshop, Crosstalk between Nucleus and Mitochondria in Human Disease

[Σεβίλλη, Ισπανία, 22/03/2022 – 25/03/2022]

Angelos Yfantis, Ilias Mylonis, George Simos, Structural and functional analysis of the mitochondrial HIF-1 α /mortalin complex (Αναρτημένη ανακοίνωση)

Διαδικτυακό συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)

[01/2021 – 06/2021]

Angelos Yfantis, Ilias Mylonis, George Simos, Structural and functional characterization of the HIF-1 α /Mortalin interaction (Αναρτημένη ανακοίνωση)

69ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)

[Λάρισα, Ελλάδα, 23/11/2018 – 25/11/2018]

Angelos Yfantis, Ilias Mylonis, George Simos, Mapping of the interaction between HIF-1 α and mortalin (Αναρτημένη ανακοίνωση)

40ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ)

[Βέροια, Ελλάδα, 24/05/2018 – 26/05/2018]

Fotiadis George, Koukoulas Kreon, Yfantis Aggelos, Mylonis Ilias and Simos George, HIF-1A mediated hypoxic adaption and stress granules formation: interaction of two basic tumor cell survival mechanisms (Αναρτημένη Ανακοίνωση)

68ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)

[Αθήνα, Ελλάδα, 10/11/2017 – 12/11/2017]

George Fotiadis, Kreon Koukoulas, Angelos Yfantis, Ilias Mylonis and George Simos, Cross-talk between the cellular adaption to hypoxia and stress-granule dependent response to oxidative stress (Αναρτημένη ανακοίνωση)

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Επιστημονικές ομιλίες

Εμπειρία από επιστημονικές παρουσιάσεις στο πλαίσιο των προπτυχιακών, μεταπτυχιακών και διδακτορικών σπουδών

ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΒΡΑΒΕΙΑ

Υποτροφία Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για σπουδές επιπέδου διδακτορικού στην Ελλάδα

[30/05/2022 – 1/06/2023]

Υποτροφία Ελληνικού Ιδρύματος Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) για σπουδές επιπέδου διδακτορικού στην Ελλάδα

[08/10/2019 – 07/04/2022]

Υποτροφία Ιδρύματος Μποδοσάκη για σπουδές επιπέδου διδακτορικού στην Ελλάδα

[01/09/2018 – 31/10/2019]

Υποτροφία Ιδρύματος Ωνάση για συμμετοχή στο συνέδριο «The 2019 Lectures in Biology and Chemistry powered by Onassis Foundation-Genome Editing», Ι.Τ.Ε, Ηράκλειο, Κρήτη

[08/07/2019 – 12/07/2019]

Υποτροφία Ιδρύματος Ωνάση για συμμετοχή στο συνέδριο «The 2018 Lectures in Biology and Chemistry powered by Onassis Foundation-Eukaryotic transcription and its regulation», Ι.Τ.Ε, Ηράκλειο, Κρήτη

[16/07/2018 – 20/07/2018]

Υποτροφία Ιδρύματος Μποδοσάκη για μεταπτυχιακές σπουδές στην Ελλάδα

[01/09/2016 – 31/08/2017]

Βραβείο ενεργής συμμετοχής στην επίσημη ομάδα εθελοντικής οργάνωσης αιμοδοσίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

[03/2016]

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά

5/2010: Proficient Communication Certificate (University of Michigan)

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ
ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ
ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ HIF-1 α -ΜΟΡΤΑΛΙΝΗΣ»**

ΑΓΓΕΛΟΣ ΥΦΑΝΤΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Γεώργιος Σίμος**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(Επιβλέπων)
- 2. Ηλίας Μυλωνής**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3. Γρηγόριος Αμούτζιας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη
Μικροβιολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ως υποξία ορίζεται η ελάττωση των διαθέσιμων επιπέδων οξυγόνου που παρατηρείται σε κύτταρα ή ιστούς και είναι χαρακτηριστικό πολλών φυσιολογικών (π.χ. μεγάλο υψόμετρο και έντονη μυϊκή άσκηση) και παθολογικών καταστάσεων (π.χ. ισχαιμία, καρκίνος). Ο HIF-1 αποτελεί μεταξύ άλλων, την κύρια πρωτεΐνη, που ρυθμίζει την απόκριση των κυττάρων στην υποξία, κυρίως μέσω της δράσης του ως μεταγραφικός παράγοντας. Επιπλέον, η δράση του έχει συσχετιστεί με προώθηση της επιβίωσης και αναστολή της απόπτωσης σε διάφορους καρκίνους. Ο HIF-1 είναι ετεροδιμερές αποτελούμενος από μία υπομονάδα που εκφράζεται συνεχώς, την HIF-1β ή ARNT, και από την υπομονάδα HIF-1α, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται οξυγονο-εξαρτώμενα μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (υδροξυλίωσης) και αποικοδόμησης. Ωστόσο ο HIF-1α επιδρά σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από τη μεταγραφική του δράση, αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες εκτός του ARNT. Από προηγούμενες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου Βιοχημείας, δείχθηκε ότι η υποκυτταρική κατανομή και οι αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες, ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser641/Ser643. Όταν ο HIF-1α τροποποιείται σε αυτές τις θέσεις, συγκεντρώνεται στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με την νουκλεοφосμίνη (NPM1) και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Η απώλεια της φωσφορυλίωσης στις θέσεις 641 και 643, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την εξπορτίνη CRM1 και την εξαγωγή του από τον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, όπου αλληλεπιδρά με τη μορταλίνη, η οποία διαμεσολαβεί τη στόχευση του στα μιτοχόνδρια και την συγκρότηση ενός συμπλόκου που αναστέλλει την έναρξη της απόπτωσης.

Κύριο θέμα της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν, τόσο πειράματα *in vitro* δέσμευσης, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα τμήματα των δύο πρωτεϊνών, όσο και ανοσοκατακρήμνιση, ώστε να χαρτογραφηθούν οι αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης μεταξύ τους και ναδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση είναι άμεση και λειτουργική. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η καρβοξυτελική επικράτεια της μορταλίνης δεσμεύεται άμεσα και εξειδικευμένα με τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α. Επίσης, δείχθηκε ότι ένα φυσικό παράγωγο, που ονομάζεται εμπελίνη και είναι γνωστός αναστολέας της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μορταλίνης και της p53, μπορεί να αναστείλει την αλληλεπίδραση μορταλίνης/HIF-1α και να οδηγήσει σε απομάκρυνση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α από τα μιτοχόνδρια. Η επαγόμενη από την εμπελίνη, απομάκρυνση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγεί στη μετακίνηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (B-cell lymphoma 2-

associated X protein) στα μιτοχόνδρια, κάτω από συνθήκες στρες. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι σε συνθήκες υποξίας και απενεργοποίησης των ERK1/2, η άμεση και ειδική δέσμευση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α, παρεμποδίζει τη στόχευση της Bax στα μιτοχόνδρια και προστατεύει τα κύτταρα από κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης.

Abstract

Hypoxia is defined as a decrease in the available oxygen levels observed in cells or tissues and is characteristic of many physiological (e.g., high altitude and intense muscle exercise) and pathological conditions (e.g., ischemia, cancer). HIF-1 plays a major role in regulating the cell response to hypoxia acting as a transcription factor. Furthermore, its activity has been correlated with promotion of cancer cell survival and apoptosis inhibition in different cancer types. HIF-1 is a heterodimer, consisting of a constantly expressed subunit, HIF-1 β or ARNT, and a HIF-1 α subunit, the expression of which is regulated by a post-translational modification (hydroxylation) and subsequent degradation. However, HIF-1 α affects various cellular functions also through mechanisms independent of its transcriptional activity, via interacting with proteins other than ARNT. As it has been previously demonstrated by the Laboratory of Biochemistry, the subcellular localization of HIF-1 α along with its protein interactions are regulated through ERK1/2 kinase-mediated phosphorylation of amino acid residues Ser641/Ser643. When HIF-1 α is modified at these sites, it is concentrated inside the nucleus, where it interacts with nucleophosmin (NPM1) and activates the transcription of its target genes as a response to low oxygen levels. On the other hand, lack of phosphorylation at Ser641/Ser643, results in the interaction of HIF-1 α with the exportin CRM1 and its export from the nucleus into the cytoplasm, where it interacts with mortalin, which mediates its targeting to the mitochondria and the formation of a complex which inhibits apoptosis initiation.

In the context of characterizing the HIF-1 α -mortalin interaction, recombinant fragments of the two proteins were used for *in vitro* binding assays and immunoprecipitation experiments to map the corresponding binding sites and demonstrate that their interaction is direct and functional. More specifically, it was shown that the C-terminal domain of mortalin binds specifically and directly with non-phosphorylated HIF-1 α . We could also show that embelin, a natural product and known inhibitor of the mortalin-p53 interaction, could block assembly of the mortalin-HIF-1 α complex and, furthermore, remove unmodified HIF-1 α from the mitochondria. Embelin-induced dissociation of non-phosphorylated HIF-1 α from the mitochondrial outer membrane, leads to translocation of the pro-apoptotic protein B-cell lymphoma 2-associated X protein (Bax) at the mitochondria, under stress conditions. In summary, our results prove that, under hypoxia and ERK1/2 kinase inactivation conditions, the direct and specific binding between mortalin and HIF-1 α inhibits mitochondrial targeting of Bax and protects cells from cell death through apoptosis.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	18
1.1. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία.....	18
1.1.1. Υποξία.....	18
1.1.2. Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIF)	19
1.1.2.1. Δομή των HIF.....	19
1.1.2.2. Ο ρόλος των HIF στην υγεία.....	23
1.1.2.3. Ο ρόλος των HIF στον καρκίνο.....	25
1.1.3. Ρύθμιση του HIF-1.....	28
1.1.3.1. Ρύθμιση της σταθερότητας και της δραστικότητας του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου.....	28
1.1.3.2. Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου <i>HIF1A</i>	31
1.1.3.3. Ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA που κωδικοποιεί για τον HIF-1α.....	32
1.1.4. Ρύθμιση μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.....	34
1.1.4.1. Φωσφορυλίωση.....	34
1.1.4.1.1. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στη σταθερότητα του HIF-1α	34
1.1.4.1.2. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT	35
1.1.4.1.3. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α	35
1.1.4.2. Ρύθμιση της δραστικότητας και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2	36
1.1.4.2.1. Χρήση πεπτιδίων της επικράτειας ETD για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2	39
1.1.5. Μεταγραφικές και μη μεταγραφικές δράσεις του HIF-1.....	41
1.2. Υποξία, HIF-1 και μιτοχόνδρια	44
1.3. Ο HIF-1 και οι κυτταρικοί μηχανισμοί απόπτωσης	46
1.3.1. Η απόπτωση ως είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου	46
1.3.2. Οδοί απόπτωσης: το εξωγενές και το ενδογενές/μιτοχονδριακό μονοπάτι	47
1.3.3. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 και η σχέση τους με τη ρύθμιση της απόπτωσης: ο ρόλος της Bax.....	50
1.3.4. Επίδραση του HIF-1 στην απόπτωση ανεξάρτητα ή μη από τη μεταγραφική του δράση	53
1.4. Η Μορταλίνη	55
1.4.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP): η μορταλίνη ως μέλος της υπο-οικογένειας HSP70.....	55
1.4.1.1. Ανακάλυψη της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP, Heat Shock Proteins).....	55
1.4.1.2. Ανακάλυψη της μορταλίνης	56
1.4.1.3. Ονοματολογία της μορταλίνης με βάση τους λειτουργικούς της ρόλους ...	57

1.4.2.	Δομή της μορταλίνης	58
1.4.2.1.	Γενικές πληροφορίες για τη δομή της μορταλίνης	58
1.4.2.2.	Ο ρόλος της επικράτειας δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD, Nucleotide Binding Domain)	59
1.4.2.3.	Ο ρόλος της επικράτειας δέσμευσης υποστρωμάτων (SBD, Substrate Binding Domain)	59
1.4.3.	Λειτουργίες της μορταλίνης.....	60
1.4.3.1.	Μιτοχονδριακές λειτουργίες.....	60
1.4.3.1.1.	Εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια	60
1.4.3.1.2.	Αναδίπλωση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών	62
1.4.3.2.	Λειτουργίες πέρα από τα όρια των μιτοχονδρίων	62
1.4.3.2.1.	Κυτταρική διαίρεση	62
1.4.3.2.2.	Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες	63
1.4.3.2.2.1.	Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-1).....	63
1.4.3.2.2.2.	p53.....	63
1.4.3.3.	Ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων.....	65
1.4.3.4.	Συσχέτιση με το ενδοπλασματικό δίκτυο	65
1.4.3.5.	Βιοσυνθετικά μονοπάτια: μονοπάτι μεβαλονικού οξέος	66
1.4.4.	Μορταλίνη και καρκίνος.....	66
2.	Σκοπός.....	69
3.	Υλικά και Μέθοδοι	70
3.1.	Υλικά	70
3.1.1.	Κυτταρικές σειρές.....	70
3.1.2.	Μέσα κυτταροκαλλιιεργειών	70
3.1.3.	Βακτηριακά στελέχη	71
3.1.4.	Πλασμιδιακοί φορείς.....	71
3.1.5.	Υλικά χρωματογραφίας	78
3.1.6.	Εταιρείες προμήθειας χημικών αντιδραστηρίων	79
3.1.7.	Εταιρείες προμήθειας αναλωσίμων μοριακής βιολογίας	79
3.1.8.	Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές	79
3.1.9.	Αντισώματα.....	80
3.2.	Μέθοδοι.....	82
3.2.1.	Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	82
3.2.2.	Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.....	86
3.2.3.	Σύνθεση cDNA μέσω PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).....	87
3.2.4.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	87
3.2.5.	Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς.....	88
3.2.5.1.	Πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού	88
3.2.5.2.	Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	89

3.2.5.3.	Αντίδραση λιγάσης (ligation).....	90
3.2.5.4.	Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων	90
3.2.5.5.	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	91
3.2.5.6.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation).....	91
3.2.6.	Υπερέκφραση ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών	92
3.2.7.	Απομόνωση ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> BL21-RIL	93
3.2.7.1.	Παραλαβή συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> BL21-RIL	94
3.2.7.2.	Καθαρισμός ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας ..	94
3.2.8.	Δοκιμασίες <i>in vitro</i> δέσμησης μεταξύ καθαρών ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών	95
3.2.9.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης μακρομορίων	96
3.2.10.	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	97
3.2.10.1.	Ανίχνευση διαχωρισθέντων πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue-G-250	98
3.2.10.2.	Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση.....	98
3.2.11.	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	100
3.2.11.1.	Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών.....	100
3.2.11.2.	Απόψυξη κυτταρικών σειρών	100
3.2.11.3.	Ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών	100
3.2.11.4.	Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών σε συνθήκες υποξίας.....	101
3.2.12.	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση κατιονικών πολυμερών	101
3.2.13.	Παραλαβή διαλυτού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα ..	101
3.2.14.	Ανοσοκατακρήμνιση	101
3.2.15.	Μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	102
3.2.16.	Ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού πρωτεϊνών από δεδομένα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού.....	104
3.2.17.	Προσδιορισμός της δραστηριότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7	104
4.	Αποτελέσματα	105
4.1.	Μοριακά εργαλεία: συλλογή πλασμιδιακών κατασκευών	105
4.1.1.	Έλεγχος της ορθότητας των πλασμιδιακών κατασκευών που προορίζονται για έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα	105
4.1.2.	Έλεγχος της ορθότητας των πλασμιδιακών κατασκευών που προορίζονται για έκφραση πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα	113

4.2.	Δομικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης.....	124
4.2.1.	Απομόνωση ανασυνδυασμένων τμημάτων της μορταλίνης, σε σύντηξη με επιτόπους His ₆ και GST, από βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> BL21-RIL	124
4.2.2.	Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορταλίνης και HIF-1α.....	127
4.3.	Η αλληλεπίδραση μορταλίνης/HIF-1α εντός των κυττάρων και ο ρόλος αυτής στην αναστολή της απόπτωσης	133
4.3.1.	Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού των κατασκευών της μορταλίνης, σε σύντηξη με επιτόπους GFP και Flag.....	133
4.3.2.	Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του καρβοξυτελικού άκρου της μορταλίνης με τον HIF-1α, μέσα στα κύτταρα.....	138
4.3.3.	Λειτουργικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης μορταλίνης/HIF-1α.....	139
4.4.	Διερεύνηση της επίδρασης της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α	140
4.4.1.	Επίδραση της εμπελίνης στην <i>in vitro</i> δέσμευση μεταξύ μορταλίνης και HIF-1α	140
4.4.2.	Επίδραση της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση μεταξύ μορταλίνης/μιτοχονδρίων και HIF-1α μέσα στα κύτταρα.....	141
4.5.	Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού αναστολής της απόπτωσης από το μιτοχονδριακό σύμπλοκο μορταλίνης/HIF-1α	144
5.	Συζήτηση.....	147
6.	Σύνοψη.....	155
7.	Βιβλιογραφία.....	156

1. Εισαγωγή

1.1. Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία

1.1.1. Υποξία

Οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα οξυγόνου στο εσωτερικό των κυττάρων τους. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζουν ένα είδος ομοιοστασίας, τόσο σε επίπεδο κυττάρου και ιστού, όσο και σε επίπεδο ολόκληρου οργανισμού. Πολλοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί (π.χ. κυανοβακτήρια) μπορούν να εκτελέσουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας και νερού, το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα μετατρέπεται σε γλυκόζη με παράλληλη απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου. Συνεπώς, η συνεισφορά των μικροοργανισμών που φωτοσυνθέτουν ήταν κομβικής σημασίας στην κατακόρυφη αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα της Γης πριν από περίπου 2,4 δισεκατομμύρια χρόνια. Η επακόλουθη εξέλιξη μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών που μπορούν να πραγματοποιήσουν αερόβια οξείδωση της γλυκόζης οδήγησε στην παραγωγή μεγάλων ποσών ενέργειας με τη μορφή ATP, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τέλος, η εξέλιξη και η ανάπτυξη πολυκύτταρων μεταζώων και θηλαστικών στηρίχθηκε στη δημιουργία περίπλοκων συστημάτων, όπως είναι το αναπνευστικό και το κυκλοφορικό σύστημα, τα οποία ελέγχουν και συντονίζουν την είσοδο και τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς αντίστοιχα.

Ως υποξία ορίζεται η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου που παρατηρείται σε έναν οργανισμό, ιστό ή κύτταρο και η οποία αποτελεί ένα φυσιολογικό ερέθισμα, το οποίο εμφανίζεται σε διάφορες φυσιολογικές καταστάσεις, καθώς και σε περιπτώσεις παθολογίας. Οι συνθήκες υποξίας συναντώνται φυσιολογικά ύστερα από έκθεση σε μεγάλο υψόμετρο και σε περιπτώσεις έντονης μυϊκής άσκησης (1). Η υποξία είναι απαραίτητη τόσο κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών (2), όσο και στις βιολογικές διεργασίες της ερυθροποίησης, της διατήρησης και της ομαλής λειτουργίας των βλαστοκυττάρων, καθώς κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των ιστών (αίματος και οστών) (3, 4). Από την άλλη, οι αυστηρά ρυθμιζόμενες φυσιολογικές αποκρίσεις του κυκλοφορικού και του αναπνευστικού συστήματος, τα οποία είναι σχεδιασμένα, ώστε να παρέχουν επαρκή ποσότητα οξυγόνου σε καθένα από τα 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα ενός ενήλικου ανθρώπου, μπορούν να διαταραχθούν λόγω διαφόρων ασθενειών όπως είναι η ισχαιμία, οι αναιμίες, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και ο καρκίνος (5, 6).

Οι βασικοί ρυθμιστές της απόκρισης των κυττάρων στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, είναι οι HIF (Hypoxia Inducible Factors). Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες (HIF) δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες. Η μεγάλη σημασία του τρόπου με τον οποίο τα

κύτταρα αισθάνονται και αποκρίνονται στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, φάνηκε από την απονομή του βραβείου Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 2019, στους πρωτοπόρους ερευνητές του πεδίου William Kaelin Jr., Peter J. Ratcliffe και Gregg L. Semenza (7).

1.1.2. Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIF)

1.1.2.1. Δομή των HIF

Οι HIF αποτελούν μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που σχηματίζουν πυρηνικά ετεροδιμερή και οι οποίοι όταν σταθεροποιηθούν λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου (1% O₂), επάγουν την έκφραση γονιδίων στόχων, των οποίων τα προϊόντα θα συμβάλλουν στην προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων στην υποξία (8). Το ετεροδιμερές σύμπλοκο αποτελείται από μία υπομονάδα HIF-α της οποίας η σταθερότητα ελέγχεται από τη διαθέσιμη συγκέντρωση οξυγόνου και από μία υπομονάδα HIF-1β, που παράγεται σε σταθερά επίπεδα (9, 10).

Ο HIF-1β ή ARNT ανακαλύφθηκε λόγω της αλληλεπίδρασής του, εντός του πυρήνα με τον υποδοχέα των αρυλο-υδρογονανθράκων (AHR) (11). Έπειτα, ταυτοποιήθηκε ως η υπομονάδα βήτα των HIF (10). Ο AHR συγκαταλέγεται στη κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων bHLH-PAS και σχετίζεται με περιβαλλοντικούς ρύπους. Συγκεκριμένα, αφού ο προσδέτης (ligand) του AHR, δεσμευθεί στον τελευταίο, στο κυτταρόπλασμα, ο υποδοχέας μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα. Ακολούθως, αφού ετεροδιμεριστεί με τον ARNT οδηγεί στη συγκρότηση ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου, το οποίο δεσμεύεται σε υποκινητές γονιδίων στόχων του, ώστε με τη μεταγραφική του δράση να ρυθμίζει την απόκριση στους περιβαλλοντικούς ρύπους (12).

Τα γονίδια που φέρουν την πληροφορία για την έκφραση των τριών ισομορφών της υπομονάδας HIF-α είναι τα: α. γονίδιο *HIF1A* (HIF-1α), β. γονίδιο *EPAS1* (HIF-2α) και γ. γονίδιο *IPAS* (HIF-3α) στα θηλαστικά (10, 13, 14). Το γονίδιο *HIF1A* μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος, φέρει τη πληροφορία για την έκφραση 3 ώριμων mRNA με κύρια ισομορφή να είναι η τύπου 1, ανάμεσα στις τρεις και να ταυτίζεται με τον HIF-1α (15). Η εν λόγω ισομορφή αποτελείται από 826 αμινοξέα, παράγεται σχεδόν σε όλα τα είδη ιστών και έχει διερευνηθεί ενδελεχώς αναφορικά με τη δομή της, τις λειτουργίες που επιτελεί και τη ρύθμιση της, αφού λαμβάνει μέρος σε μια πληθώρα λειτουργιών του κυττάρου που μεταβάλλονται κάτω από συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (16). Ο HIF-2α ή *EPAS1* (Endothelial PAS domain protein 1) όπως προαναφέρθηκε κωδικοποιείται από το γονίδιο *EPAS1* και αποτελείται από 870 αμινοξέα. Η έκφραση του γονιδίου *EPAS1* παρουσιάζει ιστοειδικότητα, έχοντας τον υψηλότερο βαθμό έκφρασης σε κυτταρικούς ιστούς όπως είναι οι πνεύμονες, το

ήπαρ, οι νεφροί, η καρδιά και ο εγκέφαλος (17, 18). Από την άλλη, ο HIF-3α μπορεί να ανιχνευθεί σε ποικίλες ισομορφές, λόγω πολύπλοκου εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου *HIF3A* ή *IPAS* που τον κωδικοποιεί. Οι διαφορετικές αυτές ισομορφές του HIF-3α εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία σε σχέση τόσο με τη δομή όσο και τη λειτουργία τους, ενώ παράγονται ιστοειδικά και τα mRNA που τις κωδικοποιούν έχουν ανιχνευθεί κυρίως στην καρδιά, τους σκελετικούς μύες και τον πλακούντα και λιγότερο στους νεφρούς, το ήπαρ και τους πνεύμονες (19, 20). Σε κάποιες ισομορφές του HIF-3α, η καρβοξυτελική υποπεριοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD απουσιάζει. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ισομορφής HIF-3α1 η C-TAD έχει αντικατασταθεί από ένα μοτίβο φερμουάρ λευκίνης, ενώ στην περίπτωση της ισομορφής HIF-3α4 οι περιοχές TAD απουσιάζουν (14, 21).

Οι διάφορες λειτουργικές επικράτειες των HIF χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό ομοιότητας. Οι HIF υπάγονται στους μεταγραφικούς παράγοντες bHLH/PAS. Η επικράτεια αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας επικράτειας με χαρακτηριστική δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic Helix Loop Helix, bHLH) και η οποία διαμεσολαβεί την πρόσδεση στο DNA. Το δομικό μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα παρουσιάζει συντήρηση σε επίπεδο λειτουργίας από τα βακτήρια ως τα θηλαστικά (9). Επίσης χαρακτηρίζονται από μία επικράτεια Per-ARNT-Sim (PAS) με περιοχές -A και -B, που διαμεσολαβούν τη δημιουργία ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου, με τον ARNT (**Εικόνα 1**).

Η ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των επικρατειών bHLH/PAS σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας είναι αρκετά υψηλή, μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών HIF-α στον άνθρωπο. Οι επικράτειες bHLH μεταξύ HIF-1α και HIF-2α είναι ομόλογες με ποσοστό ομοιότητας 85%, σε αντίθεση με αυτήν του HIF-3α που παρουσιάζει 74% ομοιότητα, με τους HIF-1α και HIF-2α. Από την άλλη, οι επικράτειες PAS-A και PAS-B είναι όμοιες σε ποσοστό 70% μεταξύ του HIF-1α και του HIF-2α. Οι ανάλογες επικράτειες του HIF-3α εμφανίζουν ομοιότητα 57% με τον HIF-1α και 53% με τον HIF-2α (9, 22, 23).

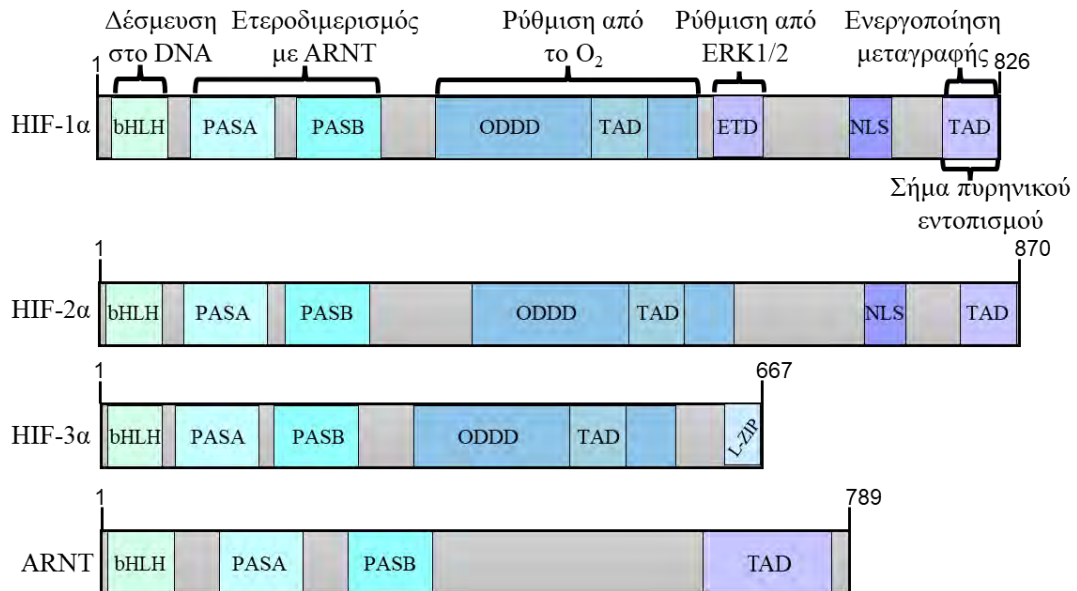
Στο κέντρο των HIF-α υπομονάδων, εντοπίζεται η επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODDD) (**Εικόνα 1**). Η επικράτεια ODDD διαθέτει συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης, τα οποία σε συνθήκες αφθονίας μοριακού οξυγόνου υδροξυλιώνονται από τις προλυλο-υδροξυλάσες (PHDs). Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία αποικοδόμησης των HIF-α υπομονάδων (24). Η αμινοξική αλληλουχία που καλύπτεται από την ODDD, περιλαμβάνει την περιοχή 401-603 στη περίπτωση του HIF-1α και οι κύριες θέσεις υδροξυλίωσης είναι οι προλίνες στις θέσεις 402 και 564. Στη περίπτωση του HIF-2α η επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης αφορά τα αμινοξέα από την θέση 401 έως την θέση 565 και οι προλίνες που υδροξυλιώνονται βρίσκονται στις θέσεις 405

και 531. Τα κατάλοιπα που βρίσκονται παραπλεύρως των θέσεων υδροξυλίωσης τόσο στις ισομορφές 1 και 2 των HIF-α υπομονάδων παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό εξελικτικής συντήρησης, καθώς παρατηρείται ομοιότητα σε ποσοστό 70% (25). Από την άλλη, η ισομορφή 1 του HIF-3α υδροξυλιώνεται από τις υδροξυλάσες προλίνης (PHDs) μόνο στην προλίνη στη θέση 492, ενώ η επικράτεια οξυγονο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης δεν υπάρχει στις υπόλοιπες ισομορφές του HIF-3α, οι οποίες δεν ρυθμίζονται από τα επίπεδα του διαθέσιμου οξυγόνου (9).

Η επικράτεια ODDD διακόπτεται από την αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD), η οποία σε συνδυασμό με την αντίστοιχη καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (C-TAD) αποτελούν τις επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation Domains, TADs) (**Εικόνα 1**). Η επικράτεια N-TAD αφορά την περιοχή 532-585 στον HIF-1α, και η C-TAD την 776-826 στον HIF-1α (9). Σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, διαδραματίζει μία ενδογενώς αδόμητη περιοχή η οποία βρίσκεται μεταξύ των TAD (σε HIF-1α και HIF-2α), και ονομάζεται ανασταλτική επικράτεια (Inhibitory Domain, ID) (26, 27). Η ομοιότητα που παρατηρείται σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας της C-TAD μεταξύ HIF-1α και HIF-2α ανέρχεται στο ποσοστό 67%. Παρά το γεγονός ότι μεταξύ N-TAD και C-TAD υπάρχει συνεργατική δράση, μία συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων-στόχων του HIF-1 ή του HIF-2 βασίζουν την έκφραση τους στην N-TAD. Επίσης η εξειδίκευση των HIF-α ως προς τα διάφορα γονίδια-στόχους τους προσδίδεται από την N-TAD, καθώς αποδείχθηκε ότι η αντικατάσταση της N-TAD στη περίπτωση του HIF-2α με την αντίστοιχη του HIF-1α μπορεί να προσδώσει στον HIF-2α την ικανότητα να ενεργοποιεί γονίδια-στόχους του HIF-1α. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο με την αντικατάσταση των C-TAD (25).

Παράλληλα, οι HIF διαθέτουν σήματα για τη ρύθμιση του υποκυτταρικού τους εντοπισμού (**Εικόνα 1**). Συγκεκριμένα, για να είναι οι HIF ικανοί να ασκήσουν τη μεταγραφική τους δράση, θα πρέπει τόσο οι υπομονάδες HIF-α και ARNT να εισέλθουν στον πυρήνα. Ο πυρηνικός φάκελος διαθέτει πόρους οι οποίοι επιτρέπουν τη διέλευση πρωτεϊνών κάτω των 40 kDa μέσω παθητικής διάχυσης. Η είσοδος πρωτεϊνών άνω των 40 kDa στον πυρήνα πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται μμπορτίνες. Οι μμπορτίνες διαθέτουν την ικανότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) στις πρωτεΐνες-στόχους. Έπειτα, διαμεσολαβούν την είσοδο των πρωτεϊνών αυτών διαμέσου των πυρηνικών πόρων στον πυρήνα, ξοδεύοντας ενέργεια που προέρχεται από την υδρόλυση της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP). Ο ARNT εμφανίζει συνεχώς πυρηνικό εντοπισμό, αφού φέρει ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στην αμινοτελική του περιοχή το οποίο αναγνωρίζεται από τις

μπορτίνες α/β (28). Επιπροσθέτως, ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού το οποίο αναγνωρίζεται από τις μπορτίνες α/β έχει βρεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο όλων των HIF- α και είναι λειτουργικό στη περίπτωση των ανθρώπινων HIF-1 α και HIF-2 α (29, 30). Ωστόσο, έχει χαρακτηριστεί ένα νέο σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1 α και το οποίο διαθέτει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις μπορτίνες 4/7, αποκαλύπτοντας ένα εναλλακτικό μονοπάτι εισαγωγής του HIF-1 α στον πυρήνα (31).



Εικόνα 1: Οι δομικές επικράτειες των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF. Οι HIF φέρουν επικράτειες αλληλεπίδρασης με το DNA (bHLH), ετεροδιμερισμού με την υπομονάδα HIF-1 β (PASA και PASB) και μεταγραφικής ενεργοποίησης (η αμινοτελική N-TAD και η καρβοξυτελική C-TAD), ενώ επίσης διαθέτουν σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS). Επίσης χαρακτηρίζονται από την επικράτεια οξυγόνο-εξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODDD). Στον HIF-1 α έχει προσδιοριστεί η επικράτεια ETD στην οποία περιέχονται δύο αμινοξέα σερίνης στις θέσεις 641 και 643 τα οποία δέχονται τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK1/2.

Από άποψη ρύθμισης, εξίσου σημαντική είναι και η αντίστοιχη πυρηνική εξαγωγή. Η ενεργή εξαγωγή των πρωτεϊνών από τον πυρήνα, πραγματοποιείται μέσω ενός ετεροτριμερούς συμπλόκου, που αποτελείται από την πρωτεΐνη-φορτίο, την Ran-GTP και μία εξπορτίνη. Η εξπορτίνη CRM1 (Chromosomal maintenance 1) αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη διαμεσολάβησης της εξαγωγής πρωτεϊνών από τον πυρήνα, στα θηλαστικά. Στο πλαίσιο προηγούμενων ερευνητικών δημοσιεύσεων του Εργαστηρίου Βιοχημείας, προσδιορίστηκαν εντός της επικράτειας ID, τόσο στον HIF-1 α , όσο στον HIF-2 α , δύο σήματα εξαγωγής από τον πυρήνα NES (Nuclear Export Signal) και των οποίων η αλληλουχία διαφέρει. Η επίδραση με τον αναστολέα της CRM1, λεπτομυκίνη B, είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση τόσο του HIF-1 α όσο και του HIF-2 α στον πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι η εξαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα διαμεσολαβείται από την CRM1. Δείχθηκε επίσης ότι η αλληλεπίδραση και

των δύο ισομορφών των HIF, με την CRM1, αναστέλλεται κατόπιν φωσφορυλίωσής τους από τις ERK1/2. Αυτό που συμβαίνει είναι η απόκρυψη των θέσεων που αναγνωρίζει η CRM1, λόγω της παρουσίας της φωσφορικής ομάδας, καθώς και η επακόλουθη συσώρευση των HIF-α στον πυρήνα (32-34). Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι η κατάργηση των θέσεων στις οποίες οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α, οδηγεί στην εξαρτώμενη από την CRM1 πυρηνική εξαγωγή του, και στην επακόλουθη αλληλεπίδρασή του με τη μορταλίνη η οποία διαμεσολαβεί τη στόχευση του στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (35).

1.1.2.2. Ο ρόλος των HIF στην υγεία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω η υποξία εμφανίζεται εκτός των περιπτώσεων διαφόρων ασθενειών και σε φυσιολογικές περιπτώσεις. Οι HIF έχουν καθοριστική σημασία σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες των θηλαστικών. Σε αυτές περιλαμβάνονται: α. η εδραίωση δικτύων αγγείων του κυκλοφορικού συστήματος, β. η ανάπτυξη, γ. ο μεταβολισμός, δ. η ερυθροποίηση και ε. η διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων.

Η διαδικασία δημιουργίας και εγκαθίδρυσης δικτύων αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνει τόσο την νεοαγγειογένεση (vasculogenesis) που είναι η de novo δημιουργία αγγείων και την αγγειογένεση (angiogenesis) που με τη σειρά της είναι η δημιουργία αγγείων από προ-υπάρχοντα αγγειακά δίκτυα. Ο παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στις διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (36). Ο HIF-1 και σε μεγαλύτερο βαθμό ο HIF-2 συμμετέχουν στις προαναφερθείσες διεργασίες καθώς ο VEGF αποτελεί γονίδιο-στόχος τους (37, 38) (**Εικόνα 2**). Ο VEGF ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τους VEGFA/B, PGF (Placental Growth Factor), VEGFC/D. Τα τρία πρώτα μέλη είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αιμοφόρων αγγείων, ενώ τα δύο τελευταία συμμετέχουν στο σχηματισμό των αγγείων του λεμφικού συστήματος (λεμφοαγγειογένεση) (39). Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια-στόχους των HIF και ρυθμίζουν την αγγειογένεση είναι ο παράγοντας PDGF (Platelet Derived Growth Factor), η ANGPT1/2 (Angiopoietin) και οι πρωτεάσες MMPs (Matrix Metalloproteinases) οι οποίες αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη του αγγειακού ενδοθηλίου (40-44).

Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι HIF στην ανάπτυξη του πλακούντα κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών είναι εξαιρετικά σημαντικός. Η ανάπτυξη του πλακούντα καθορίζεται κυρίως από τη διαβάθμιση της περιεκτικότητας του οξυγόνου στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Συγκεκριμένα, σε έμβρυα τρωκτικών, πριν την εμβρυική μέρα 9,5, λόγω της υποξίας που παρατηρείται, έχουν την ικανότητα να στηρίζονται κυρίως στην παραγωγή ATP από την οδό της αναερόβιας γλυκόλυσης. Ως απόκριση στην υποξία οι HIF επάγουν τις απαραίτητες

αγγειογενετικές διαδικασίες που θα εξασφαλίσουν τη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών στο έμβρυο, την εμβρυϊκή μέρα 10,5-11,5. Επίσης, απαλοιφή των γονιδίων που εκφράζουν τη πληροφορία για την παραγωγή των πρωτεϊνών ARNT, VHL, PHD2 ή συνδυαστική απαλοιφή των HIF-1α/HIF-2α, οδήγησαν σε δυσλειτουργίες στη δομή του πλακούντα και στην αγγείωσή του. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της διαβάθμισης της συγκέντρωσης του μοριακού οξυγόνου και των παραγόντων HIF, στα διάφορα στάδια δημιουργίας του πλακούντα (36).

Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του οξυγόνου που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο αποτελεί και σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της λιπογένεσης. Δεδομένου του γεγονότος ότι η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι απαραίτητη για το καταβολισμό των λιπαρών οξέων, η υποξία περιορίζει τη χρήση των λιπαρών οξέων, καθώς και τη δημιουργία νέων λιποκυττάρων και συνεπώς λιπώδους ιστού. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας αναστέλλεται η διαδικασία μετατροπής των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την εξασθένηση της έκφρασης των υποδοχέων PPAR γ (Peroxisome Proliferative Activated Receptor γ) που είναι υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα (36, 45).

Η παρατεταμένη έκθεση ενός ζωντανού οργανισμού σε υποξία, οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας των HIF εντός των κυττάρων του. Στα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται εξειδικευμένα κύτταρα κυρίως στους νεφρούς και δευτερευόντως στο ήπαρ, που παράγουν την ερυθροποιητίνη (EPO) (**Εικόνα 2**). Η EPO όταν εκκριθεί στο αίμα συνδέεται σε αντίστοιχους υποδοχείς πρόδρομων ερυθροειδών κυττάρων, και οδηγεί στην επαγωγή τόσο της επιβίωσης, όσο και της διαφοροποίησής τους. Η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, έγινε στο πλαίσιο μελετών της πρόσδεσής του σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ερυθροποιητίνη (EPO). Επίσης, μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η ερυθροποίηση καθώς και η EPO, υπόκεινται σε ρύθμιση κυρίως ή και αποκλειστικά από τον HIF-2 και όχι από τον HIF-1 (46, 47). Άλλη δημοσίευση εξήγησε ότι κάτω από συνθήκες ήπιας υποξίας (12% O $_2$) στους νεφρούς, η έκφραση της ερυθροποιητίνης ελέγχεται και από τον HIF-1 και από τον HIF-2, ενώ στον εγκέφαλο ιδιαίτερα από τον HIF-2 (48, 49). Οι HIF ελέγχουν τη διαδικασία της ερυθροποίησης μέσω της έκφρασης γονιδίων των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη του σιδήρου από το έντερο και τη μεταφορά αυτού στο μυελό των οστών, καθώς και μέσω επαγωγής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της EPO (1).

Επίσης έχει δειχθεί ότι οι HIF προωθούν τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Συγκεκριμένα γονίδια όπως είναι τα NANOG, SOX2, OCT4 ελέγχονται κυρίως από τον HIF-2 σε υποξία (6% O₂) (50-52) (**Εικόνα 2**).

1.1.2.3. Ο ρόλος των HIF στον καρκίνο

Τα καρκινικά κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με διάφορες συνθήκες στο πλαίσιο του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος. Πολλές από τις συνθήκες αυτές που χαρακτηρίζουν τους περισσότερους καρκινικούς όγκους, χαρακτηρίζουν και τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Οι ιδιότητες αυτές έχουν να κάνουν με: α. την παρατεταμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που προωθούν την μεγάλη ικανότητα ανάπτυξης και το ισχυρό πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, β. την διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, γ. την αποφυγή σηματοδοτικών μορίων-τελεστών που καταστέλλουν την δυνατότητα ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, δ. την δυνατότητα αθανатоποίησης στο πλαίσιο ατέρμονης αντιγραφής του γενετικού υλικού και διαμοιρασμού του στα θυγατρικά κύτταρα, ε. την προαγωγή φλεγμονωδών αποκρίσεων στον συμπαγή όγκο, ζ. την ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης, η. την εγκαθίδρυση αγγειακών δικτύων, η. τις μεταλλάξεις και τη γενωμική αστάθεια, θ. την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης, ι. την αποδιοργάνωση της ρύθμισης του κυτταρικού μεταβολισμού και κ. την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (53).

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω ο καρκίνος αποτελεί μία από τις ασθένειες στην οποία η υποξία διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο καθώς αποτελεί χαρακτηριστικό των περισσότερων συμπαγών όγκων. Η επαγωγή των HIF ως απόκριση στην υποξία είναι ζωτικής σημασίας για την προσαρμοστική απόκριση των καρκινικών κυττάρων στο υποξικό μικροπεριβάλλον (54). Οι HIF αποκρίνονται στην υποξία κυρίως μέσω μεταγραφικών δράσεων, επάγοντας την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν σημαντικές διεργασίες όπως είναι η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, η διήθηση και η μετάσταση για τις οποίες θα γίνει ανάλυση παρακάτω (55).

Η παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στους διάφορους ιστούς πραγματοποιείται με τη βοήθεια του κυκλοφορικού συστήματος. Ωστόσο, λόγω της ιδιότητας των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να μην υπόκεινται στους κυτταρικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι μεταβολικές ανάγκες όσο και οι απαιτήσεις σε οξυγόνο είναι αυξημένες. Λόγω αυτού του γεγονότος υπάρχει μία ανισορροπία στο ισοζύγιο κατανάλωσης και παροχής οξυγόνου προς τον εκάστοτε συμπαγή όγκο. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας

οδηγεί σε υποξία και επαγωγή των HIF, μέσω των οποίων πυροδοτείται η έναρξη της αγγειογένεσης (56). Ωστόσο, τόσο η κατανομή όσο και η μορφολογία των αγγείων που δημιουργούνται συνδυαστικά με την άσκηση μηχανικής πίεσης στον συμπαγή καρκινικό όγκο, καταλήγουν σε μη αποτελεσματική εδραίωση δικτύων και διάρρηξη των αγγείων (57). Έτσι στον αναπτυσσόμενο όγκο δημιουργούνται ζώνες-υποπεριοχές μεταξύ των οποίων υπάρχει διαβάθμιση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, από την περιφέρεια προς το εσωτερικό του. Η εξωτερική ζώνη που αναφέρεται στην περιφέρεια του όγκου παρουσιάζει την μεγαλύτερη εγγύτητα προς τα αιμοφόρα αγγεία και χαρακτηρίζεται από επαρκή οξυγόνωση. Την προηγούμενη ζώνη διαδέχεται μία ζώνη μέσης οξυγόνωσης όπου υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου (υποξία). Με τη σειρά της, ακολουθείται από μία νεκρωτική ζώνη, όπου χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη οξυγόνου, συνθήκη που προσδιορίζεται ως ανοξία (58). Συνεπώς, η υποξία που εμφανίζεται στους συμπαγείς όγκους και μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον στρες για τα καρκινικά κύτταρα, οδηγεί στην ενεργοποίηση των HIF, οι οποίοι επάγουν με μεταγραφικό τρόπο τα γονίδια που εκφράζουν για τις πρωτεΐνες VEGF, ANGPT1/2, iNOS, υποβοηθώντας την αγγείωση και τη παροχή οξυγόνου στους αναπτυσσόμενους όγκους (59).

Οι HIF βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να αποκριθούν στο στρες που προκαλείται από το φαινόμενο της υποξίας, μέσω επαναπρογραμματισμού του κυτταρικού μεταβολισμού, που περιλαμβάνει κυρίως την μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αναερόβια γλυκόλυση. Παράλληλα, αναστέλλεται η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, αυξάνεται η λιπογένεση και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποθηκεύονται με τη μορφή λιποσταγονιδίων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου να αξιοποιούν τον μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της ζύμωσης σε γαλακτικό οξύ για παραγωγή ενέργειας και όχι μέσω της οδού αερόβιας γλυκόλυσης-κύκλου Krebs και αναπνευστικής αλυσίδας/οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η ιδιότητα αυτή των καρκινικών κυττάρων ονομάστηκε φαινόμενο Warburg (60).

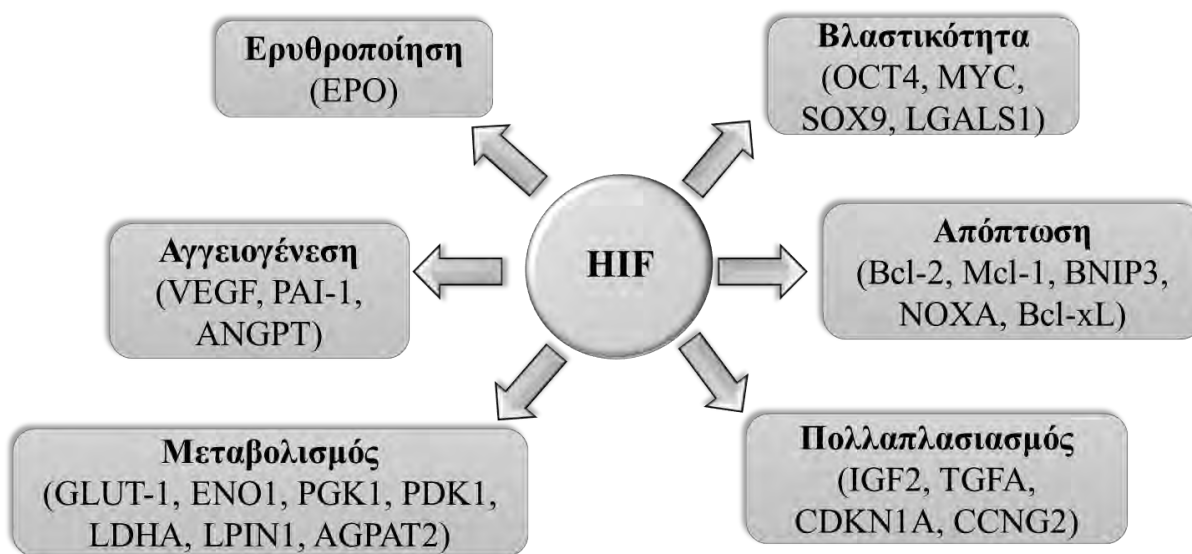
Ο HIF-1 προωθεί το μεταβολισμό της γλυκόζης, επάγοντας την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε κάθε στάδιο της γλυκολυτικής πορείας όπως είναι η εξοκινάση-2 (HK-2), φωσφοφρουκτοκινάση (PFK1), η αλδολάση (ALDO A/C), η κινάση του φωσφογλυκερικού (PGK), η μουτάση του φωσφογλυκερικού (PGM), η ενολάση (ENO1) και η κινάση του πυροσταφυλικού (PKM2) (61, 62) (**Εικόνα 2**). Επίσης, προωθεί τη γλυκόλυση ενεργοποιώντας το γονίδιο που εκφράζει τον μονομεταφορέα γλυκόζης GLUT1 (**Εικόνα 2**), ο οποίος προωθεί σε σημαντικό βαθμό την πρόσληψη γλυκόζης από το κυκλοφορικό σύστημα, ώστε να αξιοποιηθεί ενεργειακά για την κάλυψη των αυξημένων μεταβολικών αναγκών των καρκινικών

κυττάρων. Επιπροσθέτως, ο HIF-1 επάγει την έκφραση της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (PDK1) (**Εικόνα 2**) και με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζει το μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-coA) που χρησιμοποιείται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs) (63). Επίσης, ο HIF-1 συμβάλλει στην επαγωγή της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (LDH) (**Εικόνα 2**), η οποία μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ και του μεταφορέα μονοκαρβοξυλικών οξέων (MCT4), ο οποίος μεταφέρει μία ποσότητα του γαλακτικού οξέος εκτός του καρκινικού κυττάρου με παράλληλη μεταφορά H^+ , συμβάλλοντας στην οξίνιση του εξωκυττάρου χώρου του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος. Η οξίνιση του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος έχει συσχετιστεί με την αυξημένη ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς. Επίσης, ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, μειώνει τη ροή του μεταβολισμού προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ως εκ τούτου, η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή ROS, ελαττώνονται σημαντικά (1). Στο τελευταίο, καθοριστική συμβολή διαδραματίζει και η βελτίωση της λειτουργίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω της εξαρτώμενης από τον HIF-1 μετατροπής του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας (οξειδάση του κυτοχρώματος c) από COX4-1 σε COX4-2 (64).

Η συμμετοχή του HIF-1 στην αλλαγή του κυτταρικού μεταβολισμού αφορά επίσης το μεταβολισμό των λιπιδίων. Έχει δειχθεί πως τόσο ο HIF-1α, όσο και ο HIF-2α συμβάλλουν στη συσσώρευση λίπους σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 αναστέλλοντας τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (65). Επίσης πολλές δημοσιεύσεις αποδεικνύουν πως τα γονίδια-στόχοι του HIF-1 φέρουν την πληροφορία για την παραγωγή πρωτεϊνών και ενζύμων που αναστέλλουν τη λιπόλυση (66), προωθούν την πρόσληψη (67, 68) και την de novo βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (69). Ακόμα στα γονίδια-στόχους του HIF-1 περιλαμβάνονται ένζυμα που αποθηκεύουν τα λιπαρά οξέα σε μορφή τριακυλογλυκερολών (AGPAT2, Lipin-1) (70, 71) (**Εικόνα 2**) και που συμμετέχουν στη σύνθεση της μεμβράνης των λιποσταγονιδίων (72, 73) όπου γίνεται η τελική τους αποθήκευση.

Γενικά, έχει βρεθεί ότι σε πολλά είδη καρκίνου η έκφραση του HIF-1α είναι εξαιρετικά αυξημένη, γεγονός το οποίο πιστοποιείται από πολλά κλινικά δεδομένα βιοψιών σε συμπαγείς όγκους. Η υπερέκφραση των HIF έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης καθώς και υψηλή θνησιμότητα σε διάφορα είδη καρκίνων. Συνεπώς η άμεση ή έμμεση στόχευση των HIF με φαρμακολογικά μέσα μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία διαφόρων καρκίνων και στην άρση της αντίστασης που αυτοί παρουσιάζουν σε ραδιοθεραπείες και χημειοθεραπείες (74). Πρόσφατα η ανακάλυψη ενός εξειδικευμένου ανταγωνιστή του HIF-

2 ονομάστηκε PT2399. Το μόριο αυτό που δημιουργήθηκε με τη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων, ανέστειλε τη συμπλοκοποίηση μεταξύ ARNT και HIF-2α σε ανθρώπινο νεφρικό καρκίνωμα (75).



Εικόνα 2: Ο ρόλος των HIF στην υγεία και τον καρκίνο. Οι HIF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στην υποξία, επάγοντας την έκφραση γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι η ερυθροποίηση, η αγγειογένεση, ο επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού, η βλαστικότητα, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.

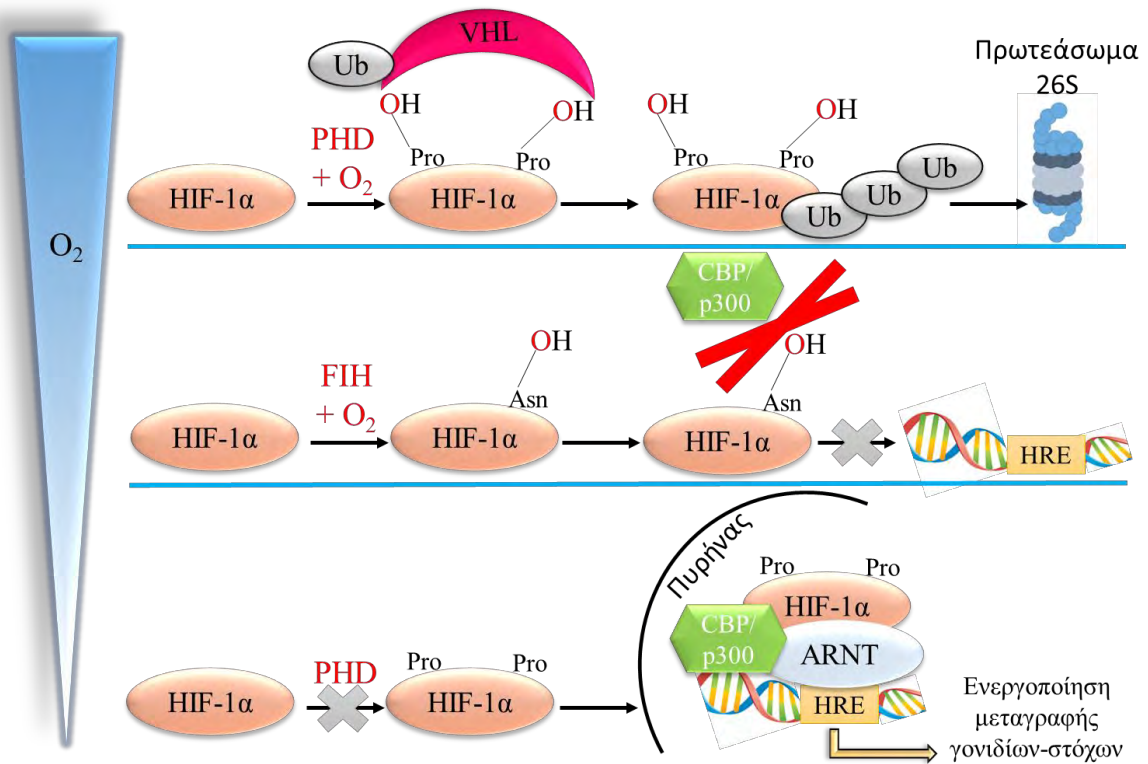
1.1.3. Ρύθμιση του HIF-1

1.1.3.1. Ρύθμιση της σταθερότητας και της δραστηριότητας του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου

Ένα από τα κυριότερα επίπεδα ελέγχου του HIF-1α, αφορά στον έλεγχο τόσο της σταθερότητάς του, όσο και της δραστηριότητας του από επίπεδα του οξυγόνου που παρατηρούνται στα κύτταρα ή στους ιστούς. Πρωταρχικό βήμα στον έλεγχο της σταθερότητας του HIF-1α είναι η υδροξυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων προλίνης εντός της επικράτειας ODDD, από τις προλυλο-υδροξυλάσες PHD1-3 (Prolyl Hydroxylase Domain Proteins 1-3). Έχει δειχθεί πως η PHD2 φαίνεται να αποτελεί την κύρια προλυλο-υδροξυλάση που ασκεί ρύθμιση στον HIF-1α, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί γονίδιο στόχο του, δημιουργώντας έναν κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης (76). Συγκεκριμένα, η υδροξυλίωση των P402 και P564 καταλύεται σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου (νορμοξία). Ακολούθως η αναγνώριση των υδροξυλιωμένων καταλοίπων προλίνης πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη pVHL (Von Hippel-Lindau tumor suppressor) η οποία έχει δράση E3 λιγάσης ουβικιτίνης. Η pVHL αποτελεί μέρος ενός συμπλόκου που συγκροτείται από τις πρωτεΐνες Elongin B, Elongin C,

cullin2 και RBX1 (Ring Box Protein 1). Ο ρόλος της μετά την αναγνώριση των προαναφερθέντων αμινοξέων προλίνης, αφορά την πολυουβικιτινίωση του HIF-1α και την επακόλουθη μεταφορά του στο πρωτεάσωμα 26S για αποικοδόμηση (8, 77) (**Εικόνα 3**).

Ένα άλλο σημαντικό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α από τα επίπεδα οξυγόνου είναι ο παράγοντας FIH (Factor Inhibiting HIF). Ο FIH καταλύει την υδροξυλίωση ενός αμινοξέος ασπαραγίνης στη θέση 803 (Asn803) της περιοχής C-TAD του HIF-1α, παρεμποδίζοντας τη αλληλεπίδρασή του, με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής CBP/p300, οι οποίοι διαμεσολαβούν την έναρξη της μεταγραφής από τον HIF-1α (**Εικόνα 3**). Οι PHDs και ο FIH, είναι διοξυγενάσες και χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα παρουσία δισθενούς σιδήρου (Fe^{+2}) και α-κετογλουταρικού (ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος) προκειμένου να πραγματοποιήσουν την ενζυμική τους κατάλυση. Πιο συγκεκριμένα κατά την αντίδραση υδροξυλίωσης πραγματοποιείται αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρικό οξύ με ταυτόχρονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, ως δότες ηλεκτρονίων στην κατάλυση λειτουργούν ο Fe^{+2} που οξειδώνεται σε Fe^{+3} , καθώς και η οξείδωση του ασκορβικού οξέος σε ημυδροασκορβικό οξύ με παράλληλη αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή μορφή (76, 78). Η αγχιστεία που παρουσιάζει ο FIH για το μοριακό οξυγόνο είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τις PHDs. Συνεπώς, παραμένει ενεργός ακόμα και σε συνθήκες υποξίας, ελέγχοντας την μεταγραφική δράση του σταθεροποιημένου HIF-1α (79).



Εικόνα 3: Η σταθερότητα και η ενεργότητα του HIF-1α ρυθμίζεται από τα επίπεδα του διαθέσιμου οξυγόνου. Οι αισθητήρες των διαθέσιμων επιπέδων οξυγόνου είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που ανήκουν στις διοξυγενάσες και χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το μοριακό οξυγόνο. Σε αυτές ανήκουν οι υδροξυλάσες προλίνης PHD και ο παράγοντας FIH. Όταν η συγκέντρωση του διαθέσιμου οξυγόνου βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα, οι υδροξυλάσες προλίνης PHD είναι ενεργές και καταλύουν την υδροξυλίωση δύο καταλοίπων προλίνης στον HIF-1α. Τα υδροξυλιωμένα κατάλοιπα προλίνης αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη VHL η οποία είναι μέρος ενός συμπλόκου με δράση E3 λιγάσης ουβικιτίνης. Ο HIF-1α πολυουβικιτινώνεται από την VHL και στοχεύεται στο πρωτεάσωμα 26S για αποικοδόμηση. Παρουσία οξυγόνου ο παράγοντας FIH είναι ενεργός και καταλύει την υδροξυλίωση ενός καταλοίπου ασπαραγίνης στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση με τους συμπαράγοντες της μεταγραφής CBP/p300. Ωστόσο σε συνθήκες υποξίας οι PHD απενεργοποιούνται με αποτέλεσμα ο HIF-1α να σταθεροποιείται και να εισέρχεται στον πυρήνα όπου θα συναντήσει τη β υπομονάδα των HIF που ονομάζεται ARNT. Στη συνέχεια οι δύο υπομονάδες ετεροδιμερίζονται συγκροτώντας ένα λειτουργικό σύμπλοκο, το οποίο προσδένεται σε κατάλληλα στοιχεία απόκρισης στην υποξία στους υποκινητές των γονιδίων στόχων των HIF, που ονομάζονται HRE. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή των γονιδίων στόχων του HIF-1α, η έκφραση των οποίων θα οδηγήσει στην απόκριση των κυττάρων στην υποξία.

Εκτός από την έλλειψη οξυγόνου, η λειτουργικότητα των PHDs ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες. Σε συνθήκες υποξίας, ενοείται η δημιουργία ηλεκτρικού οξέος από το α-κετογλουταρικό οξύ στο πλαίσιο του κύκλου του Krebs. Η συσσώρευση του ηλεκτρικού οξέος ως ενδιάμεσου μεταβολίτη, ανταγωνίζεται τη σύνδεση του α-κετογλουταρικού στις υδροξυλάσες προλίνης, αναστέλλοντας περαιτέρω τη λειτουργία τους (80). Ακόμα, λόγω μη σωστής λειτουργίας των διαδικασιών αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια κατά την υποξία, ενοείται ο σχηματισμός ROS. Τα ROS σε συνδυασμό με το

μονοξειδίου του αζώτου (NO) που παράγεται μέσω της εξαρτώμενης από τον HIF-1 επαγωγής της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase), μπορούν να αναστείλουν τη δράση των PHDs (81).

1.1.3.2. Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF1A*

Ένα πολύ σημαντικό επίπεδο ρύθμισης του HIF-1α, είναι ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *HIF1A*. Το mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή του γονιδίου του *HIF1A* μπορεί να ανιχνευθεί σε όλους τους κυτταρικούς ιστούς. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης διαφοροποιούνται σημαντικά σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, καθώς παράγοντες όπως η υποξία, τα ROS, συνθήκες φλεγμονής και ποικίλα άλλα σηματοδοτικά μόρια μπορούν να τα επηρεάσουν. Μελέτες καταδεικνύουν την επίδραση της υποξίας στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *HIF1A*. Έχει δειχθεί ότι η ήπια υποξία είναι ικανή να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων mRNA σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως είναι το ηπατοκαρκίνωμα, το νεφρικό καρκίνωμα, οι ινοβλάστες και τα νευρικά βλαστοκύτταρα με τη μεγαλύτερη αύξηση να εντοπίζεται στις δύο ώρες. Με το πέρας των ωρών αυτών τα επίπεδα mRNA επανέρχονται στα βασικά μεταγραφικά επίπεδα. Παράλληλα, άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για 4 ώρες, δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *HIF1A* (82). Σε άλλη μελέτη επιβεβαιώθηκε η παροδική άνοδος των επιπέδων mRNA του HIF-1α σε λευκοκύτταρα εθελοντών και συσχετίστηκε με την παράλληλη αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου που παράγονται, όπως προαναφέρθηκε, λόγω μη σωστής λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας (83).

Ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της απόκρισης των κυττάρων σε συνθήκες φλεγμονώδους αντίδρασης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Ο NF-κB δημιουργείται ως ετερο- ή ομο-διμερές από τον διαφορετικό συνδυασμό των υπομονάδων p65, RelB, cRel, p50 και p52. Επίσης, αναστέλλεται από τη δράση των κινασών IKKs (Inhibitory kappa B Kinases) (84). Η ανακάλυψη μιας γενετικής αλληλουχίας συναίνεσης για τον NF-κB στο γονίδιο *HIF1A* στις θέσεις -197/-188 ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής υποδεικνύει πιθανό έλεγχο της μεταγραφής του από τον NF-κB. Ακόμα δείχθηκε ότι η περιοχή του γονιδίου *HIF1A* στην οποία δεσμεύεται ο NF-κB παρουσιάζει μεγάλο βαθμό εξελικτικής συντήρησης μεταξύ διαφορετικών ειδών. Όλες μελέτες για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *HIF1A* πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές λείων μυϊκών κυττάρων πνευμονικών αρτηριών (PASMC, Pulmonary Artery Smooth Muscle cells), οστεοσαρκώματος (U2OS) και HEK-293 (Human Embryonic Kidney) (85).

Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι σε λεία μυϊκά κύτταρα πνεύμονα, καθώς και σε διάφορες καρκινικές σειρές η προαναφερθείσα αναγνώριση του γονιδίου *HIF1A* από τον NF-κB, συνεισφέρει στη διατήρηση του mRNA του HIF-1α σε βασικά επίπεδα. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται μία συσχέτιση μεταξύ των μονοπατιών της υποξίας και της απόκρισης στη φλεγμονή. Επίσης είναι γνωστό πως η κυτοκίνη TNF-α (Tumor Necrosis Factor) που ενεργοποιεί τον NF-κB δρα συνεργατικά με τα ROS και άλλα σηματοδοτικά μόρια-τελεστές όπως η θρομβίνη για τη μεταγραφή του γονιδίου *HIF1A* σε συνθήκες νορμοξίας (86-88).

Σημαντική ρύθμιση στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον HIF-1α παρέχεται από τον STAT3 (μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα ο STAT3 επάγει το γονίδιο *HIF1A*. Από την άλλη η αναστολή του STAT3 από την κινάση PKR καταλήγει σε αρνητικό έλεγχο του *HIF1A* (89).

Τα ROS εκτός από το ρόλο που διαδραματίζουν στον έλεγχο της δραστηριότητας των PHDs, συμμετέχουν και στη ρύθμιση του γονιδίου *HIF1A*. Ένας από τους βασικότερους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας που διαθέτουν τα κύτταρα βασίζεται στην σύνθεση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική θωράκισή τους, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Nuclear Factor – erythroid 2 -related factor 2). Αν και η σχέση μεταξύ Nrf2 και HIF-1α δεν έχει αποσαφηνιστεί ξεκάθαρα, βιβλιογραφικές μελέτες δείχνουν πως ο Nrf2 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *HIF1A* στα βασικά του επίπεδα (basal levels) ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου. Έχει ανακαλυφθεί σε καρκινικά κύτταρα νεφρών πως η αποσιώπηση του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί για τον Nrf2, οδηγεί σε μείωση των επιπέδων mRNA του HIF-1α ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου (90). Σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου που εκτίθενται σε υποξία, η αποσιώπηση της έκφρασης του Nrf2 έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω HIF-1α (91).

1.1.3.3. Ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA που κωδικοποιεί για τον HIF-1α

Η ρύθμιση της καθολικής μετάφρασης των πρωτεϊνών, υπόκειται σε έλεγχο από δύο οδούς σηματοδότησης, των οποίων η πυροδότηση ενεργοποιείται από την πρόσδεση μορίων, όπως είναι οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες, σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης. Σε παθολογικές συνθήκες, όπως στον καρκίνο, υπάρχει απορρύθμιση των δύο αυτών σηματοδοτικών οδών λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν για τους τελεστές των μονοπατιών, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη ενεργοποίησή τους (55). Τα δύο μονοπάτια ρύθμισης της μετάφρασης είναι: α. το μονοπάτι που διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORc1 (mammalian target of rapamycin complex 1) και β. το μονοπάτι των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases).

Ο κύριος έλεγχος της μετάφρασης των mRNA πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του mTOR. Η σύνδεση αυξητικών παραγόντων στους διαμεμβρανικούς RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης PI3K (phosphoinositide 3-kinase), η οποία ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως κινάση πρωτεϊνών B, PKB). Στη συνέχεια ενεργοποιείται το mTOR μέσω της PKB/AKT. Το μονοπάτι αυτό καταλήγει στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες περιλαμβάνονται η μεταγραφή, η μετάφραση, ο μεταβολισμός, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η απόπτωση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D-καλσιτριόλης (calcitriol) οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των HIF-α, εμπλεκόμενη στο μονοπάτι PI3K/AKT, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (92, 93).

Η δεύτερη οδός ελέγχου της μετάφρασης των mRNA του HIF-1α αφορά τις κινάσες MAPK. Συγκεκριμένα, το μονοπάτι ξεκινά όπως περιγράφηκε και προηγουμένως με τη δέσμευση ενός εξωκυττάριου προσδέτη σε υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης. Έπειτα πυροδοτείται η έναρξη ενός καταρράκτη σηματοδοτικών φωσφορυλιώσεων στο πλαίσιο των οποίων οι κινάσες RAF ενεργοποιούνται και φωσφορυλιώνουν τις MEK, οι οποίες ακολούθως φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK (Extracellular signal Regulated Kinases). Οι ERK ρυθμίζουν μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών που έχουν να κάνουν με τον πολλαπλασιασμό και την αποφυγή της απόπτωσης (94). Επιπλέον, οι ERK φωσφορυλιώνουν και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν αρνητικά το σύμπλοκο TSC1/TSC2, προωθώντας την ενεργοποίηση της δράσης του mTOR.

Οι δύο οδοί που περιγράφηκαν προηγουμένως οδηγούν στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4E-Binding Protein 1, 4E-BP1) και της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6. Συγκεκριμένα οι ERK και mTOR φωσφορυλιώνουν την κινάση p70-S6 η οποία ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη S6 και τον παράγοντα 4E-BP1. Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF4E αναστέλλεται, με αποτέλεσμα την σύνδεση των πολυριβοσωμάτων στα mRNA του πληθυσμού των mRNA που έχουν 5' καλύπτρα, στα οποία περιλαμβάνεται και αυτό του HIF-1α (95). Οι κινάσες ERK ενεργοποιούν τις MNK, οι οποίες έχουν την δυνατότητα φωσφορυλίωσης του eIF4E και ενισχύουν τη δράση του ευνοώντας την μετάφραση των mRNA με 5' καλύπτρα (96). Ακόμα σχετικά με τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αποτελεί μέρος της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S και ενεργοποιείται από την S6K, η οποία έχει ενεργοποιηθεί από το mTOR. Η S6K οδηγεί στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και γονιδίων που προωθούν σε μεγαλύτερο βαθμό την πρωτεϊνοσύνθεση (97).

Η ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA του HIF-1α από το σύνολο του κυτταρικού μεταγραφώματος, πραγματοποιείται με τρεις τρόπους. Ο πρώτος τρόπος αφορά τη σύνδεση των πολυριβωσωμάτων στα mRNA που φέρουν 5'καλύπτρα (98) για τον οποίο έχει γίνει λόγος στη προηγούμενη παράγραφο. Ο δεύτερος τρόπος σχετίζεται με την δράση του παράγοντα YB-1 (Y-Box Binding Protein 1). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι ο YB-1 του οποίου η μετάφραση επάγεται από το mTOR, ενισχύει την μετάφραση του mRNA του HIF-1α δεσμευόμενος στην 5'-UTR του υπό μετάφραση mRNA προωθώντας την μετάσταση σε καρκινικά κύτταρα σαρκώματος (99). Ο τρίτος μηχανισμός αφορά τον ρόλο των θέσεων IRES (Internal Ribosome Entry Site). Οι θέσεις αυτές αποτελούν cis ρυθμιστικά στοιχεία στην 5'-UTR των μεταγράφων και οι οποίες επιτρέπουν την μετάφρασή των mRNA, ανεξάρτητα του μηχανισμού έναρξης της μετάφρασης που εξαρτάται από την 5'καλύπτρα (5'cap dependent translation) . Παρά το γεγονός ότι η υποξία αποτελεί ερέθισμα που οδηγεί σε καθολική παύση της πρωτεϊνσύνθεσης μέσω της οδού του mTOR, το mRNA του HIF-1α (μεταξύ άλλων) συνεχίζει να μεταφράζεται μέσω της χρήσης των IRES (100, 101).

1.1.4. Ρύθμιση μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

1.1.4.1. Φωσφορυλίωση

Ο HIF-1α δέχεται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η S-νιτροσυλίωση, η ουβικιτινίωση, η σουμοϋλίωση, με ιδιαίτερα σημαντική τη φωσφορυλίωση (102). Ένα από τα επίπεδα ρύθμισης του HIF-1α περιλαμβάνει τον έλεγχο της σταθερότητάς του, του ετεροδιμερισμού του με τον ARNT, της μεταγραφικής του ενεργότητας, του υποκυτταρικού του εντοπισμού, καθώς και της αλληλεπίδρασής του με της πρωτεΐνες και την χρωματίνη, μέσω της φωσφορυλίωσης.

1.1.4.1.1. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στη σταθερότητα του HIF-1α

Συγκεκριμένα, η ρύθμιση της σταθερότητάς του, πραγματοποιείται μέσω της κινάσης GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3) (**Εικόνα 4**). Η εν λόγω κινάση καταλύει τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στα κατάλοιπα Ser551/Ser589 και Thr555, συμβάλλοντας στην καταστροφή του HIF-1α στο πρωτεάσωμα, μέσω ενός μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο από τη δράση των υδροξυλασών προλίνης PHD1-4 και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης pVHL. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση της GSK3 πραγματοποιείται σε συνθήκες μακροχρόνιας υποξίας λόγω της ελάττωσης της δραστηριότητας των κινασών PI3K/AKT (103, 104). Μία άλλη σημαντική κινάση που ονομάζεται ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (**Εικόνα 4**) ρυθμίζει το σύμπλοκο mTOR, μέσω φωσφορυλίωσης του HIF-1α στη Ser696. Η φωσφορυλίωση αυτή αυξάνει την ενεργότητά του σε συνθήκες υποξίας, οδηγώντας στη ρύθμιση του mTOR (105). Η ρύθμιση αυτή περιλαμβάνει την εξαρτώμενη από τον HIF-1α επαγωγή της REDD1, η οποία

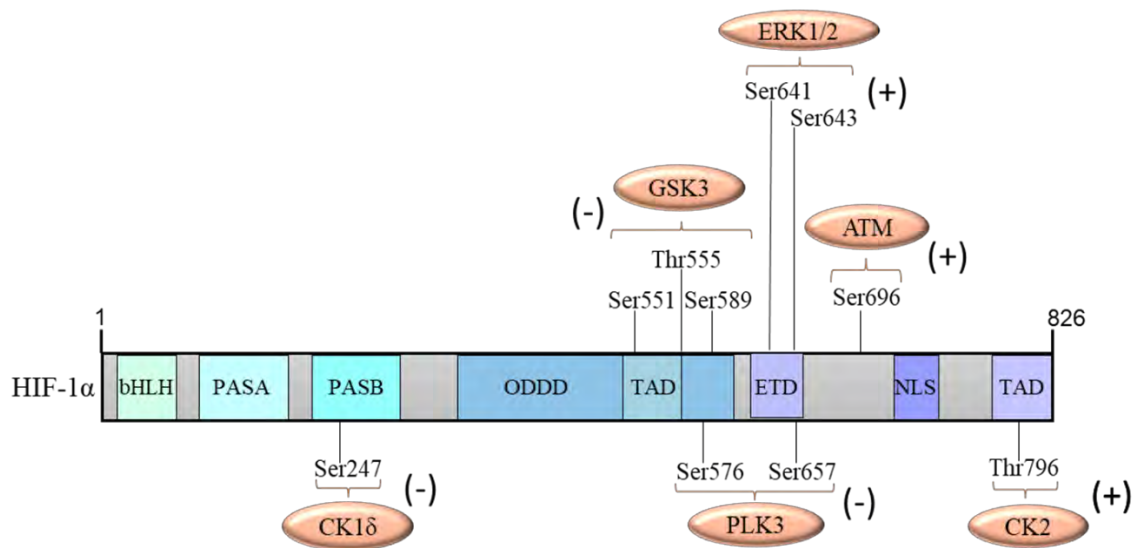
ενεργοποιεί το σύμπλοκο TSC1/TSC2, το οποίο αναστέλλει το mTOR (106). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι η κινάση Plk3 (Polo-like kinase 3) η οποία ρυθμίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στις Ser576/657 (**Εικόνα 4**) και τον οδηγεί σε καταστροφή στο πρωτεάσωμα, με ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από τις PHD1-4 (107). Ακόμα, έχει ανακαλυφθεί πως ο HIF-1 εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και ο έλεγχος αυτός καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών Cdk1 και Cdk2. Οι κινάσες αυτές έχουν την ικανότητα φωσφορυλίωσης του HIF-1α. Η φωσφορυλίωση από την Cdk1 καταλήγει σε σταθεροποίηση του HIF-1α (108), ενώ η φωσφορυλίωση από την Cdk2 οδηγεί τον HIF-1α στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση οδηγώντας σε μετάβαση στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου και σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων που αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας (109). Έχει δείχθει πως σε συνθήκες υποξίας-επανοξυγόνωσης, πυροδοτείται η ενεργοποίηση της κινάσης PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει τον HIF-1α αυξάνοντας τη σταθερότητά του και τη μεταγραφική του δραστηριότητα, προωθώντας την αλληλεπίδραση με τον p300 (115).

1.1.4.1.2. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με τον ARNT

Από προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του Εργαστηρίου Βιοχημείας, ανακαλύφθηκε ότι η κινάση CK1δ (Casein Kinase 1δ) τροποποιεί τον HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης στη Ser247 (**Εικόνα 4**), εντός της επικράτειας ετεροδιμερισμού PAS, και αποδείχτηκε ότι η αλληλεπίδραση με τον ARNT αναστέλλεται (110). Ως εκ τούτου, δείχθηκε ότι η παραπάνω φωσφορυλίωση οδηγεί σε ελάττωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α, καθώς και της εξαρτώμενης από τον HIF-1 επαγωγή της σύνθεσης της λιπίνης-1, της συσσώρευσης λιποσταγονιδίων και της αναπροσαρμογής του μεταβολισμού των λιπιδίων σε συνθήκες στέρησης οξυγόνου (111).

1.1.4.1.3. Επίδραση της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α

Η φωσφορυλίωση του HIF-1α εντός της C-TAD, στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης 796, επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον FIH, ο οποίος φυσιολογικά μέσω υδροξυλίωσης παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και CBP/p300 (112). Έπειτα ανακαλύφθηκε πως η κινάση CK2 (Casein Kinase 2), είναι θετικός ρυθμιστής του HIF-1α. Αρχικά δείχθηκε ότι αποσιώπηση της έκφρασής της οδηγεί σε ελαττωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α (113). Ακολούθως η φωσφορυλίωση στη προαναφερθείσα Thr796 αποδόθηκε στη CK2 (**Εικόνα 4**), η οποία καταστέλλει τον αρνητικό έλεγχο που ασκείται στον HIF-1α από τον παράγοντα FIH, ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την δέσμευση του HIF-1α με τους CBP/p300 (114).



Εικόνα 4: Θετική και αρνητική ρύθμιση του HIF-1α από διάφορες κινάσες. Κινάσες ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη δράση του HIF-1α, μέσω φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να αφορά την σταθερότητα του HIF-1α, τον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT, τη μεταγραφική του ενεργότητα και τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Ενδεικτικά, απεικονίζονται οι κινάσες CK1δ, PLK3 και GSK3 οι οποίες ασκούν αρνητική ρύθμιση, ενώ οι CK2, ATM και ERK1/2 ασκούν θετική.

1.1.4.2. Ρύθμιση της δραστηριότητας και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2

Στην παρούσα διατριβή κεντρικό ρόλο κατέχει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 ή αλλιώς p44/p42 MAPK (Εικόνα 4). Η φωσφορυλίωση αυτή έχει μεγάλη σημασία από πλευράς ρύθμισης του HIF-1α, καθώς επηρεάζει τη μεταγραφική του δραστηριότητα, την αλληλεπίδραση του με τις πρωτεΐνες και τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Η πυροδότηση της σηματοδοτικής οδού που αφορά την εμπλοκή των κινασών ERK1/2, πραγματοποιείται από εξωγενή μόρια τις είναι οι αυξητικοί παράγοντες ή οι κυτοκίνες (115, 116). Η πρόσδεση των εξωγενών σημάτων σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs, Receptor Tyrosine Kinase) οδηγεί στην ενεργοποίηση της GTPάσης Ras. Καθοδικά της οδού, ενεργοποιείται ο σηματοδοτικός καταρράκτης φωσφορυλίωσης από τις κινάσες MAP. Συγκεκριμένα το μονοπάτι ξεκινά με την ενεργοποίηση των κινασών RAF (MAPKKK), οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MEK1/2 (MAPKK), και αυτές με τη φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK1/2 (p44/p42 ή MAPK). Από τις πρώτες έρευνες που οδήγησαν στο χαρακτηρισμό του HIF-1α ως φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη, δείχθηκε τις ότι φωσφορυλιώνεται *in vivo* από τις κινάσες MAP και ειδικά από τις ERK1/2. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι οι p38 και JNK συγκαταλέγονται τις κινάσες MAPK δεν φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α (117).

Η άμεση φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφικής του δράσης. Η απενεργοποίηση των MEK με την αξιοποίηση ειδικών αναστολέων (PD98059 και U0126) βοήθησε σημαντικά στη μελέτη της ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2 (118). Παλαιότερα ερευνητικά δεδομένα του Εργαστηρίου Βιοχημείας επιβεβαίωσαν τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2. Τις, κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 στα αμινοξέα σερίνης τις θέσεις 641 και 643 (Ser641/Ser643) του HIF-1α (34). Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι προσθήκη του αναστολέα PD98059 ή υπερέκφραση μεταλλαγμάτων του HIF-1α στα οποία καταργούνται οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (αντικατάσταση των Ser641/Ser643 με αλανίνες, SA) προκάλεσαν την αναστολή της συσσώρευσης του HIF-1α στον πυρήνα και την ελάττωση στα επίπεδα της μεταγραφικής του δράσης σε σύγκριση με τον αγρίου τύπου HIF-1α (Wild type, WT). Προσθήκη της ουσίας λεπτομυκίνη Β (LMB), η οποία αναστέλλει την CRM-1 (exportin 1), είχε ως αποτέλεσμα την συγκράτηση του HIF-1α στον πυρήνα, παράλληλα με την μερική ανάκτηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α. Έτσι, τα δεδομένα αυτά υποστήριζαν ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση του HIF-1α στον πυρήνα, μέσω παρεμπόδισης της εξαρτώμενης από την CRM1 εξόδου του στο κυτταρόπλασμα (34) (Εικόνα 5).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της αυτόνομου υδρόφοβου NES (⁶³²MEDIKILI⁶³⁹) γειτονικά των σερινών 641/643. Σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση των αμινοξέων ισολευκίνης τις θέσεις 635, 637 και 639 σε αλανίνες (μετάλλαγμα HIF-1α IA), έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, ακόμα και όταν παράλληλα καταργούνται και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (διπλό μετάλλαγμα HIF-1α IA/SA). Όταν στα κύτταρα υπερεκφράστηκε ο HIF-1α που φέρει φωσφομιμητική μετάλλαξη (μίμηση φωσφορυλίωσης λόγω φορτίου) με αντικατάσταση της σερίνης 641 σε γλουταμινικό οξύ (μετάλλαγμα HIF-1α SE), είχε ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση του εντός πυρήνα και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας τις και στη περίπτωση του αγρίου τύπου HIF-1α. Επιπλέον, ο HIF-1α SE παρέμεινε ανεπηρέαστος από τη δράση των αναστολέων των ERK1/2. Για να διερευνηθεί παραπάνω η επικράτεια που περιέχει τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 και το σήμα πυρηνικής εξόδου (NES) και η οποία χαρακτηρίστηκε ως ETD (ERK Targeted Domain, αμινοξέα 616-658), παράχθηκε ως ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είτε στη μορφή αγρίου τύπου, είτε με τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 ή/και το NES. Η υπερέκφραση της μορφής ETD αγρίου τύπου σε καρκινικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας, είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του εντοπισμού στον πυρήνα και της μεταγραφικής δράσης του ενδογενούς HIF-1α. Ωστόσο, η επίδραση από την υπερέκφραση του

ETD-SA στη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς HIF-1α ήταν ανύπαρκτη, με τον εντοπισμό του τελευταίου να παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, αποδείχθηκε ότι η έξοδος των πεπτιδίων ETD από τον πυρήνα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τις CRM1 με το NES, ενώ η αλληλεπίδραση αυτή ρυθμίζεται από τη κατάσταση φωσφορυλίωσης των θέσεων σερίνης 641 και 643 από τις ERK1/2 που εντοπίζονται παραπλεύρως του πυρηνικού σήματος εξαγωγής (33).

Επιπλέον είναι γνωστό πως διάφορα φλαβονοειδή μπορούν να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του μονοπατιού των κινασών MAPK και να προκαλέσουν αναστολή της φωσφορυλίωσης και της ενεργότητας του HIF-1α (119). Δεδομένης της σημασίας του μονοπατιού των κινασών MAPK και του HIF-1 στην ανάπτυξη του ηπατοκαρκινώματος, εξετάστηκε η επίδραση του φλαβονοειδούς καμφερόλη στην ανάπτυξη κυττάρων ηπατοκαρκινώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν την αναστολή του μονοπατιού των κινασών MAPK, την επακόλουθη πυρηνική έξοδο του HIF-1α, την ελαττωμένη ενεργότητά του, την αδυναμία επιβίωσης των κυττάρων (120) καθώς και αναπροσαρμογή του μεταβολισμού τους σε συνθήκες υποξίας (70). Επιπροσθέτως, βρέθηκε ότι οι ERK1/2 ρυθμίζουν τον εντοπισμό και τη μεταγραφική δράση του HIF-2α, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που ισχύει στη περίπτωση του HIF-1α, γεγονός που φανερώνει τη σημασία του για τη προσαρμογή των κυττάρων σε καταστάσεις στέρησης οξυγόνου (32).

Σε συνέχεια της προηγούμενης έρευνας του Εργαστηρίου Βιοχημείας παρήχθησαν πεπτίδια της επικράτειας ETD σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag στο καρβοξυτελικό άκρο και με τμήμα της πρωτεΐνης TAT στο αμινοτελικό, με σκοπό τη χρήση τους ως πεπτιδικούς αναστολείς της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2. Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία προέρχεται από τον ιό HIV προσέδωσε στα πεπτίδια την ιδιότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχονται στα κύτταρα, όταν προστίθενται στο θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Τα πεπτίδια, εκτός από το μετάλλαγμα SA παρουσίασαν πυρηνικό εντοπισμό και εξειδικευμένα ανταγωνίστηκαν τον ενδογενή HIF-1α, οδηγώντας τον από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, καταλήγοντας σε ελάττωση της μεταγραφικής του δράσης ως αναστολείς. Δεδομένου ότι το πεπτίδιο ETD-SE (φωσφομιμητικό μετάλλαγμα) μπορεί να ανταγωνιστεί τον ενδογενή HIF-1α αλλά το ίδιο δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, δείχνει ότι ο ανταγωνισμός αυτός διαμεσολαβείται μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου της φωσφορυλίωσης από τις παραπάνω κινάσες (121).

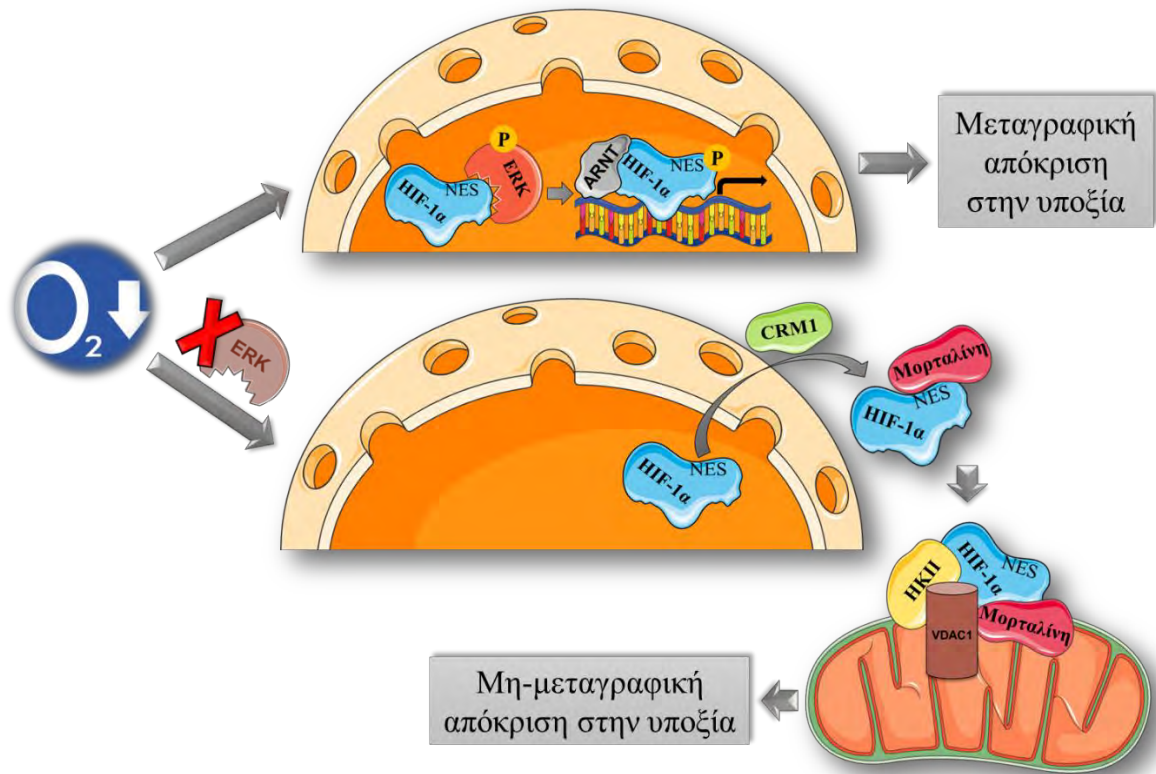
Στην πορεία ανακαλύφθηκε ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2, καθώς και φωσφομιμητικές μεταλλάξεις έχουν αρνητική επίδραση στην ενδοπυρηνική κινητικότητα του HIF-1α, υποδεικνύοντας ότι ο φωσφορυλιωμένος HIF-1α συνδέεται ισχυρά στη χρωματίνη. Έτσι, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη νουκλεοφοσμίνη (NPM1) αλληλεπιδρά

ειδικά με το μετάλλαγμα ETD-SE. Ακόμα δείχθηκε ότι σε συνθήκες υποξίας η NPM1 συνεντοπίζεται με τον HIF-1α σε συνθήκες ενεργοποίησης των ERK1/2 (122).

1.1.4.2.1. Χρήση πεπτιδίων της επικράτειας ETD για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση από τις ERK1/2

Τέλος, σε προηγούμενη δουλειά του Εργαστηρίου Βιοχημείας, προκειμένου να αναζητηθούν αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με νέες πρωτεΐνες, οι οποίες να εξαρτώνται από τη κατάσταση φωσφορυλίωσής του από τις ERK1/2, ανασυνδυασμένα τμήματα της επικράτειας ETD αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων SA και SE χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκατακρήμιση πρωτεϊνών από καρκινικά κύτταρα HeLa. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία μίας ζώνης στα 75 kDa, η οποία ανιχνεύεται εξειδικευμένα στη συνθήκη που έχει χρησιμοποιηθεί ως δόλωμα συγκατακρήμισης το μετάλλαγμα ETD SA. Μέσω φασματοσκοπίας μαζών ταυτοποιήθηκε πως πρόκειται για την πρωτεΐνη μορταλίνη η οποία δεν έχει συσχετιστεί προηγουμένως με το μονοπάτι της υποξίας και του HIF-1 (Εικόνα 5). Μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμισης, δείχθηκε ότι σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και αναστολής του μονοπατιού που εμπλέκονται οι κινάσες ERK1/2 (προσθήκη αναστολέα U0126), η αλληλεπίδραση της μορταλίνης με τον HIF-1α ήταν πιο ισχυρή με τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η μορταλίνη συνεντοπίζεται με τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α εκτός πυρήνα και ότι σε συνθήκες αναστολής του μονοπατιού των MAPK, είτε χρησιμοποιώντας τον αναστολέα U0126, είτε μέσω στέρησης ορού από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, ο HIF-1α εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Ακόμα, χρησιμοποιώντας τον αναστολέα LMB συνδυαστικά με στέρηση ορού, δείχθηκε ότι ο μη φωσφορυλιωμένος HIF-1α συγκρατείται στον πυρήνα σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου όπου εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Το τελευταίο εύρημα δείχνει ότι η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 έχει ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση του στον πυρήνα και την παρεμπόδιση της εξαρτώμενης από την CRM1 εξαγωγής από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε μη καρκινικά πρωτογενή λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας κουνελιού (RTSM, Rabbit Tracheal Smooth Muscle), γεγονός που καταδεικνύει ότι ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του HIF-1α σε συνθήκες που οι ERK1/2 είναι ανενεργές δεν είναι μοναδική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Υπερεκφράζοντας σε κύτταρα τόσο τον πλήρους μεγέθους HIF-1α, όσο και την ETD στις μορφές αγρίου τύπου (WT) και SA αποδείχθηκε πως: α. οι πρωτεΐνες HIF-1α-SA και ETD-SA εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και β. οι HIF-1α-WT και ETD-WT είναι πυρηνικές, αλλά παρουσία U0126 συνεντοπίζονται με τα μιτοχόνδρια. Ακολούθως, δείχθηκε μέσω πειραμάτων βιοχημικής κλασμάτωσης σε κύτταρα στα οποία έχει προηγηθεί αποσιώπηση της έκφρασης της ενδογενούς μορταλίνης, η μείωση των επιπέδων του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α στο μιτοχονδριακό

κλάσμα και η ταυτόχρονη ανάκτησή του στο κυτταρόπλασμα, υποδεικνύοντας το ρόλο της μορταλίνης στη μιτοχονδριακή του στόχευση. Μέσω πειραμάτων διαπερατοποίησης της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις διγιτονίνης, δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α με τη μορταλίνη πραγματοποιείται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Εν συνεχεία, είτε αποσιωπώντας την έκφραση του ενδογενούς μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α, είτε προκαλώντας ανταγωνισμό της σύνδεσής του με τη μορταλίνη (υπερεκφράζοντας το μετάλλαγμα ETD-SA) προέκυψε: α. η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από 48 και 72 ώρες, β. η μείωση της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεολυμένης μορφής του VDAC1 (VDAC-1-ΔC), γ. η αύξηση των επιπέδων της ενεργής πρωτεολυμένης κασπάσης 3 στο κυτταρόπλασμα και δ. η αύξηση της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7. Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών μεταλλαγμάτων (SA, SE) της καρβοξυτελικής περιοχής του HIF-1α καθώς και της ETD στα επίπεδα της δραστηριότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7, σε συνθήκες νορμοξίας, υπό συνθήκες στρες. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η ETD-SA ενώ συνδέεται στα μιτοχόνδρια και αλληλεπιδρά με τη μορταλίνη, αδυνατεί από μόνη της να προστατεύσει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται εξωγενώς με τη χρήση χημειοθεραπευτικών όπως είναι το ετοποσίδιο ή η δοξορουβικίνη. Σε αντίθεση, η παρουσία της καρβοξυτελικής περιοχής του HIF-1α στη μορφή SA οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της ενεργότητας των κασπασών 3 και 7 συγκριτικά με τις μορφές SE και αγρίου τύπου, ύστερα από επώαση με ετοποσίδιο ή δοξορουβικίνη, αναστέλλοντας πιο αποτελεσματικά την έναρξη της απόπτωσης. Τέλος, στο πλαίσιο διερεύνησης του μηχανισμού αντι-αποπτωτικής δράσης του HIF-1α, δείχθηκε μέσω πειραμάτων βιοχημικής κλασμάτωσης και ανοσοκατακρήμνισης (σε υποξία και σε συνθήκες απενεργοποίησης της οδού των MAPK) ότι ο HIF-1α βρίσκεται σε σύμπλοκο με HKII και VDAC1 οι οποίες είναι πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης (35).



Εικόνα 5: Ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2. (Πάνω σχήμα) Σε συνθήκες ελλιπούς συγκέντρωσης οξυγόνου (υποξία, 1% O₂) και ενεργοποίησης των ERK1/2, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται στις θέσεις S641 και S643, γεγονός που οδηγεί στη συγκράτηση του στον πυρήνα, στον ετεροδιμερισμό του με τον ARNT και στην επακόλουθη ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων από το σύμπλοκο HIF-1α/ARNT. (Κάτω σχήμα) Σε συνθήκες υποξίας και απενεργοποίησης των ERK1/2, ο μη φωσφορυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την εξπορτίνη CRM1 μέσω της οποίας εξάγεται εκτός πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη μορταλίνη, η οποία διαμεσολαβεί τη στόχευσή του στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου συμμετέχει στη δημιουργία ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου με τις πρωτεΐνες HKII και VDAC1, το οποίο οδηγεί σε αναστολή της έναρξης της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα.

1.1.5. Μεταγραφικές και μη μεταγραφικές δράσεις του HIF-1

1.1.5.1. Μεταγραφικές δράσεις

Η βασική λειτουργία των HIF αφορά κυρίως στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα θα ενεργοποιήσουν την απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες στέρησης οξυγόνου. Όπως έχει αναλυθεί ενδελεχώς σε προηγούμενες ενότητες, τα κύρια βήματα για τη λειτουργία των HIF είναι σε πρώτη φάση η σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1α σε συνθήκες υποξίας και η είσοδος της στον πυρήνα ώστε να ετεροδιμεριστεί με τη βοήθεια των επικρατειών PAS, με την υπομονάδα HIF-1β (ARNT). Το μεταγραφικά ενεργό και λειτουργικό σύμπλοκο του HIF-1 είναι ικανό να δεσμεύεται στο DNA μέσω της επικράτειας bHLH και να αναγνωρίζει συγκεκριμένα ρυθμιστικά γενετικά στοιχεία στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του. Τα στοιχεία αυτά καλούνται στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia

Response Elements, HREs) και περιέχουν την συντηρημένη αλληλουχία 5'-RCGTG-3', όπου μία πουρίνη η οποία συμβολίζεται με R ακολουθείται από την νουκλεοτιδική αλληλουχία CGTG. Ο εντοπισμός των HRE μπορεί να ποικίλλει από γονίδιο σε γονίδιο, με την έννοια ότι πολλά από αυτά βρίσκονται τόσο σε υποκινητές πλησίον του σημείου έναρξης της μεταγραφής, ενώ μια άλλη ομάδα εντοπίζεται σε απομακρυσμένους ενισχυτές, τόσο ανοδικά, όσο και καθοδικά του εκάστοτε γονιδίου (123). Επίσης, το πρώτο HRE που προσδιορίστηκε με το μοτίβο 5'-RCGTG-3', ήταν στον ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), γεγονός που οδήγησε στον καθαρισμό και στην ταυτοποίηση του HIF-1 (124, 125).

Είναι γνωστό πως η βασική νουκλεοτιδική αλληλουχία που αποτελεί τον πυρήνα του HRE, παρουσιάζεται με μεγάλη συχνότητα στο γονιδίωμα των θηλαστικών και συγκεκριμένα πολύ πιο συχνά από τα πραγματικά λειτουργικά στοιχεία στα οποία δεσμεύονται οι HIF. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη λειτουργικότητα ενός HRE, δεν έχουν προσδιοριστεί με σαφήνεια. Πρόσφατες μελέτες συνηγορούν στο γεγονός ότι επιγενετικές τροποποιήσεις στον πυρήνα του HRE, παράπλευρες αλληλουχίες, αλληλουχίες σύνδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων και ο τύπος του κυττάρου ίσως να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, αναφορικά με την ειδικότητα και τη λειτουργικότητα ενός στοιχείου απόκρισης στην υποξία (81). Επιπροσθέτως, η εξαρτώμενη από μεθυλοτρανσφεράσες του DNA, μεθυλίωση του πυρήνα του HRE στο δινουκλεοτίδιο -CG-είναι ικανή να αναστείλει τη λειτουργικότητά του (126, 127).

Αν και ο πυρήνας του HRE αποτελεί κατά βάση την ελάχιστη αλληλουχία που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του HIF-1, δεν είναι αρκετό για να πυροδοτήσει την έναρξη της μεταγραφής. Έχει δειχθεί ότι απαιτούνται παρακείμενες αλληλουχίες που αποτελούν θέσεις δέσμευσης συμπαραγόντων της μεταγραφής των HIF όπου μπορούν να υποβοηθούν τη δράση του είτε άμεσα, είτε έμμεσα (128).

Μελέτες κατέδειξαν τη μεγάλη σημασία δύο συμπαραγόντων του HIF-1, που ονομάζονται CBP (CREB Binding Protein) και p300. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και με τις δύο επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης του HIF-1, δηλαδή και με την N-TAD και την C-TAD. Η φυσιολογική λειτουργία του p300/CBP είναι η ρύθμιση της δομής της χρωματίνης μέσω ακετυλίωσης των ιστονών ή άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγραφή, μέσω της δράσης ακετυλο-τρανσφεράσης που διαθέτει. Ο CBP/p300 στρατολογείται στη χρωματίνη αφού πρώτα κάνει σύμπλοκο με τον HIF-1α και μπορεί να δρα είτε προωθώντας τη μεταγραφή, είτε δρώντας σαν σκαλωσιά η οποία συνδέει μεταξύ τους πολλούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης έχουν βρεθεί πολλές πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν θετικά (SRC-1, MUC1, PKA, FABP5, PCAF) αλλά και αρνητικά (FIH-1, SIRT1, CITED2, FHL2, FGFR2, EAF2) την αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και CBP/p300. Επίσης, πολλές άλλες πρωτεΐνες

έχουν βρεθεί ότι ελέγχουν και ρυθμίζουν με αυστηρό τρόπο, την έναρξη της μεταγραφής από τον HIF-1. Σε αυτές ανήκουν ένζυμα που καταλύουν μεθυλίωση και απομεθυλίωση καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις, ένζυμα αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης καθώς και συμπράγοντες του συστήματος μεταγραφής όπως είναι το σύμπλοκο CDK8/Mediator (128).

Τα τελευταία δέκα χρόνια πλήθος ερευνών συσχετίζουν την ελεγχόμενη από τον HIF-1 μεταγραφική απόκριση σε συνθήκες υποξίας, με περιοχές χρωματίνης οι οποίες είναι διαθέσιμες και προσβάσιμες για δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων που θα πυροδοτήσουν την έναρξη της μεταγραφής (129). Ωστόσο, πολλές ομάδες ερευνητών υποστηρίζουν ότι σε αυτές τις «ανοιχτές» περιοχές χρωματίνης, η RNA πολυμεράση II, βρίσκεται ήδη στο σημείο έναρξης της μεταγραφής σε ενεργή κατάσταση, αλλά σε παύση. Ακόμα αποδείχθηκε, ότι το σύμπλοκο CDK8/Mediator είναι απαραίτητο για την έναρξη της επιμήκυνσης του μεταγράφου από την RNA πολυμεράση II. Επιπλέον, η δέσμευση του HIF-1, ευνοεί την αλληλεπίδραση της CDK8 με την RNA πολυμεράση II για να εκτελέσει η πρώτη τη λειτουργία της (130-133).

Ένα μη συμβατικό παράδειγμα της μεταγραφικής δράσης του HIF-1α αφορά το μονοπάτι του υποδοχέα Notch. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί η διασταυρούμενη επικοινωνία των μονοπατιών του υποδοχέα Notch και αυτού της υποξίας-HIF-1α. Ανακαλύφθηκε ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch (προκύπτει από τη δράση της γ-σεκρετάσης που είναι το ένζυμο που πρωτεολύει το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch) σε συνθήκες υποξίας, οδηγεί στη στρατολόγηση του HIF-1α σε υποκινητές γονιδίων-στόχων που αποκρίνονται στη δράση του Notch, καταλήγοντας στην παρεμπόδιση της διαφοροποίησης νευρικών και μυϊκών κυττάρων (134).

1.1.5.2. Μη μεταγραφικές δράσεις

Εκτός από τις βασικές μεταγραφικές δράσεις του HIF-1, έχουν δειχθεί μη γενωμικές δράσεις του, εκτός των ορίων του πυρήνα. Με τον όρο «μη γενωμικές δράσεις» εννοούνται οι λειτουργίες του HIF-1α που δεν σχετίζονται με τη δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα και η οποία είναι ανεξάρτητη από τη δέσμευση στο DNA και την ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Πρώτον, έχει δειχθεί πως ο HIF-1α σε συνθήκες υποξίας μπορεί να δεσμευθεί άμεσα με την πρωτεΐνη Cdc6 (Cell Division Cycle 6) και να διευκολύνει την αλληλεπίδρασή της με το σύμπλοκο MCM (Minichromosome Maintenance) που έχει δράση ελικάσης του DNA. Παρόλο που η αλληλεπίδραση Cdc6-MCM οδηγεί σε αύξηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών του συμπλόκου MCM με τη χρωματίνη, η δέσμευση του HIF-1α στο σύμπλοκο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσής του και της ενεργοποίησής του από την κινάση Cdc7. Το αποτέλεσμα είναι η αναστολή της έναρξης της αντιγραφής του DNA και η άρση της προόδου

του κυτταρικού κύκλου (135). Δεύτερον, έχει δειχθεί ένας άλλος μη μεταγραφικός ρόλος του HIF-1α που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση του με τη πρωτεΐνη μορταλίνη, η οποία διαμεσολαβεί τη στόχευση του στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και απενεργοποίησης των ERK1/2. Η στόχευση του HIF-1α στα μιτοχόνδρια μέσω της μορταλίνης, καταλήγει στην αλληλεπίδραση του και με άλλες δύο πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων την εξοκινάση II (HK2) και τον τασεο-εξαρτωμένο διάυλο ανιόντων VDAC1. Το σύμπλοκο αυτό προστατεύει κύτταρα HeLa από την απόπτωση που επάγεται από χημειοθεραπευτικά μέσα, όπως είναι το ετοποσίδιο ή η δοξορουβικίνη (35).

1.2. Υποξία, HIF-1 και μιτοχόνδρια

Η αποτελεσματική μεταφορά του οξυγόνου αποτελεί μια βασική συνθήκη για την αερόβια αναπνοή των κυττάρων και επομένως για την παραγωγή ATP (136). Η διαδικασία σύνθεσης του ATP, πραγματοποιείται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Σε συνθήκες υποξίας η αναπροσαρμογή του μεταβολισμού, στρέφει τη μεταβολική ροή προς την αναερόβια οδό και τα μιτοχόνδρια είναι τα πρώτα οργανίδια, τα οποία επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την υποξία (137).

Έχει δειχθεί πως ο HIF-1α επάγει το ένζυμο PDK1. Φυσιολογικά η PDK1 φωσφορυλιώνει την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH, Pyruvate dehydrogenase) οδηγώντας σε αναστολή της δραστηριότητάς της. Ο ρόλος της PDH είναι η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA, το οποίο τροφοδοτεί με τη σειρά του τον κύκλο του Krebs. Συνεπώς, η εξαρτώμενη από την PDK1 φωσφορυλίωση της PDH, οδηγεί σε αναστολή της έναρξης του κύκλου του Krebs και κατά συνέπεια της οδού που οδηγεί στην αναπνευστική αλυσίδα-οξειδωτική φωσφορυλίωση και στην αερόβια παραγωγή ATP, μέσω των μιτοχονδρίων. Η υπερέκφραση της PDK1 σε κύτταρα που έχει προηγηθεί αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων ATP, μειωμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αναστολή της επαγόμενης από την υποξία απόπτωσης (138, 139). Επιπλέον, η επίδραση του HIF-1α στην αναπροσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού περιλαμβάνει τις συζευγμένες διαδικασίες αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω τροποποίησης του συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας που έχει δράση οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX4-1 σε COX4-2) (64).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αποτελούν ένα παραπροϊόν από την λειτουργία αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια και εξουδετερώνονται μέσω των μηχανισμών της κυτταρικής αντιοξειδωτικής άμυνας, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή κυτταρική λειτουργία (139). Κατά τα αρχικά στάδια της υποξίας παράγονται ROS λόγω της

δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα οποία με την σταθεροποίηση του HIF-1α και την επακόλουθη ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων του, εξουδετερώνονται (136). Συγκεκριμένα, σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και σε συνθήκες υποξίας, η ενεργοποίηση του άξονα σηματοδότησης των πρωτεϊνών OMA1-OPA1, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια, τα οποία σταθεροποιούν τον HIF-1α, ευνοώντας τη στροφή προς την αναερόβια γλυκόλυση (140). Άλλες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231) έδειξαν ότι η αναστολή του mTOR μέσω της ουσίας καρδαμομίνης, οδήγησε σε αναστολή της έκφρασης του HIF-1α, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ROS, που οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (141). Άλλες ερευνητικές ομάδες απέδειξαν σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος την εξαρτώμενη από τον HIF-1 μείωση της έκφρασης του γονιδίου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD2) σε συνθήκες υποξίας, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες πειραματικές παρατηρήσεις (142). Επίσης σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231 και SUM-149) παρατηρήθηκε η εξαρτώμενη από τον HIF-1 αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης, μέσω της επαγωγής του γονιδίου της GCLM (Glutamate Cysteine Ligase) (143).

Βιβλιογραφικές μελέτες καταδεικνύουν την επίδραση της υποξίας στην κατανομή και στη δυναμική των μιτοχονδρίων. Η μιτοχονδριακή κατανομή και δυναμική ρυθμίζεται από μία ισορροπία μεταξύ δύο αντίθετων διαδικασιών, που είναι η μιτοχονδριακή σχάση και η μιτοχονδριακή σύντηξη (mitochondrial fission and fusion). Στο πλαίσιο αυτών των διαδικασιών τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς απομάκρυνσης των ελλατωματικών μιτοχονδρίων, εξασφαλίζοντας έτσι υγιείς πληθυσμούς μιτοχονδρίων (139). Μεταξύ αυτών των μηχανισμών, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η μιτοφαγία, που είναι μία επιλεκτική μορφή αποικοδόμησης των μιτοχονδρίων, μέσω αυτοφαγίας (144). Έχει δειχθεί πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής σύντηξης, ώστε να διαφεύγουν του κυτταρικού θανάτου. Συγκεκριμένα η αναστολή της μιτοφουσίνης-1 (MFN-1, mitofusin-1), που αποτελεί γονίδιο-στόχο του HIF-1 και παίζει ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας της σύντηξης των μιτοχονδρίων, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σωληνοειδούς δικτύου μιτοχονδρίων (145). Έχουν βρεθεί και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εξαρτώμενη από την υποξία ρύθμιση της δυναμικής των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ρύθμιση της πρωτεΐνης AKAP121 (mitochondrial scaffolding protein A-kinase anchor protein 1) από την λιγάση ουβικιτίνης SIAH2 σε συνθήκες υποξίας. Η AKAP121 ρυθμίζει τη δυναμική των μιτοχονδρίων μέσω της εξαρτώμενης από την PKA ανασταλτικής φωσφορυλίωσης της Drp1 (dynamin-related protein 1) και της ανεξάρτητης από την PKA αναστολής της αλληλεπίδρασης Drp1-FIS1 (fission 1 protein). Παρουσία της SIAH2, τα επίπεδα της AKAP121 μειώνονται, γεγονός που οδηγεί σε

ενεργοποίηση της Dtp1 και αλληλεπίδραση της με την FIS1 για προώθηση της μιτοχονδριακής σχάσης (146). Ακόμα, μελέτες κατέδειξαν ότι η εξαρτώμενη από τον HIF-1α επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα MXI-1, οδηγεί στην μείωση της έκφρασης της PGC-1α από το C-MYC, καταλήγοντας στην αναστολή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (147).

Όπως προαναφέρθηκε η μιτοφαγία είναι σημαντική στην εκκαθάριση μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί βλάβες και συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (148). Ο ρόλος της μιτοφαγίας στον καρκίνο είναι διφορούμενος, καθώς έχει δειχθεί τόσο ότι μπλοκάρει, όσο και ότι ευνοεί την πρόοδο της καρκινογένεσης (149). Επίσης μελέτες αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ υποξίας και μιτοφαγίας καθώς και το ρόλο που διαδραματίζει στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πράγματι οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μιτοφαγία όπως ο BNIP3L, NIX, BNIP3 και FUNDC1, υπερεκφράζονται ως απόκριση στην υποξία, στον καρκίνο (150-152), ενώ οι BNIP3 και NIX αποτελούν και γονίδια-στόχους του HIF-1. Σε άλλη μελέτη, ανακαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη E2F3d, εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προωθώντας τη μιτοφαγία ύστερα από έκθεση καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (153).

Πολλές από τις επιδράσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία στο πλαίσιο επίδρασης της υποξίας ή/και του HIF-1α στους μηχανισμούς που διέπουν τη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων και αντίστροφα, σχετίστηκαν με προώθηση ή αναστολή του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης σε διάφορα είδη καρκίνου, δεδομένου και του γεγονότος ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν το βασικό οργανίδιο για την ενδογενή οδό της απόπτωσης.

1.3. Ο HIF-1 και οι κυτταρικοί μηχανισμοί απόπτωσης

1.3.1. Η απόπτωση ως είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Η απόπτωση αποτελεί ένα πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο αυστηρών ρυθμιστικών κυκλωμάτων, που συντονίζουν την απομάκρυνση περιττών ή εν δυνάμει κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη σε έναν οργανισμό (154). Η απόπτωση είναι ένα μέσο για τη γενική διατήρηση της κυτταρικής και της συστημικής ομοιοστασίας και αποτελεί ένα, μεταξύ πολλών τρόπων, κυτταρικού θανάτου. Ειδικότερα, κατηγοριοποιείται ως είδος κυτταρικού θανάτου τύπου 1 (type 1 cell death) και προσδιορίζεται βάση συγκεκριμένων κυτταρικών μορφολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με το εκάστοτε στάδιο κατά το οποίο εξελίσσεται η διαδικασία. Η δημιουργία κυστιδίων με τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης (membrane blebbing), η συρρίκνωση του κυττάρου, η συμπύκνωση και ο κατακερματισμός της χρωματίνης, συνοδεύουν και χαρακτηρίζουν την διεργασία της απόπτωσης. Ένας άλλος τύπος κυτταρικού θανάτου είναι η διαδικασία της νέκρωσης. Η

νέκρωση χαρακτηρίζεται ως είδος κυτταρικού θανάτου τύπου 3 (type 3 cell death) και σε αντιδιαστολή με την απόπτωση, εκδηλώνεται είτε από τυχαίο τραύμα είτε από κάποιο άλλο επιζήμιο εξωτερικό ερέθισμα και οδηγεί σε διόγκωση των οργανιδίων και του ίδιου του κυττάρου, πρόωμη ρήξη της κυτταρική μεμβράνης και διαρροή κυτταρικού υλικού στην εξωκυττάρια μήτρα και στους παρακείμενους ιστούς με επακόλουθη την πρόκληση φλεγμονής (155).

1.3.2. Οδοί απόπτωσης: το εξωγενές και το ενδογενές/μιτοχονδριακό μονοπάτι

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η απόπτωση αποτελεί ένα από τα διάφορα είδη κυτταρικού θανάτου. Στην απόπτωση το κύτταρο μέσω ενός αυστηρά ρυθμιζόμενου σηματοδοτικού κυκλώματος που περιλαμβάνει διάφορους μοριακούς παίκτες, ελέγχει την αυτοκαταστροφή του, ώστε να διατηρήσει τη γενική κυτταρική ομοιοστασία. Όταν η απόπτωση ξεκίνησε να μελετάται, τα κριτήρια με βάση τα οποία χαρακτηρίστηκε ως κυτταρική διεργασία αφορούσαν κυρίως τις μορφολογικές αλλαγές που συντελούνταν σε κυτταρικό επίπεδο. Ωστόσο στην πορεία, η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο αποτέλεσε πιο ισχυρό και ασφαλές κριτήριο για τον πλήρη προσδιορισμό της απόπτωσης σε μοριακό επίπεδο (154, 156). Έτσι σε μοριακό επίπεδο, η απόπτωση κατηγοριοποιείται σε δύο βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι το εξωγενές και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό. Τα δύο μονοπάτια ενεργοποιούν διαφορετικές εναρκτήριες κασπάσες, αλλά συγκλίνουν στο επίπεδο ενεργοποίησης των εκτελεστικών κασπασών. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες με πολύ εξειδικευμένη δράση και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Οι κασπάσες, κόβουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μόνο μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος. Υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα υπό μορφή πρόδρομων ενζύμων και στο ενεργό τους κέντρο, φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη (156).

Ο όρος «εξωγενές» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την πρόκληση αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, ο οποίος πυροδοτείται από την πρόσδεση εξωκυττάρων σημάτων σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι αισθάνονται και μετάγουν το σήμα εντός του κυττάρου. Οι εξωκυττάρια προσδέτες ανήκουν στην κατηγορία των προσδετών θανάτου (death ligands), οι οποίοι συνδέονται σε αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου (death receptors). Οι πιο καλά μελετημένοι προσδέτες είναι οι FASL/CD95L (FAS ligand/CD95 ligand), TNF α ή TNF (Tumor Necrosis Factor α), TRAIL ή TNFSF10 (TNF-related apoptosis inducing ligand), οι οποίοι συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς FAS/CD95, TNFR1 (TNF- α receptor 1) και TRAILR 1-2 (TRAIL receptor 1-2). Το κύριο μονοπάτι πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης του FASL και υποδοχέα FAS. Απουσία του FASL, οι υπομονάδες του υποδοχέα FAS συναθροίζονται τυχαία στην κυτταρική μεμβράνη για να δημιουργήσουν τριμερή. Η δέσμευση του προσδέτη

σταθεροποιεί τα τριμερή, επάγοντας ταυτόχρονα αλλαγές στη διαμόρφωσή τους, γεγονός που ευνοεί τη συγκρότηση ενός δυναμικού πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου στο τμήμα του υποδοχέα που βρίσκεται προς τη μεριά του κυτταροπλάσματος. Η δημιουργία του συμπλόκου διαμεσολαβείται από μια συντηρημένη αλληλουχία 80 αμινοξέων που είναι κοινή σε όλους τους υποδοχείς θανάτου και η οποία ονομάζεται επικράτεια θανάτου (DD, Death Domain) (156). Στις πρωτεΐνες που στρατολογούνται περιλαμβάνονται οι RIPK1 (Receptor-interacting protein kinase 1), FADD (Fas-associated protein with a DD) (156), διάφορες ισομορφές του c-FLIP, cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins), E3 λιγάσες ουβικιτίνης και η προ-κασπάση 8 (ή προ-κασπάση 10). Το υπερ-μοριακό σύμπλοκο ονομάζεται σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (DISC, Death-inducing signaling complex) και λειτουργεί ως πλατφόρμα/ικρίωμα που ρυθμίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 (ή 10) (157).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των υποδοχέων TNFR χρειάζονται πρωτεΐνες όπως η TRADD (TNFR-associated DD) για τη στρατολόγηση του FADD και της κασπάσης 8 στο DISC, σε αντίθεση με την περίπτωση των υποδοχέων FAS και TRAILR1/2. Τα προηγούμενα δεδομένα υποδεικνύουν πως υπάρχουν πολλές υπο-ομάδες υποδοχέων θανάτου οι οποίοι διαφοροποιούνται ως προς τις σηματοδοτικές τους ιδιότητες. Με παρόμοιο τρόπο οι επικράτειες θανάτου σε κάποιους υποδοχείς θανάτου, όπως στην περίπτωση του TNFR1, στρατολογούν πρωτεΐνες που δεν υπάρχουν στα σύμπλοκα DISC των υποδοχέων FAS. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες TRAF2 (TNFR-associated factor 2) και TRAF5 (TNFR-associated factor 5).

Σε κάποιους τύπους κυττάρων που ονομάζονται κύτταρα τύπου I (type I cells) και στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα, η κασπάση-8 πρωτεολύει άμεσα και ενεργοποιεί την κασπάση 3 και άλλες εκτελεστικές κασπάσες όπως είναι η κασπάση-7 και η κασπάση-6. Αποτέλεσμα είναι η πυροδότηση της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τις εκτελεστικές κασπάσες, αλλά με έναν τρόπο που δεν αφορά την εμπλοκή των μιτοχονδρίων και άρα το ενδογενές/μιτοχονδριακό μονοπάτι για το οποίο θα γίνει λόγος στη συνέχεια. Από την άλλη σε άλλα κύτταρα όπως ηπατοκύτταρα και β-κύτταρα του παγκρέατος (τύπου II) η κασπάση 8 διαμεσολαβεί την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Bid (BH3-interacting domain death agonist), οδηγώντας στην παραγωγή της tBid (truncated Bid) η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια μέσω της διαπερατοποίησης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (157, 158).

Η ενδογενής σηματοδοτική οδός της απόπτωσης πραγματοποιείται μέσω των μιτοχονδρίων για αυτό και καλείται και μιτοχονδριακό μονοπάτι. Η πυροδότηση της έναρξης μονοπατιού προκύπτει από σήματα ή διάφορα είδη στρες εντός του κυττάρου όπως είναι οι βλάβες στο

DNA, η έλλειψη κυτοκινών και η επίδραση με χημειοθεραπευτικά μόρια. Η επίδραση αυτών των μορίων προκαλεί αλλαγή στη ισορροπία μεταξύ των προ-αποπτωτικών (πρωτεΐνες που προωθούν την απόπτωση) και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών παραγόντων όπως ο Bax (αναλυτικότερα στην ενότητα 1.3.3) που θα διαμεσολαβήσει την διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP, Mitochondrial outer membrane permeabilization) και είναι υπεύθυνος για την εκτελεστική φάση της απόπτωσης (159, 160). Η διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί στη διαρροή διαφορετικών αποπτωτικών μορίων, με πιο σημαντικό το κυτόχρωμα c (161, 162). Αφού το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, δεσμεύεται παρουσία ATP, στον παράγοντα Araf1 (Apoptotic protease activating factor), οδηγώντας στον ολιγομερισμό του και στην προσέλκυση της εναρκτήριας προ-κασπάσης 9. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται ονομάζεται αποπτώσωμα, που είναι μία δομή τύπου ρόδας με επταπλή συμμετρία (sevenfold symmetry). Έπειτα, η προ-κασπάση-9 μεταπίπτει στη ενεργή της μορφή, την κασπάση-9, η οποία μέσω πρωτεόλυσης οδηγεί στην ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7 (163). Ακόμα πρωτεΐνες όπως οι SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases) και HTRA2 (High Temperature Requirement Protein A2) δεσμεύουν τις πρωτεΐνες αναστολής της απόπτωσης (IAPs), επιτρέποντας την ενεργοποίηση τόσο των εναρκτήριων όσο και των εκτελεστικών κασπασών. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί να διακριθεί σε εξαρτώμενο από τις κασπάσες (caspase dependent intrinsic apoptosis) και σε ανεξάρτητο των κασπασών (caspase independent intrinsic apoptosis). Ειδικότερα το μονοπάτι που είναι ανεξάρτητο των κασπασών χαρακτηρίζεται σε μιτοχονδριακό επίπεδο από: α. την διαταραχή του ηλεκτροχημικού δυναμικού $\Delta\psi_m$, β. τη διαρροή πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα, γ. την αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας, δ. τη μείωση της σύνθεσης του ATP και ε. την αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού και ε. την ενεργοποίηση των παραγόντων AIF (Apoptosis Inducing Factor) και ENDOG (Endonuclease G) που μετατοπίζονται στον πυρήνα και διαμεσολαβούν σε μεγάλη κλίμακα τον κατακερματισμό της χρωματίνης (156).

Συνοπτικά, αφού το κύτταρο λάβει το ερέθισμα για την πυροδότηση της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης, υπόκειται σε αποικοδόμηση των οργανιδίων από ενεργές πρωτεολυτικές κασπάσες. Αναλυτικά οι μορφολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα είναι ότι: α. το κύτταρο συρρικνώνεται και γίνεται σφαιρικό, επειδή ο πρωτεϊνικός κυτταροσκελετός του αποδομείται από τις κασπάσες, β. το κυτταρόπλασμα φαίνεται πυκνό και τα οργανίδια συμπυκνωμένα, γ. η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε συμπαγή κομμάτια σε μια διαδικασία γνωστή ως συμπύκνωση (chromatin condensation), δ. ο πυρηνικός φάκελος γίνεται ασυνεχής και το DNA μέσα του

κατακερματίζεται, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως καρυόρηξη, ενώ ο πυρήνας τεμαχίζεται σε πολλά σωμάτια εξαιτίας της καταστροφής του DNA, ε. η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει ανώμαλα εξογκώματα και ζ. το κύτταρο διασπάται σε πολλά κυστίδια, που ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια, τα οποία στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται (156).

1.3.3. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 και η σχέση τους με τη ρύθμιση της απόπτωσης: ο ρόλος της Bax

Η διατήρηση αυστηρού ελέγχου στην κυτταρική ομοιοστασία μέσω της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή αλλιώς απόπτωσης είναι μείζονος σημασίας στην αποφυγή διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως είναι ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 είναι οι κύριοι ρυθμιστές της απόπτωσης. Οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας Bcl-2, ως απόκριση σε ένα αποπτωτικό ερέθισμα, καθορίζει αν θα λάβει χώρα η διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), η οποία θα οδηγήσει στην απελευθέρωση παραγόντων από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα, όπως το κυτόχρωμα c, το οποίο θα σχηματίσει το αποπτώσωμα, που με τη σειρά του θα επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών, καταλήγοντας στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Γενικά, η διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης θεωρείται ως ένα κομβικό σημείο, που μόλις ενεργοποιηθεί δεν υπάρχει δυνατότητα αναστροφής της αποπτωτικής διαδικασίας (164).

Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 αποτελείται από περίπου 20 μέλη, στα οποία συγκαταλέγονται πρωτεΐνες που έχουν είτε προ-αποπτωτική, είτε αντι-αποπτωτική δράση, ταξινομούνται σε τρεις διαφορετικές ομάδες βάση δομής και λειτουργίας και ρυθμίζουν το μονοπάτι της απόπτωσης μέσω των μιτοχονδρίων (165-168). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μελών είναι ότι μοιράζονται μία τουλάχιστον κοινή επικράτεια, μεταξύ 4 επικρατειών που αποτελούν μέρος της δομής τους, και οι οποίες ονομάζονται επικράτειες ομολογίας των Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4, Bcl-2 homology) (164).

Στη ομάδα των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών συγκαταλέγονται οι Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 (στους ανθρώπους είναι γνωστή ως Bfl-1) και οι Mcl-1 και Bcl-B (στα θηλαστικά). Οι πρωτεΐνες αυτές προωθούν την κυτταρική επιβίωση. Από την άλλη, στην ομάδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak και Bok ως σημαντικά μέλη και οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Η κατηγορία τόσο των αντι-αποπτωτικών, όσο και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών περιλαμβάνει και τις τέσσερις επικράτειες BH (1-4) (169). Επίσης, στη τρίτη ομάδα των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες Bad, BNIP3, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bik, Hrk και Bmf.

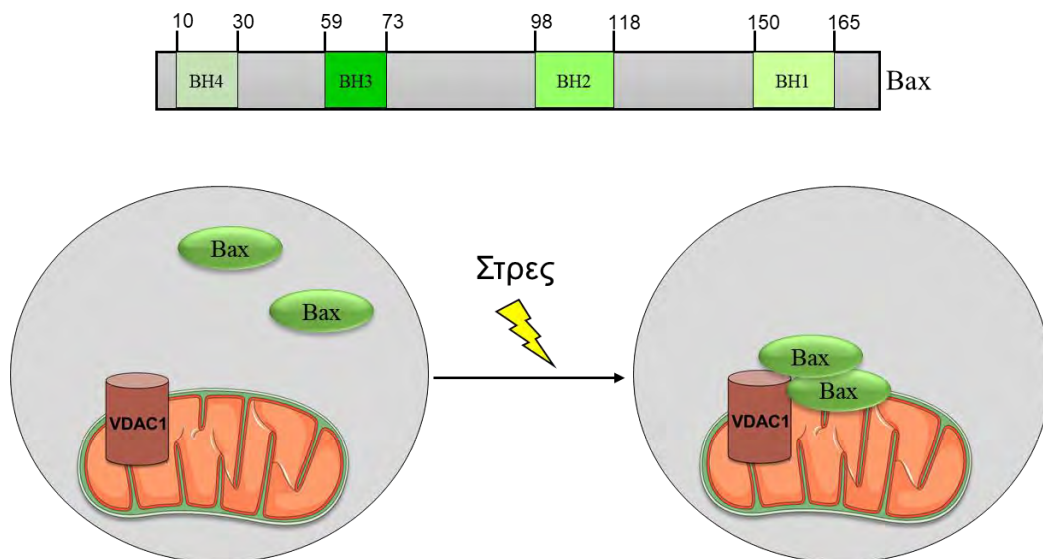
Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής (BH3-only proteins) έχουν το χαρακτηριστικό ότι διαθέτουν μόνο την επικράτεια BH3 και η λειτουργία τους σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης (164). Επίσης η παρουσία μιας καρβοξυτελικής διαμεμβρανικής επικράτειας παρατηρείται σε ένα μεγάλο μέρος προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για τον εντοπισμό τους σε μεμβράνες λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όσο και για τη γενικότερη δράση τους (164).

Με βάση τα προαναφερθέντα, ο διακόπτης που καθορίζει την στροφή του κυττάρου προς την επιβίωση ή τον θάνατο καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των τριών ομάδων της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2, δηλαδή τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες που φέρουν μόνο την επικράτεια BH3. Συγκεκριμένα η ισορροπία κυτταρικής επιβίωσης ή κυτταρικού θανάτου, οδηγείται προς τον θάνατο, μέσω των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που φέρουν μόνο την επικράτεια BH3, όπως είναι οι πρωτεΐνες Bim, Bad, Puma και Noxa οι οποίες, είτε αλληλεπιδρούν με την ομάδα αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών οδηγώντας σε απενεργοποίηση της δράσης τους (160, 166), είτε μπορούν να πραγματοποιήσουν αλληλεπιδράσεις με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bax (166, 170).

Όπως προαναφέρθηκε, ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν τη σημασία των επικρατειών BH για τη διαμεσολάβηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μελών της οικογένειας Bcl-2 καθώς και για τις λειτουργίες τους (168, 171). Επιπλέον, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak οδηγούν το κύτταρο προς την απόπτωση μέσω της διαπερατοποίησης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (160), όπου και υπόκεινται σε αλλαγές στη διαμόρφωση τους (170, 172, 173) για να σχηματίσουν πόρους, οι οποίοι δεν έχουν σαφώς χαρακτηριστεί. Ωστόσο, μελέτες προτείνουν ότι οι πόροι αυτοί αποτελούν πρωτεολιπιδικές δομές, με σημαντικό το ρόλο της καρδιολιπίνης (174, 175).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο μηχανισμός σχηματισμού των πόρων από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται και κυρίως σε συνάρτηση με τη ρύθμιση που δέχονται από τις άλλες ομάδες της οικογένειας Bcl-2 (αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες της ομάδας BH3-only), αρχίζει να αποσαφηνίζεται. Ωστόσο, υπάρχει αρκετή διχογνωμία σχετικά με το τελευταίο, με αποτέλεσμα να έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα με βάση τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα. Γενικά, σε υγιή κύτταρα, και οι δύο προ-αποπτωτικοί παράγοντες Bax και Bak βρίσκονται σε ανενεργή μορφή, με την Bak να εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την Bax στο κυτταρόπλασμα, λόγω της μετακίνησής του από τα μιτοχόνδρια μέσω της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL (176-178). Η δέσμευση των Bax και Bak από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες

αποτελεί ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Δομή και λειτουργία της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Η πρωτεΐνη Bax αποτελεί μέλος των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Υπάγεται στη ομάδα των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας (effector proteins) και διαθέτει 4 επικράτειες BH (Bcl-2 Homology domains) που παρουσιάζουν ομολογία με τις υπόλοιπες ομάδες πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια Bcl-2. Σε υγιή κύτταρα, η Bax εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά παρουσία διαφόρων ειδών στρες (υποξία, ακτινοβολίες, χημειοθεραπευτικά φάρμακα κ.α.), η Bax μεταβαίνει στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Εκεί, είτε ομο-ολιγομερίζεται, είτε δημιουργεί ετερο-ολιγομερή με τον τασσο-εξαρτώμενο διάυλο ανιόντων VDAC1 και οδηγεί στη διάνοιξη πόρων στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη της απόπτωσης.

Τα τρία μοντέλα ενεργοποίησης του προ-αποπτωτικού παράγοντα Bax που έχουν προταθεί είναι το μοντέλο της άμεσης ενεργοποίησης (direct activation), της έμμεσης ενεργοποίησης (indirect activation) και της ενσωμάτωσης (embedded together). Το μοντέλο της άμεσης ενεργοποίησης προτείνει την ενεργοποίηση των Bax και Bak με άμεσο τρόπο μέσω των άμεσων ενεργοποιητών (direct activators) που ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών Bcl-2 που φέρουν μόνο την επικράτεια BH3 (tBid, Bim, Puma), οι οποίοι μέσω της εν λόγω επικράτειας δεσμεύονται σε μια υδρόφοβη αύλακα που αποτελεί μέρος της δομής των Bax και Bak. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή αλλαγών στη διαμόρφωση των δύο πρωτεϊνών και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους (179). Η υπόλοιπη δεξαμενή της κατηγορίας των πρωτεϊνών BH3-only δρουν ως αισθητήρες (sensitizers), που συνδέονται με αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες BH3-only εμποδίζουν την ανασταλτική επίδραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και συνεπώς προωθούν την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak (180, 181). Στο πλαίσιο του μοντέλου της άμεσης ενεργοποίησης έχει προταθεί η υπόθεση ότι οι αλληλεπιδράσεις των άμεσων ενεργοποιητών του Bax και του Bak,

πραγματοποιείται μέσω σύντομων, παροδικών και δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (182). Το δεύτερο μοντέλο της έμμεσης ενεργοποίησης, προέκυψε από πειραματικά δεδομένα που ήρθαν σε αντίθεση με το μοντέλο της άμεσης ενεργοποίησης. Συγκεκριμένα, ανακαλύφθηκε ότι απουσία των άμεσων ενεργοποιητών της ομάδας πρωτεϊνών BH3-only (tBid, Bim, Puma), οι Bax και Bak ενεργοποιούνταν λόγω της δράσης των πρωτεϊνών αισθητήρων με έμμεσο τρόπο (183). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι Bax και οι Bak είναι συνεχώς ενεργές, αλλά υπόκεινται σε ανασταλτική ρύθμιση από την ομάδα των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, των οποίων η δράση αίρεται από τις πρωτεΐνες αισθητήρες BH3-only, με αποτέλεσμα τον ολιγομερισμό των ήδη ενεργών Bax/Bak. Συνεπώς σε αυτό το μοντέλο δεν υπάρχει η ανάγκη διάκρισης μεταξύ άμεσων ενεργοποιητών και πρωτεϊνών αισθητήρων, καθώς οι πρωτεΐνες της ομάδας των BH3-only πρωτεϊνών έχουν το ρόλο στην άρση της αναστολής που ασκούν οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες στις Bax/Bak.

Ένας σημαντικός παράγοντας που αποτυγχάνουν να ενσωματώσουν τα δύο πρώτα μοντέλα είναι ο ρόλος της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Έτσι προτάθηκε το τρίτο μοντέλο ενεργοποίησης των Bax/Bak (embedded together model). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των Bax και Bak εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι οποίες αναστέλλονται από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak στο κυτταρόπλασμα. Άμεσοι ενεργοποιητές της ομάδας πρωτεϊνών BH3-only αλληλεπιδρούν με τις Bax/Bak στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, οδηγώντας σε αλλαγές στη διαμόρφωση των τελευταίων, που οδηγούν στον ολιγομερισμό τους. Οι άμεσοι ενεργοποιητές αναστέλλονται από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και η αλληλεπίδραση με την εξωτερική μεμβράνη είναι καταλυτική για τη ρύθμιση της εκτόπισης των άμεσων ενεργοποιητών από την αρνητική ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (164, 184).

1.3.4. Επίδραση του HIF-1 στην απόπτωση ανεξάρτητα ή μη από τη μεταγραφική του δράση

Μία από τις βασικές λειτουργίες του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, ως απόκριση σε συνθήκες υποξίας αφορά τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Η ρύθμιση αυτή συντελείται είτε λόγω της μεταγραφικής δράσης του HIF-1 μέσω της επαγωγής συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, είτε μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων της μεταγραφής (154). Οι επιπτώσεις της σταθεροποίησης του HIF-1α στην έκβαση της απόπτωσης είναι περίπλοκες, όπως αποδεικνύεται από δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν τόσο ότι ο HIF-1α μπορεί να προωθήσει, όσο και να αναστείλει την απόπτωση.

Δεδομένης της σημασίας των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης είναι σημαντικό να αναφερθούν αρχικά οι επιδράσεις του HIF-1α στην οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (ενότητα 1.3.3.). Ο HIF-1α εμπλέκεται στη ρύθμιση διάφορων μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, έχοντας προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό αντίκτυπο, γεγονός που καθορίζεται από το είδος του κυτταρικού τύπου και τις εκάστοτε κυτταρικές συνθήκες. Οι προ-αποπτωτικές αλλαγές που μπορούν να προκληθούν από τον HIF-1α περιλαμβάνουν μείωση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 (185), επαγωγή της έκφρασης της BNIP3 (Bcl2/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3) που είναι μέλος της ομάδας των πρωτεϊνών BH3-only, της BNIP3, της ομόλογής της που ονομάζεται Nip-3-like protein 3 (151, 186, 187) και της Noxa (BH3-only protein) (188).

Από την άλλη μεριά, διάφορες ερευνητικές δημοσιεύσεις προτείνουν ότι ο HIF-1α μπορεί με μεταγραφικό τρόπο να προστατεύσει, από την πυροδότηση της έναρξης του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Οι αντι-αποπτωτικές αλλαγές που μπορούν να προκληθούν από τον HIF-1α περιλαμβάνουν την αύξηση στα επίπεδα των Bcl-2 (189), Mcl-1 (190, 191) και επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την Bcl-xL (189, 192, 193). Επίσης, σε άλλες αντι-αποπτωτικές επιδράσεις συγκαταλέγονται μείωση στα επίπεδα των προ-αποπτωτικών παραγόντων Bid (194), Bax (189, 194) και Bak (189).

Επιπρόσθετα, ο HIF-1α μπορεί να ρυθμίζει την απόπτωση, επηρεάζοντας μεταγραφικά, την έκφραση γονιδίων-στόχων του, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της δυναμικής και της μορφολογίας των μιτοχονδρίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διαμεσολαβούμενη από τον HIF-1α επαγωγή της έκφρασης της μιτοφουσίνης-1, η οποία αλλάζει τη μορφολογία του μιτοχονδριακού πληθυσμού, οδηγώντας από ένα σωληνοειδές, σε ένα πιο εκτεταμένο δίκτυο. Κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας και ήταν ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται με τη χρήση ετοποσιδίου, έγιναν ευαίσθητα στην απόπτωση μέσω αποσιώπησης της έκφρασης της μιτοφουσίνης-1 και των παραγόντων BNIP ή BNIP3L (145). Επιπρόσθετα ο HIF-1α σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια μέσω των εξοκινασών. Συγκεκριμένα η εξοκινάση 2 (HKII) βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, επάγεται από τον HIF-1 και εκτός από τον κύριο ρόλο που διαδραματίζει στο ρυθμο-καθοριστικό βήμα της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ισορροπία απόπτωσης/επιβίωσης. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον τασεο-εξαρτώμενο δίαυλο ανιόντων VDAC1 (Voltage dependent anion channel 1) στη μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγώντας σε αναστολή της απόπτωσης (195, 196), παρέχοντας έτσι μία συσχέτισή της με τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Ο HIF-1α μπορεί να ρυθμίσει την διαδικασία της απόπτωσης και μέσω μη μεταγραφικών δράσεων με σημαντικότερη την αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη μορταλίνη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (σε συνθήκες υποξίας και αναστολής των κινασών ERK1/2). Η αλληλεπίδραση μορταλίνης/HIF-1α αναστέλλει την έναρξη της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα (35).

1.4. Η Μορταλίνη

1.4.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP): η μορταλίνη ως μέλος της υποοικογένειας HSP70

1.4.1.1. Ανακάλυψη της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP, Heat Shock Proteins)

Μία σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών που συμμετέχουν τόσο στη διατήρηση της ομοιοστασίας του κυτταρικού πρωτεώματος (πρωτεοστασία, proteostasis) καθώς και σε πολλές άλλες λειτουργίες είναι οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (chaperones) ή αλλιώς πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSP) (197). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η είσοδος πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, ο έλεγχος ποιότητας τους, καθώς και η προστασία τους από διάφορα είδη στρες. Διαθέτουν την ικανότητα τόσο βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όσο και αποκρίσεων σε στρεσογόνα σήματα, μέσω αλληλεπιδράσεων με μη αναδιπλωμένες (unfolded/nascent) και λανθασμένα αναδιπλωμένες (misfolded/denatured) πρωτεΐνες. Ακόμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες άλλες κυτταρικές λειτουργίες που αφορούν τη ρύθμιση της απόπτωσης, της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της γήρανσης (198, 199).

Πριν από περίπου μισό αιώνα, ο Ferruccio Ritossa παρατήρησε κάποια περίεργα μοτίβα διογκώσεων παρακολουθώντας τα πολυταινικά χρωμοσώματα της *Drosophila*, ύστερα από έκθεση του εντόμου στο στάδιο της προνύμφης σε υψηλές θερμοκρασίες της τάξης των 37 °C. Το φαινόμενο αυτό ήταν αντιστρεπτό με τη μείωση της θερμοκρασίας σε πιο ήπια επίπεδα (197). Αργότερα, προτάθηκε ο όρος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsp-s), όταν πειράματα κατέδειξαν την αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών μοριακού βάρους στα 70 και 26 kDa, υποδεικνύοντας παράλληλα ότι πρόκειται για απαραίτητα μόρια που υποβοηθούν την αναδίπλωση πρωτεϊνών, ως απόκριση σε στρες υψηλής θερμοκρασίας (200, 201). Με την πάροδο των χρόνων η ορολογία γύρω από αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών, διευρύνθηκε ώστε να περιλαμβάνει μια μεγάλη τάξη πρωτεϊνών που προωθούν: την αναδίπλωση πολυπεπτιδίων, τη διέλευση τους μέσα από μεμβράνες κυττάρων και οργανιδίων, την αποσυναρμολόγηση μακρομοριακών συμπλόκων ή πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τη τελική ρύθμιση της

διαμόρφωσής καθώς και της πρωτεόλυσης διαφόρων πρωτεϊνών ώστε να εξασφαλιστεί ομοιόσταση σε επίπεδο σηματοδότησης και κυτταρικών λειτουργιών (197).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, αποτελείται από τουλάχιστον 40 μέλη στους ανθρώπους. Τα μέλη αυτά ομαδοποιούνται σε τουλάχιστον έξι μεγάλες υπο-οικογένειες, που καλούνται Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 και μικρές Hsp (Hsp-s). Η ομαδοποίηση γίνεται με κριτήριο τα μοριακά βάρη των μελών που ανήκουν στις προαναφερθείσες υπο-οικογένειες (202). Τα μέλη Hsp που ανήκουν στην ίδια υπο-οικογένεια έχουν παρόμοια αρχιτεκτονική στη δομή τους και παρουσιάζουν μοναδικά προφίλ έκφρασης και υποκυτταρικού εντοπισμού (203).

Η ομοιότητα που παρουσιάζουν τόσο τα ευκαρυωτικά, όσο και στα προκαρυωτικά μέλη της υπο-οικογένειας Hsp70, αγγίζει ένα ποσοστό της τάξης του 40-60%. Συνεπώς, τα μέλη Hsp70, αποτελούν μερικές από τις πιο υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες στη βιολογία (204, 205). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70 είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε κάθε οργανισμό. Παρά την μεγάλη ποικιλομορφία των μελών Hsp70, έχει παρατηρηθεί ότι κάθε διαφορετικό είδος πρωτεΐνης-θερμικού σοκ είναι λειτουργικά μοναδικό και δεν παρουσιάζει αλληλεπικαλυπτόμενες δράσεις με άλλα είδη (197).

1.4.1.2. Ανακάλυψη της μορταλίνης

Ένα σημαντικό μέλος της ομάδας των πρωτεϊνών της τάξης Hsp70 ονομάζεται μορταλίνη (mortalin). Η μορταλίνη ανακαλύφθηκε στο πλαίσιο εύρεσης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την κυτταρική θνητότητα και αθανασία, σε κυτταρικά υβρίδια ποντικών τα οποία αποτελούνταν από φυσιολογικούς και αθανάτους ινοβλάστες. Παρά το γεγονός ότι αρχικά σχετίστηκε με απώλεια της κυτταρικής αθανασίας στα προαναφερθέντα υβρίδια, περαιτέρω έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αθανатоποιημένους ινοβλάστες ποντικών έδειξε την ύπαρξη δύο ισομορφών της. Η μία ισομορφή που είναι κυτταροπλασματική και σχετίστηκε με τη θνητότητα (ονομάστηκε mortalin-1 ή mot-1) και μία που εμφανίζει περι-πυρηνικό εντοπισμό και σχετίζεται με την αθανασία (ονομάστηκε mortalin-2, mot-2) (206-208). Οι δύο πρωτεΐνες βρέθηκε ότι έχουν διαφορετικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, σε βαθμό που η υπερέκφραση της mot-1 σε αθανатоποιημένα κύτταρα NIH3T3 οδήγησε σε γήρανση, ενώ η υπερέκφραση της mot-2 στα ίδια κύτταρα οδήγησε στην επαγωγή κακοήθους μετασχηματισμού (206, 207). Μελέτες της μορταλίνης σε ανθρώπους έδειξαν την ύπαρξη μίας μόνο ισομορφής που αντιστοιχεί στην mot-2 του ποντικού και η οποία είχε ικανότητα κακοήθους κυτταρικού μετασχηματισμού και ονομάστηκε hmot-2 (207, 209). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~74 kDa (679 αμινοξέα) και επιπλέον παρουσιάζει υψηλό

ποσοστό ομολογίας με άλλα μέλη της οικογένειας Hsp70, όπως της DnaK (51%) από *Escherichia coli*, της SSC1p (65%) του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, της Hsc70 (46%) του αρουραίου και της ισομορφής του ενδοπλασματικού δικτύου BiP (49%) επίσης του αρουραίου (210). Επίσης, ανάλυση του γονιδίου της ανθρώπινης μορταλίνης απέδειξαν την ύπαρξη ενός γενωμικού τμήματος μήκους 2800 ζευγών βάσεων, το οποίο μεταγράφεται από έναν γενετικό τόπο μήκους 18.000 ζευγών βάσεων στο χρωμόσωμα 5, που αποτελείται από 17 εξόνια (211).

1.4.1.3. Ονοματολογία της μορταλίνης με βάση τους λειτουργικούς της ρόλους

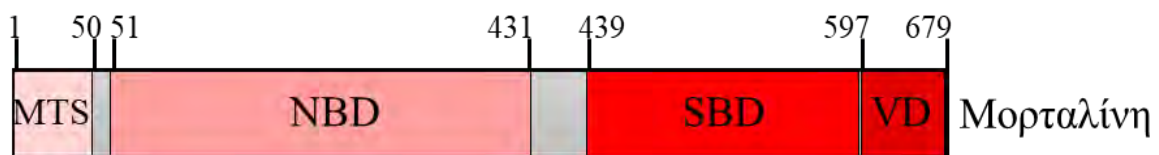
Εκτός από τον ρόλο που αποδόθηκε στη μορταλίνη ως δείκτης θνητότητας ή αθανασίας, με την πάροδο των ετών, της αποδόθηκαν και αρκετοί άλλοι ρόλοι πέραν του κλασικού ρόλου που έχουν οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp70, γεγονός που οδήγησε σε διαφορετικές ονομασίες της ίδιας πρωτεΐνης, με κριτήριο την εκάστοτε λειτουργία της. Συγκεκριμένα, η ανίχνευση της μορταλίνης ως ένα στελεχο-ειδικό (strain-specific) αντιγόνο μόνο σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια C3H, είχε ως αποτέλεσμα να ονομαστεί ως CSA (C3H-specific antigen). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μορταλίνη στα ποντίκια έχει 17 εξόνια που διακόπτονται από 16 ιντρόνια, και όπως και στους ανθρώπους δεν επάγεται από θερμικό στρες (212). Επίσης, η μορταλίνη πήρε το όνομα PBP74 (Peptide-binding protein) λόγω της ικανότητας της να συμμετέχει στην επεξεργασία αντιγόνων, στην αντιγονο-παρουσίαση καθώς και στην έμφυτη ανοσία (213). Επίσης η PBP74 ανιχνεύθηκε στην κυτταρική επιφάνεια, σε ενδοσώματα, στο Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στην κυτταρική μεμβράνη και σε δομές που μοιάζουν με κυστίδια στο κυτταρόπλασμα. Μέσω κλωνοποίησης του cDNA της PBP74, αποκαλύφθηκε ότι είναι ίδια με τη μορταλίνη (214). Έπειτα από μελέτες διαλογής πρωτεϊνών-δεικτών που αποκρίνονται σε μεταβολικό στρες στο κεντρικό νευρικό σύστημα αρουραίων, ανιχνεύθηκε ένα cDNA που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Grp75 (glucose-regulated protein 75). Στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι είναι μέλος της υπο-οικογένειας Hsp70, ταυτιζόμενη με τη μορταλίνη, καθώς και τις πρωτεΐνες PBP74 και CSA, και συνεπώς τατίστηκε με τη μορταλίνη (215). Επίσης, ένας συνδυασμός από *in vitro* και *in vivo* ανοσολογικές, βιοχημικές και λειτουργικές πειραματικές προσεγγίσεις, απέδειξαν ότι η ανθρώπινη μορταλίνη μπορεί να εισαχθεί στα μιτοχόνδρια και να παραμείνει στο εν λόγω διαμέρισμα (216). Μέσω της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, αποδείχθηκε η ύπαρξη της μορταλίνης εντός των μιτοχονδρίων, καθώς και ο συνεντοπισμός της με την Hsp60. Η αποκοπή των πρώτων 46 αμινοξέων είχε ως αποτέλεσμα τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της μορταλίνης (216), γεγονός που συνάδει με τη μεταγενέστερη ταυτοποίησή της ως αλληλουχία/σήμα στόχευσης

της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια (217). Έτσι, η μορταλίνη έχει λάβει και το όνομα mtHsp70 (mitochondrial Hsp70) λόγω του κύριου ρόλου που διαδραματίζει στα μιτοχόνδρια (197).

1.4.2. Δομή της μορταλίνης

1.4.2.1. Γενικές πληροφορίες για τη δομή της μορταλίνης

Η μορταλίνη είναι μια πρωτεΐνη 75 kDa (679 αμινοξέα) και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με άλλα μέλη της οικογένειας Hsp70 καθώς και της αντίστοιχης οικογένειας σε άλλους οργανισμούς (DnaK, Ssc1p, Hsc70, BiP, ενότητα 1.4.1) (197, 218) (Εικόνα 7). Η κρυσταλλική δομή της πλήρους μεγέθους μορταλίνης δεν έχει προσδιοριστεί, καθώς προηγούμενες πειραματικές προσπάθειες ήταν ανεπιτυχείς. Δεδομένης της υψηλής εξελικτικής συντήρησης μεταξύ των μελών Hsp70, η δομή της μορταλίνης μπορεί να μοντελοποιηθεί *in silico*. Συγκεκριμένα, με βάση τη μοντελοποίηση, η μορταλίνη/mtHsp70 φαίνεται να μοιράζεται κοινή δομή με τα υπόλοιπα μέλη Hsp70, αποτελούμενη από: α. μία αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD, Nucleotide Binding Domain) το οποίο δεσμεύει και υδρολύει ATP, β. μία καρβοξυτελική περιοχή δέσμευσης πρωτεϊνών υποστρωμάτων, η οποία δεσμεύει εκτεταμένα πολυπεπίδια (SBD, Substrate Binding Domain), γ. ένα σήμα μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS, Mitochondrial Targeting Signal) στο αμινοτελικό άκρο και δ. μια μεταβλητή περιοχή (VD, Variable Domain). Η αλληλεπίδραση ενός υποστρώματος με την επικράτεια SBD, καθώς και η αγκιστεία και η κινητική της δέσμευσής του, ελέγχονται από τη δραστικότητα της επικράτειας NBD. Η ανταλλαγή του ADP με ATP εντός της επικράτειας NBD, προκαλεί τοπικές αλλαγές στη διαμόρφωση, γεγονός που συνοδεύεται από μείωση της αγκιστείας για τη δέσμευση των υποστρωμάτων. Ύστερα από υδρόλυση του ATP, η πρωτεΐνη επανέρχεται στην διαμόρφωση που φέρει δεσμευμένο το ADP και η αγκιστεία για τη δέσμευση του εκάστοτε υποστρώματος αυξάνει σημαντικά, καθώς διαμορφώνεται το έδαφος για νέο κύκλο δέσμευσής και επακόλουθης απελευθέρωσής του τελευταίου (197, 217).



Εικόνα 7: Οι δομικές επικράτειες της πρωτεΐνης μορταλίνης. Η μορταλίνη με βάση την ομολογία που παρουσιάζει με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Hsp70 της έχει αποδοθεί μία δομή όπου αποτελείται από ένα σήμα στόχευσης στο μιτοχόνδριο (MTS), μία επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD), μία επικράτεια δέσμευσης πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (SBD) και μία μεταβλητή περιοχή (VD).

1.4.2.2. Ο ρόλος της επικράτειας δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD, Nucleotide Binding Domain)

Η επικράτεια NBD αποτελεί τη μονάδα ελέγχου της μορταλίνης και η δομή της έχει κρυσταλλωθεί (219). Η επικράτεια αυτή αναδιπλώνεται σε ένα ζεύγος λοβών, που είναι οι λοβοί I (lobe I) και II (lobe II). Ο κάθε λοβός χωρίζεται σε δύο υπο-περιοχές, οι οποίες είναι οι IA/IB (για τον λοβό I) και οι IIA/IIIB (για τον λοβό II). Οι ενεργειακές επιδράσεις από τη δέσμευση του ATP στην κεντρική θήκη του NBD (διεπιφάνεια μεταξύ των υπο-περιοχών IIA και IIIB), καθώς και από την υδρόλυσή του, μεταδίδονται ταχύτατα σε όλη την επικράτεια (220). Επιπλέον, μεταξύ των επικρατειών NBD και SBD βρίσκεται μια συνδετική αλληλουχία (interdomain linker), η οποία είναι συντηρημένη σε υψηλό βαθμό, υπογραμμίζοντας τη σημασία του τμήματος αυτού στη μετάδοση των αλλοστερικών αλλαγών που συντελούνται στην επικράτεια NBD (ως απόκριση στη δέσμευση και υδρόλυση του ATP), στην περιοχή SBD. Συγκεκριμένα στην ομόλογη πρωτεΐνη της μορταλίνης στα βακτήρια (DnaK), δείχθηκε μέσω NMR ότι στην κατάσταση που φέρει δεσμευμένο ADP, οι επικράτειες NBD και SBD είναι απομακρυσμένες και σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητες (221-223). Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί πως η ανταλλαγή και η υδρόλυση του ATP, περιλαμβάνει τη δράση κατάλληλων παραγόντων (co-chaperones), οι οποίοι είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της NBD. Με βάση τα προαναφερθέντα, υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες των επικουρικών αυτών πρωτεϊνών: α. οι πρωτεΐνες της επικράτειας J (J-domain proteins) που καταλύουν την υδρόλυση του ATP (224) και οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (NEFs, Nucleotide Exchange Factors) που υποβοηθούν την ανταλλαγή του δεσμευμένου ADP με ATP (225).

1.4.2.3. Ο ρόλος της επικράτειας δέσμευσης υποστρωμάτων (SBD, Substrate Binding Domain)

Σε αντίθεση με την επικράτεια NBD που παρουσιάζει μεγάλο βαθμό εξελικτικής συντήρησης, η επικράτεια SBD, εμφανίζει μεγαλύτερη εξελικτική διαφοροποίηση γεγονός που έχει να κάνει με το ρόλο της στη δέσμευση πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών-υποστρωμάτων στη πλειονότητα των μελών Hsp70 (217)

Η επικράτεια αυτή χωρίζεται σε μια περιοχή με δομή β-σάντουιτς (SBDβ) και μια μικρή περιοχή 12 kDa με δομή α-έλικας (SBDα), που καλείται «καπάκι» (lid). Η περιοχή SBDβ περιλαμβάνει τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος με εξειδίκευση τόσο για βασικές, όσο και για υδρόφοβες αλληλουχίες. Η περιοχή SBDα παρουσιάζει 5 α-έλικες και καλύπτει τη θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης-υποστρώματος, όταν το εκάστοτε μέλος της οικογένειας Hsp70 φέρει δεσμευμένο το ADP στην επικράτεια NBD και συνεπώς βρίσκεται στην διαμόρφωση/κατάσταση υψηλής αγχιστείας. Σε αυτή τη διαμόρφωση οι NBD και SBD δεν

αλληλεπιδρούν, αλλά συνδέονται με μία συνδετική αλληλουχία (interdomain linker). Όταν γίνει η ανταλλαγή του ADP με ATP, η περιοχή SBDα υπόκειται σε μια διαδικασία μεγάλης αλλαγής στη διαμόρφωση, καθώς και επαναπροσανατολισμού, αφήνοντας την SBDβ ελεύθερη για τη δέσμευση του επόμενου υποστρώματος (219).

Ακόμα είναι σημαντικό να επισημανθεί το γεγονός ότι η κρυσταλλική δομή της περιοχής SBDβ με τις δύο πρώτες έλικες της SBDα, επιλύθηκε πρόσφατα, όπως φαίνεται από την κατάθεση στην Protein Data Bank (PDB ID 3N8E), αλλά τα δεδομένα δεν έχουν ακόμα δημοσιευθεί.

1.4.3. Λειτουργίες της μορταλίνης

Πολλές επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει τους λειτουργικούς ρόλους της μορταλίνης, οι οποίοι μπορούν να επεκταθούν όχι μόνο στο πλαίσιο του μιτοχονδρίου, αλλά και πέρα από αυτό (extra-mitochondrial functions). Στο πλαίσιο των μιτοχονδρίων, η μορταλίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, στην αναδίπλωση πρωτεϊνών, καθώς και στην αποικοδόμησή τους. Εκτός από το μιτοχόνδριο, έχει αποδειχθεί η παρουσία της μορταλίνης σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα συμπεριλαμβανομένου του κυτταροπλάσματος, του κεντροσώματος, της κυτταρικής μεμβράνης και του ενδοπλασματικού δικτύου. Η μορταλίνη χαρακτηρίζεται από μεγάλη δυναμικότητα αναφορικά με τις ποικίλες κυτταρικές διεργασίες που μπορεί να συμμετέχει με κυρίαρχες, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη γήρανση, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού και την ομοιόσταση του ασβεστίου (197). Παρακάτω παρατίθενται μερικές από τις βασικές μιτοχονδριακές και μη, λειτουργίες, που επιτελεί η μορταλίνη.

1.4.3.1. Μιτοχονδριακές λειτουργίες

Η ομόλογη πρωτεΐνη της μορταλίνης (SSC1p) έχει μελετηθεί ενδελεχώς ως προς τις μιτοχονδριακές της δράσεις στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας παράγοντα για την εισαγωγή πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα στα διάφορα μιτοχονδριακά διαμερίσματα. Μεταβολές που επηρεάζουν την σωστή λειτουργία της μορταλίνης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, είχαν ως αποτέλεσμα επιζήμιες επιδράσεις αναφορικά με την εισαγωγή των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, τη μειωμένη αντι-οξειδωτική άμυνα, καθώς και την ενίσχυση τόσο της λανθασμένης αναδίπλωσης/αποικοδόμησης πρωτεϊνών, όσο και του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (197).

1.4.3.1.1. Εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

Οι περισσότερες πρωτεΐνες που (πάνω από το 99%), κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του πυρήνα και εισάγονται στα μιτοχόνδρια μέσω ενός περίπλοκου μηχανισμού μετατόπισης (226).

Γενικά, η εισαγωγή πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου που πρόκειται να μεταφερθεί στο εν λόγω διαμέρισμα, της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (OMM, Outer Mitochondrial Membrane), της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (IMM, Inner Mitochondrial Membrane) και του συμπλόκου PAM (Presequence translocase-Associated Motor) το οποίο εξασφαλίζει ότι η πρωτεΐνη που θα μεταφερθεί στο μιτοχόνδριο, θα ακολουθήσει μία μοναδική οδό προς τη μιτοχονδριακή μήτρα (227). Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για τα μιτοχόνδρια είναι γνωστές ως πρόδρομες πρωτεΐνες (pre-proteins) και φέρουν εξειδικευμένα σήματα στόχευσης που στη πλειονότητα είναι αλληλουχίες στο αμινοτελικό τους άκρο οι οποίες μπορούν να υποστούν κατάτμηση (226).

Η είσοδος των πρόδρομων πρωτεϊνών που προορίζονται για είσοδο στη μιτοχονδριακή μήτρα αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-υποδοχείς της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι οποίοι βρίσκονται προς τη μεριά του κυτταροπλάσματος και οι οποίες καλούνται Tom20 (Translocase of the Outer Membrane-20) και Tom22. Αρχικά, οι πρόδρομες πρωτεΐνες-στόχοι αναγνωρίζονται από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που ανήκουν στις κατηγορίες μοριακών συνοδών (ή εναλλακτικά πρωτεΐνες θερμικού σοκ), όπως οι Hsp70 και Hsp90 και οι οποίες οδηγούν τις πρωτεΐνες στα μιτοχόνδρια. Από τους υποδοχείς που προαναφέρθηκαν, η Tom20 αναγνωρίζει το σήμα στόχευσης στο μιτοχόνδριο της εκάστοτε πρωτεΐνης, υποβοηθώντας την πρόσδεση της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ η Tom22, αναγνωρίζει τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα που συνήθως χαρακτηρίζουν τα περισσότερα σήματα μιτοχονδριακού εντοπισμού, όντας η ίδια αρνητικά φορτισμένη. Έτσι η Tom22 εξασφαλίζει ότι κατά την είσοδο η πρωτεΐνη-στόχος θα είναι μη αναδιπλωμένη. Ακολούθως η Tom40 που έχει δομή β-βαρελιού διαμεσολαβεί τη μεταφορά της πρωτεΐνης-στόχου από το κυτταρόπλασμα στο διαμεμβρανικό χώρο. Με τη βοήθεια των πρωτεϊνών Tim (Translocase of the inner membrane), πραγματοποιείται η μετατόπιση της πρωτεΐνης-στόχου από τον διαμεμβρανικό χώρο στη μιτοχονδριακή μήτρα, σε συνέργεια με το σύμπλοκο PAM που συγκροτείται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η ομόλογη της μορταλίνης πρωτεΐνη SSC1p αποτελεί βασικό συστατικό του PAM όπου μέσω της ικανότητας να δεσμεύει και να υδρολύει ATP, προωθεί σε συνεργασία και με άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου την ολοκληρωτική μετατόπιση της πρωτεΐνης-στόχου διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης προς τη μήτρα. Όντας στη μήτρα η πρωτεΐνη-στόχος, υποβάλλεται σε κατάτμηση της αμινοτελικής πρόδρομης αλληλουχίας από κατάλληλες πεπτιδάσες (MPPs, Matrix Processing Peptidases) και έπειτα αναδιπλώνεται ξανά με τη βοήθεια πρωτεϊνών μοριακών συνοδών, όπως είναι η Hsp60 και η Hsp10 (228).

1.4.3.1.2. Αναδίπλωση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών

Όπως προαναφέρθηκε με την είσοδο της πρωτεΐνης-στόχου στη μιτοχονδριακή μήτρα, η SSC1p διαδραματίζει σημαντικό ρόλο εκτός από την μετακίνηση της πρωτεΐνης μέσω του συμπλόκου PAM στη μιτοχονδριακή μήτρα, και στην αναδίπλωση της. Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν τη δράση των παραγόντων Hsp60 και Hsp10 συμπληρωματικά με την SSC1p για την αναδίπλωση νέο-εισαχθέντων πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή μήτρα. Λειτουργικές αναλύσεις απέδειξαν ότι επίσης η δράση των πρωτεϊνών μοριακών συνοδών GrpE και Mdj1 (co-chaperones), συνεισέφεραν συνεργικά στην διαμεσολαβούμενη από την SSC1p αναδίπλωση πρωτεϊνών (229). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν τη σημασία της παρουσίας των επικουρικών μοριακών συνοδών όπως της Mdj1 στις ζύμες (*Saccharomyces cerevisiae*) για τη διατήρηση κυτταρικής βιωσιμότητας. Επίσης μελέτες απαλοιφής του γονιδίου της Mdj1 δεν επηρέασε την είσοδο πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, αλλά την αναδίπλωσή τους, υποδεικνύοντας τη σημασία των πρωτεϊνών της οικογένειας DNAj στη διαδικασία αναδίπλωσης (230). Με βάση τα παραπάνω δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι η SSC1p, η GrpE και η Mdj1 συγκροτούν ένα σύμπλοκο το οποίο κρατάει την πρωτεΐνη-στόχο σε μια χαλαρή διαμόρφωση, μέχρι η GrpE να προωθήσει την υδρόλυση του ATP, απελευθερώνοντας την πρόδρομη πρωτεΐνη και οδηγώντας στη μεταφορά της, στο σύμπλοκο Hsp60/Hsp10, όπου θα μπορούσε να αναδιπλωθεί στην φυσική της διαμόρφωση (229). Από την άλλη μεριά έχει δειχθεί πως η SSC1p μαζί με την επικουρική πρωτεΐνη μοριακό συνοδό Mdj1 που αναφέρθηκε και προηγουμένως, συμμετέχουν και στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων (231). Συγκεκριμένα η SSC1p έχει τη δυνατότητα σταθεροποίησης λανθασμένα πτυχωμένων ή κατεστραμμένων πολυπεπτιδίων, σε μια μη αναδιπλωμένη κατάσταση, όπου είναι ευάλωτες στην δράση μιτοχονδριακών πρωτεασών όπως είναι οι m-AAA και PIM1 (232, 233).

1.4.3.2. Λειτουργίες πέρα από τα όρια των μιτοχονδρίων

1.4.3.2.1. Κυτταρική διαίρεση

Είναι αποδεδειγμένο από τη βιβλιογραφία πως η μορταλίνη εντοπίζεται μαζί με τα διπλασιασμένα κεντροσώματα (234). Τα κεντροσώματα αποτελούν κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων σε κύτταρα θηλαστικών και λειτουργούν με σκοπό τη δημιουργία δομής μικροσωληνίσκων, η οποία αλληλεπιδρά με τα χρωμοσώματα για τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου κατά τη μίτωση (235). Δείχθηκε ότι η μορταλίνη συνεντοπίζεται με τα κεντροσώματα στις φάσεις G1, S, G2 και απομακρύνεται από τα κεντροσώματα κατά τη μίτωση. Επιπρόσθετα, υπερέκφραση της μορταλίνης οδήγησε σε ελάττωση της διαμεσολαβούμενης από την p53 καταστολής του διπλασιασμού των κεντροσωμάτων, αποδίδοντας στη μορταλίνη έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (234). Επιπροσθέτως, η μορταλίνη

βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την κινάση σερίνης/θρεονίνης Mps1, που είναι απαραίτητη για τον διπλασιασμό των κεντροσωμάτων (236). Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση των καταλοίπων Thr62 και Ser65 της μορταλίνης, από την κινάση Mps1, οδηγεί σε υπερ-ενεργοποίηση της τελευταίας μέσω ενός βρόχου θετικής ανατροφοδότησης, επιταχύνοντας τον διπλασιασμό των κεντροσωμάτων. Ακόμα, μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης προσδιορίστηκε η αλληλεπίδραση της μορταλίνης με τον υποδοχέα RHAMM (Receptor for hyaluronan mediated motility) που αποτελεί πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων και των κεντροσωμάτων (237). Ο RHAMM έχει την ιδιότητα να προωθεί την κυτταρική μετανάστευση, τον κυτταρικό μετασχηματισμό μέσω της ras, την πρόοδο της καρκινογένεσης και την μετάσταση (238). Η μορταλίνη συνδέεται με τον RHAMM στη μεσόφαση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο με αυτόν τον τρόπο στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων (237).

1.4.3.2.2. Αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

1.4.3.2.2.1. Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-1)

Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs Fibroblast Growth Factors) είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αγγειογένεση, στην επούλωση τραυμάτων και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μελέτες έχουν αποδείξει την αλληλεπίδραση της μορταλίνης και του FGF-1 σε κύτταρα μυοβλαστών αρουραίων (L6) καθώς και αντίστοιχων ινοβλαστών (239, 240). Ακόμα η μορταλίνη και ο FGF-1 αλληλεπιδρούν στο όψιμο στάδιο της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου και η φωσφορυλίωση της μορταλίνης σε κατάλοιπα τυροσίνης ρυθμίζει την αλληλεπίδραση αυτή (240).

1.4.3.2.2.2. p53

Η μορταλίνη συμμετέχει σε μία από τις καλύτερα μελετημένες και χαρακτηρισμένες αλληλεπιδράσεις, και η οποία αφορά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η p53 είναι γνωστή και ως ο «φύλακας του γονιδιώματος», καθώς είναι μία πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην άρση προόδου του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην πυροδότηση της έναρξης της απόπτωσης (241). Γενικά υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 50% των ανθρώπινων καρκίνων φέρουν μετάλλαξη στην p53 (242). Η αλληλεπίδραση μορταλίνης και p53, εντοπίζεται σε διάφορες υποκυτταρικές περιοχές, όπως είναι το κυτταρόπλασμα, τα κεντροσώματα και τα μιτοχόνδρια (234, 243-245). Μέσω πειραμάτων *in vitro* δέσμευσης και χρήσης ανασυνδυασμένων μεταλλαγμάτων απαλοιφής τόσο της p53 όσο και της μορταλίνης, χαρτογραφήθηκαν οι περιοχές δέσμευσης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η μορταλίνη αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής 253-282 που βρίσκεται στην αμινοτελική της επικράτεια (NBD), με την

καρβοξυτελική περιοχή της p53 (246). Ωστόσο, αντικρουόμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της μορταλίνης και της p53 διαμεσολαβείται μέσω της καρβοξυτελικής επικράτειας της μορταλίνης (SBD) (247).

Η αλληλεπίδραση μορταλίνης-p53 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων, υπογραμμίζοντας τη σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης για την πρόοδο της καρκινογένεσης (197). Από πλευράς μηχανισμού, η μορταλίνη δεσμεύει την p53 στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την μετατόπιση της τελευταίας στον πυρήνα, καθώς και την επακόλουθη προώθηση της απόπτωσης, μέσω της μεταγραφικής δράσης της p53. Συνεπώς με αυτόν τον τρόπο η μορταλίνη αίρει την αντι-καρκινική δράση της p53, μέσω καταστολής της αποπτωτικής της δράσης (248, 249). Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί πως η ουσία MKT-077 αποτελεί επιλεκτικό αναστολέα της μορταλίνης, και η χορήγησή της σε καρκινικά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασής της με την p53 και την επανάκτηση της μεταγραφικής δράσης της τελευταίας, επιβεβαιώνοντας το σημαντικό ρόλο της μορταλίνης στη ρύθμιση της λειτουργίας της p53 στον καρκίνο (250). Ακόμα,δείχθηκε ότι η χρήση ιϊκών φορέων για την αποσιώπηση της έκφρασης της μορταλίνης (mortalin-targeting Adon virus, mot-Adon), είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαμεσολαβούμενης από την p53 απόπτωσης, σε καρκινικά κύτταρα (251). Πειράματα κατέδειξαν τη χρήση μιας φυσικής κινόνης, που ονομάζεται εμπελίνη (embelin), ως αναστολέα της μορταλίνης. Η εμπελίνη η οποία προσδένεται στην επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων της μορταλίνης (NBD), αναστέλλει την αλληλεπίδρασή της με την p53, οδηγώντας σε αύξηση της συσσώρευσης της p53 στον πυρήνα και την επακόλουθη ανάκτηση της μεταγραφικής της δράσης, που οδηγεί σε άρση της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα μαστού (252). Ακόμα έχειδειχθεί ότι μια σειρά κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με τη μορταλίνη, και παρεμβαίνουν στο σχηματισμό συμπλόκων μορταλίνης-p53 στο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη DAB2IP η οποία δεσμεύει την GRP75 εμποδίζοντας την εξαρτώμενη από την τελευταία ουβικιτίνωση της p53 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (253).

Περαιτέρω μελέτες, έδειξαν ότι η p53 μεταβαίνει στα μιτοχόνδρια υπό συνθήκες στρες και άμεσα επηρεάζει την απόπτωση μέσω μιτοχονδρίων (243). Στα μιτοχόνδρια η p53 αλληλεπιδρά με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax, οδηγώντας σε αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ενεργοποίηση των κασπασών 3/9 και επακόλουθη πρόκληση απόπτωσης (254, 255).

1.4.3.3. Ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων

Η μορταλίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία μέσω επικοινωνίας με τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Το σύστημα του συμπληρώματος βοηθάει όχι μόνο στην εξολόθρευση παθογόνων, αλλά και στην απομάκρυνση ανοσοσυμπλεγμάτων και αποπτωτικών κυττάρων. Μηχανιστικά, οι διάφορες υπομονάδες του συμπληρώματος (C5b, C6, C7, C8, και C9) δημιουργούν το σύμπλοκο MAC (Membrane Attack Complex) στην κυτταρική επιφάνεια, δημιουργώντας έναν πόρο, που οδηγεί σε καταστροφή κυττάρων ή παθογόνων-ξενιστών (256).

Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης μιας ποικιλίας ρυθμιστικών πρωτεϊνών ώστε να αναστείλουν τις υπομονάδες του συμπλόκου MAC που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο (257). Η μορταλίνη μπορεί να απελευθερωθεί από το κύτταρο και να καλύψει τα μεμβρανικά κυστίδια που φέρουν τις υπομονάδες του συμπλόκου MAC ως φορτίο, προστατεύοντας τα καρκινικά κύτταρα από λύση που μπορεί να προκληθεί από τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος (213, 257). Οι Rozenberg και οι συνεργάτες έδειξαν ότι η Hsp90 μπορεί επιπλέον να προστατεύσει τα κύτταρα από το εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα μέσω αναστολής της συναρμολόγησης και/ή της σταθερότητας των υπομονάδων C5b-9 στην πλασματική μεμβράνη. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε άμεση δέσμευση της Hsp90 με την μορταλίνη. Ο σχηματισμός συμπλοκών Hsp90-μορταλίνης παρουσία των ενεργοποιημένων C5b-9 προσφέρει αποτελεσματική προστασία έναντι των C5b-9 (258). Λειτουργικά, πιστεύεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και της μορταλίνης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση του υποδοχέα, παρέχοντας έτσι ένα επίπεδο ρύθμισης της λειτουργίας της IL-1 στα κύτταρα (259).

1.4.3.4. Συσχέτιση με το ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι ένα δίκτυο σωληνίσκων και σάκων (δεξαμενών) που περιβάλλονται από μεμβράνη και λειτουργεί συντονισμένα για να διεκπεραιώσει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης πρωτεϊνών, της σύνθεσης λιπιδίων και της αποθήκευσης ασβεστίου. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και το μιτοχόνδριο σχηματίζουν ένα δυναμικό ενδομεμβρανικό δίκτυο συνεισφέροντας στον έλεγχο πολλών επιπέδων κατά τη ροή του μεταβολισμού, της μεταφοράς πρωτεϊνών, της ενδοκυτταρικής σηματοδότηση μέσω ιόντων Ca^{2+} και του κυτταρικού θανάτου (197). Αναφορικά με τη ρύθμιση του Ca^{+2} , η μορταλίνη αποδείχθηκε ότι αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ του τασεο-εξαρτώμενου διάυλου ανιόντων VDAC1 που εδράζει στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και του υποδοχέα-καναλιού τριφωσφορικής ινοσιτόλης το οποίο διαμεσολαβεί την

απελευθέρωση ιόντων Ca^{+2} από το ενδοπλασματικό δίκτυο (260). Αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μορταλίνη (mortalin knock-down) ανέστειλε τη συσσώρευση Ca^{2+} εντός του μιτοχονδρίου, υπογραμμίζοντας τον ρόλο της μορταλίνης σε αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον, μελέτες κατέδειξαν την αλληλεπίδραση της μορταλίνης με την πρωτεΐνη GRP94 (261, 262) που αποτελεί μία πρωτεΐνη που εδράζει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συμμετέχει στην επεξεργασία και τη μεταφορά εκκρινόμενων πρωτεϊνών (263).

1.4.3.5. Βιοσυνθετικά μονοπάτια: μονοπάτι μεβαλονικού οξέος

Το ένζυμο MPD (Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase) είναι απαραίτητο στην μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος, η οποία είναι σημαντική για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της πρενυλίωσης πρωτεϊνών και του ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης (264). Μελέτες από τον Wadhwa και τους συνεργάτες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ μορταλίνης και της αποκαρβοξυλάσης MPD, μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras και της φωσφορυλιωμένης κινάσης ERK2. Δεδομένου ότι η ογκογόνος πρωτεΐνη Ras διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, η αναστολή της από τη μορταλίνη παρέχει έναν μηχανισμό προστασίας απέναντι στην καρκινογένεση (265).

1.4.4. Μορταλίνη και καρκίνος

Η υψηλή έκφραση της μορταλίνης στους συμπαγείς όγκους έχει συσχετιστεί με μειωμένη επιβίωση ασθενών που πάσχουν από διάφορες μορφές καρκίνου, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (266), ο καρκίνος του μαστού (267), το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (268), οι καρκίνοι των ωοθηκών και τραχήλου της μήτρας (269, 270), ο γαστρικός καρκίνος (271) και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (272, 273). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η υπερέκφραση της μορταλίνης ανιχνεύθηκε τόσο σε αδενώματα, όσο και σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου (274). Παρόλο που ο ρόλος της μορταλίνης στην καρκινογένεση αφορά τον ενδοκυττάριο πληθυσμό της πρωτεΐνης σε όλους τους παραπάνω τύπους καρκίνου, εντούτοις τα εξωσώματα (exosomes) που παράγονται από καρκινικά κύτταρα μαστού, ωοθηκών, προστάτη, ήπατος, στομάχου και παχέος εντέρου έχουν αυξημένα επίπεδα μορταλίνης συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα (275).

Σε καρκινικά κύτταρα, στα οποία τα επίπεδα της μορταλίνης είναι αυξημένα, η μορταλίνη δεσμεύει την p53 στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατόπιση της στον πυρήνα, καθώς και την επακόλουθη προώθηση της απόπτωσης μέσω της μεταγραφικής δράσης της p53. Συνεπώς με αυτόν τον τρόπο η μορταλίνη αίρει την αντι-καρκινική δράση της p53 μέσω καταστολής της αποπτωτικής της δράσης (248, 249).

Ο ρόλος της μορταλίνης στη διαδικασία της ογκογένεσης μπορεί να ερμηνευθεί από την πρωτεΐνη CD151. Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται σε κακοήθεις τύπους καρκίνου και προωθεί την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση σε διάφορους τύπους καρκίνου (276). Σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), η μορταλίνη βρέθηκε ότι σταθεροποιεί την CD151 συμβάλλοντας στην εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (277). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση της μορταλίνης οδήγησε σε ελάττωση της διαμεσολαβούμενης από την p53 καταστολής του διπλασιασμού των κεντροσωμάτων (234). Δείχθηκε ότι ένας αναστολέας της μορταλίνης με το όνομα UBXN2A, και ο οποίος παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση μορταλίνης-p53 (278), είναι εμπλουτισμένος στα κεντροσώματα. Ένα άλλο κομβικό γεγονός στην ανάπτυξη ενός όγκου είναι η ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση. Το μονοπάτι των κινασών Raf/MEK/ERK είναι υπεύθυνο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μελέτες στον καρκίνο των ωοθηκών κατέδειξαν το ρόλο της μορταλίνης στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης των ενεργοποιημένων Raf/MEK/ERK, υπογραμμίζοντας τον ρυθμιστικό ρόλο στη σηματοδοτική αυτή οδό και στην ογκογένεση (274, 279). Περαιτέρω μελέτες για την εμπλοκή της μορταλίνης στη σηματοδότηση Raf/MEK/ERK αποκάλυψαν ότι η μείωση της μορταλίνης σε κύτταρα που έχουν ενεργοποιημένο το μονοπάτι των MEK/ERK είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p21^{CIP1}. Ο αναστολέας της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21^{CIP1} πυροδοτεί μηχανισμούς καταστολής της ογκογένεσης μέσω αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Είναι ενδιαφέρον ότι η διαμεσολαβούμενη από τη μορταλίνη ρύθμιση της p21^{CIP1} εξαρτάται από την ενεργότητα των κινασών MEK/ERK (280). Τέλος, σε κυτταρική σειρά από φαιοχρωμοκύτωμα επινεφριδίων αρουραίου (PC12) αποδείχθηκε ότι η μορταλίνη μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση AKT ανεξάρτητα της PI3K, μέσω του μονοπατιού των κινασών Raf/MEK/ERK σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης. Η ενεργοποίηση των AKT και ERK από τη μορταλίνη καταστέλλει την αλλαγή διαμόρφωσης στη Bax, ελαττώνει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και μειώνει την απόπτωση (281).

Εκτός από τις λειτουργίες της κυτταροπλασματικής μορταλίνης που σχετίζονται με τον καρκίνο, η πυρηνική μορταλίνη που δεν φέρει το σήμα στόχευσης στο μιτοχόνδριο φάνηκε να αυξάνει τις κακοήθεις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού τους, της ικανότητας σχηματισμού αποικιών, της κινητικότητας και της ικανότητας σχηματισμού όγκου τόσο σε μοντέλα *in vitro* όσο και *in vivo*. Συγκεκριμένα, η πυρηνική μορταλίνη δεσμεύει και καταστέλλει τη λειτουργία του p53 ενώ ενεργοποιεί την τελομεράση και την hnRNP-K (heterogeneous ribonucleoprotein-K) ώστε να προωθήσει την καρκινογένεση (282). Τέλος, η υπερέκφραση της μορταλίνης σχετίζεται με τον εμπλουτισμό αρκετών δεικτών βλαστικότητας των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι οι ABCG2, OCT-4, CD133, ALDH1, CD9, MRP1 και η κονεξίνη (283). Χρησιμοποιώντας καρκινικά κύτταρα

μαστού, αποδείχθηκε ότι η υπερεκφρασμένη μορταλίνη μπορεί να οδηγεί σε μείωση των επιθηλιακών δεικτών E-καδερίνη (CDH1), CK8 (KRT8), και CK18 (KRT18). Ταυτόχρονα, υπερέκφραση μορταλίνης ενισχύει τους μεσεγγυματικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένης της βιμεντίνης, της φμπρονεκτίνης, της β-κατενίνης, της CK14 και της hnRNP-K (284). Ακόμα, μια πρόσφατη μελέτη σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού έδειξε ότι η μορταλίνη υποστηρίζει τα καρκινικά βλαστοκύτταρα του μαστού και ενισχύει την επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση (EMT), μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Wnt/GSK3β/β-κατενίνης (285).

2. Σκοπός

Παρά το γεγονός ότι η ανακάλυψη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πραγματοποιήθηκε πρόσφατα, δεν έχουν διευκρινιστεί περαιτέρω λεπτομέρειες. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι: α. η δομική και λειτουργική ανάλυση του συμπλόκου HIF-1α-μορταλίνης, το οποίο συγκροτείται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη κάτω από συνθήκες υποξίας (1% O₂) και αναστολής της οδού σηματοδότησης των κινασών ERK1/2 και β. η επίδραση της αλληλεπίδρασης αυτής στους αποπτωτικούς μηχανισμούς σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν οι εξής:

- *In vitro* χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης, μέσω χρήσης ανασυνδυασμένων μεταλλαγμάτων απαλοιφής των δύο πρωτεϊνών
- Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης εντός καρκινικών κυττάρων HeLa
- Αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης, τόσο *in vitro*, όσο και εντός κυττάρων HeLa, ώστε να αποσαφηνιστεί η λειτουργική της σημασία για την προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία
- Διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο ο μιτοχονδριακός HIF-1α ασκεί την αντι-αποπτωτική του δράση

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Κυτταρικές σειρές

Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διδακτορική διατριβή, ονομάζεται HeLa_S3 (RRID:CCVL_0058). Αποτελεί αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας. Χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή ανθεκτικότητα και ο μικρός χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων HeLa, τα καθιστούν εξαιρετικό εργαλείο στο πλαίσιο της επιστημονικής έρευνας.

3.1.2. Μέσα κυτταροκαλλιέργειών

Τα βασικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ✓ Θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium). Διαθέτει D-γλυκόζη σε υψηλή συγκέντρωση (4500 mg/L), πυροσταφυλικό νάτριο (110 mg/L), μη απαραίτητα αμινοξέα και τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης (15 mg/L). Ενδείκνυται για την καλλιέργεια των περισσότερων καρκινικών κυτταρικών σειρών.
- ✓ Βόειος εμβρυϊκός ορός FBS (Gibco, Fetal Bovine Serum, Τελική συγκέντρωση 10 % v/v). Αποτελεί πηγή παροχής απαραίτητων αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι προωθούν την κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη. Ο ορός υπόκειται σε μια διαδικασία απενεργοποίησης μέσω θερμότητας. Συγκεκριμένα επωάζεται σε υδατόλουτρο (heatblock), σε θερμοκρασία 56 °C για μισή ώρα. Ο σκοπός της σύντομης θερμικής απενεργοποίησης είναι η καταστροφή των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και η πρόληψη επιμολύνσεων από μυκόπλασμα. Έπειτα, διαμοιράζεται σε μικρότερες ποσότητες και συντηρείται στους -20 °C.
- ✓ Αντιβιοτικό σχήμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Biosera, Τελική συγκέντρωση 100 U/ml). Ο συνδυασμός αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης συνεισφέρει στην πρόληψη μικροβιακών επιμολύνσεων των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών.
- ✓ Τρυψίνη (Biosera, Trypsin-EDTA 1x σε PBS). Η θρυψίνη είναι μία πρωτεάση η οποία χρησιμοποιείται για την διάσπαση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα τόσο με την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας όπου είναι προσκολλημένα, όσο και μεταξύ τους. Το διάλυμα τρυψίνης διαμοιράζεται σε μικρές ποσότητες και συντηρείται στους -20 °C.
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Appllichem, Dimethylsulfoxide/DMSO, Τελική συγκέντρωση 10% v/v). Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυσταλλοπροστατευτικός παράγοντας, για τις κυτταρικές σειρές που πρόκειται να συντηρηθούν, είτε στους -80 °C, είτε σε υγρό N₂.

3.1.3. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- ✓ TOP10 (Invitrogen), τα οποία διαθέτουν εγγενή ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις διαδικασίες μοριακής κλωνοποίησης.
- ✓ BL21RIL-CodonPlus-RIL strain 3 (Invitrogen) τα οποία παρουσιάζουν εγγενή ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ετερόλογων ανθρώπινων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις. Είναι γενετικά τροποποιημένα, ώστε να παράγουν σπάνια tRNA που αναγνωρίζουν κωδικόνια για τα αμινοξέα αργινίνη (R), ισολευκίνη (I) και λευκίνη (L).

3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς

Για την παρούσα ενότητα, καθώς και όλες τις υπόλοιπες που ακολουθούν είναι σημαντικό να οριστούν τα εξής:

-Mortalin/Mort-FL: αναφέρεται στην αμινοξική αλληλουχία της πλήρους μήκους μορταλίνης (1-679)

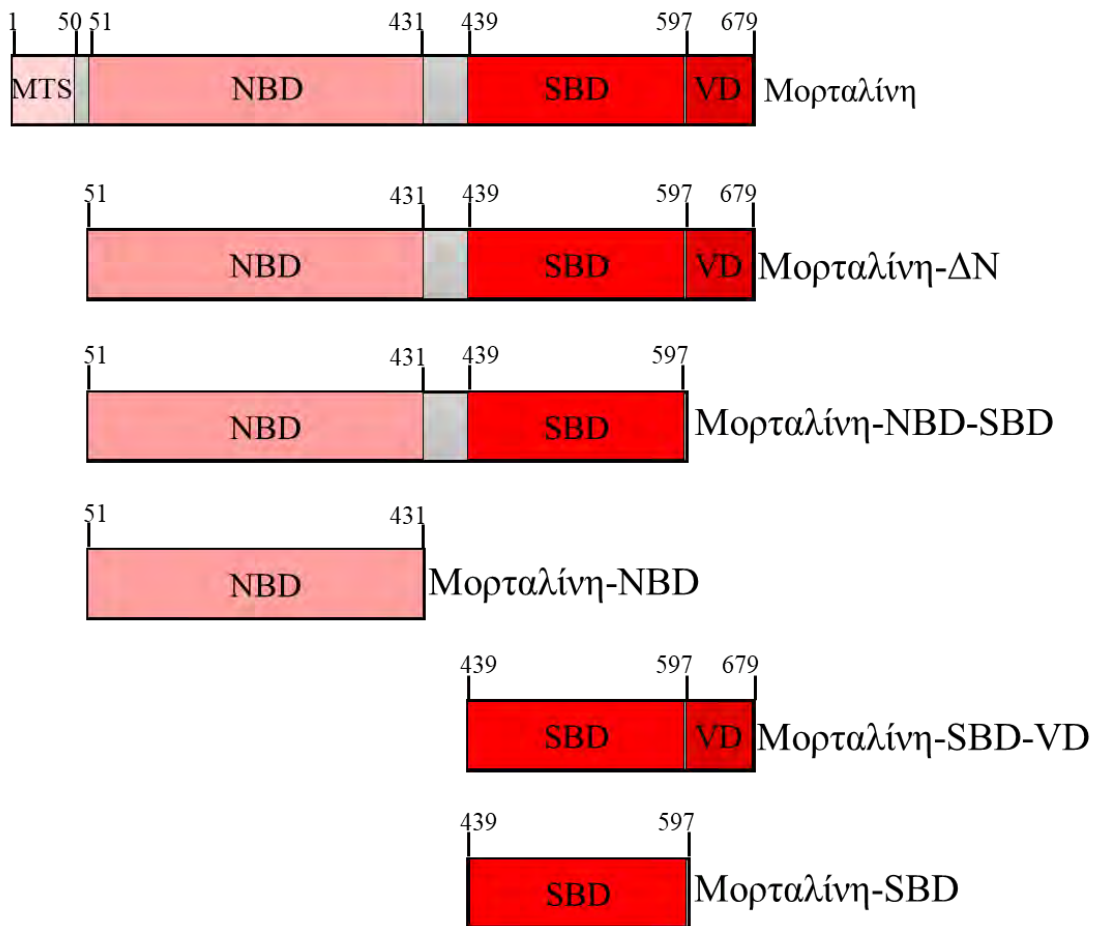
-Mortalin/Mort-Δ(1-51) ή Mortalin/Mort-ΔN: αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων 51-679 της μορταλίνης

-Mortalin/Mort-NBD-SBD: αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων 51-597 της μορταλίνης

-Mortalin/Mort-NBD: αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων 51-431 της μορταλίνης

-Mortalin/Mort-SBD-VD: αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων 439-679 της μορταλίνης

-Mortalin/Mort-SBD: αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων 439-597 της μορταλίνης (**Εικόνα 8**)



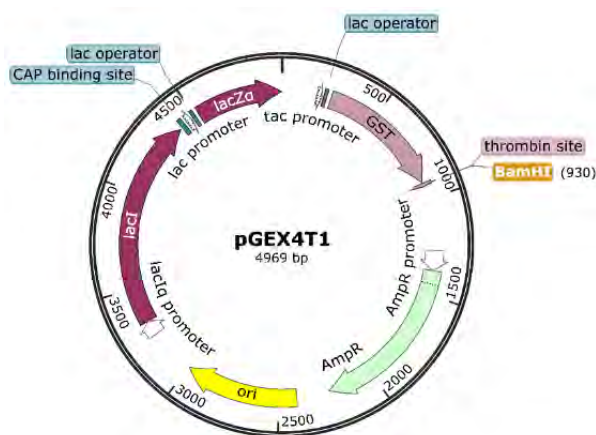
Εικόνα 8: Σχηματικές αναπαραστάσεις ανασυνδυασμένων μεταλλαγμάτων της μορταλίνης. Απεικόνιση των περιοχών Μορταλίνη-ΔN (αμινοξέα 51-679), Μορταλίνη-NBD-SBD (αμινοξέα 51-597), Μορταλίνη-NBD (αμινοξέα 51-431), Μορταλίνη-SBD-VD (αμινοξέα 439-679) και Μορταλίνη-SBD (αμινοξέα 439-597) που χρησιμοποιήθηκαν ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στην παρούσα διατριβή.

- pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences UK Ltd)

Είναι πλασμιδιακός φορέας έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα και έχει μέγεθος 4,9 kb. Φέρει τα εξής βασικά γενετικά στοιχεία: **α.** έναν ισχυρό υβριδικό υποκινητή tac, **β.** ένα γονίδιο lacI που εκφράζει τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης, **γ.** την αλληλουχία χειριστή lac operator όπου προσδένεται ο παραγόμενος καταστολέας του οπερονίου, **δ.** την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά του πολυσυνδέτη (MCS) παρέχοντας τη δυνατότητα έκφρασης των κλωνοποιημένων cDNA ως πρωτεΐνες σύντηξης με τη GST στο αμινοτελικό τους άκρο και **ε.** την αλληλουχία που κωδικοποιεί για ένζυμο που μεταβολίζει το αντιβιοτικό αμικιλίνη προσφέροντας ανθεκτικότητα σε βακτηριακά κύτταρα που φέρουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο (**Εικόνα 9**).

Στο φορέα αυτό κλωνοποιήθηκε το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στην περιοχή SBD-VD (αα: 439-679) της μορταλίνης, οδηγώντας στην κατασκευή του πλασμιδίου pGEX-4T-1-Mortalin-SBD-VD. Το cDNA εισήχθη στη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής

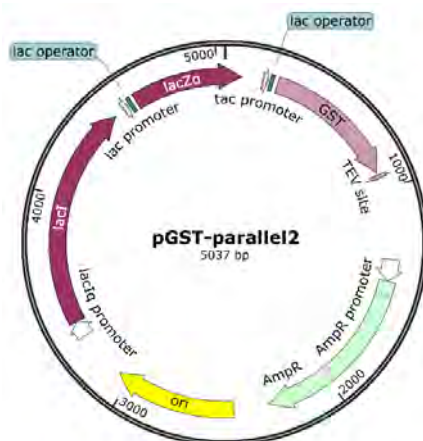
ενδονουκλεάσης BamHI. Επιπρόσθετα στο φορέα αυτό έχουν ήδη κλωνοποιηθεί τα cDNA που αντιστοιχούν: α. στο μετάλλαγμα της επικράτειας ETD του HIF-1α όπου καταργούνται οι θέσεις φωσφορυλίωσης στις σερίνες 641 και 643 από τις ERK1/2 λόγω μετάλλαξης αυτών σε αλανίνες, β. στη μορφή της επικράτειας ETD του HIF-1α όπου η σερίνη στη θέση 641 έχει μεταλλαχθεί σε γλουταμινικό οξύ και ως εκ τούτου συμπεριφέρεται ως φωσφορυλιωμένη λόγω μίμησης του φορτίου φωσφορυλίωσης, γ. στα τμήματα αγρίου τύπου των περιοχών 348-616 (286), 530-826 και 652-826 του HIF-1α (33).



Εικόνα 9: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pGEX-4T-1

- pGST-parallel2 (Pharmacia, Sweden)

Ο φορέας pGST-parallel2 αποτελεί φορέα έκφρασης σε προκαρυωτικά κύτταρα και έχει μέγεθος 5,037 kb. Έχει προκύψει από τον pGEX-4T-1 μέσω γενετικών τροποποιήσεων που οδηγούν στην εισαγωγή μιας θέσης αναγνώρισης για την ενδονουκλεάση περιορισμού ClaI, μετά την αλληλουχία που φέρει τη πληροφορία για τη GST και πριν τη θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση TEV (287) (**Εικόνα 10**).



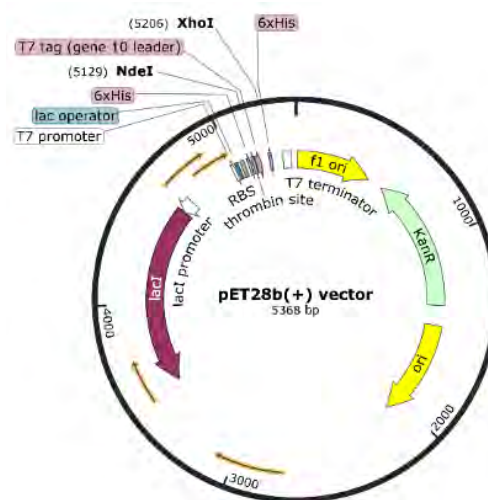
Εικόνα 10: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pGST-parallel2

Στο φορέα αυτό ήταν ήδη κλωνοποιημένο το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στην περιοχή NBD (αα: 52-431) της μορταλίνης, οδηγώντας στην κατασκευή του πλασμιδίου pGST-parallel2-Mortalin-NBD, όπως έχει δημοσιευθεί (219). Η θέση κλωνοποίησης του cDNA της NBD στον εν λόγω φορέα είναι άγνωστη. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή αποτελεί ευγενική παραχώρηση του Dr. Saurav Misra (219).

- pET28b (+) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Είναι φορέας έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα. Έχει μέγεθος 5,368 kb και φέρει: **α.** τον υποκινητή T7 στον οποίο προσδένεται η RNA πολυμεράση T7 του ξενιστή, **β.** ένα γονίδιο lacI που εκφράζει τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης, **γ.** την αλληλουχία χειριστή lac operator όπου προσδένεται ο παραγόμενος καταστολέας του οπερονίου, **δ.** γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα των βακτηρίων παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνης και **ε.** δύο αλληλουχίες που κωδικοποιούν για επιτόπους ιστιδινών (His_{x6}-tag) μία εκ των οποίων εντοπίζεται μετά τον υποκινητή T7 και η άλλη μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την αμινοξική αλληλουχία που αποτελεί θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση θρομβίνη. Και οι δύο επιτόποι εξασφαλίζουν την έκφραση των κλωνοποιημένων cDNA ως πρωτεΐνες σύντηξης είτε με αμινοτελικό, είτε με καρβοξυτελικό επίτοπο His_{x6} (**Εικόνα 11**).

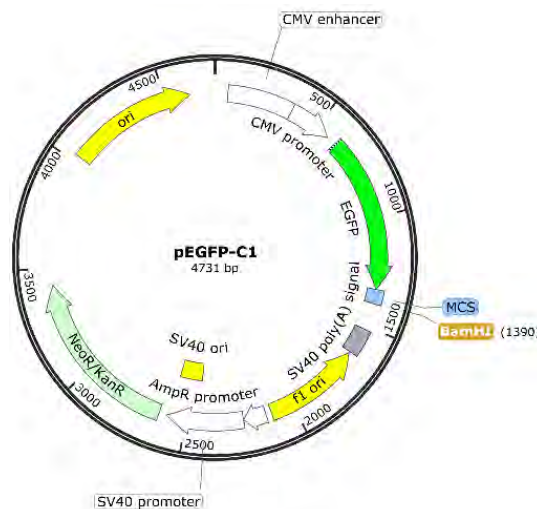
Τα cDNA των περιοχών NBD (αα: 51-431), NBD-SBD (αα: 51-597), SBD-VD (αα: 439-679), SBD (αα: 439-597) κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pET28b(+) ως τμήματα με κολλώδη άκρα που έχουν προκύψει ύστερα από ταυτόχρονη διπλή πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI. Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν είναι οι εξής: pET28b(+)-Mortalin-NBD, pET28b(+)-Mortalin-NBD-SBD, pET28b(+)-Mortalin-SBD-VD, pET28b(+)-Mortalin-SBD. Το cDNA της περιοχής 52-679 [Mortalin-Δ(1-51)] που είναι κλωνοποιημένη στον pET28b(+) [πλασμίδιο: pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51)] αποτελεί ευγενική παραχώρηση του Dr. James A. Cowan (288).



Εικόνα 11: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pET28b(+)

- pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, CA, USA)

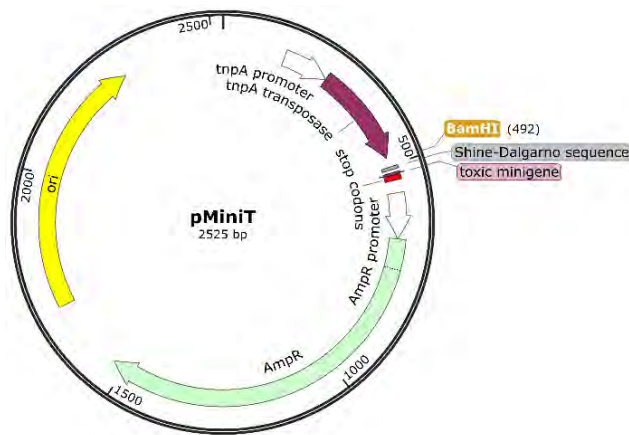
Αποτελεί φορέα έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και έχει μέγεθος 4,731 kb. Διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά: **α.** τον υποκινητή του ιού CMV, **β.** γονίδιο το οποίο παρέχει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και **γ.** μία αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον επίτοπο GFP που βρίσκεται στην 5' πλευρά του πολυσυνδέτη (MCS) γεγονός που δίνει τη δυνατότητα υπερέκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με αμινοτελική GFP (**Εικόνα 12**). Στο φορέα αυτό εισήχθησαν τα cDNA που αντιστοιχούν στις περιοχές Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-NBD-SBD, Mortalin-SBD-VD, Mortalin-SBD στη θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού BamHI. Επιπρόσθετα, το cDNA που εκφράζει την πλήρους μήκους αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α που φέρει συγκεκριμένες μεταλλάξεις οδηγώντας σε αντικατάσταση των αμινοξέων σερίνης στις θέσεις 641 και 643 (θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2) σε αλανίνες, ήταν ήδη κλωνοποιημένο στον εν λόγω φορέα, όπου χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή.



Εικόνα 12: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pEGFP-C1

- pMiniT (NEB, Ipswich, Massachusetts)

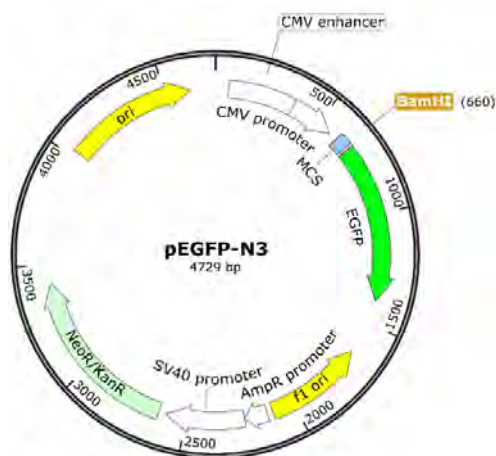
Ο φορέας έχει μέγεθος 2,525 kb, περιέχει θέσεις περιορισμού για εύκολη κλωνοποίηση ενθέματος και ενδείκνυται για εύκολη ανίχνευση των μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων που φέρουν το κλωνοποιημένο ένθεμα. Η ανίχνευση αυτή βασίζεται στην έκφραση ενός τοξικού γονιδίου που κωδικοποιεί για ένα διπεπτίδιο, το οποίο είναι τοξικό και παρεμποδίζει τη μετάφραση στα βακτήρια. Παρουσία του κλωνοποιημένου ενθέματος, διακόπτεται το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του προαναφερθέντος γονιδίου, με αποτέλεσμα την επιβίωση και τη δυνατότητα επιλογής των αντίστοιχων βακτηριακών αποικιών (**Εικόνα 13**). Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του cDNA που εκφράζει την πλήρους μεγέθους μορταλίνη (Mortalin-Full Length/FL) στη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI.



Εικόνα 13: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pMiniT

- pEGFP-N3 (NEB, Ipswich, Massachusetts)

Έχει μέγεθος ~4,7 kb και ανήκει στην κατηγορία των φορέων έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών. Διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά: **α.** τον υποκινητή του ιού CMV, **β.** γονίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και **γ.** μία αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον επίτοπο GFP που βρίσκεται στην 3' πλευρά του πολυσυνδέτη (MCS) γεγονός που δίνει τη δυνατότητα υπερέκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με καρβοξυτελική GFP (**Εικόνα 14**). Στο φορέα αυτό κλωνοποιήθηκε το cDNA που αντιστοιχεί στην πλήρους μεγέθους μορταλίνη (Full Length/FL-Mortalin) στη θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού BamHI. Επίσης στο φορέα αυτό ήταν ήδη κλωνοποιημένο το cDNA που αντιστοιχεί στην πλήρους μεγέθους HKII, στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού 5' EcoRI-BamHI 3'. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή (pEGFP-N3-HKII) αγοράστηκε από την Addgene (#21920).

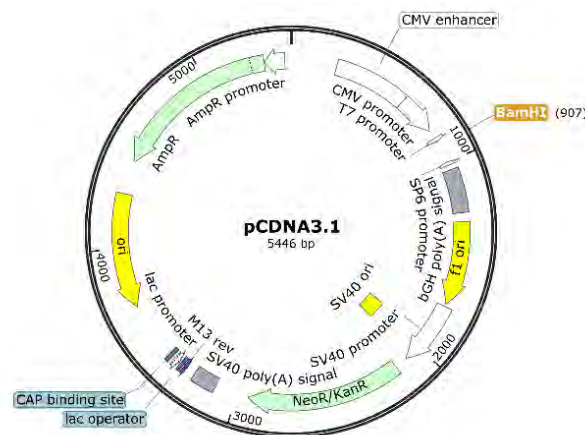


Εικόνα 14: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pEGFP-N3

- pCDNA3.1-Flag (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Έχει μέγεθος ~5,4 kb και αξιοποιείται στην υπερέκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών των οποίων τα cDNA βρίσκονται στο ίδιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) με τον αμινοτελικό επίτοπο FLAG (οκταπεπτίδιο DYKDDDDKL), (**Εικόνα 15**).

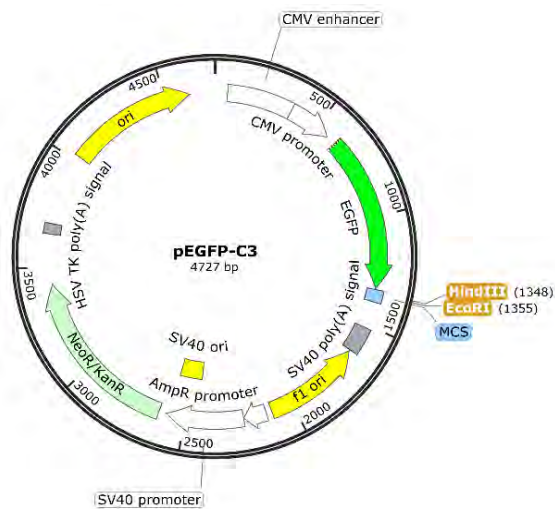
Διαθέτει επίσης: **α.** τον ευκαρυωτικό υποκινητή CMV, **β.** γονίδιο που παρέχει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη για την επιλογή βακτηριακών κλώνων που είναι μετασχηματισμένοι με τον εν λόγω φορέα και **γ.** την περιοχή MCS στην οποία υπάρχει η θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού BamHI όπου έχει πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση σε κάθε περίπτωση, των cDNA, που αντιστοιχούν στις περιοχές Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD και Mortalin-SBD. Στον φορέα αυτό είναι ήδη κλωνοποιημένο το cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία του μεταλλαγμένου πλήρους μήκους HIF-1α, όπου υπάρχουν οι αντικαταστάσεις των καταλοίπων σερίνης σε αλανίνες (S641 σε A641 και S643 σε A643) στις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 καθώς, όπου χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή.



Εικόνα 15: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pCDNA3.1-Flag

- **pEGFP-C3 (Clontech)**

Έχει μέγεθος ~4,7 kb και ανήκει στην κατηγορία των φορέων έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών. Διαθέτει παρόμοια χαρακτηριστικά με το φορέα έκφρασης pEGFP-C1. Ο εν λόγω φορέας φέρει κλωνοποιημένο το cDNA που αντιστοιχεί στην πλήρους μεγέθους προαποπρωτεΐνη Bax (Full Length/Bax-FL) στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού HindIII και EcoRI (**Εικόνα 16**). Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή (pEGFP-C3-Bax) αγοράστηκε από την Addgene (#19741).



Εικόνα 16: Απεικόνιση του χάρτη του φορέα έκφρασης pEGFP-C3

3.1.5. Υλικά χρωματογραφίας

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- Σφαιρίδια Αγαρόζης-Γλουταθειόνης (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey-Nagel, Duren, Germany) τα οποία αποτελούν ένα μέσο χρωματογραφίας αγκιστείας που επιτρέπει τον καθαρισμό πρωτεϊνών σε σύντηξη με τον επίτοπο GST ή γενικότερα πρωτεϊνών, που δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια στη γλουταθειόνη, η οποία είναι ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων χμαιοικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με τη GST, από συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* BL21RIL-CodonPlus-RIL strain 3, καθώς και για δοκιμασίες *in vitro* δέσμευσης μεταξύ ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (*in vitro* binding assays).
- Σφαιρίδια Αγαρόζης-Νικελίου (Ni-NTA Agarose, Qiagen, Germany). Το εν λόγω μέσο χρωματογραφίας αποτελείται από σφαιρίδια αγαρόζης, πάνω στα οποία έχει ακινητοποιηθεί δισθενές νικέλιο-νιτριλοτριοξικό οξύ (Ni^{+2} -NTA). Τα σφαιρίδια επιτρέπουν τον καθαρισμό πρωτεϊνών σύντηξης με επίτοπο ιστιδίνης (His-tag) από πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηρίων *E. Coli* ή πρωτεϊνών που έχουν ισχυρή συγγένεια για το δισθενές νικέλιο. Ο καθαρισμός αυτός βασίζεται στην ικανότητα του αμινοξέος ιστιδίνη να δημιουργεί δεσμούς με το ιόντα νικελίου. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων χμαιοικών πρωτεϊνών σε σύντηξη με επίτοπο έξι ιστιδινών (His_{x6}), από συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* BL21RIL-CodonPlus-RIL strain 3.
- Σφαιρίδια Agarose-GFP-Trap (Chromotek, GmbH, Planegg, Germany). Τα συγκεκριμένα σφαιρίδια χρωματογραφίας αποτελούμενα από αγαρόζη, φέρουν ομοιοπολικά

συνδεδεμένο ειδικό αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών σύντηξης με τον επίτοπο GFP.

3.1.6. Εταιρείες προμήθειας χημικών αντιδραστηρίων

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από τις εταιρείες PanReac AppliChem ITW Reagents (Darmstadt, Germany) και Sigma Aldrich-Merck (Darmstadt, Germany).

3.1.7. Εταιρείες προμήθειας αναλωσίμων μοριακής βιολογίας

Τα υλικά μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκουν στις εταιρείες New England Biolabs Inc (Ipswich, Massachusetts), Takara Bio (Shiga, Japan), Applied Biological Materials Inc (Richmond, Canada), Fermentas και Macherey Nagel (Düren, Germany).

3.1.8. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές

Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν μικρού μήκους μονόκλιωνα μόρια DNA, τα οποία καλούνται εκκινητές. Για την ενίσχυση οποιουδήποτε δίκλωνου τμήματος DNA, οι εκκινητές χρησιμοποιούνται σε ζεύγη, όπου ο ένας ονομάζεται πρόσθιος-νοηματικός εκκινητής (Forward Primer, F) και ο άλλος οπίσθιος-αντινοηματικός εκκινητής (Reverse Primer, R). Στο πλαίσιο πραγματοποίησης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) για τη ενίσχυση των τμημάτων cDNA που αντιστοιχούν στα διάφορα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα της μορταλίνης, χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι ζεύγη εκκινητών:

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' - 3') και Θερμοκρασίες τήξης [Tms (°C)]	Τμήματα cDNA
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG (49 °C)	Mortalin-NBD
XhoI431R	TTTCTCGAGTTAATCGCCGGCCAACACACCTCC (67 °C)	
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG (49 °C)	Mortalin-NBD-SBD
XhoI597R	TTTCTCGAGTTATTCCATCTTGGTTTCTGTGTCG (58 °C)	
NdeI439F	TTTCATATGGATGTCACTCCCCTGTCTCTGG (61 °C)	Mortalin-SBD-VD
T7 terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCGG (57 °C)	
NdeI439F	TTTCATATGGATGTCACTCCCCTGTCTCTGG (61 °C)	Mortalin-SBD
XhoI597R	TTTCTCGAGTTATTCCATCTTGGTTTCTGTGTCG (58 °C)	
Mort-BamHI-1F	TTTGGATCCATGATAAGTGCCAGCCGAGC (65 °C)	Mortalin-FL
Mort-BamHI-679R	TTTGGATCCCTGTTTTCCTCCTTTTGATC (60 °C)	
MortN-B51F	TTTTGGATCCATCAAGGGAGCAGTTGTTGG (58 °C)	Mortalin-Δ(1-51)
MortV-B679R	TTTTGGATCCCTACTGTTTTCCTCCTTTTGATC (53 °C)	
MortN-B51F	TTTTGGATCCATCAAGGGAGCAGTTGTTGG (58 °C)	Mort-NBD

MortN-B431R	TTTTGGATCCTTAATCGCCGGCCAACACACCTCC (67 °C)	
MortN-B51F	TTTTGGATCCATCAAGGGAGCAGTTGTTGG (58 °C)	Mort-NBD-SBD
MortS-B597R	TTTTGGATCCTTATTCATCTTGGTTTCTGTGTCG (58 °C)	
Mort-S-B439F	TTTTGGATCCGATGTCACCTCCCTGTCTCTGG (61 °C)	Mortalin-SBD-VD
Mort-V-B679R	TTTTGGATCCTTACTGTTTTTCTCCTTTTGATC (53 °C)	
Mort-S-B439F	TTTTGGATCCGATGTCACCTCCCTGTCTCTGG (61 °C)	Mortalin-SBD
MortS-B597R	TTTTGGATCCTTATTCATCTTGGTTTCTGTGTCG (58 °C)	

Πίνακας 1: Ζεύγη ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων cDNA που αντιστοιχούν στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα της μορταλίνης, με απώτερο στόχο την κλωνοποίηση αυτών τόσο σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτήρια, όσο και σε κύτταρα θηλαστικών

Με έντονη γραφή παρουσιάζεται η αλληλουχία αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού **BamHI**, η οποία αξιοποιήθηκε για τη κλωνοποίηση των παραπάνω τμημάτων cDNA στους αντίστοιχους φορείς για τους οποίους γίνεται λόγος στην ενότητα **3.1.4** της παρούσας διατριβής. Επίσης με υπογράμμιση επισημαίνεται το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής. Οι εκκινήτες που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) (**Πίνακας 1**).

3.1.9. Αντισώματα

Αντισώματα	Είδος	Αραίωση	Αριθμός καταλόγου	Εταιρεία
Έναντι μορταλίνης	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:1000 (Ανοσοαποτύπωση, Ανοσοφθορισμός)	sc-13967	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)
Έναντι HSP60	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:800 (Ανοσοφθορισμός)	4870	Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
Έναντι β-ακτίνης	Μονοκλωνικό ποντικού	1:5000 (Ανοσοαποτύπωση)	3700	
Έναντι β-τουμπουλίνης	Μονοκλωνικό ποντικού	1:10000 (Ανοσοαποτύπωση)	86298	
Έναντι HIF-1α	Μονοκλωνικό ποντικού	1:500 (Ανοσοαποτύπωση)	610959	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, U.S.)
Έναντι Bax	Μονοκλωνικό ποντικού	1:500 (Ανοσοφθορισμός)	581-1P160531	Acris GmbH (Herford, Germany)
Έναντι His	Μονοκλωνικό κουνελιού	1:1000 (Ανοσοαποτύπωση)	04-1664	Merck KGaA, (Darmstadt, Germany)
Έναντι Flag	Μονοκλωνικό ποντικού	1:10000 (Ανοσοαποτύπωση)	F4042	Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany)
		1:1000 (Ανοσοφθορισμός)		

Έναντι GFP	Πολυκλωνικό κουνελιού	1:2000 (Ανοσοαποτύπωση)	A6455	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)
Έναντι GST	Πολυκλωνικό ποντικού	1:10000 (Ανοσοαποτύπωση)	15TF2- 1D10	Ximbio (London, United Kingdom)

Πίνακας 2: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση και μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση και ο πολλαπλασιασμός μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, από ένα δείγμα/υπόστρωμα που περιέχει μία δεξαμενή διαφορετικών μορίων DNA, πραγματοποιείται με τη χρήση της μοριακής τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το υπόστρωμα DNA μπορεί να είναι είτε πλασμιδιακό, είτε γενωμικό, είτε ολικό cDNA καθώς και από πολλές άλλες πηγές. Για την επίτευξη της ειδικής ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος δίκλωνου DNA χρησιμοποιούνται ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία καλούνται εκκινητές (primers). Υπό κατάλληλες συνθήκες, που περιλαμβάνουν την αποδιάταξη (denaturation) του DNA, οι εκκινητές μπορούν να υβριδοποιηθούν μέσω συμπληρωματικότητας στο στόχο-DNA (annealing). Επίσης επιτρέπουν τη δέσμευση μιας ειδικής θερμοάντοχης πολυμεράσης του DNA, η οποία προωθεί τη σύνθεση-επιμήκυνση (extension) του συμπληρωματικού κλώνου, μέσω χρήσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Κάθε κύκλος PCR χαρακτηρίζεται από την αλληλοδιάδοχη εκτέλεση των τριών βασικών σταδίων (αποδιάταξη, υβριδοποίηση, επιμήκυνση) και οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επώασης χαρακτηρίζουν τα προαναφερθέντα στάδια. Η χρήση πολυμερασών του DNA που είναι ανθεκτικές σε μετουσίωση από υψηλές θερμοκρασίες, κατέστησε εφικτή τη διαδοχική εναλλαγή των κύκλων της PCR, χωρίς να υπάρχει ανάγκη ανανέωσης του ενζύμου στην αντίδραση. Η προσθήκη άλατος $MgCl_2$ προσφέρει ιόντα Mg^{+2} που είναι απαραίτητα ως συμπαραγόντας του ενζύμου.

Στη παρούσα διατριβή τα cDNA που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες: Mortalin-FL, Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-NBD-SBD, Mortalin-SBD-VD, Mortalin-SBD ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης για τις ενδονουκλεάσες περιορισμούς NdeI, XhoI και BamHI (**Πίνακας 1**), με στόχο την απομόνωση των προϊόντων ενίσχυσης τόσο με άκρα 5' NdeI/XhoI 3' (κλωνοποίηση σε φορείς έκφρασης βακτηριακών κυττάρων, **3.1.4**), όσο και με άκρα 5' BamHI/BamHI 3' (κλωνοποίηση σε φορείς έκφρασης κυττάρων θηλαστικών, **3.1.4**). Ως εκμαγείο στη περίπτωση ενίσχυσης των cDNA των περιοχών Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-NBD-SBD, Mortalin-SBD-VD και Mortalin-SBD χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51). Στη περίπτωση του cDNA του γονιδίου της πλήρους μεγέθους μορταλίνης (Mortalin-FL) ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ολικό cDNA κυττάρων HeLa, το οποίο προέκυψε μέσω αντίστροφης μεταγραφής του υποπληθυσμού mRNA από το συνολικό RNA των προαναφερθέντων κυττάρων. Για το στάδιο υβριδοποίησης, η θερμοκρασία εκτιμήθηκε με βάση τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m) (**Πίνακας 1**) η οποία με τη σειρά της υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού SnapGene Viewer, ανάλογα με το μέγεθος και τη σύσταση των ολιγονουκλεοτιδίων σε βάσεις. Η μαθηματική φόρμουλα που χρησιμοποιείται για την εύρεση του T_m (για μικρούς

εκκινητές ~25 νουκλεοτιδίων) είναι ο εξής: $T_m=2(A+T)+4(G+C)$. Για την ενίσχυση των προαναφερθέντων cDNA χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμεράσες του DNA Q5, Phusion, και Vent (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) και Taq (Kapa Biosystems Inc, Wilmington, MA). Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για κάθε cDNA παρουσιάζονται αναλυτικά στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 3):

Τμήματα cDNA	Μίγμα αντίδρασης	Συνθήκες αντίδρασης	
Mortalin-FL	-700 ng ολικού cDNA κυττάρων HeLa -1x Q5 Reaction Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²) -0,2 mM dNTPs -0,5 μM Mort-BamHI-1F -0,5 μM Mort-BamHI-679R -0,02 Units/μl πολυμεράση του DNA Q5 -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μl	Αρχική αποδιάταξη	98 °C, 3 min
		Αποδιάταξη	98 °C, 10 sec
		Υβριδοποίηση	63 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 1,5 min
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 2 min
		Κύκλοι	35
Mortalin-Δ(1-51)	-20 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -1x Thermopol Buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1% Triton®-X-100, pH 8.8) - 0,2 mM dNTPs -0,5 μM MortN-B51F -0,5 μM MortV-B679R -0,02 Units/μl πολυμεράση του DNA Vent -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μl	Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 5 min
		Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
		Υβριδοποίηση	59 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 2 min
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 5 min
		Κύκλοι	30
Mortalin-NBD	-20 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -KAPA HiFi Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²) -0,3 mM dNTPs	Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 5 min
		Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
		Υβριδοποίηση	52 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 1,5 min

	-0,2 μ M T7 forward	Τελική επιμήκυνση	72 °C, 5 min
	-0,2 μ M XhoI431R		
	-0,02 Units/ μ l πολυμεράση του DNA Hifi Taq	Κύκλοι	30
	-H ₂ O έως τελικό όγκο 10 μ l		
	-20 ng pET28b(+)-Mort- Δ (1- 51)(288)	Αρχική αποδιάταξη	98 °C, 3 min
		Αποδιάταξη	98 °C, 10 sec
		Υβριδοποίηση	61 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 50 sec
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 2 min
		Κύκλοι	30
	-1x Q5 Reaction Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²)		
		-0,2 mM dNTPs	
-0,5 μ M MortN-B51F			
-0,5 μ M MortN-B431R			
-0,02 Units/ μ l πολυμεράση του DNA Q5			
-H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μ l			
Mortalin- NBD-SBD	-20 ng pET28b(+)-Mort- Δ (1- 51)(288)	Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 5 min
	-KAPA HiFi Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²)	Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
	-0,3 mM dNTPs	Υβριδοποίηση	52 °C, 30 sec
	-0,2 μ M T7 forward	Επιμήκυνση	72 °C, 2 min
	-0,2 μ M XhoI597R	Τελική επιμήκυνση	72 °C, 5 min
	-0,02 Units/ μ l πολυμεράση του DNA Hifi Taq	Κύκλοι	30
	-H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μ l		
	-20 ng pET28b(+)-Mort- Δ (1- 51)(288)	Αρχική αποδιάταξη	98 °C, 3 min
		Αποδιάταξη	98 °C, 10 sec
		Υβριδοποίηση	61 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 50 sec
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 2 min
Κύκλοι		30	
-1x Q5 Reaction Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²)			
	-0,2 mM dNTPs		
	-0,5 μ M MortN-B51F		
	-0,5 μ M MortS-B597R		
	-0,02 Units/ μ l πολυμεράση του DNA Q5		
	-H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μ l		

Mortalin-SBD-VD	-40 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -1x Thermopol Buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1% Triton®-X-100, pH 8.8) - 0,2 mM dNTPs -0,5 μM MortN-B51F -0,5 μM MortV-B679R -0,02 Units/μl πολυμεράση του DNA Vent -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μl	Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 5 min
		Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
		Υβριδοποίηση	52 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 2 min
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 5 min
		Κύκλοι	30
	-20 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -1x Q5 Reaction Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²) -0,2 mM dNTPs -0,5 μM MortS-B439F -0,5 μM MortV-B679R -0,02 Units/μl πολυμεράση του DNA Q5 -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μl	Αρχική αποδιάταξη	98 °C, 3 min
		Αποδιάταξη	98 °C, 10 sec
		Υβριδοποίηση	56 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 25 sec
Τελική επιμήκυνση		72 °C, 2 min	
Κύκλοι		30	
Mortalin-SBD	-20 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -1x Phusion Buffer - 0,2 mM dNTPs -0,3 μM NdeI439F -0,3 μM XhoI597R -0,02 Units/μl πολυμεράση του DNA Phusion -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 μl	Αρχική αποδιάταξη	95 °C, 5 min
		Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
		Υβριδοποίηση	60 °C, 30 sec
		Επιμήκυνση	72 °C, 30 sec
		Τελική επιμήκυνση	72 °C, 5 min
		Κύκλοι	30
	-20 ng pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)(288) -1x Q5 Reaction Buffer (contains 2 mM Mg ⁺²)	Αρχική αποδιάταξη	98 °C, 3 min
		Αποδιάταξη	98 °C, 10 sec
		Υβριδοποίηση	60 °C, 30 sec

	-0,2 mM dNTPs	Επιμήκυνση	72 °C, 15 sec
	-0,5 µM MortS-B439F -0,5 µM MortS-B597R	Τελική επιμήκυνση	72 °C, 2 min
	-0,02 Units/µl πολυμεράση του DNA Q5 -H ₂ O έως τελικό όγκο 50 µl	Κύκλοι	30

Πίνακας 3: Συνθήκες της αντίδρασης PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του cDNA των τμημάτων Mort-Δ(1-51), Mort-NBD, Mort-NBD-SBD, Mort-SBD-VD, Mort-SBD και Mort-FL

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να ελεγχθεί η ακεραιότητα και η καθαρότητα των προϊόντων των αντιδράσεων. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη χρήση του πρωτοκόλλου «Nucleospin Gel clean-up kit» της εταιρείας Macherey-Nagel και αποτέλεσαν τα DNA ενθέματα, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στη συνέχεια στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (3.1.4). Συγκεκριμένα, το cDNA της πλήρους μεγέθους μορταλίνης (Mortalin-FL) κλωνοποιήθηκε αρχικά στο φορέα pMiniT (5' BamHI-BamHI 3') και έπειτα μέσω υποκλωνοποίησης στον φορέα pEGFP-N3 (5' BamHI-BamHI 3'). Το cDNA της Mortalin-Δ(1-51) κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEGFP-C1 (5' BamHI-BamHI 3') και της Mortalin-NBD στους φορείς pET28b(+) (5' NdeI-XhoI 3') και pEGFP-C1 (5' BamHI-BamHI 3'). Όμοια τα cDNA των περιοχών NBD-SBD, SBD-VD και SBD της μορταλίνης κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά σε κάθε περίπτωση στους φορείς pET28b(+) και pEGFP-C1 ως ενθέματα με άκρα κλωνοποίησης 5' NdeI-XhoI 3' και 5' BamHI-BamHI 3' αντίστοιχα. Τα cDNA των Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD και Mortalin-SBD κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pCDNA3.1-Flag (3.1.4) ως τμήματα με άκρα κλωνοποίησης 5' BamHI-BamHI 3'. Επίσης, το τμήμα SBD-VD κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEX-4T-1 (3.1.4) ως ένθεμα με άκρα κλωνοποίησης 5' BamHI-BamHI 3'.

3.2.2. Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα

Το αντιδραστήριο NucleoZol (Macherey-Nagel) αξιοποιήθηκε στο πλαίσιο της απομόνωσης ολικού RNA κυττάρων HeLa. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με διάλυμα 1x PBS, και λύθηκαν με προσθήκη 400 µl NucleoZol, σε πιάτο καλλιέργειας διαμέτρου 60 mm. Το εκχύλισμα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου Eppendorf και έπειτα προστέθηκαν 160 µl αποστειρωμένου ddH₂O. Το δείγμα αναδεύτηκε μέσω περιδίνησης με τη βοήθεια συσκευής τύπου vortex. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στους 25°C. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του RNA, από το DNA και το σύνολο των κυτταρικών πρωτεϊνών, μέσω φυγοκέντρησης των δειγμάτων στα 12000xg για 15 λεπτά. Στη συνέχεια η υδατική φάση στην

οποία εντοπίζεται το RNA, μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου Eppendorf, όπου και προστέθηκε 100% v/v ισοπροπανόλη. Ο όγκος της ισοπροπανόλης που χρησιμοποιήθηκε είναι ίσος με αυτόν της υδατικής φάσης. Ακολούθως, αφού το μίγμα υποβλήθηκε σε ισχυρή ανάδευση επώαστηκε στους 25°C για 10 λεπτά. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 12000xg για 10 λεπτά, ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Αφού απομακρύνθηκε η ισοπροπανόλη που εντοπίζεται στο υπερκείμενο, έγινε προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλης στο ίζημα, ώστε να εκπλυθεί το RNA. Πραγματοποιήθηκε άμεση φυγοκέντρηση του δείγματος για 3 λεπτά στα 12000xg. Το ίζημα εκπλύθηκε ξανά και έγινε πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης. Το RNA που βρίσκεται στο ίζημα, επαναιωρήθηκε σε 30 μl αποστειρωμένου ddH₂O, απαλλαγμένου από RNAσες. Τα δείγματα συντηρούνται στους -80 °C.

3.2.3. Σύνθεση cDNA μέσω PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η μέθοδος της RT-PCR στηρίζεται στην ενεργότητα ενός ενζύμου που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το RNA για τη σύνθεση δίκλωνου cDNA. Στην παρούσα διατριβή η αντίστροφη μεταγραφή του kit PrimeScript™ RT reagent kit της εταιρείας Takara Bio Inc χρησιμοποιήθηκε με βάση τις εκάστοτε οδηγίες με σκοπό την σύνθεση δίκλωνου cDNA από υπόστρωμα ολικού RNA, όπου με τη χρήση εκκινητών oligo-dT επιτεύχθηκε η αντίστροφη μεταγραφή μόνο του υποπληθυσμού mRNA που φέρουν πολυαδενυλιωμένες ουρές (polyA tails). Το ολικό αυτό cDNA χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ενίσχυση και απομόνωση του cDNA που εκφράζει την πλήρους μεγέθους μορταλίνη.

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία βασική μεθοδολογία ηλεκτροχημείας που βρίσκει άμεση εφαρμογή στον διαχωρισμό μεγαλομορίων, όπως το DNA. Στηρίζεται στην κίνηση μακρομορίων που έχουν φορτίο σε κατάλληλο υγρό μέσο (ρυθμιστικό διάλυμα), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το DNA όντας αρνητικά φορτισμένο μετακινείται προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου το οποίο αποτελεί τον θετικό πόλο του συστήματος ηλεκτροφόρησης. Η οπτικοποίηση της μετανάστευσης του DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο έχει την ικανότητα παρεμβολής στις αζωτούχες βάσεις του DNA, καθώς και απορρόφησης ακτινοβολίας UV, την οποία επανεκπέμπει στο φάσμα του ορατού ερυθρού (590 nm). Στην εν λόγω διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα με περιεκτικότητα 1% w/v σε αγαρόζη, ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM M Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8), και βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Επιπλέον, πριν την φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος, τα δείγματα DNA

αναμιγνύονται με πυκνό διάλυμα φορτώματος (6x Loading Buffer). Η σύσταση του διαλύματος φορτώματος στα δείγματα είναι η εξής:

- Γλυκερόλη 5 % v/v
- Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,042 % w/v
- Κυανούν του ξυλενίου 0,042 % w/v

3.2.5. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα βακτηριακά κύτταρα φέρουν μικρά δίκλιωνα μόρια DNA κυκλικής διαμόρφωσης, τα οποία έχουν την ιδιότητα ανεξάρτητου αναδιπλασιασμού από το πυρηνοειδές που είναι το κύριο μόριο DNA που διαθέτουν. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των πλασμιδίων είναι ότι φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που μεταβολίζουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά, παρουσιάζοντας έτσι αντίσταση στην αντι-μικροβιακή δράση των τελευταίων. Τα πλασμίδια έχουν την ικανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού, καθώς και μεταφοράς μεταξύ βακτηρίων. Η μεταφορά πλασμιδίων σε βακτήρια οδηγεί στο μετασχηματισμό των τελευταίων τα οποία αποκτούν νέες ιδιότητες. Τα πλασμίδια παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο σε διαδικασίες κλωνοποίησης γονιδίων, όσο και στην παραγωγή ετερόλογων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

3.2.5.1. Πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελούν ένα από τα πιο βασικά και χρήσιμα εργαλεία μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιούνται στο πλαίσιο της Γενετικής μηχανικής για την κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA. Τα ένζυμα αυτά ανακαλύφθηκαν ως ένα σύστημα άμυνας των βακτηριακών κυττάρων, ενάντια στη προσβολή τους από ιούς-ξενιστές. Συγκεκριμένα, έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στο ξένο DNA, και να το κόβουν εντός αυτών σε μια διαδικασία που καλείται πέψη περιορισμού. Με την ολοκλήρωση της πέψης περιορισμού, το προκύπτουν DNA εμφανίζει συμπληρωματικά (κολλώδη, sticky) ή τυφλά (blunt) άκρα. Στην παρούσα διατριβή η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκε: 1) για τον έλεγχο της εισαγωγής του εκάστοτε ενθέματος μέσα στον αντίστοιχο φορέα, καθώς του προσανατολισμού ένθεσής του, 2) για την αποκοπή τμημάτων DNA τα οποία πρόκειται να κλωνοποιηθούν και 3) για το σχηματισμό κολλωδών άκρων μεταξύ του εκάστοτε ενθέματος και του εκάστοτε φορέα στον οποίο θα γίνει η ένθεσή του. Στην παρούσα διατριβή, τόσο τα προϊόντα της PCR των τμημάτων cDNA της μορταλίνης (**Πίνακας 3**), όσο και όλοι οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες για κλωνοποίηση (**3.1.4**) υπεβλήθησαν σε πέψεις με τα ένζυμα NdeI, XhoI και BamHI σύμφωνα με τις προδιαγραφές των εταιρειών για τα ένζυμα αυτά (NEB). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πέψεις περιορισμού με τα ένζυμα EcoRI, HindIII, PstI, PvuII, EcoRV,

Sall, SacI, AseI, ύστερα από την ολοκλήρωση της κάθε κλωνοποίησης με σκοπό τον έλεγχο της ορθότητας και της ακεραιότητας της κάθε ανασυνδυασμένης κατασκευής.

Για τον έλεγχο της ένθεσης ενός τμήματος DNA μέσα σε έναν πλασμιδιακό φορέα, η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και περιείχε 0,2 μg πλασμιδίου, 1 Unit από το ένζυμο (NEB) και 1x κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που διαφέρει για κάθε ένζυμο και καθορίζεται από την εταιρεία παρασκευής (Cutsmart® Buffer, 50 mM Οξικό Κάλιο, 20 mM Tris-οξικό, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 100 μg/ml BSA, pH 7.9). Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε επώαση της αντίδρασης για 60 λεπτά στους 37 °C. Για τη δημιουργία κολλωδών άκρων μεταξύ φορέα και ενθέματος, η αντίδραση έγινε τελικό όγκο 50 μl και διήρκησε 2-3 ώρες. Την τελευταία ώρα προστέθηκαν, μόνο στην αντίδραση πέψης του φορέα, 20 Units από το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP), (10.000 Unit/ml, NEB).

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, στα 120 V. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε λυχνία UV για να καταστούν ορατές οι ζώνες του DNA που μας ενδιαφέρουν και έγινε αποκοπή αυτών από το πήκτωμα.

3.2.5.2. Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Ακολουθώντας τη διαδικασία του πρωτοκόλλου από το kit «Nucleospin Gel Cleanup» της εταιρείας Macherey-Nagel για εξαγωγή DNA από πηκτώματα αγαρόζης, κατέστη δυνατή η ανάκτηση του επιθυμητού DNA από το πήκτωμα.

Αρχικά με τη βοήθεια αποστειρωμένου χειρουργικού νυστεριού, επετεύχθη η αποκοπή των περιοχών πηκτώματος αγαρόζης που περιέχουν τα επιθυμητά τμήματα DNA, κάτω από λυχνία εκπομπής υπεριώδους φωτός για την οπτικοποίηση του DNA. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση της επιπρόσθετης αγαρόζης και το επιθυμητό τμήμα του πηκτώματος μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια ζυγίστηκε μέσω αναλυτικού ζυγού όπου προσδιορίστηκε η μάζα του σε mg. Έπειτα στο σωληνάκι προστέθηκε το «Binding Buffer» του kit σε αναλογία (αναλογία μάζας πηκτώματος/όγκος Binding Buffer: 1:2) ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Ακολούθησε επώαση του τμήματος του πηκτώματος σε θερμοκρασία 50 °C για 5-10 λεπτά με ενδιάμεσες ισχυρές αναδεύσεις μέσω vortex, ώστε να επέλθει πλήρης διάλυση της αγαρόζης. Εν συνεχεία, το δείγμα φορτώθηκε σε ειδική στήλη πυριτίου (silica), η οποία διασφαλίζει την πρόσδεση του DNA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 11.000 g για 60 sec. Έπειτα η στήλη εκπλύθηκε με το διάλυμα «Wash Buffer» που περιέχει αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11000 g για 60 sec. Διενεργήθηκε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 2 λεπτά για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης. Η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστέθηκαν 30 μl με κατάλληλο «Elution Buffer» απευθείας πάνω στη μεμβράνη τα στήλης, ώστε να εκλουστεί το DNA. Το δείγμα επώαστηκε θερμοκρασία 25 °C

για 60 sec. Μετά έγινε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 60 sec με σκοπό την έκλυση του DNA. Το DNA συντηρήθηκε στους -20 °C. Τέλος, έγινε ηλεκτροφόρηση γνωστού όγκου των απομονωθέντων τμημάτων DNA σε πήκτωμα αραρόζης 1%, με σκοπό την ποσοτικοποίηση τους.

3.2.5.3. Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Ο φορέας και το ένθεμα αναμιγνύονται σε κατάλληλη κάθε φορά μοριακή αναλογία (συνήθως χρησιμοποιείται αναλογία φορέα:ένθεμα ίση με 1:3). Ο τελικός όγκος αντίδρασης ρυθμίζεται στα 20 μ l, στον οποίο εμπεριέχεται ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης (50 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, 10 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 20 mM Tris-acetate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA pH 7.9), 2,5 Units ενζύμου λιγάσης (5 Unit/ μ l, NEB) και ddH₂O. Η αντίδραση επώαστηκε ολονύκτια στους 16 °C.

3.2.5.4. Παρασκευή επιδεκτικών για μετασηματισμό βακτηριακών κυττάρων

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τη δημιουργία βακτηριακών κυττάρων που μπορούν εύκολα να προσλάβουν ανασυνδυασμένες πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν κλωνοποιημένο ένθεμα ετερόλογου DNA. Το πρωτόκολλο πραγματοποιείται με τη χρήση άλατος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2).

Αρχικά εμβολιάστηκαν 5ml διαλύματος TYM (2% Τρυπτόνη, 0.5% Εκχύλισμα ζύμης, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO_4) με βακτήρια *E. coli* BL21-RIL (συντηρούνται σε γλυκερόλη 10% v/v, στους -80 °C), παρουσία χλωραμφαινικόλης (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, σε 100 %v/v EtOH) ή *E. coli* TOP10 παρουσία στρεπτομυκίνης (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, σε ddH₂O). Πραγματοποιήθηκε επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση για 12-16 ώρες. Έπειτα γίνεται αραίωση της καλλιέργειας 1:100 σε τελικό όγκο 3 ml θρεπτικού μέσου TYM με επώαση αυτής υπό ανάδευση στους 37 °C για 3h παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού και στη συνέχεια 1:200 σε όγκο 50 ml θρεπτικού μέσου TYM με επώαση αυτής υπό ανάδευση στους 37 °C μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει σε οπτική πυκνότητα $\text{OD}_{600} = 0.35-0.4$, απουσία αντιβιοτικού. Έγινε συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 800 g στους 4°C. Τα κύτταρα αιωρήθηκαν σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-I (100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% γλυκερόλη, 30 mM CH_3COOK , pH 7), και επώαστηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση τους για 10 λεπτά στα 800 g και επαναιωρήθηκαν σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7). Το αιώρημα έμεινε στους 4 °C για 1 ώρα και τελικά διαμοιράστηκε σε ποσότητες των 100 μ l που αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

3.2.5.5. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Στη παρούσα διατριβή μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα BL21-RIL και *E. coli* TOP10. Σε 50 μl του βακτηριακού αιωρήματος προστέθηκαν 100-200 ng του επιθυμητού πλασμιδίου. Τα κύτταρα επώστηκαν στους 4°C για μισή ώρα. Ακολούθως έγινε επώαση των κυττάρων στους 42 °C για 1-2 λεπτά (θερμικό σοκ). Κατόπιν προστέθηκαν 500 μl θρεπτικού υλικού LB (LURIABROTH, 1% w/v Τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl) και ακολούθησε επώαση των βακτηρίων για 45 λεπτά με μία ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση. Ύστερα από φυγοκέντρηση 3 λεπτών σε 800 g απομακρύνθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα LB από το υπερκείμενο και έγινε επαναϊώρηση των κυττάρων στον εναπομείναντα όγκο. Τα αιωρημένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (2% w/v άγαρ) που περιέχει το επιθυμητό αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 37 °C για 16-18 ώρες.

Την επόμενη μέρα εμβολιάστηκαν ίσοι όγκοι (3 ml) LB παρουσία του επιθυμητού αντιβιοτικού επιλογής, έκαστος με μία διαφορετική βακτηριακή αποικία/κλώνο από τα *E.coli* TOP10. Οι υγρές καλλιέργειες επώστηκαν ολονύκτια στους 37 °C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm). Στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli* BL21-RIL εμβολιάστηκαν μικροί όγκοι L.B (20 ml) με μία βακτηριακή αποικία έκαστος, παρουσία του επιθυμητού αντιβιοτικού επιλογής, συνδυαστικά με το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Οι υγρές καλλιέργειες επώστηκαν ολονύκτια στους 37 °C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm).

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

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πλέον επιθυμητή και προτιμώμενη για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Η διαδικασία ξεκινά χρησιμοποιώντας μικρές (3 ml) καλλιέργειες βακτηρίων *E. coli* TOP10, τα οποία φέρουν πλασμιδιακό DNA που πρόκειται να απομονωθεί. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 3 λεπτά σε 4000 g και το ίζημα αιωρείται σε 150 διαλύματος TE (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) αφού έχει προστεθεί 0,1 mg/ml RNase A. Ακολούθως προστίθενται 200 μl διαλύματος λύσης κυττάρων (200 mM NaOH, 1% SDS). Έπειτα, στο μίγμα προστίθενται 150 μl διαλύματος εξουδετέρωσης 3M CH₃COONa ή CH₃COOK pH 5,2. Στη συνέχεια διενεργήθηκε φυγοκέντρηση σε 11.000 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο όπου περιέχει το διαλυτό πλασμιδιακό DNA μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Μέσω προσθήκης 100% παγωμένης ισοπροπανόλης και επώαση στους -20 °C για 30 λεπτά γίνεται η κατακρήμνιση του πλασμιδίου. Τέλος, αφού έγινε φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 10 λεπτά αφαιρέθηκε η

ισοπροπανόλη και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος που περιέχει το πλασμιδιακό DNA σε 30 μl ddH₂O.

Για πιο καθαρή απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν στήλες καθαρισμού με μεμβράνη που έχουν ως βάση το πυρίτιο και έτοιμα διαλύματα, με βάση το πρωτόκολλο του DNA purification kit της εταιρείας Macherey-Nagel με διαδικασία παρόμοια με αυτή στη μέθοδο του καθαρισμού και της απομόνωσης DNA από πήκτωμα αгарόζης (3.2.5.2). Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε για την ύπαρξη και το σωστό προσανατολισμό του ενθέματος μέσα στο φορέα, μέσω πέψων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά παραπάνω (3.2.5.1).

3.2.6. Υπερέκφραση ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών

Η δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα με τη βοήθεια οργανισμών ξενιστών αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές και σημαντικές μεθοδολογίες των κλάδων της βιοτεχνολογίας και της γενετικής μηχανικής. Συγκεκριμένα, η χρήση των βακτηρίων *E. coli* είναι ευρέως διαδεδομένη για την παραγωγή ανασυνδυσμένων ετερόλογων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, προκειμένου να παραχθεί μία πρωτεΐνη σε βακτηριακά στελέχη, θα πρέπει το cDNA που την κωδικοποιεί να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο φορέα έκφρασης για βακτηριακά κύτταρα. Οι φορείς αυτοί είναι γενετικά τροποποιημένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να διαθέτουν κατάλληλα συστήματα για τη βέλτιστη και ελεγχόμενη έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η έκφραση των κλωνοποιημένων cDNA βασίζονται στο σύστημα του οπερονίου της λακτόζης. Το cDNA ελέγχεται από έναν ισχυρό υποκινητή, είτε τον T7, είτε τον υβριδικό υποκινητή tac, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με αλληλουχίες του χειριστή (lac operator) και του γονιδίου lacI το οποίο οδηγεί στη παραγωγή ενός μορίου καταστολέα, ο οποίος όταν προσδένεται στο χειριστή, εμποδίζει την πολυμεράση του RNA του βακτηρίου να ξεκινήσει την έκφραση του επιθυμητού cDNA. Το εναρκτήριο σήμα για την έκφραση του κλωνοποιημένου cDNA και την επακόλουθη παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης είναι η λακτόζη ή χημικά ανάλογα της όπως το IPTG (Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside). Το IPTG αποτελεί έναν μοριακό μιμητή της αλλολακτόζης και πιο συγκεκριμένα μη μεταβολίσιμο επαγωγέα του οπερονίου, καθώς η β-γαλακτοζιδάση που παράγεται από την έκφραση του οπερονίου, δεν μπορεί να υδρολύσει το IPTG και συνεπώς η συγκέντρωση του παραμένει σταθερή στο μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων. Το IPTG δρα δεσμευόμενο στον καταστολέα, καταργώντας τη σύνδεση του με τον χειριστή και έτσι επιτρέποντας στην πολυμεράση του RNA του βακτηρίου να ενεργοποιήσει την έκφραση του cDNA, οδηγώντας σε υπερ-παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης. Τα πλασμίδια που φέρουν κλωνοποιημένα τα cDNA που κωδικοποιούν για τις περιοχές Mortalin-Δ(1-51) [pET28b(+)-Mort-Δ(1-51)], Mortalin-NBD

[pET28b(+)-Mort-NBD], Mortalin-NBD-SBD [pET28b(+)-Mort-NBD-SBD], Mortalin-SBD-VD [pET28b(+)-Mort-SBD-VD], Mortalin-SBD [pET28b(+)-Mort-SBD], GST-SBD-VD (pGEX-4T1-Mort-SBD-VD) και GST-NBD (pGST-parallel2-Mort-NBD) χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21-RIL. Μία βακτηριακή αποικία σε κάθε περίπτωση εμβολιάστηκε σε 20 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB, παρουσία του συνδυασμού των αντιβιοτικών χλωραμφαινικόλης και αμικικιλίνης (στη περίπτωση των pGEX-4T1-Mort-SBD-VD και pGST-parallel2-Mort-NBD), είτε χλωραμφαινικόλης και καναμυκίνης (στη περίπτωση των pET28b(+)) κατασκευών) και επώαστηκε υπό ανάδευση (250 rpm) για 16 h στους 37 °C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αραίωση των καλλιιεργειών σε νέες, όγκου 500 ml, ώστε να έχουν οπτική πυκνότητα $O.D._{600\text{ nm}}=0,1$. Έπειτα οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 37 °C μέχρι η απορρόφησή της να φτάσει στην τιμή 0,4. Στο στάδιο αυτό η επαγωγή της παραγωγής των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα cDNA που είναι κλωνοποιημένα στους φορείς pET28b(+) και pGEX-4T1 επετεύχθη με την προσθήκη 0,3 mM IPTG και επώαση της καλλιέργειας στους 30 °C υπό ανάδευση (250 rpm) για 4 ώρες. Στη περίπτωση της κατασκευής GST-NBD, έγινε προσθήκη 0,25 mM IPTG στο μέσο καλλιέργειας και επώαση αυτής στους 22 °C υπό ανάδευση (250 rpm) για 2 ώρες. Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα όγκου 1 ml από τις καλλιέργειες πριν την προσθήκη IPTG και μετά το πέρας της επώασης αφού αυτό προστέθηκε. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 4000 g για 3 λεπτά, τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και τα ιζήματα των βακτηρίων επαναιωρήθηκαν σε 30 μl ddH₂O και χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση πρωτεϊνών. Τα βακτηριακά κύτταρα με το πέρας της διαδικασίας επαγωγής, φυγοκεντρήθηκαν σε 4000 g για 30 λεπτά στους 4 °C, και το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα 1x PBS (Phosphate Buffer Saline) το οποίο περιείχε 0,1 mM AEBSF (υδροχλωρικό 4-βενζολοσουλφονυλοφθορίδιο) που είναι αναστολέας πρωτεασών σερίνης. Πραγματοποιήθηκε άλλη μια φυγοκέντρωση όπως ακριβώς στο προηγούμενο στάδιο για να κατακρημνιστούν βακτήρια που πιθανώς επαναιωρήθηκαν κατά την έκπλυση και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -20 °C, είτε αξιοποιήθηκε άμεσα στη διαδικασία παραλαβής του διαλυτού βακτηριακού εκχυλίσματος και του καθαρισμού των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών από αυτό (3.2.7).

3.2.7. Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL

Τα διάφορα τμήματα της μορταλίνης που παρήχθησαν στα βακτήρια *E. coli* BL21-RIL ως πρωτεΐνες σύντηξης, είτε με επιτόπους GST, είτε με His₆, απομονώθηκαν, παραλαμβάνοντας σε πρώτο στάδιο το διαλυτό βακτηριακό εκχύλισμα και έπειτα σε δεύτερο στάδιο καθαρίζοντας τες από αυτό, μέσω χρωματογραφίας αχιστείας. Τα δύο αυτά στάδια αναλύονται παρακάτω.

3.2.7.1. Παραλαβή συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL

Αρχικά πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση του ιζήματος των βακτηρίων με 8 ml κατάλληλου διαλύματος λύσης. Στη περίπτωση των πρωτεϊνών σύντηξης με επίτοπο GST χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα A (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης A: 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% v/v Triton X-100, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF), ενώ στη περίπτωση των πρωτεϊνών σύντηξης με επίτοπο His₆ το διάλυμα B (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης B: 50 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1% v/v Triton X-100, 5% v/v γλυκερόλη, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF). Η αιώρηση πραγματοποιήθηκε σε πάγο και έπειτα το αιώρημα υποβλήθηκε σε υπερήχους για χρονικό διάστημα 5 λεπτών (σε πάγο, παλμοί 20 sec/min, παύση 40 sec/min, εύρος παλμών σε τιμή ίση με 60, VibraCell, Sonics and Materials Inc) για να γίνει διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Έγινε φυγοκέντρηση σε 10000 g για 40 λεπτά στους 4°C με σκοπό το διαχωρισμό του συνολικού βακτηριακού εκχυλίσματος σε διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα. Συλλέχθηκαν 50 μl δείγματος υπερκείμενου (διαλυτό κλάσμα) για ανάλυση πρωτεϊνών και το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των υπερεκφρασμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Στο αδιάλυτο κλάσμα (ίζημα) έγινε σταδιακή προσθήκη 8 ml διαλύματος λύσης. Τέλος, μετά την αιώρηση του ιζήματος συλλέχθηκαν 50 μl δείγματος για ανάλυση πρωτεϊνών.

3.2.7.2. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία αγκιστείας

Στην παρούσα διατριβή ο καθαρισμός των επιθυμητών πρωτεϊνών σύντηξης έγινε τόσο με στήλες αγκιστείας που φέρουν γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σφαιρίδια αγαρόζης (Αγαρόζη-GSH, Macherey Nagel, Duren, Germany), όσο και με στήλες που φέρουν τον χηλικό παράγοντα νιτριλοτριοξικό οξύ μαζί με δισθενή ιόντα νικελίου και τα τελευταία καθηλωμένα επίσης σε σφαιρίδια αγαρόζης (Αγαρόζη-NTA-Ni²⁺, Qiagen, Hilden, Germany). Η επιλογή της στήλης που θα χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό της επιθυμητής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, εξαρτάται από τον επίτοπο με τον οποίο αυτή έχει συντηχθεί, δηλαδή είτε την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST), είτε τον επίτοπο των έξι ιστιδινών (His₆). Έτσι, ο διαχωρισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού εκχυλίσματος επιτυγχάνεται, είτε χάρη στην αλληλεπίδραση της δεσμευμένης γλουταθειόνης με την GST, είτε λόγω της αλληλεπίδρασης των κατιόντων νικελίου με τον επίτοπο His₆. Η έκλυση της πρωτεΐνης στην πρώτη περίπτωση γίνεται με την διαβίβαση υψηλής συγκέντρωσης διαλύματος ανηγμένης L-γλουταθειόνης, ενώ στη δεύτερη περίπτωση με τη χρήση πάλι υψηλής συγκέντρωσης διαλύματος ιμιδαζολίου.

Αρχικά έγινε εξισορρόπηση τόσο σφαιριδίων αγαρόζης-GSH και αγαρόζης-NTA-Ni²⁺ στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των βακτηρίων. Ξεκινώντας, 200 μl

αιωρήματος σφαιριδίων αναμίχθηκαν με 5 ml διαλύματος λύσης (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης A για τα σφαιρίδια αραρόζης-GSH και ρυθμιστικό διάλυμα λύσης B για τα σφαιρίδια αραρόζης-NTA-Ni²⁺) με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Πραγματοποιήθηκαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις εξισορρόπησης ακολουθούμενες από ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις των 3 λεπτών σε 1500 g με αλλαγή του διαλύματος λύσης κάθε φορά. Στη συνέχεια τα διαλυτά πρωτεϊνικά κλάσματα μεταφέρθηκαν στις εξισορροπημένες στήλες σφαιριδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω και τα αιωρήματα των σφαιριδίων επώαστηκαν για 1 ώρα με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με τα ίδια διαλύματα λύσης και ακολούθησαν οι εκλούσεις των πρωτεϊνών. Για τις εκλούσεις παρασκευάστηκε διάλυμα 10 mM ανηγμένης γλουταθειόνης σε διαλύτη 25 mM Tris-HCl pH 8,5, καθώς και διαλύματα 50 mM και 300 mM ιμιδαζολίου σε διαλύτη το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης B (3.2.7.1). Έπειτα, προστέθηκαν 500 μl διαλύματος γλουταθειόνης στα σφαιρίδια αραρόζης-GSH και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 4°C με ανάδευση κυκλικής τροχιάς. Μετά από φυγοκέντρωση 3 λεπτών σε 1500 g παραλαμβάνεται το υπερκείμενο έκλουσμα που περιέχει την καθαρή πρωτεΐνη και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για την συλλογή του δεύτερου και του τρίτου εκλούσματος. Στη περίπτωση των σφαιριδίων αραρόζης-NTA-Ni²⁺ πραγματοποιήθηκαν 3 επιπρόσθετες πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου, με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις και ανανέωση κάθε φορά του διαλύματος, όπως έχει ήδη αναφερθεί και προηγουμένως. Έπειτα, προστέθηκαν 500 μl διαλύματος 300 mM ιμιδαζολίου στα σφαιρίδια αραρόζης-NTA-Ni²⁺ και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 4°C με ανάδευση κυκλικής τροχιάς. Ύστερα, από φυγοκέντρωση σε 1500 g για 3 λεπτά, συλλέγεται το υπερκείμενο έκλουσμα που περιέχει την καθαρή πρωτεΐνη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με τον ίδιο τρόπο για την παραλαβή και των υπόλοιπων εκλουσμάτων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συλλέχθηκαν δείγματα τόσο από τις διάφορες εκπλύσεις, όσο και από τα τελικά εκλούσματα και αφού έγινε ανάμιξη των εκλουσμάτων μεταξύ τους, συλλέχθηκε και δείγμα από τη συνολική δεξαμενή τους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρωτεϊνών από τα δείγματα όλης της διαδικασίας απομόνωσης των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

3.2.8. Δοκιμασίες *in vitro* δέσμευσης μεταξύ καθαρών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι δοκιμασίες *in vitro* δέσμευσης μεταξύ καθαρών πρωτεϊνών, αποτελούν μία από τις βασικές μεθόδους διερεύνησης για τις ενδεχόμενες άμεσες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ τους, καθώς και για τη χαρτογράφηση των περιοχών που τις διαμεσολαβούν.

Αιώρημα σφαιριδίων αραρόζης-GSH (30 μl, 1:1) εξισορροπήθηκε με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα A (έχοντας προσθέσει 0,5 μM αναστολέων πρωτεασών λευπεπτίνης και πεπστατίνης) (3.2.7.1). Η εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε κάνοντας 3 αλληλοδιάδοχες εκπλύσεις των

σφαιριδίων υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς για δέκα λεπτά στους 4 °C, με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις και ανανέωση του διαλύματος σε κάθε έκπλυση. Καθεμία από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST, GST-HIF-1α-ETD, στις μεταλλαγμένες μορφές WT, SA και SE, καθώς και οι GST-HIF-1α-530-826, 348-616 και 652-826 αραιώθηκε με το διάλυμα A σε τελικό όγκο 0,5 ml, και επώαστηκε με τα σφαιρίδια, υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς για μία ώρα, στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1000 g για 1-2 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμευτήκαν στα σφαιρίδια (unbound proteins). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα σφαιρίδια που φέρουν τις ακινητοποιημένες GST-πρωτεΐνες, υποβλήθηκαν σε τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με το διάλυμα A, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, με σκοπό την απομάκρυνση μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών. Ακολούθως τα σφαιρίδια εξισορροπήθηκαν πάλι όπως αναφέρθηκε παραπάνω με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα B (έχοντας προσθέσει 0,5 μM αναστολέων πρωτεασών λευπεπτίνης και πεπστατίνης) (3.2.7.1). Έπειτα οι ανασυνδυασμένες κατασκευές His_{x6}-Mortalin-ΔN, NBD, NBD-SBD, SBD-VD και SBD αφού αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 0,5 ml με το διάλυμα B, επώαστηκαν με τα σφαιρίδια που έφεραν τις δεσμευμένες GST-πρωτεΐνες υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς για 3 ώρες, στους 4 °C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν εκπλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα B, με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με διάλυμα 10 mM ανηγμένης L-γλουταθειόνης (σε 25 mM Tris-HCl pH 8,5). Έγιναν δύο διαδοχικές εκκλύσεις των 50 μl και επώαση σε κάθε περίπτωση στους 4 °C για πέντε λεπτά. Οι εκκλύσεις ενώθηκαν μεταξύ τους, έχοντας τελικό όγκο υλικού 100 μl. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και στη συνέχεια χρώση Commassie και ανοσοανίχνευση.

Για να ελεγχθεί η επίδραση της εμπελίνης στην *in vitro* δέσμευση μεταξύ της GST-HIF-1α-530-826 και των His_{x6}-Mortalin-ΔN και His_{x6}-Mortalin-SBD-VD, οι His_{x6} κατασκευές προεπώαστηκαν με την εμπελίνη (10 μM) στο διάλυμα B για 2 ώρες, στους 4 °C, πριν την επώαση τους με τα σφαιρίδια που έφεραν τις GST-πρωτεΐνες.

3.2.9. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός συγκέντρωσης μακρομορίων

Η συγκέντρωση των μορίων DNA και RNA προσδιορίστηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop 2000. Σε πρώτο στάδιο γίνεται ρύθμιση του οργάνου χρησιμοποιώντας ως τυφλό 2 μl ddH₂O και ακολούθως το επιθυμητό δείγμα εναποτίθεται σε κατάλληλη κεφαλή για μέτρηση απορρόφησης. Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιείται είναι 1 μl. Το φασματοφωτόμετρο προσδιορίζει την απορρόφηση και μέσω κατάλληλου λογισμικού μετατρέπεται σε συγκέντρωση με αυτοματοποιημένο τρόπο.

Η φασματοφωτομετρική-χρωματομετρική μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Η εν λόγω χρωστική κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών κάνει σύμπλοκα και απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Biorad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μl αραιώνοντας σε τελικό όγκο 1 ml με ddH₂O στη περίπτωση του τυφλού, είτε με προσθήκη ορισμένης ποσότητας (μl) διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει την δημιουργία πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε με φωτομέτρηση διαδοχικών αραιώσεων δείγματος αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η αντιστοίχιση απορρόφησης-συγκέντρωσης. Η χρήση της πρότυπης καμπύλης επιτρέπει στην συνέχεια τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο διάλυμα.

3.2.10. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και οι αποδιατακτικές συνθήκες εξασφαλίζονται με τη χρήση του απορρυπαντικού SDS, αναγωγικών παραγόντων (DTT) και θέρμανσης των δειγμάτων πρωτεϊνών πριν την ηλεκτροφόρηση στους 97 °C για 5 λεπτά. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel, 7,5 cm ύψος, 1 mm πάχος) και το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel, 2,5 cm ύψος, 1 mm πάχος). Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθενται πρώτα 5 ml του διαλύματος του πηκτώματος διαχωρισμού με περιεκτικότητα 10-15 % v/v πολυακρυλαμιδίου και pH 8,8. Ακολούθως παρασκευάζεται και στοιβάζεται διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης 4 ml, περιεκτικότητας 4,5% v/v σε πολυακρυλαμίδιο και pH 6,8. Αφού πήξει, το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλύπτεται πλήρως με κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V.

Παρατίθεται η χημική σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων που περιεγράφηκαν παραπάνω:

α) Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating gel buffer): 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % w/v SDS, **β)** Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (stacking gel buffer): 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % w/v SDS, **γ)** Μίγμα πηκτώματος διαχωρισμού (Separating gel): 10-15% v/v ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0,04% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού, **δ)** Μίγμα πηκτώματος επιστοιβάξης (Stacking gel): 4-5% v/v ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0,0625% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα Επιστοιβάξης, **ε)** Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer): 50 mM Tris, 0,38 M

γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,3, ζ) Διάλυμα δειγμάτων (Laemmli buffer): 62,5 mM Tris-HCl, 2,3 % SDS, 10 % γλυκερόλη, 0,05 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 25 mM DTT.

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ανιχνεύθηκαν με:

- Χρώση με Coomassie brilliant blue σε υδατικό διάλυμα που περιέχει: 45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 3 g/L Coomassie brilliant blue
- Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

3.2.10.1. Ανίχνευση διαχωρισθέντων πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue-G-250

Η συνολική ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μέσω χρώσης αυτών με κατάλληλους παράγοντες αποτελεί μία από τις πιο χρήσιμες και γρήγορες μεθοδολογίες του κλάδου της αναλυτικής βιοχημείας. Η χρήση του παράγοντα Coomassie Brilliant Blue G-250 ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) είναι ευρύτατα διαδεδομένη για τη χρώση πρωτεϊνών που έχουν διαχωρισθεί με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά (αλλά όχι ομοιοπολικά) με τις αμινικές και καρβοξυλικές ομάδες των πρωτεϊνών, έτσι ώστε να δημιουργηθούν σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικής. Ο σχηματισμός των συμπλόκων σταθεροποιεί την αρνητικά φορτισμένη ανιονική μορφή της χρωστικής, δημιουργώντας μπλε χρώμα που επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών.

Συγκεκριμένα, μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με SDS-PAGE, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε κατάλληλο διάλυμα που περιέχει την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (3.2.10) και επώαστηκε υπό ανάδευση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα να χρωματιστεί μπλε. Με το πέρας της επώασης, το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε κατάλληλο διάλυμα (10 % v/v CH_3COOH , 10 % v/v CH_3CH_2OH) και επώαστηκε υπό ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελευταίο διάλυμα συνεισφέρει στον αποχρωματισμό του μπλε χρώματος στο φόντο του πήκτωματος, ενώ στα σημεία που υπάρχουν πρωτεΐνες το μπλε χρώμα παραμένει, λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζει η χρωστική για αυτές. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές εκπλύσεις του πηκτώματος με dH_2O . Τέλος, το πήκτωμα συντηρήθηκε σε ddH_2O ή ξηράθηκε με τη χρήση κατάλληλης αντλίας κενού.

3.2.10.2. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται σε ημίξηρο περιβάλλον (ηλεκτρομεταφορά ημίξηρης φάσης, semidry transfer), όπου όλα τα

επιμέρους υλικά (βλπ παρακάτω) έχουν εμποτιστεί σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (125 mM Tris-Borate pH 8,5, 0,2% w/v SDS, 0,5 mM DTT). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, πάνω στη πλάκα όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος, τοποθετούνται με τη σειρά:

- 3 χαρτιά Whatman 3MM
- η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- το πήκτωμα
- 3 χαρτιά Whatman 3MM.

Η πηκτή τοποθετείται προσανατολισμένη προς το ηλεκτρόδιο της καθόδου. Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται σε συνθήκες σταθερής έντασης ηλεκτρικού ρεύματος, δηλαδή στα 80 mA για 60 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο Fisherbrand™ Semi-Dry Blotters. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S (2% w/v Ponceau, 30% v/v τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% v/v σουλφοσαλικυλικό οξύ), έτσι ώστε να ελεγχθεί η αποτύπωση. Η μεμβράνη εκπλύθηκε αρχικά με απιονισμένο νερό στον επιθυμητό βαθμό για την ανίχνευση των διαχωρισθέντων πρωτεϊνών και έπειτα αποχρωματίστηκε πλήρως με διάλυμα 1x PBS-0.1% Tween 20.

Για την μέθοδο της ανοσοανίχνευσης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις δεσμευμένες πρωτεΐνες εμβαπτίζεται σε διάλυμα κορεσμού, για 60 λεπτά, υπό ανάδευση. Το διάλυμα κορεσμού περιέχει είτε 5% w/v αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20, είτε 1% w/v αλβουμίνη ορού βόως σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20. Έπειτα η μεμβράνη επώαζεται με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού ή μόνο 1x PBS - 0.1% Tween 20. Η επώαση έγινε ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Με το πέρας της επώασης του πρώτου αντισώματος η μεμβράνη υποβλήθηκε σε 3 δεκάλεπτες πλύσεις στους 25 °C με 1x PBS - 0.1% Tween 20. Εν συνεχεία έγινε επώαση για 1 ώρα στους 25 °C με το δεύτερο αντίσωμα (όπως παραπάνω) έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού ή ποντικού αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού. Μετά τη σύνδεση του δεύτερου αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πεντάλεπτες πλύσεις. Προετοιμάζεται διάλυμα εμφάνισης που περιέχει 10 ml διαλύματος λουμινόλης (σε διαλύτη 0,1 M Tris-Cl pH 8,5 περιέχονται 1,25 mM λουμινόλης, 0,1 % v/v H₂O₂, 6,8 mM κουμαρικού οξέος). Τέλος πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα εμφάνισης για 1-2 λεπτά στους 25 °C, ώστε να λάβει χώρα η αντίδραση χημειοφωταύγειας. Στη συνέχεια το παραγόμενο σήμα ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού (Uvitec Cambridge) και αντίστοιχου λογισμικού (Uvitec Alliance).

3.2.11. Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο (θρεπτικό υλικό DMEM, 10% v/v FBS, 100 U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη), τόσο σε πιάτα καλλιέργειας διαμέτρου 10 cm και 60 mm, όσο και σε πιάτα 6, 24 ή 96 θέσεων. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιούνται σε κατάλληλο θάλαμο στους 37 °C με ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε 5% CO₂.

3.2.11.1. Κρυοσυντήρηση κυτταρικών σειρών

Για το πάγωμα των κυττάρων που βρίσκονταν σε καλλιέργεια, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, pH 7,4) και προστέθηκε σε αυτά 1 ml τρυψίνης (Biosera 1x). Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 2500 g, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρήθηκε σε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM το οποίο περιέχει επιπλέον 10% v/v DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Τέλος, πραγματοποιήθηκε μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε κατάλληλους μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner) και αφού έγινε σταδιακή ψύξη τους σε θερμοκρασία -80 °C, αποθηκεύτηκαν τελικά σε υγρό άζωτο στους -196°C.

3.2.11.2. Απόψυξη κυτταρικών σειρών

Η απόψυξη κυττάρων διενεργήθηκε με γρήγορη θέρμανση του παγωμένου κυτταρικού αιωρήματος σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37 °C. Το αιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε, έπειτα το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 7 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM (όπως στην ενότητα 3.2.11.1) και μεταφέρθηκε σε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm. Τα κύτταρα μένουν σε καλλιέργεια για ένα χρονικό διάστημα μέχρι να ανακτήσουν τον φυσιολογικό ρυθμό πολλαπλασιασμού και ακολούθως μέρος τους συλλέγεται για κρυοσυντήρηση (3.2.11.1), ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται στο πλαίσιο πειραματικών διαδικασιών.

3.2.11.3. Ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα επωάζονται και ανακαλλιεργούνται όταν το πιάτο κορεστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Τα κύτταρα HeLa ανακαλλιεργούνται κάθε 48 ώρες. Αρχικά αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από το κορεσμένο πιάτο καλλιέργειας, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,46 mM KH₂PO₄). Έπειτα επώαστηκαν με 1 ml διαλύματος τρυψίνης για 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό υλικό, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη αραίωση και το αιώρημα αναδεύτηκε σχολαστικά με τη χρήση πιπέτας. Εν συνεχεία, ορισμένα ml αιωρήματος κυττάρων μεταφέρθηκαν σε νέα πιάτα καλλιέργειας στα οποία προστέθηκαν 7 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (για πιάτο διαμέτρου 10 cm) ή 3 ml (για πιάτο διαμέτρου 60 mm).

3.2.11.4. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών σε συνθήκες υποξίας

Προκειμένου να επαχθεί η σταθεροποίηση του HIF-1α τα καρκινικά κύτταρα επωάζονται σε κατάλληλο υποξικό θάλαμο *IN VIVO* 200 (Baker Ruskinn, Sanford, ME). Εφαρμόστηκε συνθήκη ήπιας υποξίας 1% O₂ που προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των συμπαγών όγκων.

3.2.12. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση κατιονικών πολυμερών

Για τη διαμόλυνση κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν κατιονικά πολυμερή ως παράγοντες διαμόλυνσης. Το ένα ονομάζεται Turbofect (Fermentas) και το άλλο PEI (CELLnTEC). Και για τους δύο παράγοντες διαμόλυνσης, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή με κάποιες μικρές διαφορές. Σε θρεπτικό υλικό DMEM απουσία αντιβιοτικών και ορού (DMEM -/-) προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA και το μέσο διαμόλυνσης σε αναλογία μαζών 1:2 αντίστοιχα. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε για τις πλάκες των 96 ήταν 0,8 μg, για τις πλάκες 12 πηγαδιών ήταν 1 μg, για τα πιάτα με διάμετρο 60mm ήταν 1,5 - 2 μg και για τα πιάτα με διάμετρο 100 mm 10 μg. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση του μίγματος στους 25 °C για 20 λεπτά στη περίπτωση του Turbofect και 8 λεπτά στη περίπτωση του PEI, προκειμένου να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα. Κατόπιν, στο μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε DMEM με 5% v/v FBS χωρίς αντιβιοτικά και μεταφέρθηκε στα κύτταρα. Στην περίπτωση του PEI, τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με το αντιδραστήριο, ενώ στην περίπτωση του Turbofect 4 ώρες, στους 37 °C και 5% CO₂. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προαιρετικά έκπλυση των κυττάρων με PBS. Τέλος, έγινε προσθήκη πλήρους DMEM στα κύτταρα και επακόλουθη επώασή τους για 16 έως 24 ώρες σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂.

3.2.13. Παραλαβή διαλυτού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα

Τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα στο πιάτο καλλιέργειας εκπλύθηκαν με 1x PBS και συλλέχθηκαν με κατάλληλη ξύστρα κυττάρων (cell harvesting), ύστερα από προσθήκη του κατάλληλου διαλύματος λύσης και συλλέχθηκαν σε σωληνάκια τύπου erpendorf. Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε είχε την εξής σύσταση: 25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton-X-100, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν με χρήση πιπέτας, επώαστηκαν στους 4 °C για 20 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 g, στους 4 °C για 20-30 λεπτά, ώστε να συλλεχθεί το υπερκείμενο διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα.

3.2.14. Ανοσοκατακρήμνιση

Η ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθοδολογίες του κλάδου της αναλυτικής βιοχημείας και έχει ως βασική αρχή τη χρήση αντισώματος για την εξειδικευμένη αναγνώριση μίας επιθυμητής πρωτεΐνης και την

επακόλουθη απομόνωσή της από ένα διάλυμα που περιέχει ένα μεγάλο σύνολο πρωτεϊνών. Επίσης, σε συγκεκριμένες συνθήκες λύσης των κυττάρων δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης εκτός μεμονωμένων πρωτεϊνών, και άθικτων πρωτεϊνικών συμπλόκων (π.χ. ένα οποιοδήποτε αντιγόνο μαζί με άλλους προσδέτες ή πρωτεΐνες που έχουν δεσμευθεί στο πρώτο), (συνανοσοκατακρήμιση, co-IP). Η ανοσοκατακρήμιση είναι μία από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών στο πλαίσιο κυτταρικού περιβάλλοντος.

Κύτταρα HeLa στα οποία πραγματοποιήθηκε παροδική συν-έκφραση του χιμαιρικών πρωτεϊνών με επίτοπους GFP και Flag, συλλέχθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα ανοσοκατακρήμισης (25 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT and 0,1 mM AEBSF) και επώαστηκαν σε πάγο για 20 min (3.2.13). Ύστερα, το ομογενοποιημένο κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 12000 g, σε 4 °C για 20-30 λεπτά. Το υπερκείμενο αποτέλεσε το διαλυτό κλάσμα πρωτεϊνών, από το οποίο κρατήθηκε το 1/10 του συνολικού του όγκου ως δείγμα ελέγχου (input). Έπειτα, η υπόλοιπη ποσότητα του διαλυτού κλάσματος αραιώθηκε σε με το διάλυμα ανοσοκατακρήμισης σε τελικό όγκο ίσο με 0,5 ml και στη συνέχεια αναμίχθηκε με 25 μl αιωρήματος (1:1) σφαιριδίων χρωματογραφίας GFP-TRAP Agarose (ChromoTek GmbH, Planegg, Germany). Το διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών επώαστηκε με τα σφαιρίδια (τα οποία είχαν προηγουμένως εξισορροπηθεί με το διάλυμα ανοσοκατακρήμισης για 3 ώρες, στους 4 °C). Ακολούθως τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν τρεις φορές με το διάλυμα ανοσοκατακρήμισης για δέκα λεπτά, στους 4 °C, υπό ανάδευση κυκλικής τροχιάς, με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στα 1000 g για 1-2 min και παράλληλη ανανέωση του διαλύματος. Το στάδιο αυτό έχει ως στόχο την απομάκρυνση μη-ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών. Τέλος, οι δεσμευμένες πρωτεΐνες, εκλούστηκαν με διάλυμα Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, 2,3% w/v SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 0,2% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης) και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

3.2.15. Μικροσκοπία φθορισμού και έμμεσου ανοσοφθορισμού

Για να ελεγχθεί η επίδραση της εμπελίνης σε κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν παροδικά την κατασκευή GFP-HIF-1α-SA, κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επώαστηκαν με εμπελίνη (10 μM) ή DMSO για 16 ώρες σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂. Έπειτα, σταθεροποιήθηκαν με 3,7 % v/v φορμαλδεΐδη (σε 1x PBS) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλύθηκαν εις τριπλούν με 1x PBS για πέντε λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο της διαπερατοποίησης με 0,1 % v/v Triton X-100 (σε PBS) για 15 λεπτά στους 4 °C. Ακολούθησαν ξανά εκπλύσεις με 1x PBS και στη συνέχεια επώαστηκε με το διάλυμα κορεσμού (1% w/v BSA, 0,1% v/v Tween-20 σε PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν με πρώτο αντίσωμα κουνελιού (rabbit) έναντι της

HSP60, για 16 ώρες, στους 4 °C, εκπλύθηκαν με 0,1% v/v Tween-20 σε PBS και τέλος επώαστηκαν με δευτερεύον αντίσωμα (anti-rabbit) συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa Fluor 568 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Τελικά, τα κύτταρα εκπλύθηκαν ξανά εις τριπλούν με 0,1% v/v Tween-20 σε PBS για 5 λεπτά, επεξεργάστηκαν με τη χρωστική DAPI για την εμφάνιση των πυρήνων και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας Mowiol (Sigma Aldrich, Burlington, MA, ΗΠΑ).

Για να ελεγχθεί η επίδραση της εμπελίνης στις ενδογενείς πρωτεΐνες των κυττάρων HeLa, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παραπάνω με τη διαφορά της χρήσης ενός μείγματος των δύο κύριων αντισωμάτων, ενός έναντι της μορταλίνης (rabbit) και ενός έναντι του HIF-1α (mouse) και ενός μείγματος δύο δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με Alexa Fluor 568 (anti-rabbit) ή Alexa Fluor 488 (anti-mouse).

Για να ελεγχθεί η επίδραση της εμπελίνης στον εντοπισμό του ενδογενούς Bax, τα κύτταρα HeLa που συνεκφράζουν παροδικά Flag ή Flag-HIF-1α-SA και pDsRed2-Mito (Clontech Laboratories, CA, USA) υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με εμπελίνη ή DMSO όπως παραπάνω, επώαστηκαν με ετοποσίδιο (75 μM) για 4 ώρες, σε 37 °C και 5% CO₂, σταθεροποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία όπως παραπάνω χρησιμοποιώντας ένα κύριο αντίσωμα έναντι της Bax (mouse). Στη περίπτωση της επίδρασης της εμπελίνης στον εντοπισμό του υπερεκφρασμένου GFP-Bax, τα κύτταρα HeLa που συνεκφράζουν παροδικά Flag ή Flag-HIF-1α-SA και pEGFP-C3-Bax επώαστηκαν πρώτα με εμπελίνη ή DMSO, έπειτα με ετοποσίδιο (όπως και προηγουμένως) και ακολούθως υποβλήθηκαν σε χρώση με την ουσία Mitotracker (100 nM) για 20 λεπτά σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂ ώστε να βαφθούν τα μιτοχόνδρια. Ακολούθως έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων, και επώαση με DAPI/Mowiol.

Χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axio Imager Z2. Το μικροσκόπιο χρησιμοποιεί έχει την δυνατότητα ακτινοβολίας σε 4 κανάλια διαφορετικού μήκους κύματος διέγερσης [λ_{exc} = 365 (DAPI), 450-490 (πράσινο), 510-560 (κόκκινο), 575-625 (Υπέρυθρο)] προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορετικές φθορίζουσες σε ένα δείγμα. Ο έλεγχος των καναλιών πραγματοποιείται μέσω του λογισμικού ZEN, ενώ η ενσωματωμένη κάμερα AxioCam MRm είναι μονοχρωματική και επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών υψηλής ανάλυσης. Στην εν λόγω διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα κανάλια με μήκη κύματος ακτινοβολίας διέγερσης στα 365, 450-490 και 510-560 nm. Έτσι επιτυγχάνεται η αντίστοιχη ανίχνευση των φθορίζουσών DAPI (κυανό) και των συνδεδεμένων σε δευτερεύοντα αντισώματα φθοριοχρωμάτων Alexa Fluor 488 (πράσινο), και Alexa Fluor 568 (κόκκινο).

3.2.16. Ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού πρωτεϊνών από δεδομένα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού

Για την ανάλυση της αλληλοεπικάλυσης των σημάτων από το φθορισμό των πρωτεϊνών μορταλίνης και HIF-1α, GFP-HIF-1α-SA και HSP60, Bax και DsRED2-Mito και GFP-Bax και μιτοχονδρίων (Mitotracker) χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο λογισμικό ImageJ. Ελέγχθηκε η αλληλοεπικάλυση των δύο σημάτων φθορισμού (σε διαφορετικά κανάλια) που εκφράζεται στις τιμές του συντελεστή συνεντοπισμού Manders'. Ο συντελεστής Manders εκφράζει ποσοτικά το ποσοστό αλληλοεπικάλυσης των δύο σημάτων φθορισμού και κυμαίνεται από το 0 (καθόλου αλληλοεπικάλυση) έως το +1 (100% αλληλοεπικάλυση). Οι έλεγχοι βασίστηκαν στο πρόσθετο εργαλείο (plugin) του Image J με το όνομα JACoP (Just Another Colocalization Plugin). Οι τιμές των συντελεστών Manders που αφορούσαν ένα σύνολο περίπου 30-50 κυττάρων ανά περίπτωση, εισήχθησαν στο λογισμικό GraphPad Prism ώστε να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των δεδομένων που εξήχθησαν από την μελέτη αλληλοεπικάλυσης των δύο καναλιών. Οι στατιστικές διαφορές και η εξαγωγή της στατιστικής σημαντικότητας των δεδομένων υπολογίστηκαν με το στατιστικό κριτήριο t (**P < 0.001).

3.2.17. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7

Η δραστηριότητα των κασπασών 3 και 7 προσδιορίστηκε μέσω του kit "Caspase-Glo® 3/7 Assay" της εταιρείας Promega, το οποίο βασίζεται σε μία τεχνική προσδιορισμού φωταύγειας. Κύτταρα HeLa επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων (2000 κύτταρα/θέση) και ακολούθως συν-διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν για τις κατασκευές GFP, GFP-HIF-1α-SA, Flag και Flag-Mort-SBD-VD στους κάτωθι συνδυασμούς: α. GFP και Flag, β. GFP και Flag-Mort-SBD-VD, γ. GFP-HIF-1α-SA και δ. Flag, GFP-HIF-1α-SA και Flag-Mort-SBD-VD. Ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν με ετοποσίδιο (75 μM, 4 h, 37 °C, 5% CO₂) και με το πέρας της επώασης το αντιδραστήριο του kit προστέθηκε στα κύτταρα σε αναλογία όγκων 1:1 με το θρεπτικό μέσο. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η επώαση των κυττάρων με το αντιδραστήριο για 60 λεπτά. Έπειτα το πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων τοποθετήθηκε σε φωτόμετρο-ανιχνευτή για πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων (Tekan MicroPlate Reader, Switzerland) και καταγράφηκε το σήμα της φωταύγειας από κάθε συνθήκη.

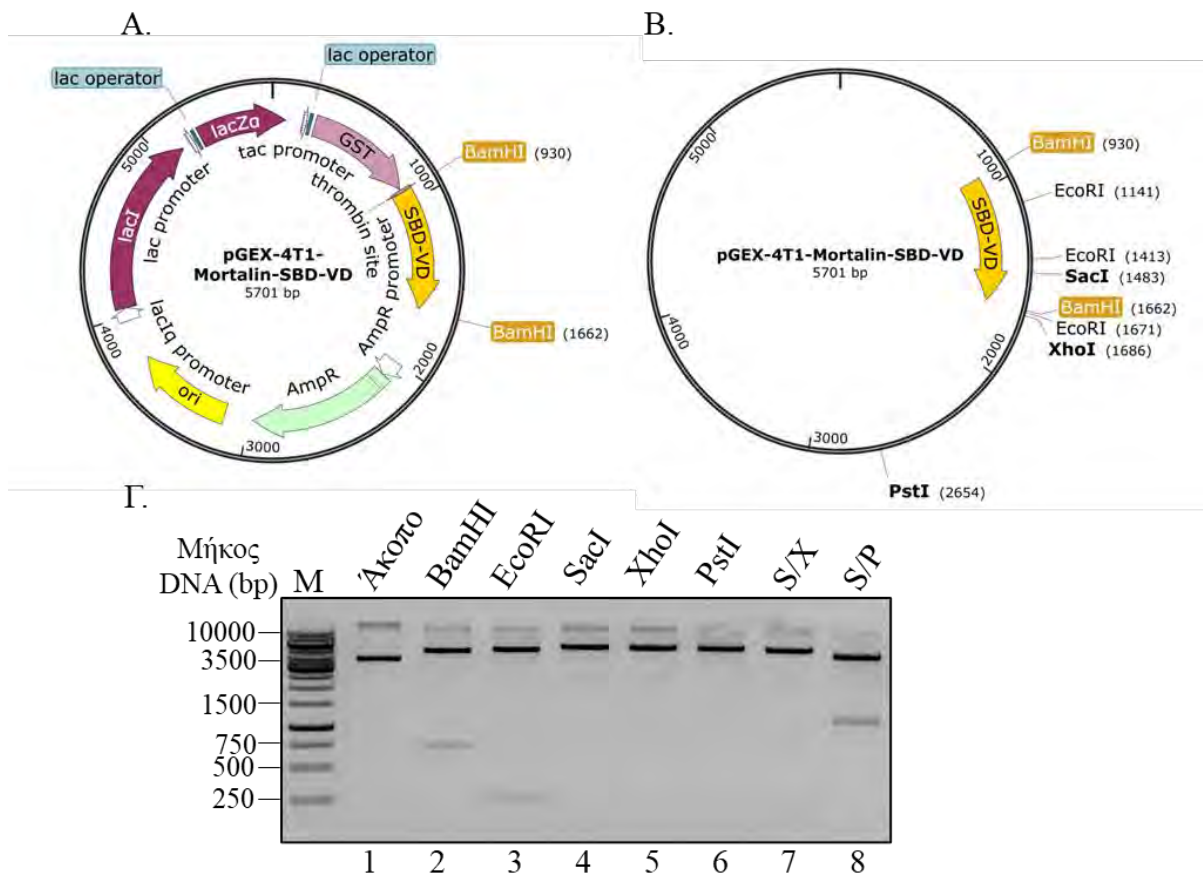
4. Αποτελέσματα

4.1. Μοριακά εργαλεία: συλλογή πλασμιδιακών κατασκευών

Στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» της παρούσας διατριβής έχουν περιγραφεί αναλυτικά οι διαδικασίες κατασκευής μιας σειράς πλασμιδίων που φέρουν κλωνοποιημένα cDNA τα οποία κωδικοποιούν τόσο για την πλήρους μεγέθους μορταλίνη, όσο και για τμήματα αυτής. Οι πλασμιδιακές αυτές κατασκευές δημιουργήθηκαν είτε μέσω υποκλωνοποίησης, είτε μέσω ενίσχυσης με PCR των εκάστοτε cDNA και ένθεση αυτών σε φορείς έκφρασης που προορίζονται τόσο για παραγωγή πρωτεϊνών τόσο σε βακτηριακά κύτταρα, όσο και σε κύτταρα θηλαστικών. Ένα μεγάλο μέρος των προαναφερθέντων κατασκευών αποτέλεσαν θεμελιώδη μοριακά εργαλεία στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας και για το σκοπό αυτό θα παρουσιαστούν στις υποενότητες που ακολουθούν.

4.1.1. Έλεγχος της ορθότητας των πλασμιδιακών κατασκευών που προορίζονται για έκφραση πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν μέσω κλωνοποίησης των τμημάτων cDNA της μορταλίνης σε φορείς έκφρασης πρωτεϊνών για βακτηριακά κύτταρα (bacterial expression vectors) ελέγχθηκαν για την ακεραιότητα και κατ' επέκταση την ορθότητά τους μέσω πέψων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

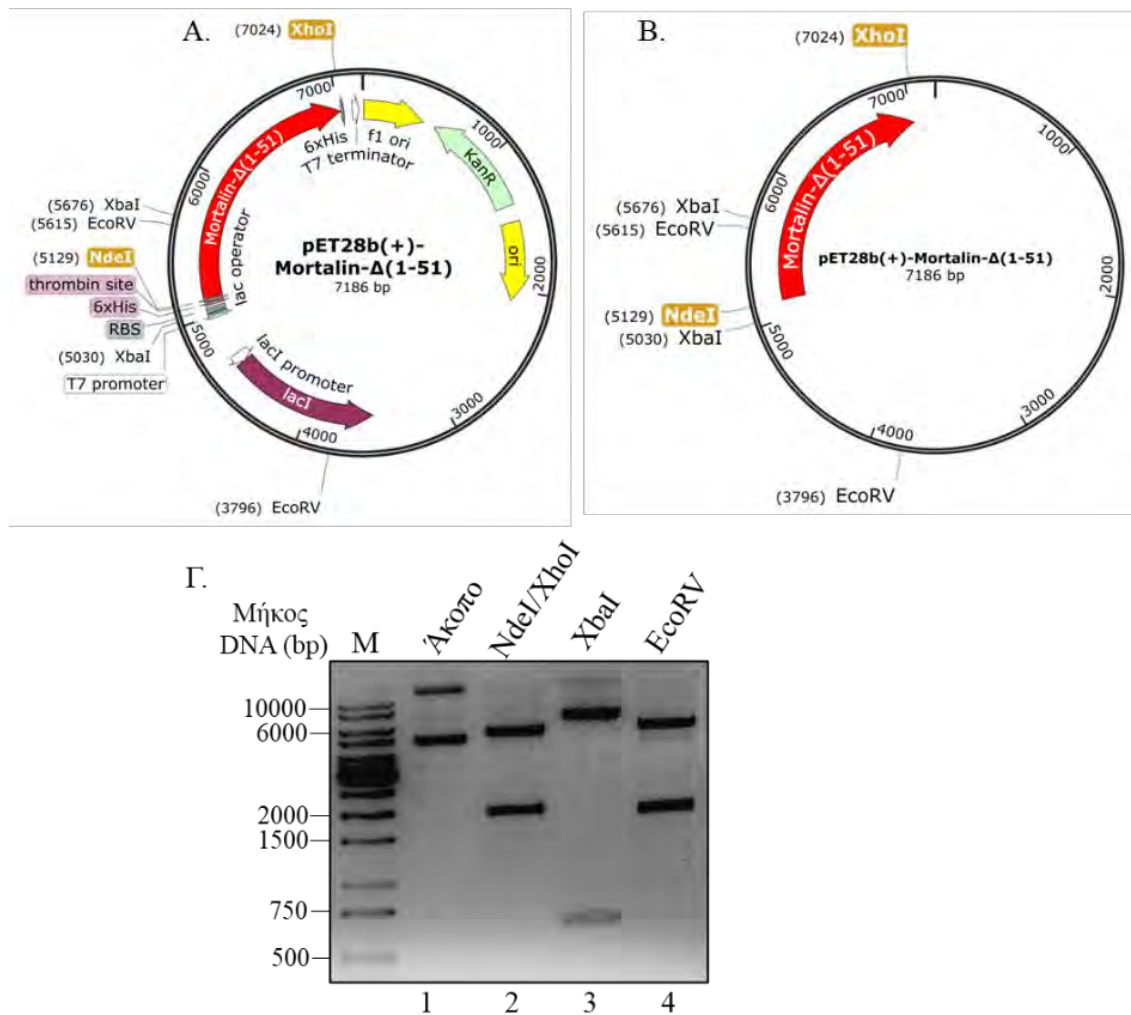


Εικόνα 17: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pGEX-4T1-Mortalin-SBD-VD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pGEX-4T1-Mortalin-SBD-VD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pGEX-4T1-Mortalin-SBD-VD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI, EcoRI, SacI, XhoI και PstI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pGEX-4T1-Mortalin-SBD-VD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4969 bp και 732 bp, διαδρομή 2), EcoRI (5171 bp, 272 bp, 258 bp, διαδρομή 3), SacI (5701 bp, διαδρομή 4), XhoI (5701 bp, διαδρομή 5), PstI (5701 bp, διαδρομή 6), SacI-XhoI (5494 bp, 207 bp, διαδρομή 7) και SacI-PstI (4530 bp, 1171 bp, διαδρομή 8), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Τα μεγέθη που προκύπτουν από τις αντιδράσεις πέψεων της κατασκευής pGEX-4T1-Mortalin-SBD-VD είναι στα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 17**). Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση και καθαρισμό της χμιαϊκής πρωτεΐνης GST-Mortalin-SBD-VD από βακτηριακά κύτταρα.

Συνεχίζοντας, η πλασμιδιακή κατασκευή pGST-parallel2-Mortalin-NBD, για την οποία έχει γίνει λόγος στην ενότητα **3.1.4**, δεν θα παρουσιαστεί στην παρούσα υποενότητα, καθώς δεν είναι γνωστή η πληροφορία για τη θέση ένθεσης του cDNA της NBD στον φορέα pGST-parallel2 γεγονός που δυσχεραίνει τη δημιουργία ενός πληροφοριακού χάρτη περιορισμού. Επίσης αποτελεί ευγενική παραχώρηση του Dr Misra (219) και φέρει την πληροφορία για την κωδικοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-NBD η οποία απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα.

Έπειτα η κατασκευή pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51) που αποτέλεσε επίσης ευγενική παραχώρηση του Dr. Cowan (288) (3.1.4.) ελέγχθηκε μέσω πέψης με διάφορες ενδονουκλεάσες περιορισμού όπως και προηγουμένως.

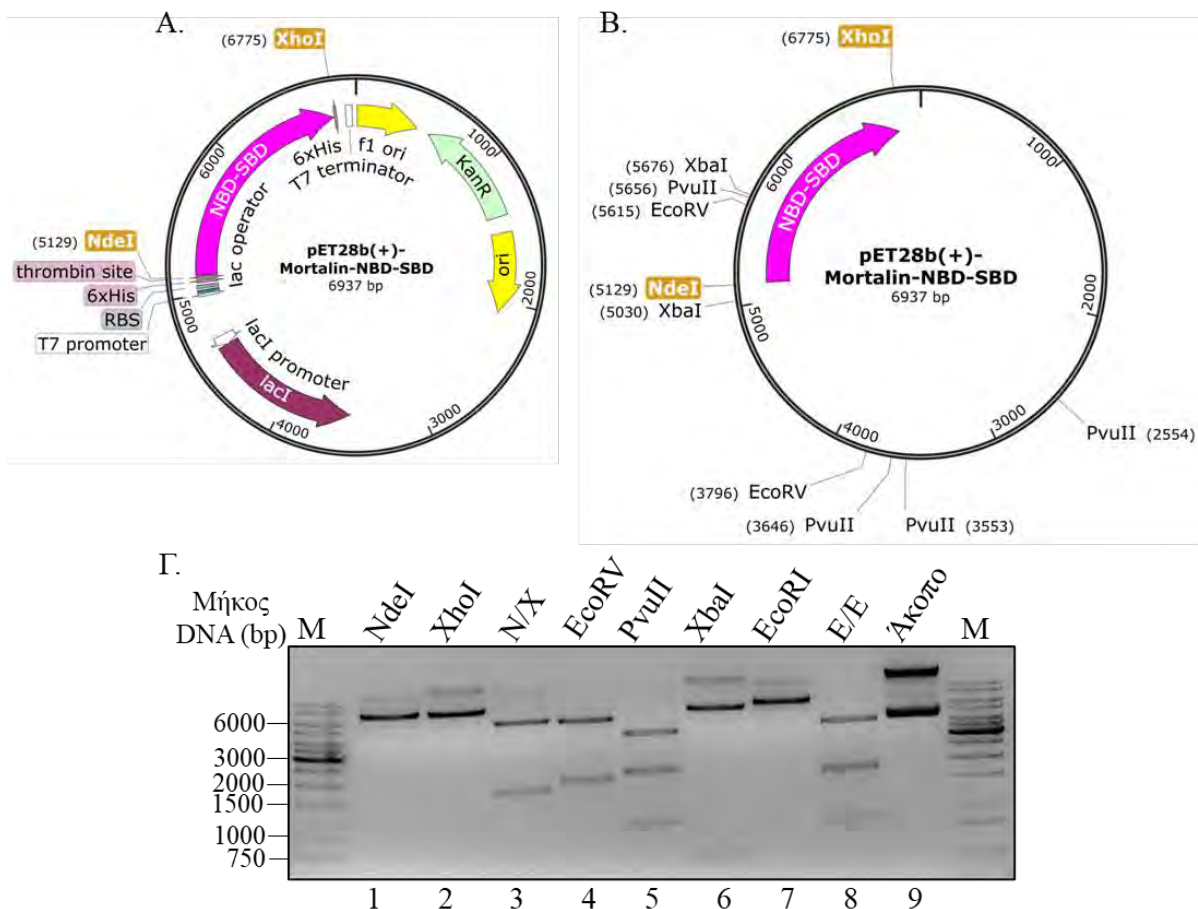


Εικόνα 18: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51). (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51). (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51) με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού NdeI, XhoI, XbaI και EcoRV. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51) με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI-XhoI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5290 bp και 1896 bp, διαδρομή 2), XbaI (6540 bp, 646 bp, διαδρομή 3), EcoRV (5367 bp, 1819 bp διαδρομή 4), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

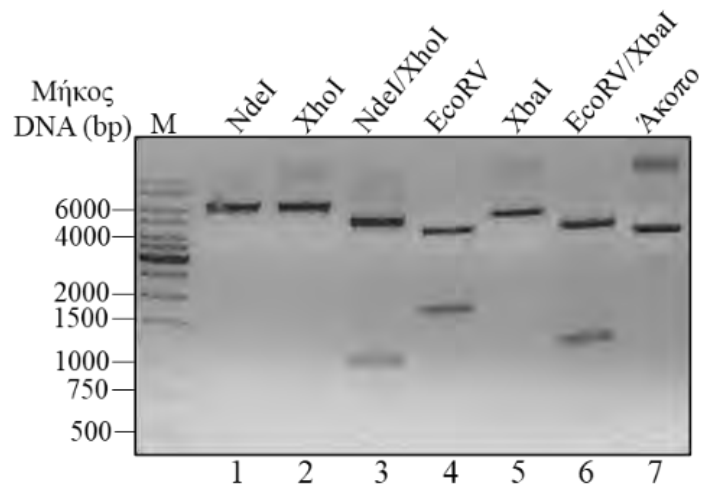
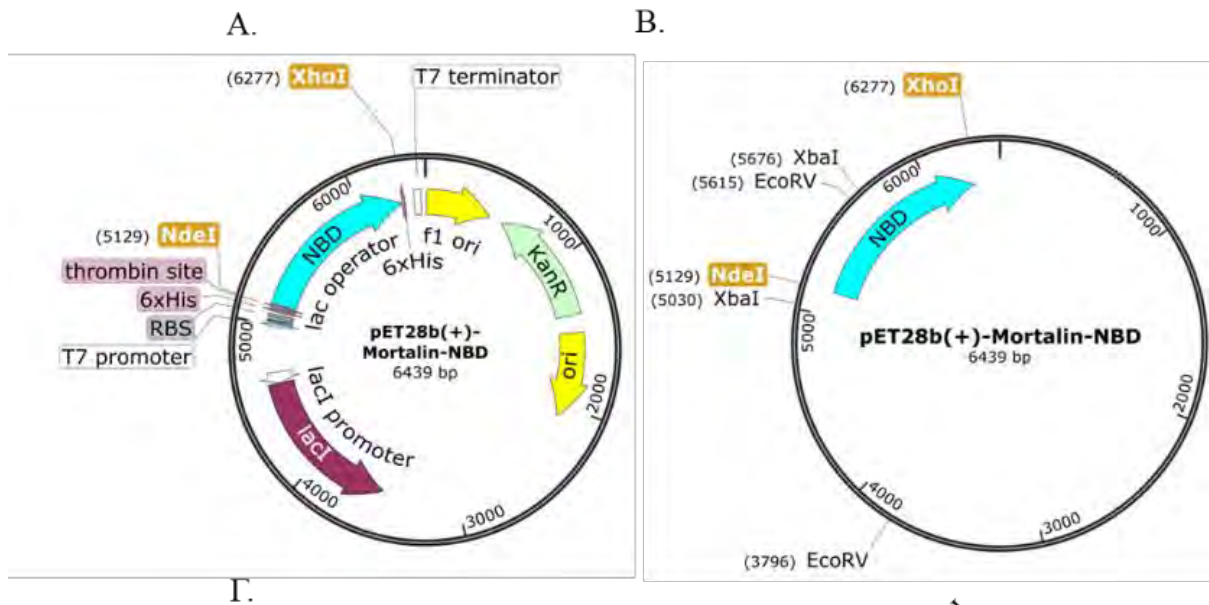
Τα μεγέθη που προκύπτουν από τις αντιδράσεις πέψεων της κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-Δ(1-51) είναι στα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων (Εικόνα 18). Η κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό και την απομόνωση της πρωτεΐνης σύντηξης His₆-Mortalin-Δ(1-51) από βακτήρια *E. coli*.

Οι επόμενες τέσσερις πλασμιδιακές κατασκευές που ακολουθούν ελέγχθηκαν για την ορθότητά τους όπως και οι προηγούμενες και φέρουν αντίστοιχα την πληροφορία για την κωδικοποίηση των πρωτεϊνών Mortalin-NBD-SBD (Εικόνα 19), Mortalin-NBD (Εικόνα 20), Mortalin-SBD-

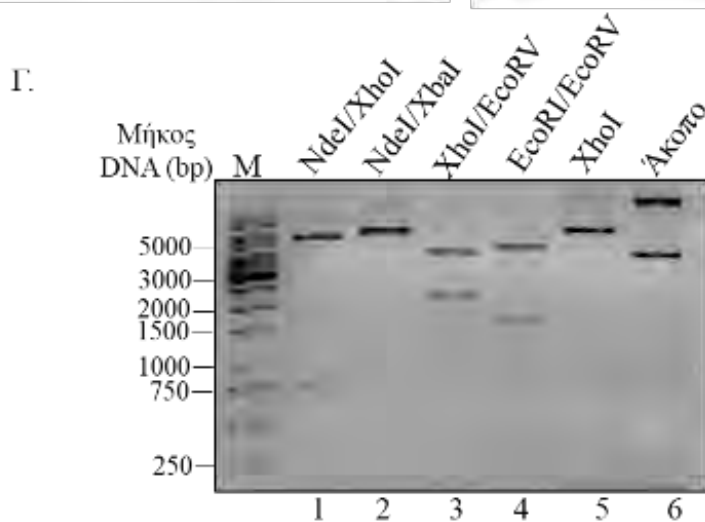
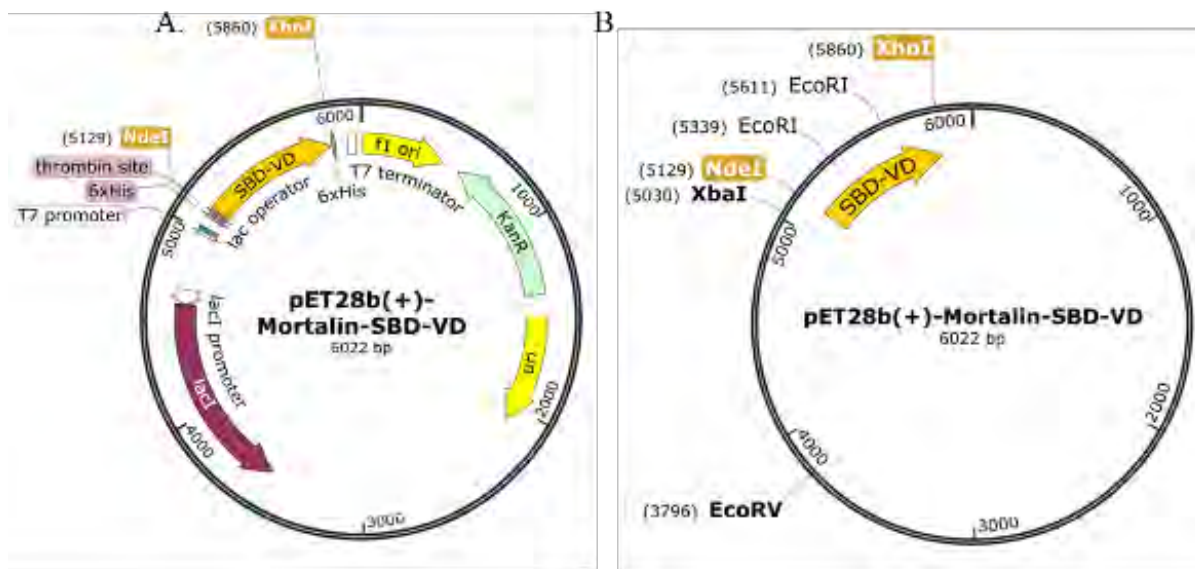
VD (Εικόνα 21) και Mortalin-SBD (Εικόνα 22) σε σύντηξη με επίτοπο His₆ στο αμινοτελικό τους άκρο. Οι κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των His₆-πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα. Τα ζεύγη βάσεων των προϊόντων πέψης ήταν τα αναμενόμενα και σε αυτές τις τέσσερις κατασκευές.



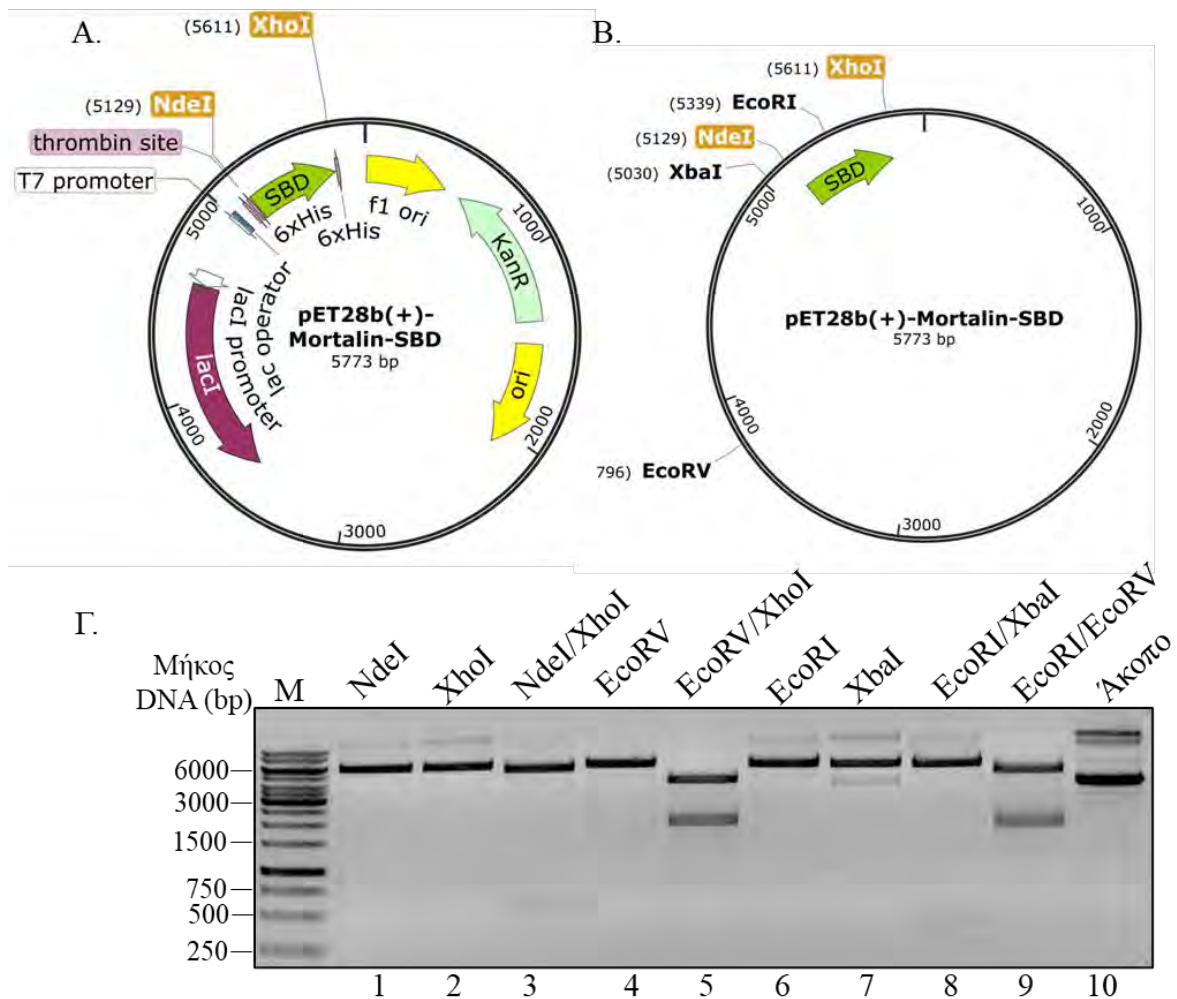
Εικόνα 19: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD-SBD. (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-NBD-SBD. (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD-SBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού NdeI, XhoI, EcoRV, PvuII και XbaI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD-SBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI (προκύπτει τμήμα μεγέθους 6937 bp, διαδρομή 1), XhoI (6937 bp, διαδρομή 2), NdeI-XhoI (5290 bp και 1647 bp, διαδρομή 3), EcoRV (3956 bp, 2066 bp, διαδρομή 4), PvuII (3835 bp, 2010 bp, 999 bp, 93 bp, διαδρομή 5), XbaI (6291 bp, 646 bp, διαδρομή 6), EcoRI (6937 bp, διαδρομή 7), EcoRI-EcoRV (4228 bp, 1819 bp, 890 bp, διαδρομή 8), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 9). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



Εικόνα 20: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-NBD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού NdeI, XhoI, EcoRV, και XbaI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-NBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI (προκύπτει τμήμα μεγέθους 6439 bp, διαδρομή 1), XhoI (6439 bp, διαδρομή 2), NdeI-XhoI (5290 bp και 1149 bp, διαδρομή 3), EcoRV (4620 bp, 1819 bp, διαδρομή 4), XbaI (5793 bp, 646 bp, διαδρομή 5), EcoRV-XbaI (4557 bp, 1236 bp, 583 bp, 63 bp διαδρομή 6), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 7). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

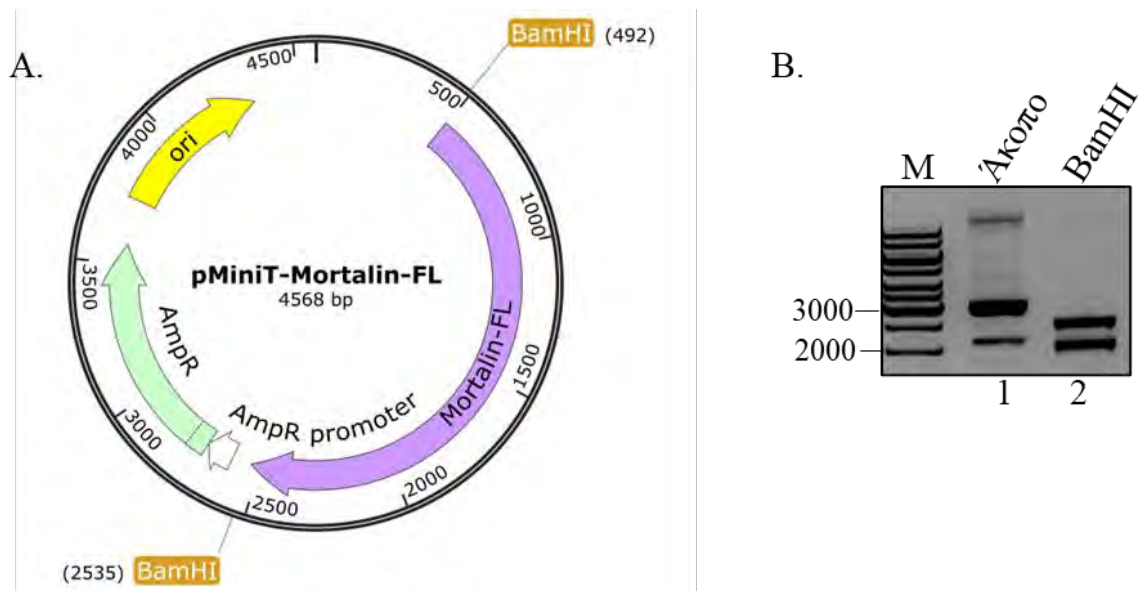


Εικόνα 21: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD-VD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-SBD-VD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD-VD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού NdeI, XhoI, XbaI, EcoRV και EcoRI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD-VD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI-XhoI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5290 bp, 732 bp, διαδρομή 1), NdeI-XbaI (5924 bp, 28 bp, διαδρομή 2), XhoI-EcoRV (3956 bp, 2066 bp, διαδρομή 3), EcoRI-EcoRV (4205 bp και 1545 bp, 272 bp, διαδρομή 4), XhoI (6022 bp, διαδρομή 5) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 6). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



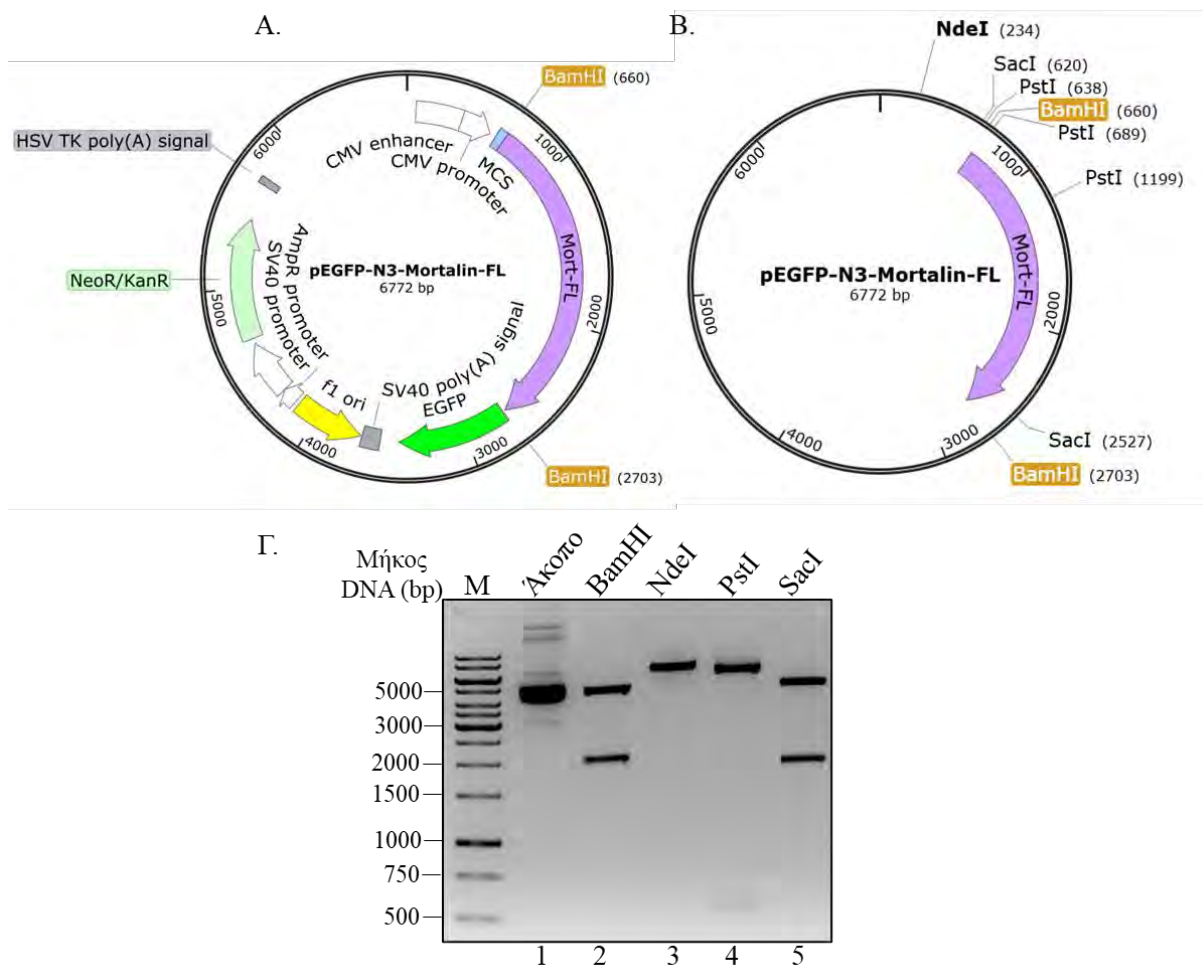
Εικόνα 22: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pET28b(+)-Mortalin-SBD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού NdeI, XhoI, XbaI, EcoRV και EcoRI. (C) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pET28b(+)-Mortalin-SBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI (προκύπτει τμήμα μεγέθους 5773 bp, διαδρομή 1), XhoI (5773 bp, διαδρομή 2), NdeI-XhoI (5290 bp, 483 bp, διαδρομή 3), EcoRV (5773 bp, διαδρομή 4), EcoRV-XhoI (3956 bp, 1817 bp, διαδρομή 5), EcoRI (5773 bp, διαδρομή 6), XbaI (5773 bp, διαδρομή 7), EcoRI-XbaI (5464 bp, 309 bp, διαδρομή 8), EcoRI-EcoRV (4228 bp, 1545 bp, διαδρομή 9) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 10). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Τέλος, το πλασμίδιο pMiniT-Mortalin-FL ελέγχθηκε με παρόμοιο τρόπο όπως όλες οι προηγούμενες κατασκευές και προέκυψαν τα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 23**). Η κατασκευή αυτή αποτέλεσε ενδιάμεσο στάδιο στη διαδικασία κλωνοποίησης της πλήρους μεγέθους μορταλίνης (**3.1.4**).



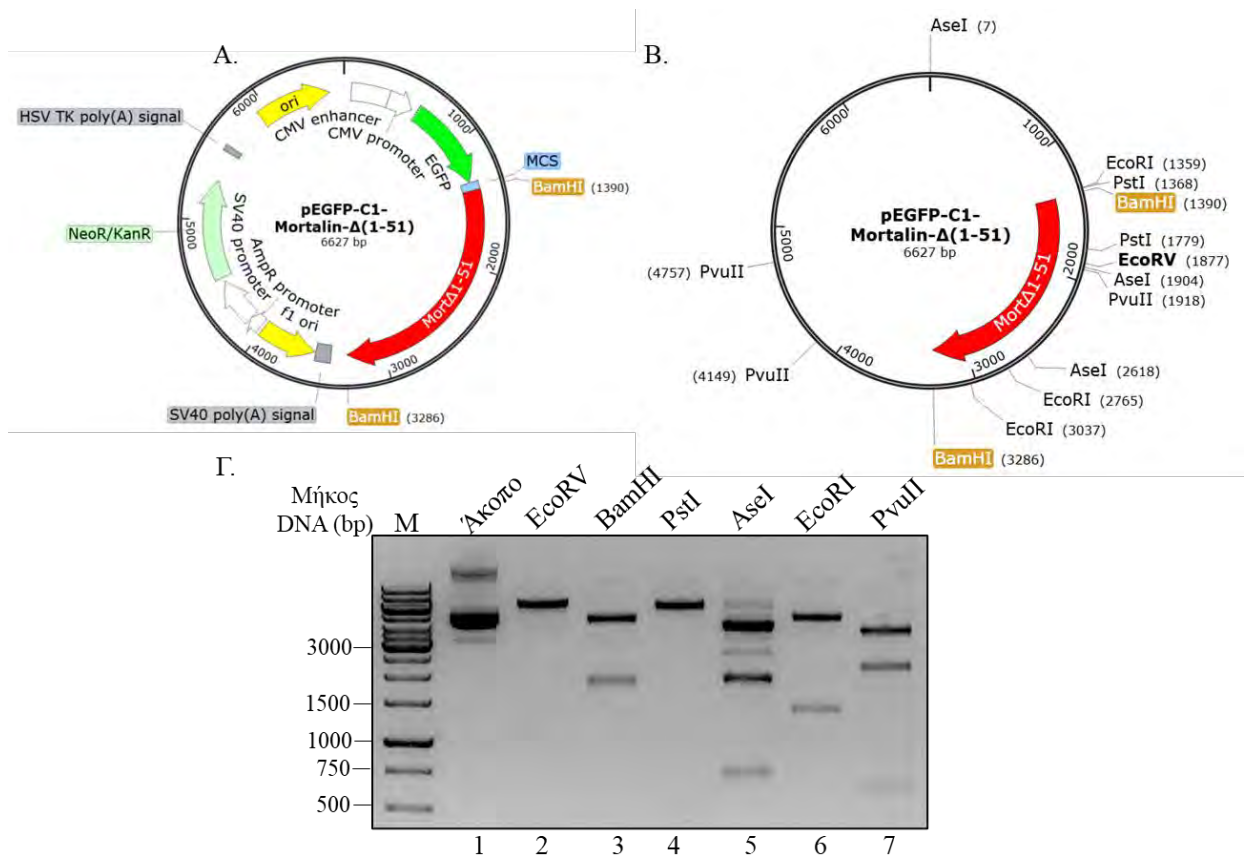
Εικόνα 23: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου *pMiniT-Mortalin-FL*. (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής *pMiniT-Mortalin-FL*. (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου *pMiniT-Mortalin-FL* με έμφαση στη θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης περιορισμού *Bam*HI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου *pMiniT-Mortalin-FL* με την ενδονουκλεάση περιορισμού *Bam*HI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 2525 bp, 2043 bp, διαδρομή 2), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). Μ: μάρτυρας μοριακού βάρους.

4.1.2. Έλεγχος της ορθότητας των πλασμιδιακών κατασκευών που προορίζονται για έκφραση πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα

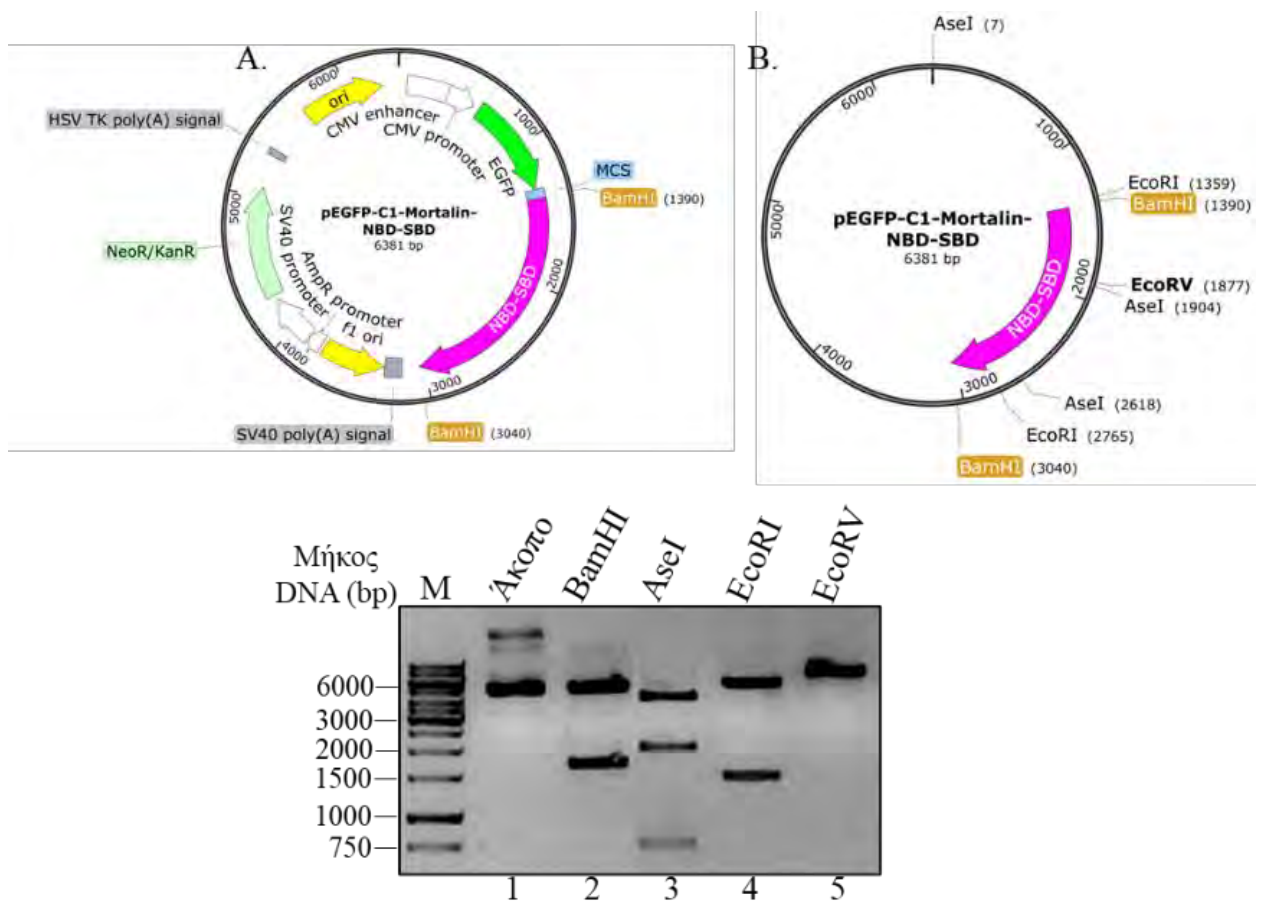


Εικόνα 24: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-N3-Mortalin-FL. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-N3-Mortalin-FL. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-N3-Mortalin-FL με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI, NdeI, PstI, SacI. (C) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-N3-Mortalin-FL με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4729 bp, 2043 bp, διαδρομή 2), NdeI (6772 bp, διαδρομή 3), PstI (6211 bp, 510 bp, 51 bp, διαδρομή 4), SacI (4865 bp, 1907 bp, διαδρομή 5) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

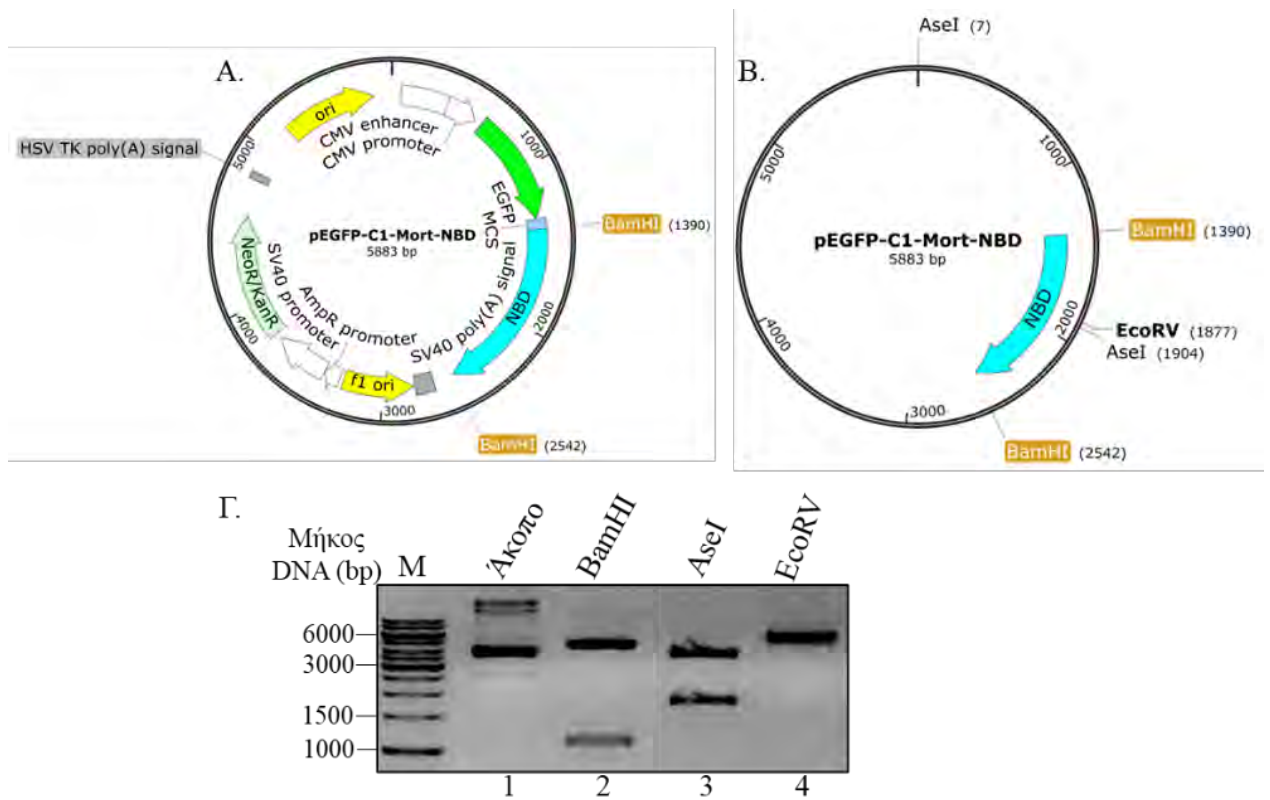
Τα ζεύγη βάσεων για το εν λόγω πλασμίδιο (Εικόνα 24), είναι τα αναμενόμενα με βάση το μάρτυρα μοριακού βάρους. Επίσης το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της πλήρους μεγέθους μορταλίνης σε σύντηξη με GFP στο καρβοξυτελικό της άκρο σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Το ίδιο ισχύει και για τα πλασμίδια που περιγράφονται παρακάτω, τα οποία με τη σειρά τους χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση τμημάτων της μορταλίνης σε σύντηξη με GFP στο αμινοτελικό τους άκρο (Εικόνα 25, Εικόνα 26, Εικόνα 27, Εικόνα 28, Εικόνα 29).



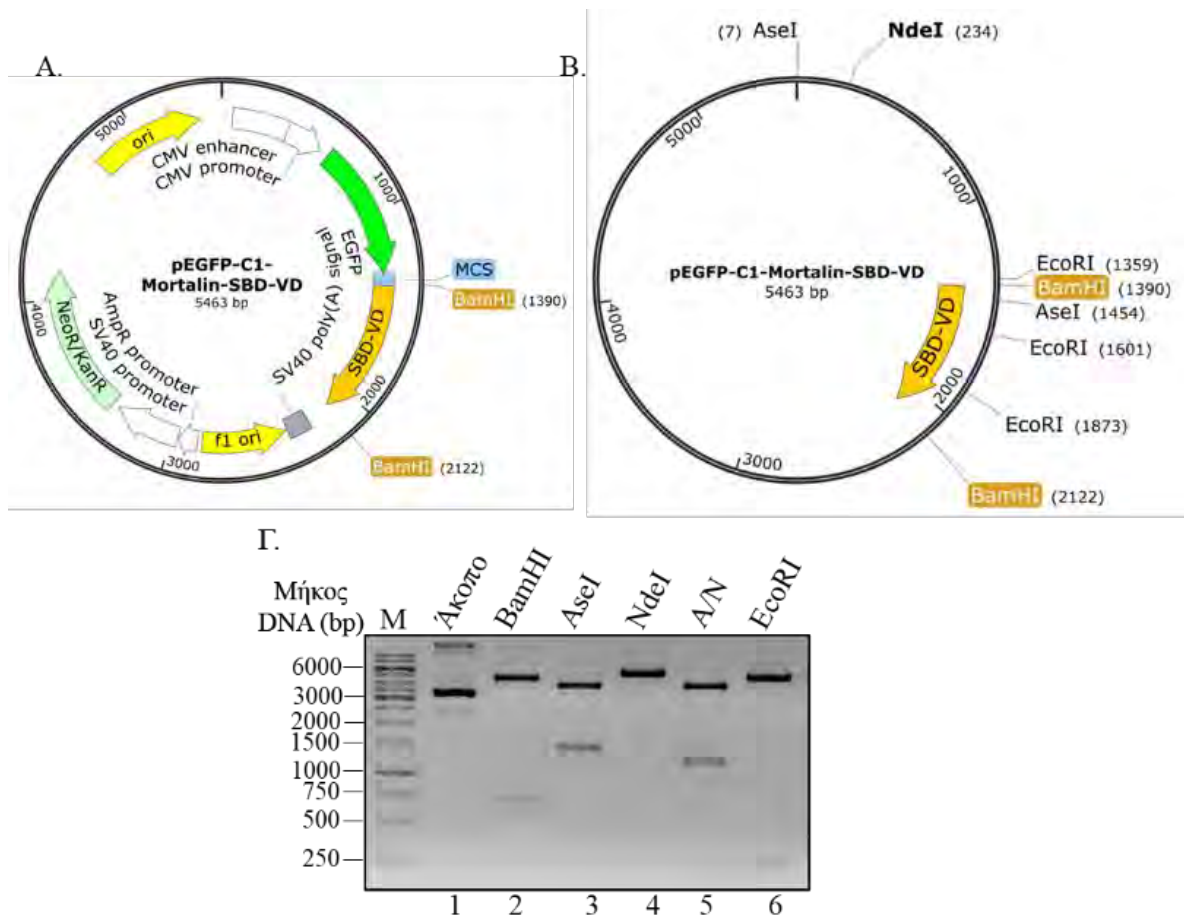
Εικόνα 25: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-Δ(1-51). (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-C1-Mortalin-Δ(1-51). (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-Δ(1-51) με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού EcoRV, BamHI, PstI, AseI, EcoRI, PvuII. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-Δ(1-51) με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRV (προκύπτει τμήμα μεγέθους 6627 bp, διαδρομή 2), BamHI (4731 bp, 1896 bp, διαδρομή 3), PstI (6216 bp, 411 bp, διαδρομή 4), AseI (4016 bp, 1897 bp, 714 bp, διαδρομή 5), EcoRI (4949 bp, 1406 bp, 272 bp, διαδρομή 6), PvuII (3788 bp, 2231 bp, 608 bp, διαδρομή 7) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



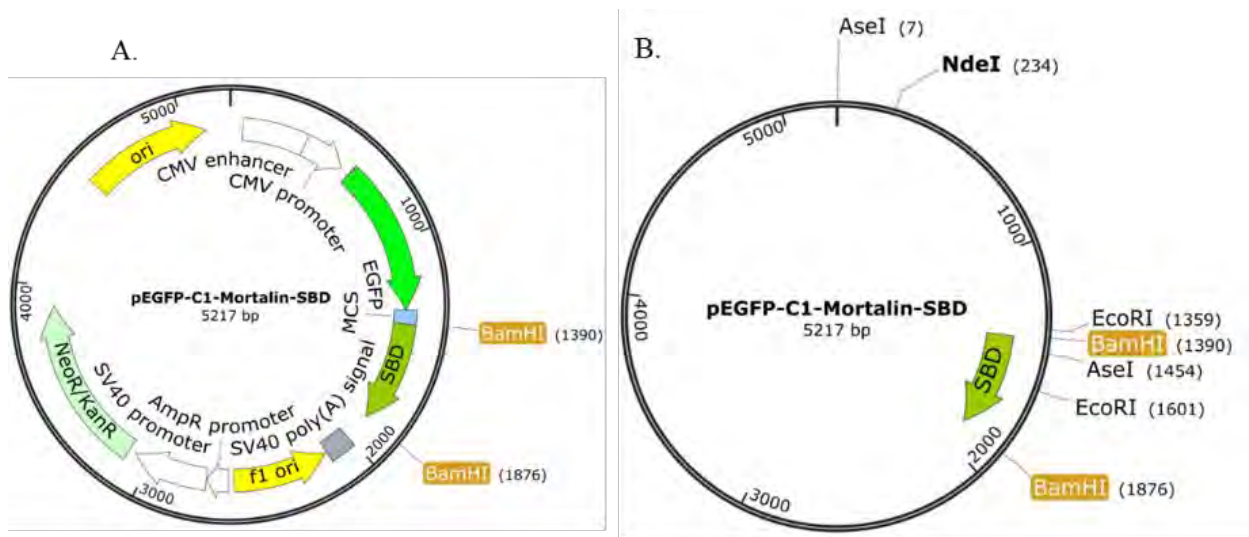
Εικόνα 26: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου *pEGFP-C1-Mortalin-NBD-SBD*. (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής *pEGFP-C1-Mortalin-NBD-SBD*. (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου *pEGFP-C1-Mortalin-NBD-SBD* με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, *Bam*HI, *Ase*I, *Eco*RI, *Eco*RV. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου *pEGFP-C1-Mortalin-NBD-SBD* με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, *Bam*HI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4731 bp, 1650 bp, διαδρομή 2), *Ase*I (3770 bp, 1897 bp, 714 bp, διαδρομή 3), *Eco*RI (4975 bp, 1406 bp, διαδρομή 4), *Eco*RV (6381 bp, διαδρομή 5) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). Μ: μάρτυρας μοριακού βάρους.



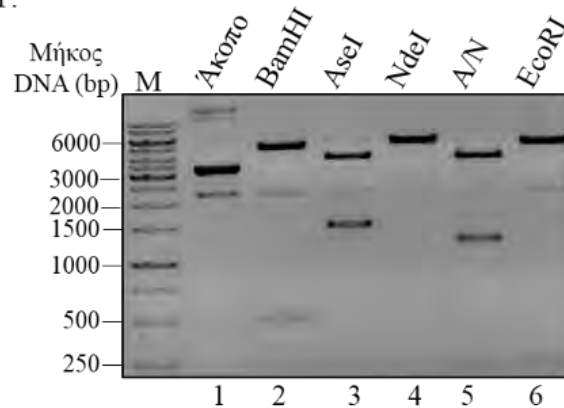
Εικόνα 27: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-NBD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-C1-Mortalin-NBD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-NBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, BamHI, AseI, EcoRV. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-NBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4731 bp, 1152 bp, διαδρομή 2), AseI (3856 bp, 1897 bp, 714 bp, διαδρομή 3), EcoRV (5883 bp, διαδρομή 4) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



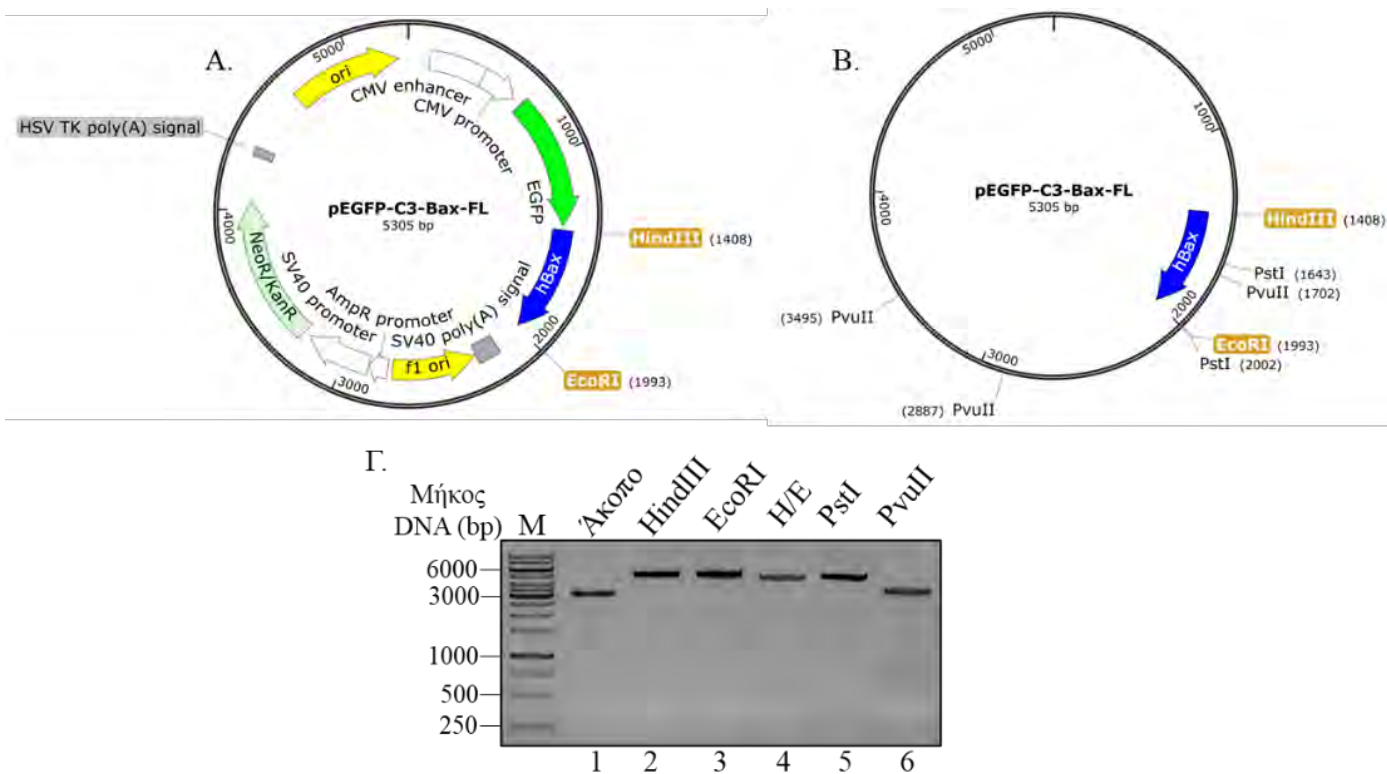
Εικόνα 28: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD-VD. (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-C1-Mortalin-SBD-VD. (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD-VD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, BamHI, AseI, NdeI, EcoRI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD-VD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4731 bp, 732 bp, διαδρομή 2), AseI (4016 bp, 1447 bp, διαδρομή 3), NdeI (5463 bp, διαδρομή 4), AseI-NdeI (4016 bp, 1220 bp, 227 bp, διαδρομή 5), EcoRI (4949 bp, 272 bp, 242 bp, διαδρομή 6) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



Γ.



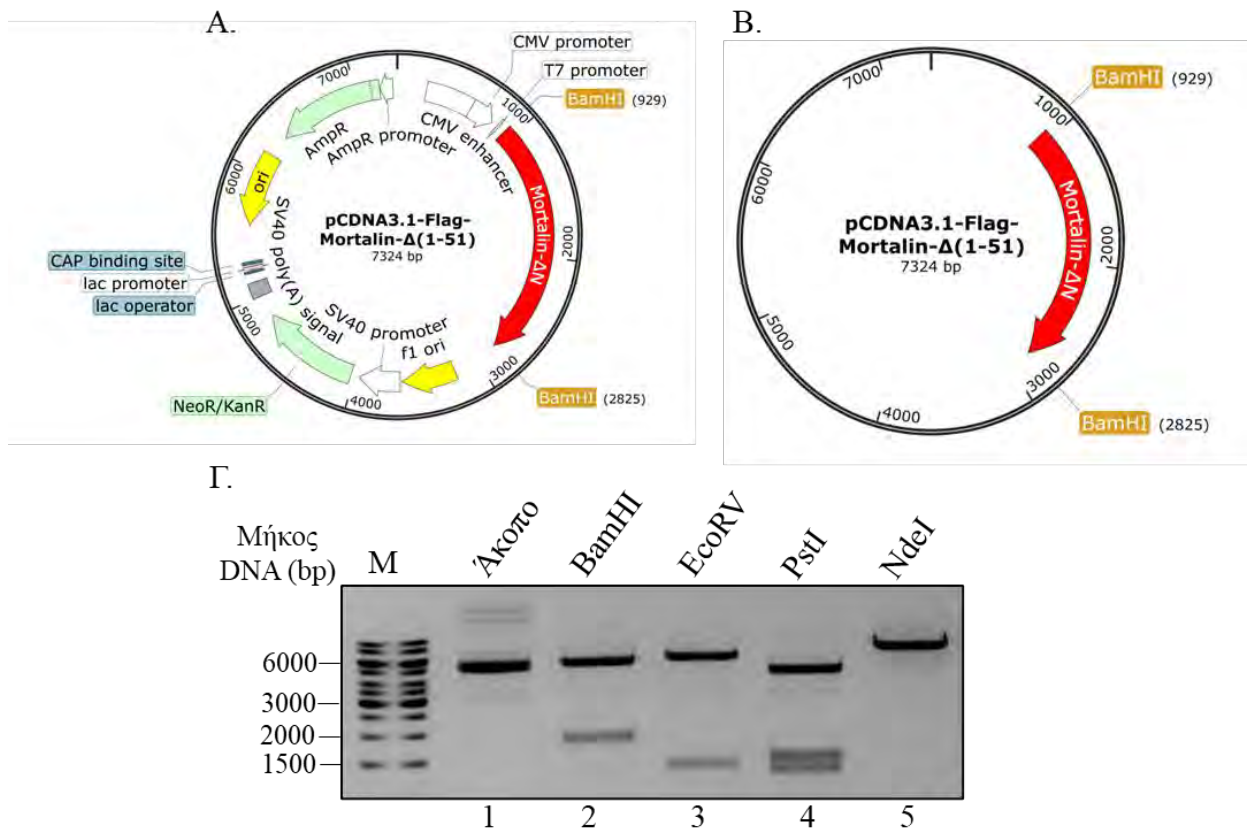
Εικόνα 29: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-C1-Mortalin-SBD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, BamHI, AseI, NdeI, EcoRI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C1-Mortalin-SBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 4731 bp, 486 bp, διαδρομή 2), AseI (3770 bp, 1447 bp, διαδρομή 3), NdeI (5217 bp, διαδρομή 4), AseI-NdeI (3770 bp, 1220 bp, 227 bp, διαδρομή 5), EcoRI (4975 bp, 242 bp, διαδρομή 6) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



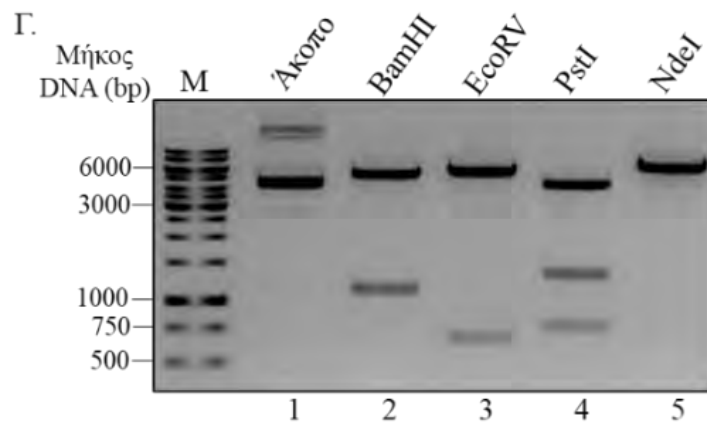
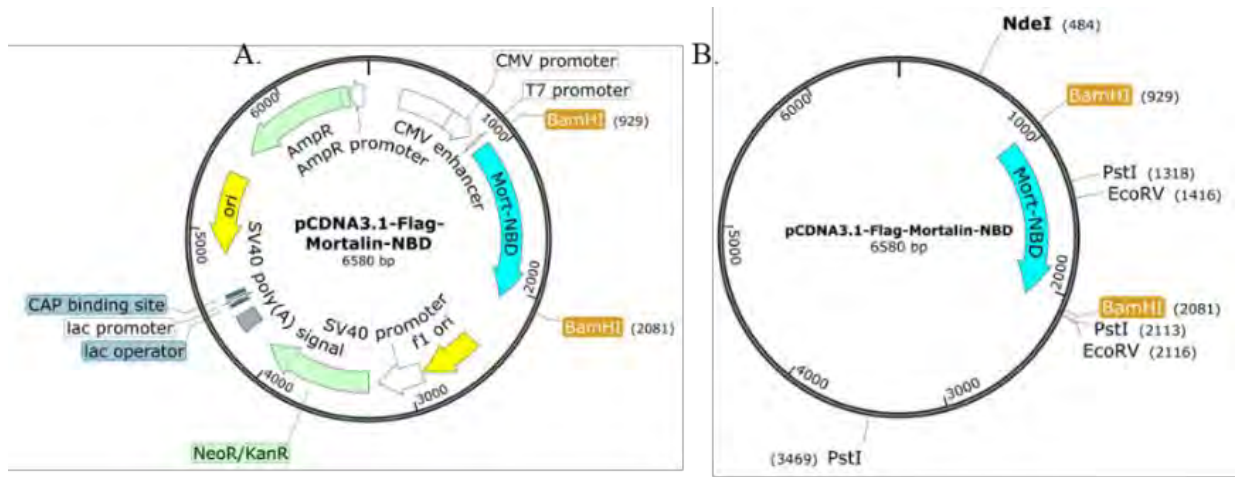
Εικόνα 30: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pEGFP-C3-Bax-FL. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pEGFP-C3-Bax-FL. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pEGFP-C3-Bax-FL με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, HindIII, EcoRI, PstI, PvuII. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C3-Bax-FL με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, HindIII (προκύπτει τμήμα μεγέθους 5305 bp, διαδρομή 2), EcoRI (5305 bp, διαδρομή 3), HindIII-EcoRI (4720 bp, 585 bp, διαδρομή 4), PstI (4946 bp, 359 bp, διαδρομή 5), PvuII (3512 bp, 1185 bp, 608 bp, διαδρομή 6) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Το παραπάνω πλασμίδιο είναι ορθό με βάση τα ζεύγη βάσεων των προϊόντων πέψης που απεικονίζονται (**Εικόνα 30**). Χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της χημικτικής πρωτεΐνης GFP-Bax σε κύτταρα θηλαστικών.

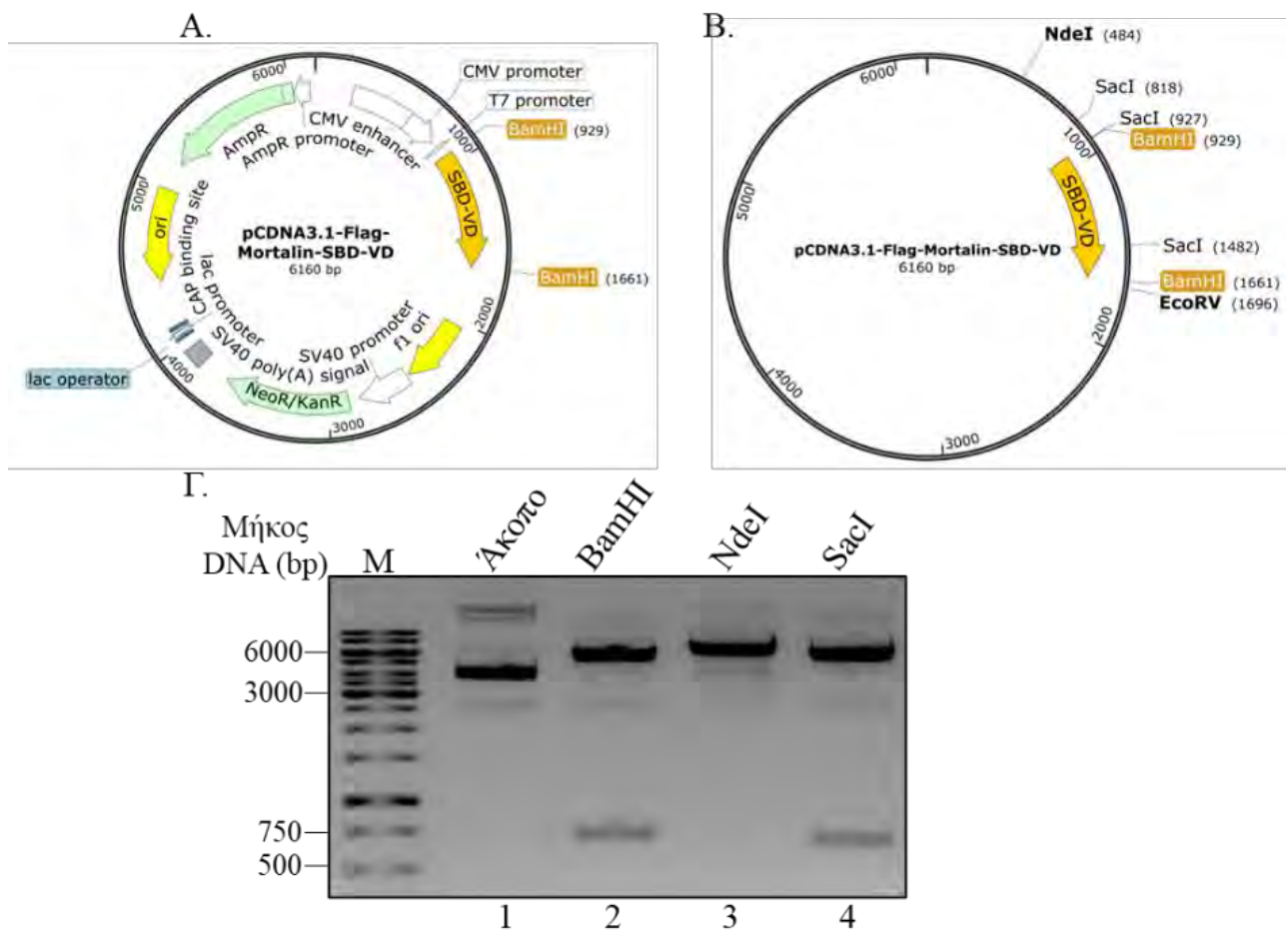
Οι επόμενες τέσσερις κατασκευές που ακολουθούν, χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση των τμημάτων Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD και Mortalin-SBD σε κύτταρα θηλαστικών ως πρωτεΐνες σύντηξης με τον επίτοπο Flag. Τα προφίλ πέψης όλων των κατασκευών αυτών αντιστοιχούν στα αναμενόμενα ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 31, Εικόνα 32, Εικόνα 33, Εικόνα 34**).



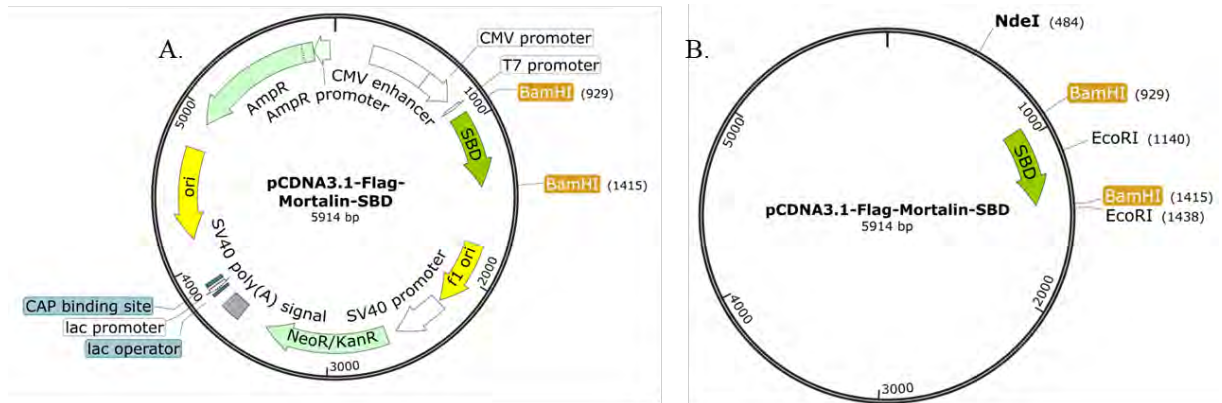
Εικόνα 31: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-Δ(1-51). (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pCDNA3.1-Flag-Mortalin-Δ(1-51). (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-Δ(1-51) με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, BamHI, EcoRV, PstI και NdeI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-Δ(1-51) με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5428 bp, 1896 bp, διαδρομή 2), EcoRV (5880 bp, 1444 bp, διαδρομή 3), PstI (4429 bp, 1539 bp, 1356 bp, διαδρομή 4), NdeI (7324 bp, διαδρομή 5) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



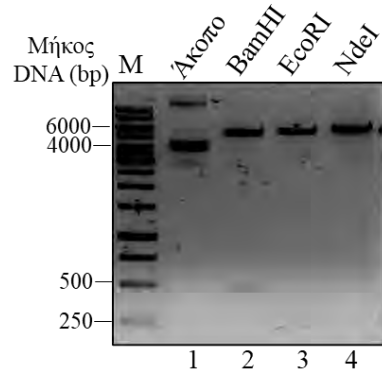
Εικόνα 32: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου *pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD*. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής *pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD*. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου *pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD* με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, *BamHI*, *EcoRV*, *PstI* και *NdeI*. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου *pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD* με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, *BamHI* (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5428 bp, 1152 bp, διαδρομή 2), *EcoRV* (5880 bp, 700 bp, διαδρομή 3), *PstI* (4429 bp, 1356 bp, 795 bp, διαδρομή 4), *NdeI* (6580 bp, διαδρομή 5) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.



Εικόνα 33: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD-VD. (Α) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD-VD. (Β) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD-VD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού, BamHI, NdeI και SacI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5428 bp, 732 bp, διαδρομή 2), NdeI (6160 bp, διαδρομή 3), SacI (5496 bp, 555 bp, 109 bp, διαδρομή 4) καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). Μ: μάρτυρας μοριακού βάρους.



Γ.

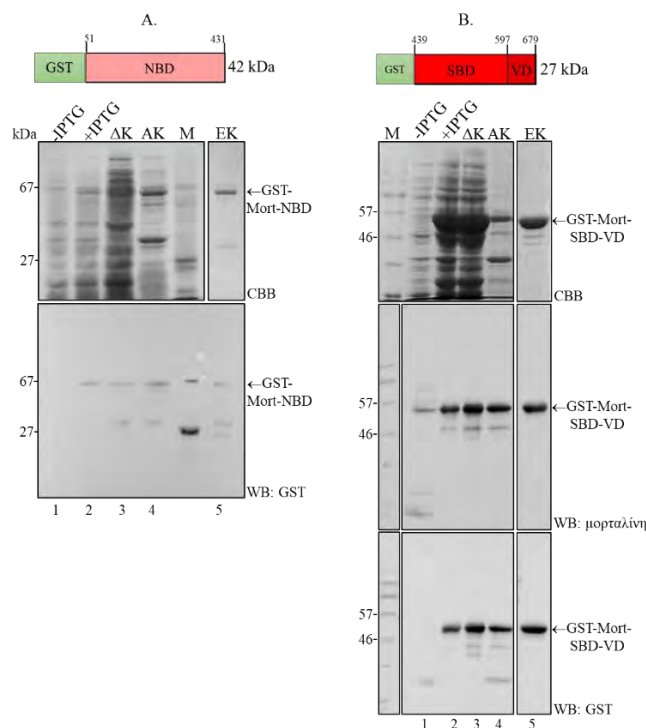


Εικόνα 34: Έλεγχος της ορθότητας του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD. (A) Απεικόνιση του χάρτη της πλασμιδιακής κατασκευής pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD. (B) Απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD με έμφαση στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού BamHI, EcoRI και NdeI. (Γ) Ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιδράσεων ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, BamHI (προκύπτουν τμήματα μεγέθους 5428 bp, 486 bp, διαδρομή 2), EcoRI (5616 bp, 298 bp, διαδρομή 3), NdeI (5914 bp, διαδρομή 4), καθώς και άκοπου πλασμιδίου (διαδρομή 1). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

4.2. Δομικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης

4.2.1. Απομόνωση ανασυνδυασμένων τμημάτων της μορταλίνης, σε σύντηξη με επιτόπους His_{x6} και GST, από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21-RIL

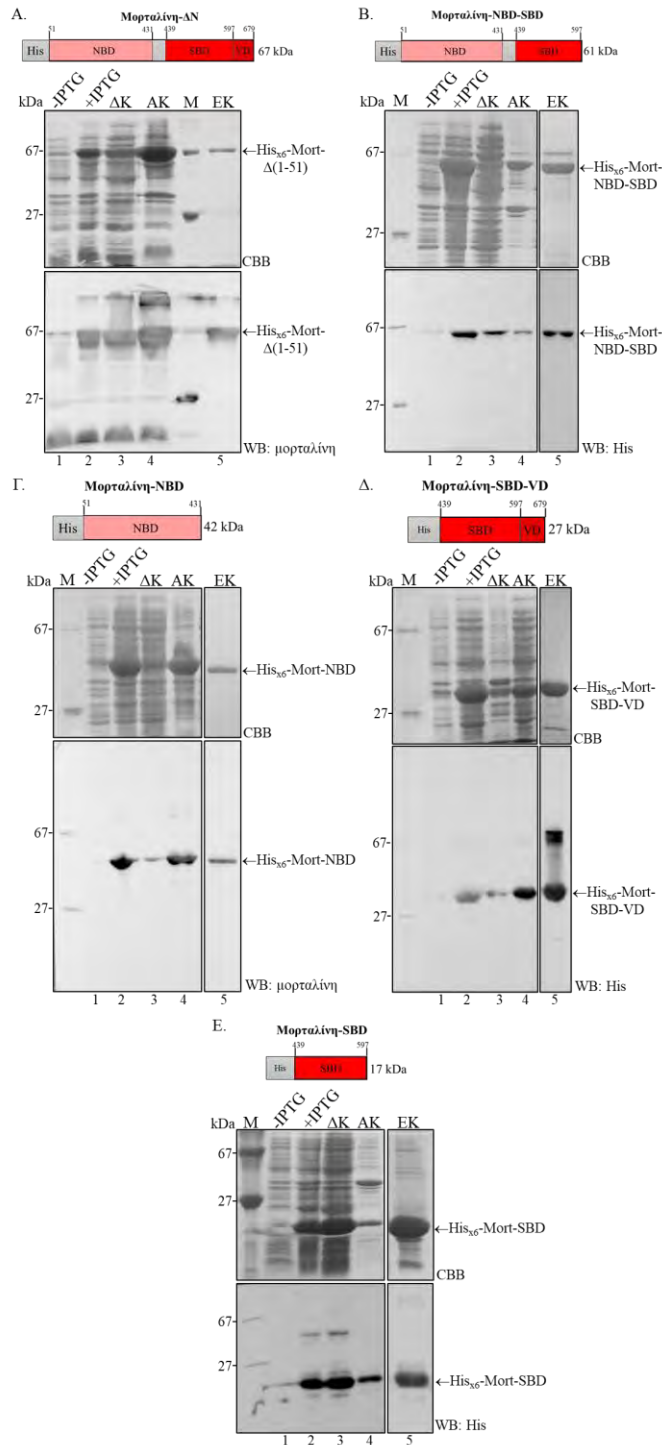
Τα πλασμίδια που περιεγράφηκαν παραπάνω (4.1.1) χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21-RIL προκειμένου να πραγματοποιηθεί σε πρώτο στάδιο επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνικών τμημάτων GST-Mortalin-NBD, GST-Mortalin-SBD-VD, His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51), His_{x6}-Mortalin-NBD-SBD, His_{x6}-Mortalin-NBD, His_{x6}-Mortalin-SBD-VD και His_{x6}-Mortalin-SBD και σε δεύτερο στάδιο ο καθαρισμός αυτών από το σύνολο του βακτηριακού πρωτεώματος μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας, όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα 3.2.7.2. της εν λόγω διατριβής. Δείγματα συλλέχθηκαν: α. πριν και μετά την επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, β. από το διαλυτό και το αδιάλυτο κλάσμα μετά τη λύση των βακτηρίων και γ. από το έκλουσμα στο τελευταίο στάδιο του καθαρισμού. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, χρώση με Coomassie και ανοσοαποτύπωση.



Εικόνα 35: Απομόνωση των ανασυνδυασμένων τμημάτων *Mortalin-NBD* (A) και *Mortalin-SBD-VD* (B) σε σύντηξη με τον επίτοπο της GST στο αμινοτελικό τους άκρο. Ανάλυση δειγμάτων των καλλιιεργειών πριν και μετά την επαγωγή (-/+ IPTG, διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα), των διαλυτών και αδιάλυτων κλασμάτων φυγοκέντρησης (ΔK: διαλυτό κλάσμα/διαδρομή 3, AK: αδιάλυτο κλάσμα/διαδρομή 4) και των κλασμάτων έκλουσης (EK, διαδρομή 5) από σφαιρίδια χρωματογραφίας αγκιστείας Agarose-GSH, με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Τα προαναφερθέντα δείγματα ελέγχθηκαν και με ανοσοαποτύπωση (WB, Western Blot) χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών. M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 35B** από την ανάλυση των σταδίων υπερέκφρασης και καθαρισμού με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue των συνολικών βακτηριακών πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του τμήματος GST-Mortalin-SBD-VD παρουσία IPTG (CBB, διαδρομή 2) σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου (CBB, διαδρομή 1). Έπειτα δείχθηκε σημαντική ανάκτηση του τμήματος αυτού στο διαλυτό κλάσμα του βακτηριακού εκχυλίσματος (CBB, διαδρομή 3), ενώ ένα μικρό μέρος ανακτήθηκε στο αδιάλυτο κλάσμα (CBB, διαδρομή 4). Μετά τον καθαρισμό της, η πρωτεΐνη GST-Mort-SBD-VD εκλούστηκε (CBB, διαδρομή 5) σε ικανοποιητικά επίπεδα απόδοσης μάζας όσο και σε καθαρότητα. Το ανασυνδυασμένο αυτό πρωτεϊνικό τμήμα εμφανίστηκε ως ζώνη μοριακού βάρους 54 kDa η οποία ταυτοποιήθηκε με αντισώματα τόσο έναντι του επιτόπου GST, όσο και έναντι της μορταλίνης (WB, διαδρομές 1, 2, 3, 4, 5). Αναφορικά με το τμήμα GST-Mortalin-NBD (**Εικόνα 35A**), δείχθηκε η επαγωγή της έκφρασής του, παρουσία IPTG (CBB, διαδρομή 2), σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου (CBB, διαδρομή 1). Ωστόσο, η διαφορά στην επαγωγή της τελευταίας ήταν πιο ασθενική συγκριτικά με τη διαφορά που παρατηρήθηκε κατά την επαγωγή της GST-Mortalin-SBD-VD. Έπειτα, παρατηρήθηκε μία περίπου ισόποση ανάκτηση της GST-Mortalin-NBD τόσο στο διαλυτό (CBB, διαδρομή 3) όσο και στο αδιάλυτο κλάσμα (CBB, διαδρομή 4), ενώ μετά τον καθαρισμό απομονώθηκε (CBB, διαδρομή 5) σε ικανοποιητικά επίπεδα καθαρότητας. Συγκεκριμένα, εμφανίστηκε ύστερα από χρώση με Coomassie ως μία ζώνη που μεταναστεύει στα 67 kDa και η οποία ταυτοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι της GST.

Οι δύο ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-Mortalin-NBD και GST-Mortalin-SBD-VD δεν χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία χαρτογράφησης της αλληλεπίδρασης HIF-1α-Μορταλίνης που περιγράφεται στην αμέσως επόμενη υποενότητα για τεχνικούς λόγους.



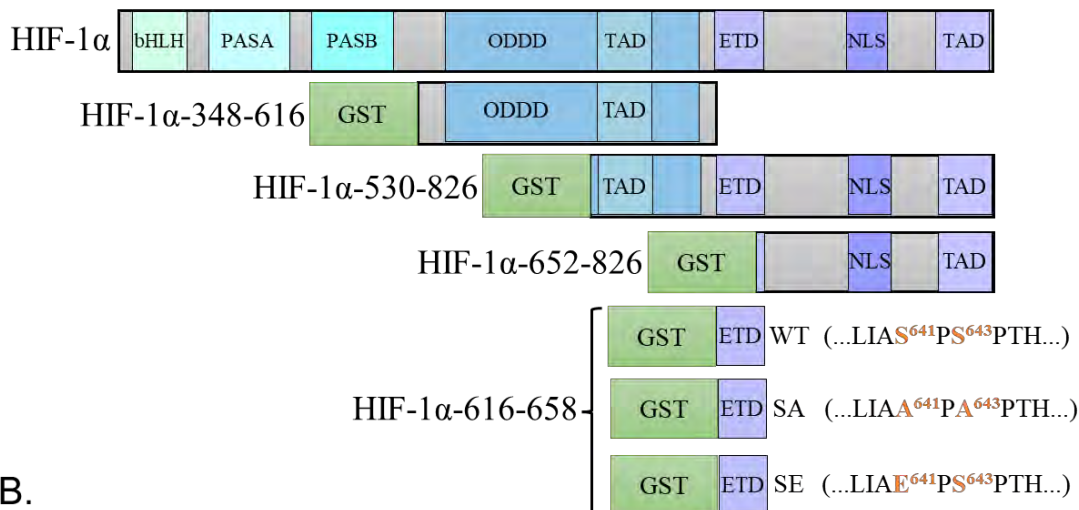
Εικόνα 36: Απομόνωση των ανασυνδυασμένων τμημάτων *Mortalin-Δ(1-51)* (A), *Mortalin-NBD-SBD* (B), *Mortalin-NBD* (Γ), *Mortalin-SBD-VD* (Δ) και *Mortalin-SBD* (E) σε σύντηξη με επίτοπο His₆ στο αμινοτελικό τους άκρο. Ανάλυση δειγμάτων των καλλιιεργειών πριν και μετά την επαγωγή (-/+ IPTG, διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα), των διαλυτών και αδιάλυτων κλασμάτων φυγοκέντρησης (ΔK: διαλυτό κλάσμα/διαδρομή 3, AK: αδιάλυτο κλάσμα/διαδρομή 4) και των κλασμάτων έκλυσης (EK, διαδρομή 5) από σφαιρίδια χρωματογραφίας αγκιστείας Agarose-NTA-Ni⁺², με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Τα προαναφερθέντα δείγματα ελέγχθηκαν και με ανοσοαποτύπωση (WB, Western Blot) χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών. M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Από την ανάλυση των σταδίων της απομόνωσης των ανασυνδυασμένων τμημάτων της μορταλίνης σε σύντηξη με τον αμινοτελικό επίτοπο His_{x6} (**Εικόνα 36**) προκύπτει ότι παρουσία IPTG όλα τα τμήματα επάγονται (CBB, διαδρομή 2) συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου (CBB, διαδρομή 1). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται ανάκτηση ενός μέρους της συνολικής υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα (CBB, διαδρομή 3) του βακτηριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ένα άλλο μέρος στο αδιάλυτο κλάσμα (CBB, διαδρομή 4). Τέλος, μετά τον καθαρισμό και την έκλυση των χιμαιρικών His_{x6}-πρωτεϊνών από σφαιρίδια Agarose-NTA-Ni²⁺ όλα τα τμήματα απομονώθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα απόδοσης και καθαρότητας (CBB, διαδρομή 5). Ηλεκτροφορητική ανάλυση SDS-PAGE και χρώση με Coomassie κατέδειξε τη μετανάστευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως ζώνες στα 69 kDa (His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51)), 61 kDa (His_{x6}-Mortalin-NBD-SBD), 43 kDa (His_{x6}-Mortalin-NBD), 30 kDa (His_{x6}-Mortalin-SBD-VD) και 18 kDa (His_{x6}-Mortalin-SBD), οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης (WB, διαδρομές 1, 2, 3, 4, 5) με τη αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών. Τα ανασυνδυασμένα τμήματα της μορταλίνης που εκφράζονται ως πρωτεΐνες σύντηξης με αμινοτελικό επίτοπο His_{x6} χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε πειράματα *in vitro* δέσμευσης με χιμαιρικά τμήματα του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο GST επίσης στο αμινοτελικό τους άκρο.

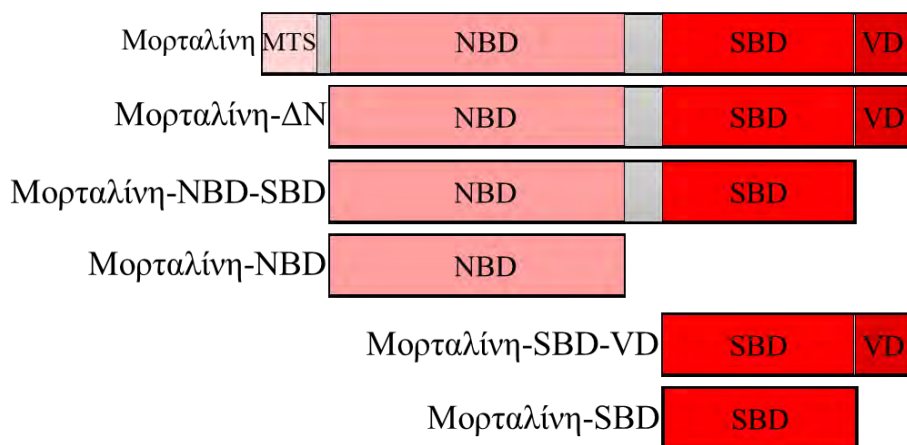
4.2.2. Χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ μορταλίνης και HIF-1α

Έχει καταδειχθεί από προηγούμενες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου μας (35) και συγκεκριμένα από πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa σε συνδυασμό με δοκιμασία φασματοσκοπίας μαζών, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης μορταλίνης με τον HIF-1α που στερείται των φωσφορυλιώσεων στα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης 641 και 643, από τις κινάσες ERK1/2 (ο οποίος θα αναφέρεται ως μη φωσφορυλιωμένος). Η αλληλεπίδραση της μορταλίνης με τον HIF-1α ήταν υπεύθυνη για τη στόχευση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και ακολούθως για την αναστολή της απόπτωσης υπό συνθήκες στρες. Δεδομένου του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει η αλληλεπίδραση μορταλίνης-HIF-1α στην αναστολή της απόπτωσης, ήταν σημαντικό να διερευνηθεί αν η αλληλεπίδρασή τους είναι άμεση ή διαμεσολαβείται μέσω μιας τρίτης πρωτεΐνης (έμμεση αλληλεπίδραση). Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν μεθοδολογίες *in vitro* δέσμευσης μεταξύ GST-ανασυνδυασμένων τμημάτων του HIF-1α (**Εικόνα 37A**), είτε αγρίου τύπου, είτε μεταλλαγμένων και His_{x6}-ανασυνδυασμένων τμημάτων της μορταλίνης (**Εικόνα 37B**), τα οποία απομονώθηκαν από βακτήρια (**4.2.1**).

A.



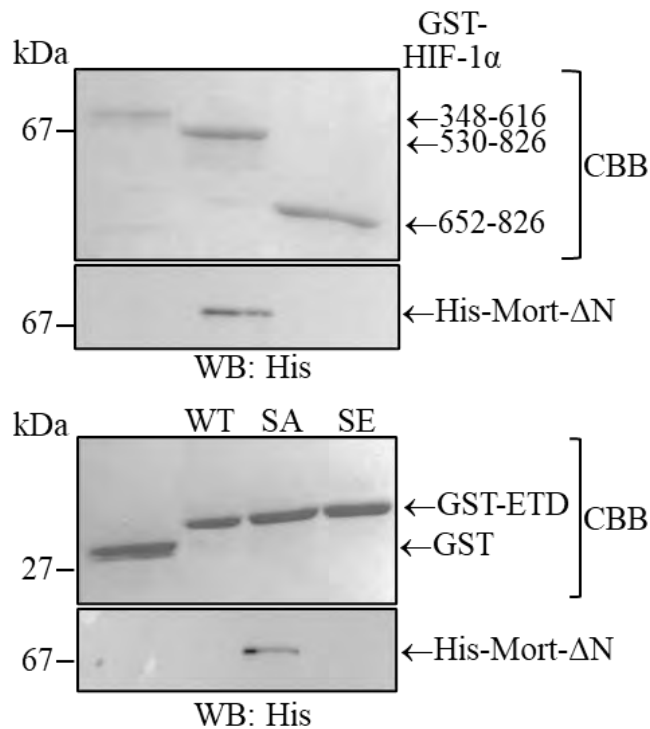
B.



Εικόνα 37: Σχηματική αναπαράσταση των δομών του HIF-1α (A), και της μορταλίνης (B) καθώς και των ανασυνδυνασμένων κατασκευών τους. (A) Απεικόνιση της πλήρους μεγέθους μορφής του HIF-1α (αμινοξέα 1-826) μαζί με τα ανασυνδυνασμένα τμήματα 348-616, 530-826 και 652-826 και 616-658 που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή. Επίσης, η αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α αγρίου τύπου (WT), μαζί με τα μεταλλάγματα SA (αδυναμία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, στις θέσεις 641 και 643 λόγω αντικαταστάσεων των αμινοξέων σερίνης σε αλανίνες) και SE (μίμηση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 λόγω φορτίου, από την αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 641 σε γλουταμινικό οξύ) απεικονίζεται με έμφαση στην περιοχή ETD που εμπεριέχει τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. **(B)** Απεικόνιση της πλήρους μεγέθους μορφής της μορταλίνης (αμινοξέα 1-679) μαζί με τα ανασυνδυνασμένα τμήματά της 51-679 (Mortalin-ΔN ή Mortalin-Δ(1-51)), 51-597 (Mortalin-NBD-SBD), 439-679 (Mortalin-SBD-VD) και 439-597 (Mortalin-SBD) που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή.

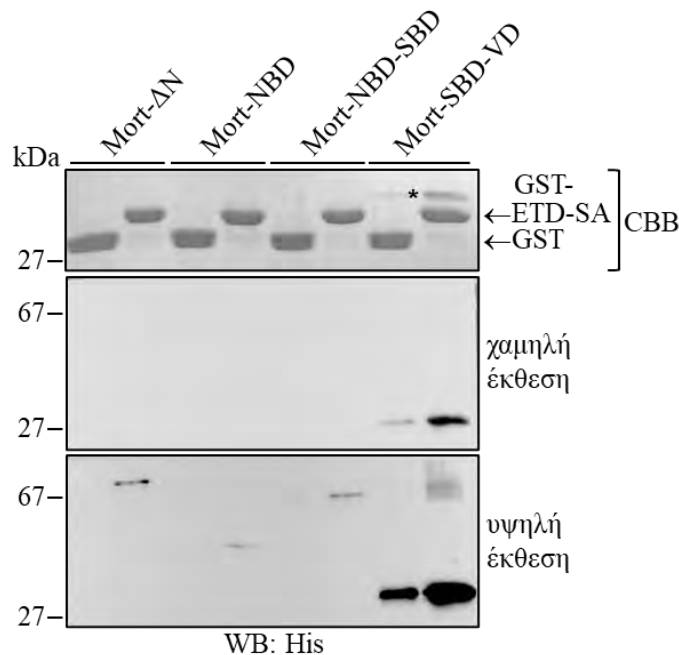
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 38** (οι δύο εικόνες πάνω) η ανασυνδυνασμένη His_{x6}-Mortalin-ΔN (αμινοξέα 51-679) παρουσίασε άμεση δέσμευση μόνο με το καρβοξυτελικό τμήμα του HIF-1α (GST-HIF-1α-530-826) που περιέχει την περιοχή ETD (αμινοξέα 616-658) και καθόλου με τα δύο τμήματα του HIF-1α που περιέχουν τις παράπλευρες αμινοξικές αλληλουχίες είτε ανοδικά, είτε καθοδικά της ETD (GST-HIF-1α-348-616 και GST-HIF-1α-652-826). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση μορταλίνης-HIF-1α είναι άμεση και διαμεσολαβείται μόνο από την ETD. Επιπροσθέτως, αυτή η άμεση αλληλεπίδραση ήταν ευαίσθητη σε

μεταλλάξεις των θέσεων στόχευσης από τις ERK1/2, καθώς η δέσμευση της His_{x6}-Mortalin-ΔN ανιχνεύθηκε μόνο στο μετάλλαγμα GST-ETD-SA, αλλά καθόλου στο αγρίου τύπου (GST-ETD-WT) ή στο φωσφομιμητικό (GST-ETD-SE) μετάλλαγμα της ETD (**Εικόνα 38**, οι δύο εικόνες κάτω).



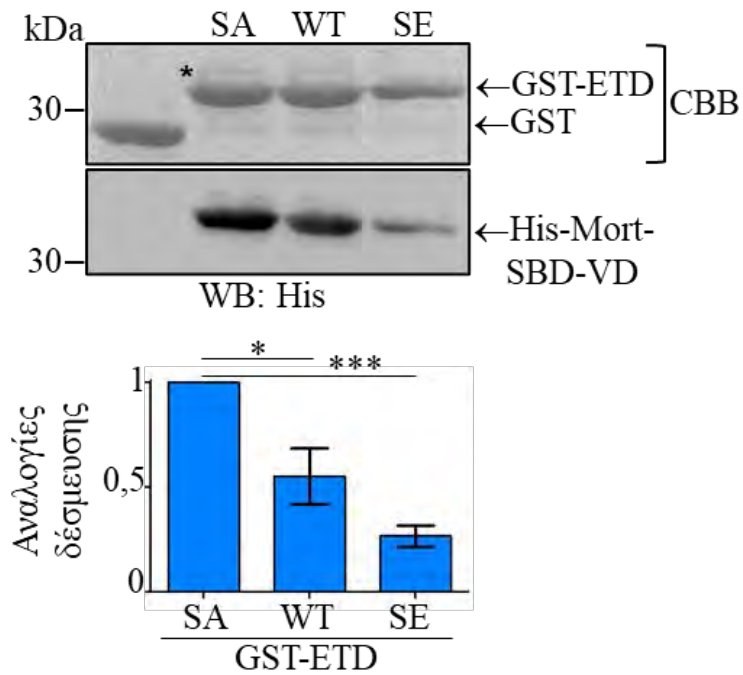
Εικόνα 38: Η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης είναι άμεση και διαμεσολαβείται από την επικράτεια ETD του HIF-1α. Η περιοχή ETD (616-658) του HIF-1α είναι και αναγκαία και επαρκής για την άμεση δέσμευση με τη μορταλίνη. Σφαιρίδια χρωματογραφίας Agarose-GSH τα οποία έφεραν ακινητοποιημένα τα ανασυνδυασμένα τμήματα του HIF-1α σε σύντηξη με GST (πρώτη εικόνα: επισημαίνονται με βέλη) ή διαφορετικές μορφές της περιοχής ETD (τρίτη εικόνα: WT, SA, SE) ή μόνο GST (τρίτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επωάστηκαν με την πρωτεΐνη His_{x6}-Mortalin-ΔN. Μετά την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω SDS-PAGE και χρώση με Coomassie των δεσμευμένων στα σφαιρίδια GST-τμημάτων του HIF-1α (πρώτη και τρίτη εικόνα, CBB), καθώς και ανοσοαποτύπωση (δεύτερη και τέταρτη εικόνα, αντίσωμα έναντι His, WB/Western Blot) για την ανίχνευση της His_{x6}-Mortalin-ΔN.

Για το λόγο αυτό, το τμήμα GST-ETD-SA χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα για να ταυτοποιηθεί η θέση σύνδεσης του HIF-1α στη μορταλίνη. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 39**, ανιχνεύθηκε η ισχυρή και εξειδικευμένη δέσμευση του τμήματος His_{x6}-Mortalin-SBD-VD (αμινοξέα 439-679) στο τμήμα GST-ETD-SA. Επίσης, ανιχνεύθηκε δέσμευση των His_{x6}-Mortalin-ΔN και His_{x6}-Mortalin-NBD-SBD (αμινοξέα 51-597) στο GST-ETD-SA (**Εικόνα 39**, υψηλή έκθεση), αλλά ήταν πιο ασθενική συγκριτικά με τη δέσμευση του His_{x6}-Mortalin-SBD-VD υπό τις ίδιες συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι το τμήμα NBD της μορταλίνης αναστέλλει την ικανότητα του τμήματος SBD-VD να αλληλεπιδρά σταθερά με την περιοχή ETD του HIF-1α.



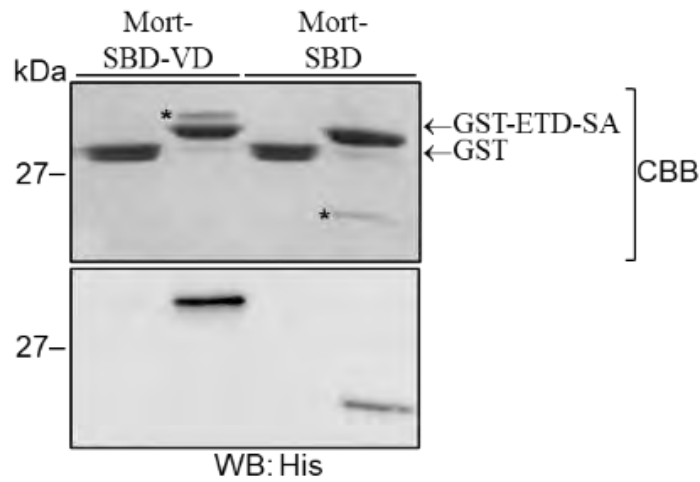
Εικόνα 39: Η καρβοξυτελική επικράτεια *SBD-VD* της μορταλίνης διαμεσολαβεί την ισχυρή αλληλεπίδρασή της τελευταίας με την περιοχή *ETD* του *HIF-1α*. Η δέσμευση του *HIF-1α* διαμεσολαβείται από το τμήμα *SBD-VD* της μορταλίνης, ενώ το τμήμα *NBD* επιδρά ανασταλτικά στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Σφαιρίδια χρωματογραφίας *Agarose-GSH* τα οποία έφεραν ακινητοποιημένο το ανασυνδεδασμένο τμήμα *HIF-1α-ETD-SA* σε σύντηξη με *GST* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) ή μόνο *GST* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επώασθηκαν με τα διαφορετικά μεταλλάγματα της μορταλίνης σε σύντηξη με τον επίτοπο *His_{x6}*. Μετά την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω *SDS-PAGE* και χρώση με *Coomassie* του δεσμευμένου στα σφαιρίδια *GST-HIF-1α-ETD-SA* (πρώτη εικόνα, *CBB*), καθώς και ανοσοαποτύπωση σε μικρή και μεγάλη έκθεση (δεύτερη και τρίτη εικόνα αντίστοιχα, αντίσωμα έναντι *His*, *WB/Western Blot*) για την ανίχνευση των *His_{x6}*-τμημάτων της μορταλίνης. Ο αστερίσκος στην πρώτη εικόνα επισημαίνει το τμήμα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*, το οποίο είναι εμφανές και μέσω χρώσης με *Coomassie* (*CBB*).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν η δέσμευση του τμήματος *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* στην *GST-ETD* ήταν εξαρτώμενη από τη κατάσταση τροποποίησής της από τις κινάσες *ERK1/2* στις θέσεις 641 και 643. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 40**, το τμήμα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* δεσμεύτηκε πιο ισχυρά στο μετάλλαγμα *GST-ETD-SA*, λιγότερο ισχυρά στο αγρίου τύπου και ακόμα πιο ασθενικά στο φωσφομιμητικό μετάλλαγμα (*GST-ETD-SE*) της *ETD*, υποδεικνύοντας ότι η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης για τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του *HIF-1α* διατηρήθηκε από το τμήμα *SBD-VD* της μορταλίνης. Ωστόσο, η υπολειμματικότητα που παρατηρείται στη σύνδεση του *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* με τα *GST-ETD-WT* και *GST-ETD-SE* και η οποία δεν παρατηρήθηκε με το μεγαλύτερο τμήμα της μορταλίνης- ΔN (**Εικόνα 38**, τρίτη και τέταρτη εικόνα), ίσως να οφείλεται στην υψηλότερη αγκιστεία του *SBD-VD* για το *ETD-SA* (**Εικόνα 39**) και/ή τη χαλάρωση της εξειδίκευσης εξαιτίας της αναποτελεσματικής αναδίπλωσης/διαμόρφωσης του μικρότερου τμήματος *SBD-VD* της μορταλίνης.



Εικόνα 40: Η αλληλεπίδραση του τμήματος *Mortalin-SBD-VD* με τον *HIF-1α* εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της επικράτειας *HIF-1α-ETD* από τις κινάσες *ERK1/2*. Η δέσμευση του τμήματος *SBD-VD* της μορταλίνης με την περιοχή *ETD* του *HIF-1α* είναι ευαίσθητη στις μεταλλάξεις των θέσεων φωσφορυλίωσης της τελευταίας από τις κινάσες *ERK1/2*. Σφαιρίδια χρωματογραφίας *Agarose-GSH* τα οποία έφεραν ακινητοποιημένα τα ανασυνδασμένα τμήματα *GST-ETD* (*WT*, *SA*, *SE*) του *HIF-1α* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) ή μόνο *GST* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επώαστηκαν με το μετάλλαγμα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*. Μετά την έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω *SDS-PAGE* και χρώση με *Coomassie* των δεσμευμένων στα σφαιρίδια *GST-HIF-1α-ETD* (*WT*, *SA*, *SE*) (πρώτη εικόνα, *CBB*), καθώς και ανοσοαποτύπωση (δεύτερη εικόνα, αντίσωμα έναντι *His*, *WB/Western blot*) για την ανίχνευση του *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*. Ο αστερίσκος στην πρώτη εικόνα επισημαίνει το τμήμα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*, το οποίο είναι εμφανές και μέσω χρώσης με *Coomassie* (*CBB*). Η τρίτη εικόνα αποτελεί γράφημα το οποίο αποτυπώνει την ανάλυση ποσοτικοποίησης των παραπάνω ανοσοαποτυπώσεων, απεικονίζοντας τη σχετική αναλογία δέσμησης μεταξύ των *His-Mort-SBD-VD* και *GST-ETD*. Η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (\pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, $n=3$, $*P<0.05$, $***P<0.001$).

Τέλος, η εικόνα **Εικόνα 41** δείχνει ότι η απομάκρυνση της αλληλουχίας *VD* από το *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* δεν κατήργησε την αλληλεπίδραση με το *GST-ETD-SA*. Ωστόσο, η δέσμευση του *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* (αμινοξέα 439-597) με το *GST-ETD-SA* ήταν ασθενέστερη από αυτή του *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*, υποδεικνύοντας ότι παρόλο που η αλληλεπίδραση διαμεσολαβείται κυρίως από το τμήμα *SBD* της μορταλίνης, το τμήμα *VD* ισχυροποιεί την αγχιστεία της αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 41: Η καρβοξυτελική επικράτεια *Mortalin-SBD* από μόνη της αρκεί για να διαμεσολαβήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ μορταλίνης και *HIF-1α*. Το τμήμα *SBD* της μορταλίνης είναι επαρκές για τη δέσμευση στην *HIF-1α-ETD*, αλλά η περιοχή *VD* συνεισφέρει επίσης στην μεταξύ τους αγκιστεία. Σφαιρίδια χρωματογραφίας *Agarose-GSH* τα οποία έφεραν ακινητοποιημένο το ανασυνδυασμένο τμήμα *HIF-1α-ETD-SA* σε σύντηξη με *GST* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) ή μόνο *GST* (πρώτη εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επωάστηκαν με τα τμήματα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* και *His_{x6}-Mortalin-SBD*. Μετά την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω *SDS-PAGE* και χρώση με *Coomassie* του δεσμευμένου στα σφαιρίδια *GST-HIF-1α-ETD-SA* (πρώτη εικόνα, *CBB*), καθώς και ανοσοαποτύπωση (δεύτερη εικόνα, αντίσωμα έναντι *His*, *WB/Western Blot*) για την ανίχνευση των προαναφερθέντων *His_{x6}-τμημάτων* της μορταλίνης. Ο αστερίσκος στην πρώτη εικόνα επισημαίνει τα τμήματα *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD* και *His_{x6}-Mortalin-SBD*, τα οποία είναι εμφανή και μέσω χρώσης με *Coomassie* (*CBB*).

4.3. Η αλληλεπίδραση μορταλίνης/HIF-1α εντός των κυττάρων και ο ρόλος αυτής στην αναστολή της απόπτωσης

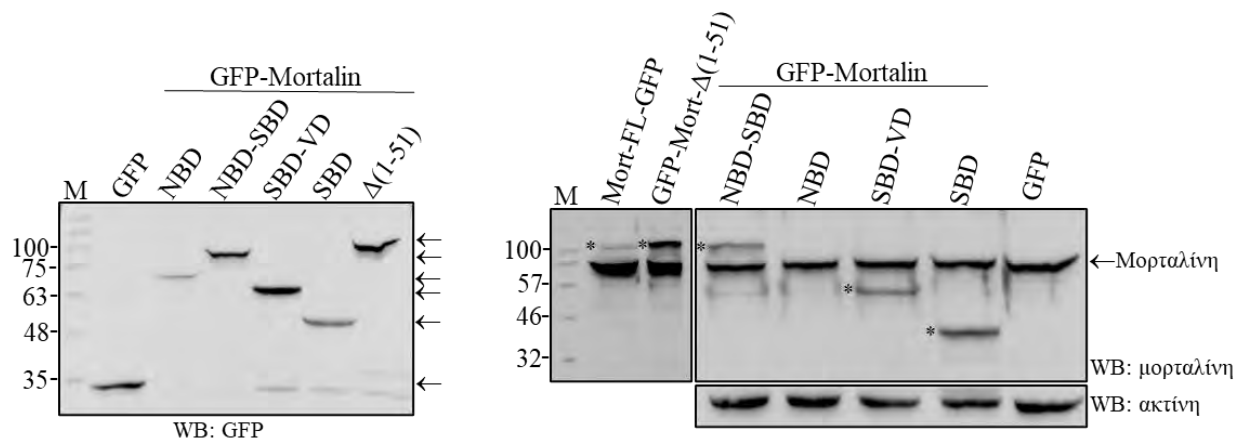
4.3.1. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού των κατασκευών της μορταλίνης, σε σύντηξη με επιτόπους GFP και Flag

Οι πλασμιδιακές κατασκευές pEGFP-N3-Mortalin-FL, pEGFP-C1-Mortalin-Δ(1-51), pEGFP-C1-Mortalin-NBD-SBD, pEGFP-C1-Mortalin-NBD, pEGFP-C1-Mortalin-SBD-VD, pEGFP-C1-Mortalin-SBD, pCDNA3.1-Flag-Mortalin-Δ(1-51), pCDNA3.1-Flag-Mortalin-NBD, pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD-VD και pCDNA3.1-Flag-Mortalin-SBD που περιεγράφηκαν στην ενότητα **4.1.2** και αφορούν στην κλωνοποίηση τμημάτων cDNA της μορταλίνης (σε σύντηξη με GFP ή Flag) σε φορείς έκφρασης πρωτεϊνών για ευκαρυωτικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την υπερέκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa τόσο για τον έλεγχο των επιπέδων πρωτεΐνης αυτών ενδοκυτταρικά, όσο και για τον έλεγχο του υποκυτταρικού τους εντοπισμού.

Για να ελεγχθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GFP-κατασκευών της μορταλίνης πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των πλασμιδίων που τις κωδικοποιούν, με σκοπό την υπερέκφραση αυτών εντός των κυττάρων. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 42** (αριστερά) όλες οι πρωτεϊνικές κατασκευές εκφράζονται στα κύτταρα και εμφανίζονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη (Mortalin-FL-GFP στα 102 kDa, GFP-Mortalin-ΔN στα 96 kDa, GFP-Mortalin-NBD-SBD στα 87 kDa, GFP-Mortalin-NBD στα 69 kDa, GFP-Mortalin-SBD-VD στα 53 kDa και GFP-Mortalin-SBD στα 44 kDa). Επίσης παρατηρείται ότι η έκφραση της κατασκευής GFP-Mortalin-NBD είναι πιο ασθενική συγκριτικά με την έκφραση των υπόλοιπων GFP-μεταλλαγμάτων. Στη συνέχεια ήταν σημαντικό να διερευνηθεί η σχέση των επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης των GFP-μεταλλαγμάτων της μορταλίνης με τα επίπεδα πρωτεΐνης της ενδογενούς μορταλίνης. Τα αποτελέσματα της **Εικόνα 42** (δεξιά) έδειξαν πως οι GFP-κατασκευές Mortalin-FL-GFP, GFP-Mortalin-Δ(1-51), GFP-Mortalin-NBD-SBD εκφράζονται σε μικρότερα επίπεδα σε σχέση με την ενδογενή μορταλίνη με εξαίρεση τα τμήματα GFP-Mortalin-SBD-VD και GFP-Mortalin-SBD, τα οποία τείνουν να προσεγγίσουν τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης. Επειδή το αντίσωμα της μορταλίνης αναγνωρίζει ως επίτοπο το καρβοξυτελικό τμήμα της μορταλίνης, καθίσταται αδύνατη η αναγνώριση και η ανοσοαποτύπωση του τμήματος GFP-Mortalin-NBD (**Εικόνα 42**, δεξιά), η οποία όμως επιτυγχάνεται με αντίσωμα έναντι του επιτόπου GFP της χμιαρικής αυτής κατασκευής όπως φαίνεται στην **Εικόνα 42** (αριστερά).

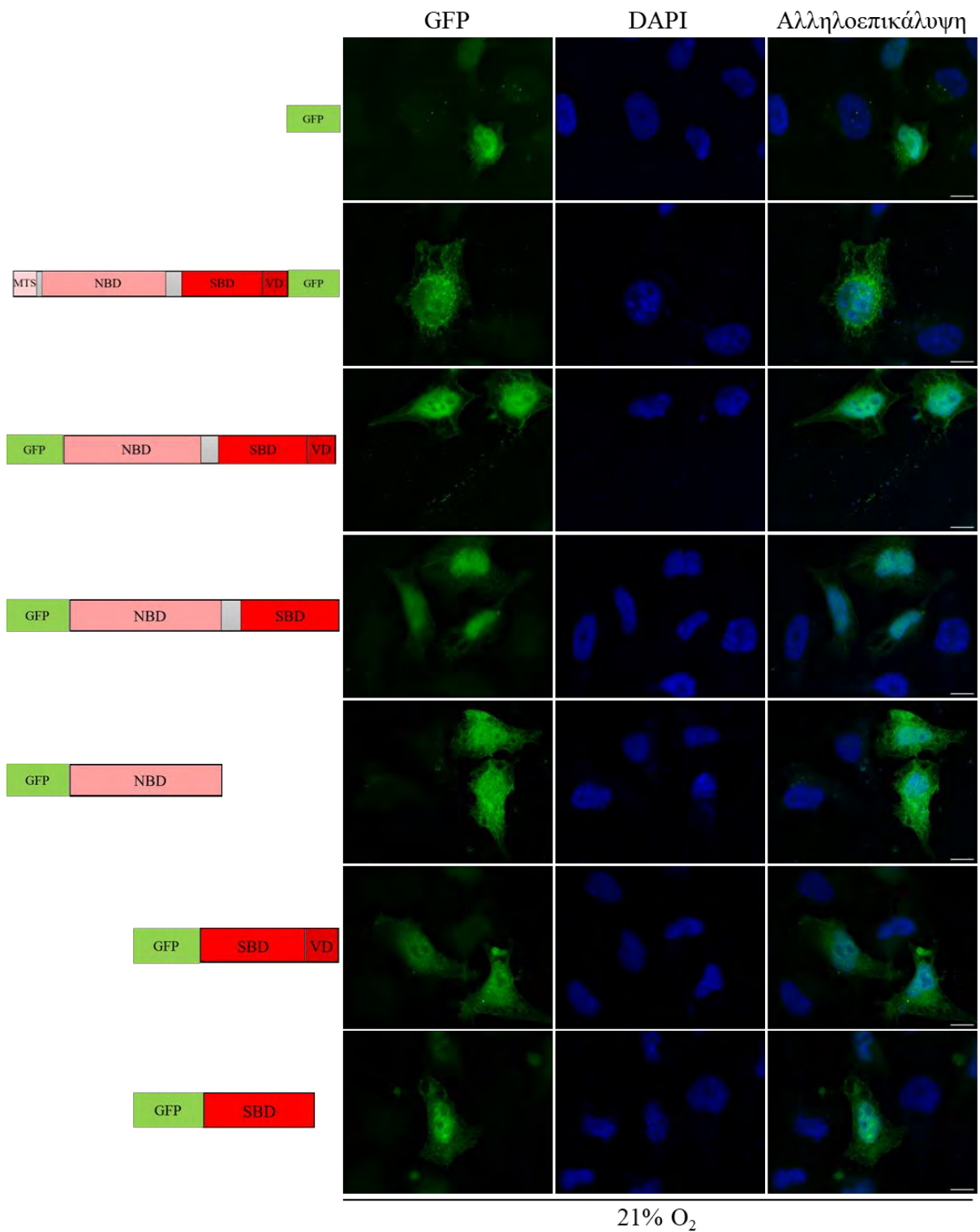
Οι πιθανοί λόγοι της μειωμένης έκφρασης των κατασκευών που υπερεκφράζονται σε σχέση με την ενδογενή μορταλίνη μπορεί να οφείλεται είτε σε χαμηλή απόδοση διαμόλυνσης των κυττάρων με τα αντίστοιχα πλασμίδια, είτε σε παρεμπόδιση της σωστής αναδίπλωσης των

παραγόμενων χημικών πρωτεϊνών λόγω μεγάλου μεγέθους της GFP, γεγονός που μπορεί να παρεμποδίσει την αντίδραση των αντισωμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση με τους επιτόπους των επιθυμητών πρωτεϊνών.



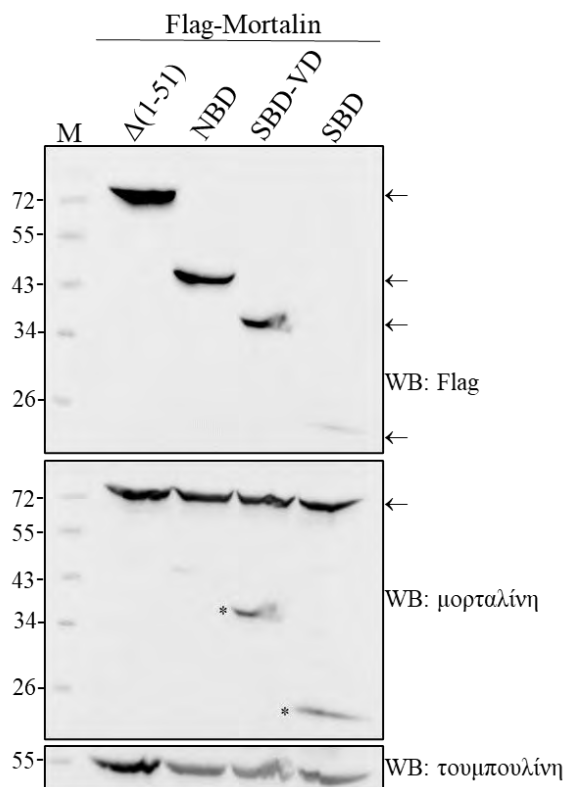
Εικόνα 42: Έκφραση μεταλλαγμάτων της μορταλίνης ως πρωτεΐνες σύντηξης με GFP σε κύτταρα HeLa. Αριστερή εικόνα: Ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων που εκφράζουν μόνο GFP (επισημαίνεται με βέλος) καθώς και τις χημικές κατασκευές της μορταλίνης σε σύντηξη με επίτοπο GFP (επισημαίνονται με βέλη), μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι της GFP (WB). M: μάρτυρας μοριακού βάρους. Δεξιά εικόνα: Ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων που εκφράζουν τις χημικές κατασκευές της μορταλίνης σε σύντηξη με GFP στο αμινοτελικό τους άκρο (επισημαίνονται με αστερίσκους) καθώς και την πλήρους μήκους μορταλίνη σε σύντηξη με GFP (επισημαίνεται με αστερίσκο) στο καρβοξυτελικό της άκρο, μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης (WB, Western Blot). Η ενδογενής μορταλίνη επισημαίνεται με βέλος. Επίσης πραγματοποιήθηκε στα ίδια δείγματα ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της ακτίνης ως μάρτυρα ισοφορτώματος. M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Στη συνέχεια για να ελεγχθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μεταλλαγμάτων της μορταλίνης, κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες σε συνθήκες νορμοξίας, μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (**Εικόνα 43**). Όπως παρατηρείται, η πρωτεΐνη Mortalin-FL-GFP φαίνεται να εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπως έχει ήδη παρατηρηθεί και για την ενδογενή μορταλίνη από προηγούμενες δημοσιεύσεις (35). Εν αντιθέσει, όλες οι υπόλοιπες GFP-κατασκευές (Mortalin-ΔN, Mortalin-NBD-SBD, Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD, Mortalin-SBD) εμφανίζουν διάχυτη κατανομή μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα.



Εικόνα 43: Εντοπισμός μεταλλαγμάτων της μορταλίνης ως πρωτεΐνες σύντηξης με GFP σε κύτταρα HeLa. Εικόνες φθορισμού από κύτταρα HeLa που καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις κατασκευές της μορταλίνης που φέρουν GFP στο αμινο- ή στο καρβοξυτελικό τους άκρο (απεικονίζονται αριστερά). Ο εντοπισμός των GFP-κατασκευών της μορταλίνης απεικονίζεται στο πράσινο κανάλι (πρώτη στήλη εικόνων), ενώ στο μπλε κανάλι παρουσιάζεται η απεικόνιση των πυρήνων με DAPI (δεύτερη στήλη εικόνων). Επίσης παρουσιάζεται η συγχώνευση/αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού του πράσινου και του μπλε καναλιού (τρίτη στήλη εικόνων, merge), με την κλίμακα μεγέθους να απεικονίζεται στα 10 μm.

Δεδομένων των δυσκολιών που προκύπτουν αναφορικά με την έκφραση των τμημάτων της μορταλίνης σε σύντηξη με GFP και οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω στη παρούσα ενότητα, δοκιμάστηκε η κλωνοποίηση των τμημάτων Mortalin-Δ(1-51), Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD και Mortalin-SBD σε φορείς για έκφραση των προαναφερθέντων πρωτεϊνών με τον επίτοπο Flag στο αμινοτελικό τους άκρο. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στη περίπτωση των GFP-κατασκευών της μορταλίνης για τον έλεγχο τόσο των επιπέδων πρωτεΐνης των Flag-κατασκευών καθώς και του υποκυτταρικού τους εντοπισμού σε κύτταρα HeLa.

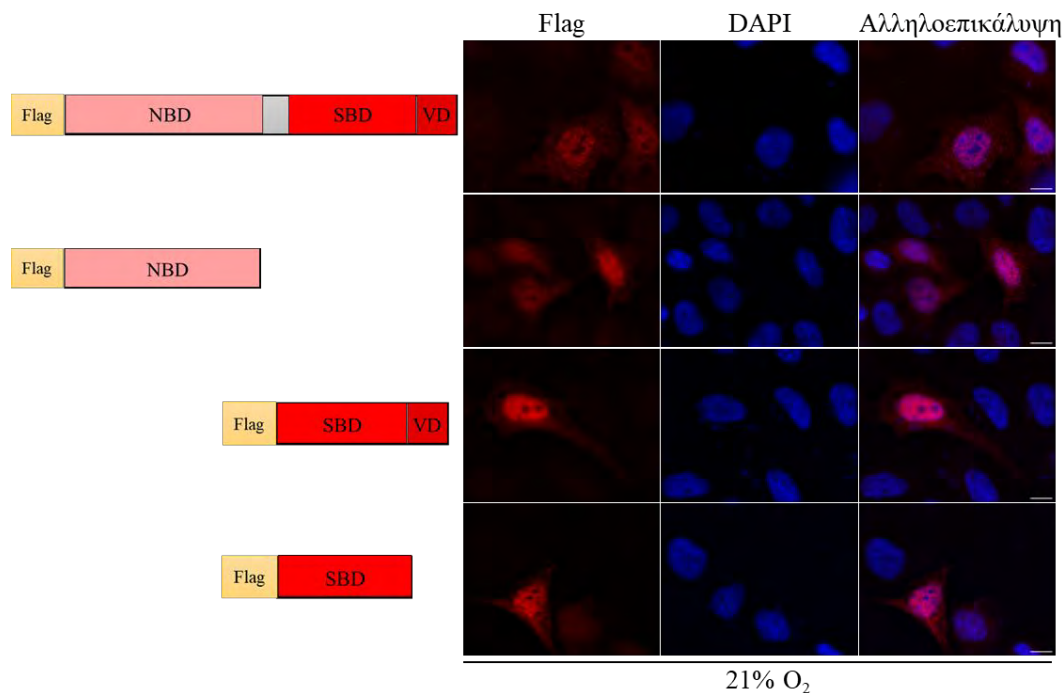


Εικόνα 44: Έκφραση μεταλλαγμάτων της μορταλίνης ως πρωτεΐνες σύντηξης με τον επίτοπο Flag σε κύτταρα HeLa. Πάνω εικόνα: Ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων που εκφράζουν τις χιμαιρικές κατασκευές της μορταλίνης σε σύντηξη με επίτοπο Flag (επισημαίνονται με βέλη), μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι του Flag (WB). M: μάρτυρας μοριακού βάρους. Μεσαία εικόνα: Ανάλυση κυτταρικών εκχυλισμάτων που εκφράζουν τις χιμαιρικές κατασκευές της μορταλίνης σε σύντηξη με Flag στο αμινοτελικό τους άκρο (επισημαίνονται με αστερίσκους) μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης (WB, Western Blot). Η ενδογενής μορταλίνη επισημαίνεται με βέλος. Κάτω εικόνα: Επίσης πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης ως μάρτυρα ισοφορτώματος (WB, Western Blot). M: μάρτυρας μοριακού βάρους.

Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 44** (πάνω εικόνα) όλες οι πρωτεϊνικές κατασκευές εκφράζονται στα κύτταρα και εμφανίζονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη (Flag-Mortalin-ΔN στα 70 kDa, Flag-Mortalin-NBD στα 43 kDa, Flag-Mortalin-SBD-VD στα 27 kDa, Flag-Mortalin-SBD στα 18 kDa). Επίσης παρατηρείται ότι η έκφραση της κατασκευής Flag-Mortalin-SBD είναι πιο ασθενική συγκριτικά με την έκφραση των υπόλοιπων Flag-

μεταλλαγμάτων. Στη συνέχεια ήταν σημαντικό να διερευνηθεί η σχέση των επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης των Flag-μεταλλαγμάτων της μορταλίνης με τα επίπεδα πρωτεΐνης της ενδογενούς μορταλίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν στην **Εικόνα 44** (μεσαία εικόνα) πως η κατασκευή Flag-Mortalin-Δ(1-51) δεν ανιχνεύεται στην ανοσοαποτύπωση καθώς συμπίπτει στο ίδιο σημείο μετανάστευσης του πηκτώματος με την ενδογενή μορταλίνη λόγω των παραπλήσιων μοριακών βαρών τους. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύεται συγκρίνοντας την ανοσοαποτύπωση του τμήματος Flag-Mort-Δ(1-51) με αντίσωμα έναντι του Flag με αυτήν που πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης. Το τμήμα Flag-Mortalin-NBD δεν ανιχνεύθηκε στην ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης καθώς όπως προαναφέρθηκε το εν λόγω αντίσωμα αντιδρά μόνο παρουσία του καρβοξυτελικού άκρου της μορταλίνης. Συγκρίνοντας τις δύο πρώτες εικόνες ανοσοαποτύπωσης (**Εικόνα 44**) τα πρωτεϊνικά επίπεδα του τμήματος Flag-Mortalin-SBD-VD είναι όμοια με τα επίπεδα της ενδογενούς μορταλίνης, σε αντίθεση με το τμήμα Flag-Mort-SBD του οποίου τα επίπεδα πρωτεΐνης είναι μειωμένα σε σχέση με αυτών της ενδογενούς.

Στη συνέχεια για να ελεγχθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μεταλλαγμάτων της μορταλίνης, κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες σε συνθήκες νορμοξίας, μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (**Εικόνα 45**). Όπως παρατηρείται, όλες οι Flag-κατασκευές (Mortalin-ΔN, Mortalin-NBD, Mortalin-SBD-VD, Mortalin-SBD) εμφανίζουν διάχυτη κατανομή μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα.



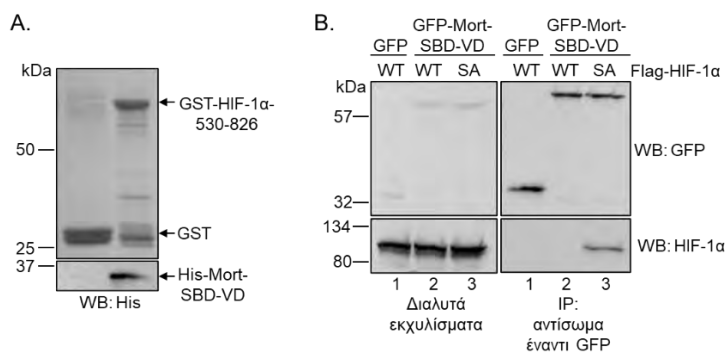
Εικόνα 45: Εντοπισμός μεταλλαγμάτων της μορταλίνης ως πρωτεΐνες σύντηξης με τον επίτοπο Flag σε κύτταρα HeLa. Εικόνες φθορισμού από κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις κατασκευές της μορταλίνης που φέρουν Flag στο αμινοτελικό τους άκρο (απεικονίζονται αριστερά). Ο εντοπισμός των Flag-κατασκευών της μορταλίνης απεικονίζεται στο κόκκινο κανάλι (πρώτη στήλη εικόνων), ενώ στο μπλε κανάλι παρουσιάζεται η απεικόνιση των πυρήνων με DAPI (δεύτερη στήλη εικόνων). Επίσης παρουσιάζεται η συγχώνευση/αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού του κόκκινου και του μπλε καναλιού (τρίτη στήλη εικόνων, merge), με την κλίμακα μεγέθους να απεικονίζεται στα 10 μm.

Από το σύνολο των προηγούμενων κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν στις ενότητες που ακολουθούν τα τμήματα GFP-Mortalin-SBD-VD και Flag-Mortalin-SBD-VD.

4.3.2. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του καρβοξυτελικού άκρου της μορταλίνης με τον HIF-1α, μέσα στα κύτταρα

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα δεδομένα που αφορούν την *in vitro* αλληλεπίδραση HIF-1α-μορταλίνης (4.2.2), διερευνήθηκε πρώτα αν το τμήμα His_{x6}-Mortalin-SBD-VD μπορεί να δεσμευθεί *in vitro* με ένα μεγαλύτερο τμήμα του HIF-1α πέραν της ETD, και το οποίο είναι το GST-HIF-1α-530-826 (Εικόνα 46A). Τα αποτελέσματα έδειξαν τη δέσμευση του τμήματος His_{x6}-SBD-VD με το τμήμα GST-HIF-1α-530-826. Έπειτα, για να ελεγχθεί εάν αυτή η αλληλεπίδραση θα μπορούσε να λάβει χώρα εντός των κυττάρων διατηρώντας την εξειδίκευση για τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α, το τμήμα GFP-Mortalin-SBD-VD εκφράστηκε σε κύτταρα HeLa, είτε μαζί με την αγρίου τύπου (HIF-1α-WT) ή μη φωσφορυλιωμένη μορφή του HIF-1α (HIF-1α-SA), σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag στο αμινοτελικό άκρο. Τα αποτελέσματα του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης (Εικόνα 46B) έδειξαν ότι το τμήμα GFP-Mortalin-SBD-

VD αλληλεπίδρασε σταθερά με το τμήμα Flag-HIF-1α-SA, που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις ERK1/2, αλλά όχι με το τμήμα Flag-HIF-1α-WT, που αναμένεται να είναι στη φωσφορυλιωμένη μορφή (**Εικόνα 46B**, διαδρομή 3 έναντι διαδρομής 2).

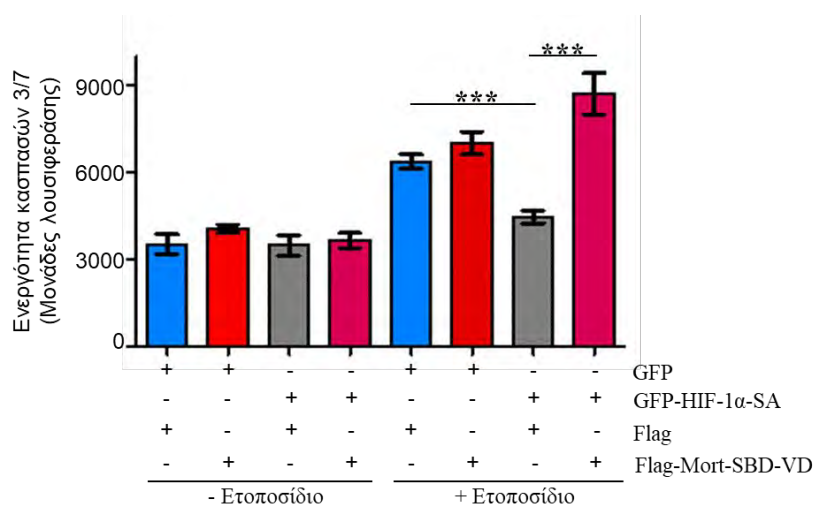


Εικόνα 46: Το τμήμα *SBD-VD* της μορταλίνης αλληλεπιδρά με τον μη φωσφορυλιωμένο *HIF-1α* μέσα στα κύτταρα (A) Το τμήμα *SBD-VD* της μορταλίνης δεσμεύεται *in vitro* με το ανασυνδασμένο τμήμα *HIF-1α*-530-826. Σφαιρίδια χρωματογραφίας *Agarose-GSH* τα οποία έφεραν ακινητοποιημένο το ανασυνδασμένο τμήμα *GST-HIF-1α*-530-826 σε σύντηξη με *GST* (πάνω εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) ή μόνο *GST* (πάνω εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επωάστηκαν με την πρωτεΐνη *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*. Μετά την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω *SDS-PAGE* και χρώση με *Coomassie* του δεσμευμένου στα σφαιρίδια *GST-τμήματος* του *HIF-1α* (πάνω εικόνα, *CBB*), καθώς και ανοσοαποτύπωση (κάτω εικόνα, αντίσωμα έναντι *His*, *WB/Western Blot*) για την ανίχνευση του τμήματος *His_{x6}-Mortalin-SBD-VD*. (B) Το τμήμα *SBD-VD* της μορταλίνης αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με τη μη φωσφορυλιωμένη πλήρους μεγέθους μορφή του *HIF-1α* μέσα στα κύτταρα. Τα διαλυτά εκχυλίσματα (εικόνες στα αριστερά) και τα ανοσοκατακρημνίσματα (*IP*: δεξιά εικόνες, *anti-GFP*) κυττάρων *HeLa* που συνεκφράζουν *GFP* με *Flag-HIF-1α-WT* (διαδρομές 1), *GFP-Mortalin-SBD-VD* με *Flag-HIF-1α-WT* (διαδρομές 2) ή *GFP-Mortalin-SBD-VD* με *Flag-HIF-1α-SA* (διαδρομές 3), αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά *Western (WB)* χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των αναγραφόμενων πρωτεϊνών.

4.3.3. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης μορταλίνης/*HIF-1α*

Έχει δειχθεί από προηγούμενες δημοσιεύσεις (35) ότι η μη φωσφορυλιωμένη και μεταγραφικά ανενεργή μορφή του *HIF-1α* (*HIF-1α-SA*) όταν υπερεκφραστεί σε κύτταρα *HeLa* που καλλιεργούνται σε συνθήκες νορμοξίας, μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και αναστέλλει την επαγόμενη από το ετοποσίδιο απόπτωση με μη γενωμικό τρόπο, που αποτελεί μια ιδιότητα που δεν παρατηρείται στη περίπτωση των μορφών *HIF-1α-WT* (αγρίου τύπου) και *HIF-1α-SE* (φωσφομιμητική μορφή) οι οποίες εμφανίζουν πυρηνικό εντοπισμό. Για να ελεγχθεί η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του τμήματος *SBD-VD* της μορταλίνης και του *HIF-1α*, διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση του *Flag-Mortalin-SBD-VD* μπορεί να επηρεάσει την αντι-αποπτωτική δράση του μιτοχονδριακού *HIF-1α*. Η **Εικόνα 47** καταδεικνύει ότι η έκφραση του *GFP-HIF-1α-SA* ανέστειλε την ενεργοποίηση των κασπασών 3/7, η οποία επάγεται μέσω της επώασης με ετοποσίδιο. Ωστόσο, ταυτόχρονη έκφραση του *Flag-Mortalin-*

SBD-VD κατήργησε την αναστολή της απόπτωσης και οδήγησε σε επαναφορά της δραστηριότητας των κασπασών 3/7 στα αρχικά επίπεδα επαγωγής με ετοποσίδιο, υποδεικνύοντας ότι το Flag-Mortalin-SBD-VD εμπόδισε την αντι-αποπτωτική λειτουργία του μιτοχονδριακού HIF-1α, πιθανώς μέσω ανταγωνισμού της ενδογενούς μιτοχονδριακής μορταλίνης για τη δέσμευση στον GFP-HIF-1α-SA, καθώς και της επακόλουθης αναστολής της σύνδεσής του τελευταίου με τα μιτοχόνδρια.



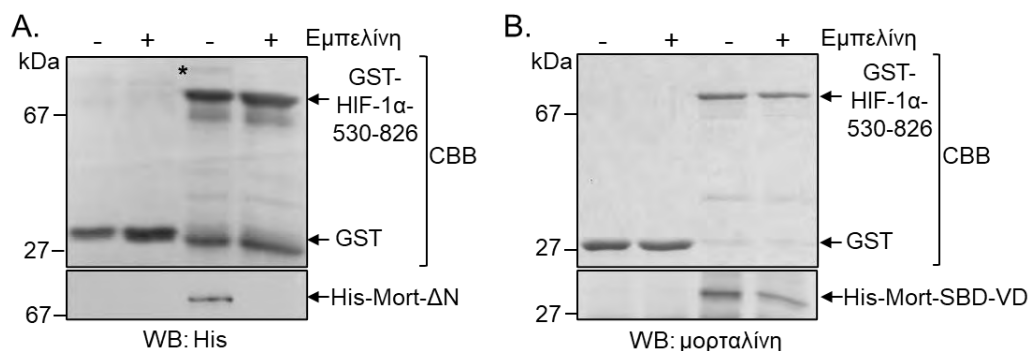
Εικόνα 47: Το τμήμα SBD-VD της μορταλίνης αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (HIF-1α-SA) σε κύτταρα HeLa. Η υπερέκφραση του τμήματος SBD-VD της μορταλίνης καταργεί την προστασία που προσφέρει ο HIF-1α έναντι της επαγόμενης από το ετοποσίδιο απόπτωσης. Κύτταρα HeLa τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και συνεκφράζουν GFP ή τον GFP-HIF-1α-SA με είτε μόνο Flag ή το τμήμα Flag-Mortalin-SBD-VD, επώαστηκαν είτε με DMSO (συνθήκη ελέγχου) είτε με ετοποσίδιο σε τελική συγκέντρωση 75 μM για 4 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, (n=6)

4.4. Διερεύνηση της επίδρασης της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α

4.4.1. Επίδραση της εμπελίνης στην *in vitro* δέσμευση μεταξύ μορταλίνης και HIF-1α

Έχει δειχθεί από προηγούμενες δημοσιεύσεις ότι η μορταλίνη δεσμεύεται στην πρωτεΐνη p53 είτε μέσω της επικράτειας NBD (246), είτε μέσω της επικράτειας SBD (247) και πως η ουσία εμπελίνη καταργεί την εν λόγω αλληλεπίδραση, δεσμευόμενη και εμποδίζοντας τη θέση δέσμευσης της p53 στην επικράτεια NBD (252). Έτσι, διερευνήθηκε από φαρμακολογικής πλευράς, η επίδραση της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 48A** η εμπελίνη ανέστειλε πλήρως την *in vitro* δέσμευση του τμήματος His₆-Mortalin-ΔN με το τμήμα GST-HIF-1α-530-826. Ωστόσο, όταν το τμήμα His₆-Mortalin-SBD-VD χρησιμοποιήθηκε έναντι του His₆-Mortalin-ΔN στο ίδιο πείραμα, η

επίδραση της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση με το GST-HIF-1α-530-826 ήταν εμφανώς πιο ασθενική, έως μηδαμινή (**Εικόνα 48B**). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη, η οποία καταδεικνύει την αγκυροβόληση της εμπελίνης στην επικράτεια NBD της μορταλίνης (252) και υποστηρίζουν την παρατήρηση ότι η NBD ρυθμίζει αλλοστερικά την αλληλεπίδραση μεταξύ SBD και HIF-1α.



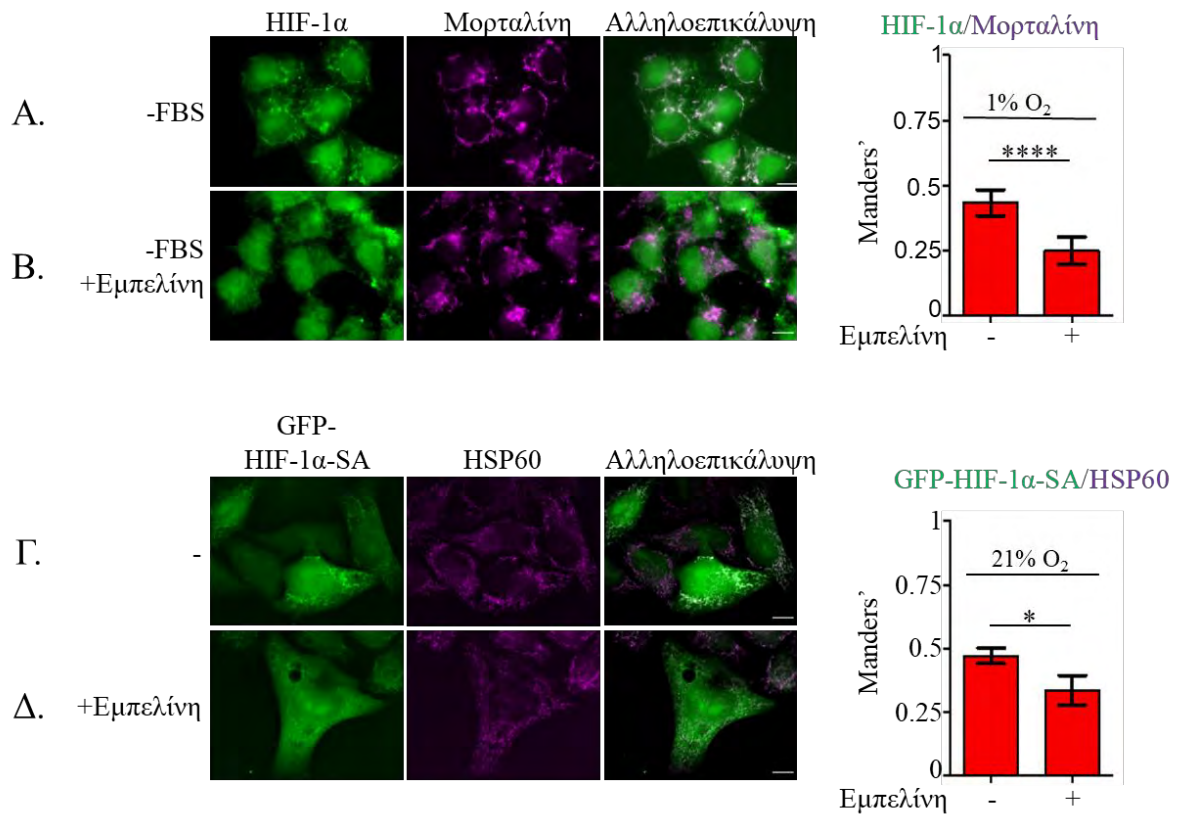
Εικόνα 48: Η ουσία εμπελίνη αναστέλλει την *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης, αλλά όχι του τμήματος SBD-VD. (A) Σφαιρίδια χρωματογραφίας Agarose-GSH τα οποία έφεραν ακινητοποιημένο το ανασυνδυασμένο τμήμα GST-HIF-1α-530-826 σε σύντηξη με GST (πάνω εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) ή μόνο GST (πάνω εικόνα: επισημαίνεται με βέλος) σαν συνθήκη ελέγχου, επωάστηκαν με την πρωτεΐνη His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51), η οποία με τη σειρά της είχε προ-επωαστεί είτε με DMSO (συνθήκη ελέγχου), είτε με εμπελίνη (10 μM) για 2 ώρες στους 4 °C. Μετά την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητική ανάλυση μέσω SDS-PAGE και χρώση με Coomassie του δεσμευμένου στα σφαιρίδια GST-τμήματος του HIF-1α (πάνω εικόνα, CBB), καθώς και ανοσοαποτύπωση (κάτω εικόνα, αντίσωμα έναντι His, WB/Western Blot) για την ανίχνευση του τμήματος His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51). Ο αστερίσκος στην πάνω εικόνα επισημαίνει την παρουσία του τμήματος His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51) που ανιχνεύεται ύστερα από χρώση με Coomassie. (B) Η περιγραφή του εν λόγω σκέλους είναι ακριβώς η ίδια όπως στο σκέλος (A) με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε το τμήμα His_{x6}-Mortalin-SBD-VD αντί του τμήματος His_{x6}-Mortalin-Δ(1-51) και το οποίο ανιχνεύθηκε με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης (κάτω εικόνα, WB/Western Blot).

4.4.2. Επίδραση της εμπελίνης στην αλληλεπίδραση μεταξύ μορταλίνης/μιτοχονδρίων και HIF-1α μέσα στα κύτταρα

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της ενότητας 4.4.1 χρησιμοποιήθηκε η ουσία εμπελίνη ως φαρμακολογικό μέσο αναστολής της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α μέσα στα κύτταρα. Η **Εικόνα 49A** δείχνει ότι σε κύτταρα HeLa τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και στέρησης ορού (οδηγεί σε αναστολή του μονοπατιού των κινασών MAP), ο HIF-1α παρουσιάζει διάχυτη κατανομή στο κυτταρόπλασμα, όπου συνεντοπίζεται με τη μορταλίνη, που με τη σειρά της παρουσιάζει στικτή κατανομή η οποία είναι σύμφωνα με τον ήδη γνωστό εντοπισμό της στα μιτοχόνδρια.

Ωστόσο, ο προηγούμενος συνεντοπισμός μεταξύ των ενδογενών HIF-1α και μορταλίνης, αναιρέθηκε σε μεγάλο βαθμό, υπό την επίδραση της εμπελίνης (**Εικόνα 49B**).

Επιπροσθέτως, η **Εικόνα 49** δείχνει πως η εμπελίνη, εκτός από το να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μορταλίνης/HIF-1α, προκαλεί την απομάκρυνση του υπερεκφρασμένου GFP-HIF-1α-SA από τα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 49Δ**) σε κύτταρα HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας, επιβεβαιώνοντας τον κρίσιμο ρόλο που παρουσιάζει η μορταλίνη στη στόχευση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

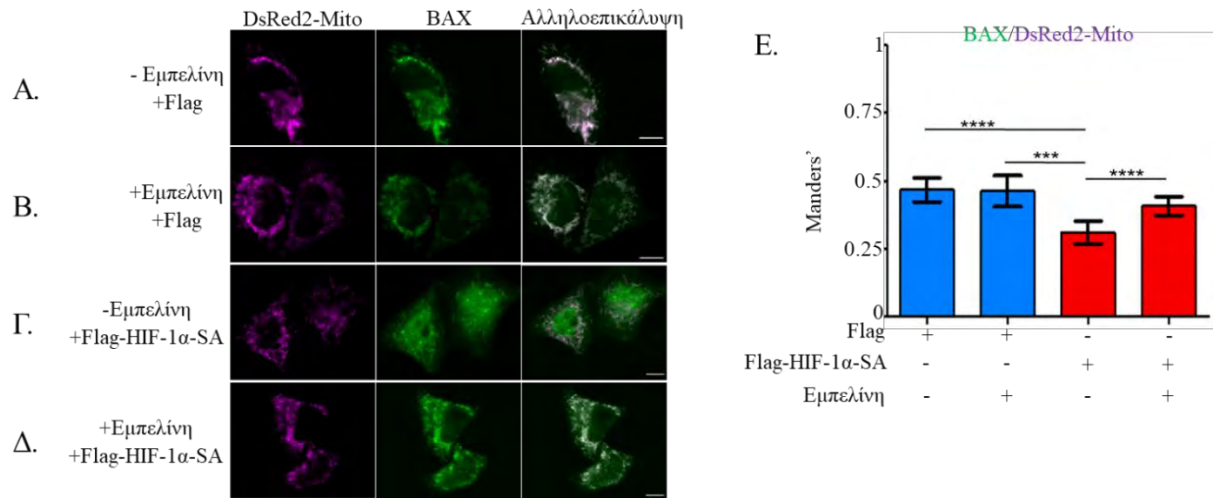


Εικόνα 49: Η εμπελίνη αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α και της μορταλίνης ή των μιτοχονδρίων μέσα στα κύτταρα (A και B) Η εμπελίνη αναστέλλει το συνεντοπισμό μεταξύ του ενδογενούς HIF-1α και της μορταλίνης σε συνθήκες υποξίας και στέρησης ορού. Στα αριστερά παρουσιάζονται εικόνες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού κυττάρων HeLa τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για 16 ώρες απουσία FBS, χωρίς ή με εμπελίνη (10 μM), χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του HIF-1α (πράσινο, πρώτη στήλη εικόνων) και έναντι της μορταλίνης (φούξια, δεύτερη στήλη εικόνων). Η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού που αντιστοιχούν τόσο στον εντοπισμό του HIF-1α όσο και της μορταλίνης (merge, τρίτη στήλη εικόνων, λευκό χρώμα), αποτελεί ένδειξη του συνεντοπισμού τους. Η κλίμακα μεγέθους έχει οριστεί στα 10 μm. Στα δεξιά οι στήλες του γραφήματος απεικονίζουν το συντελεστή συνεντοπισμού Manders', όπως αυτός υπολογίστηκε σε ένα συνολικό αριθμό 50 μεμονωμένων κυττάρων από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε κάθε συνθήκη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, **P<0,0001. (Γ και Δ) Η εμπελίνη αναστέλλει το συνεντοπισμό μεταξύ του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (GFP-HIF-1α-SA) και της μορταλίνης σε συνθήκες νορμοξίας. Στα αριστερά παρουσιάζονται εικόνες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού κυττάρων HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας, εκφράζοντας τον GFP-HIF-1α-SA (πράσινο, πρώτη στήλη εικόνων) και τα οποία επωάστηκαν με ή χωρίς εμπελίνη (10 μM) για 16 ώρες, μετά το πέρας 24 ωρών από τη διαμόλυνση τους. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της μιτοχονδριακής HSP60 (φούξια, δεύτερη στήλη εικόνων). Η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού που αντιστοιχούν τόσο στον εντοπισμό του GFP-HIF-1α-SA όσο και της HSP60 (merge, τρίτη στήλη εικόνων, λευκό χρώμα), αποτελεί ένδειξη του συνεντοπισμού τους. Η κλίμακα μεγέθους έχει οριστεί στα 10 μm. Στα δεξιά οι στήλες του γραφήματος απεικονίζουν το συντελεστή συνεντοπισμού Manders', όπως αυτός υπολογίστηκε σε ένα συνολικό αριθμό 30 μεμονωμένων κυττάρων από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε κάθε συνθήκη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, *P<0,005.**

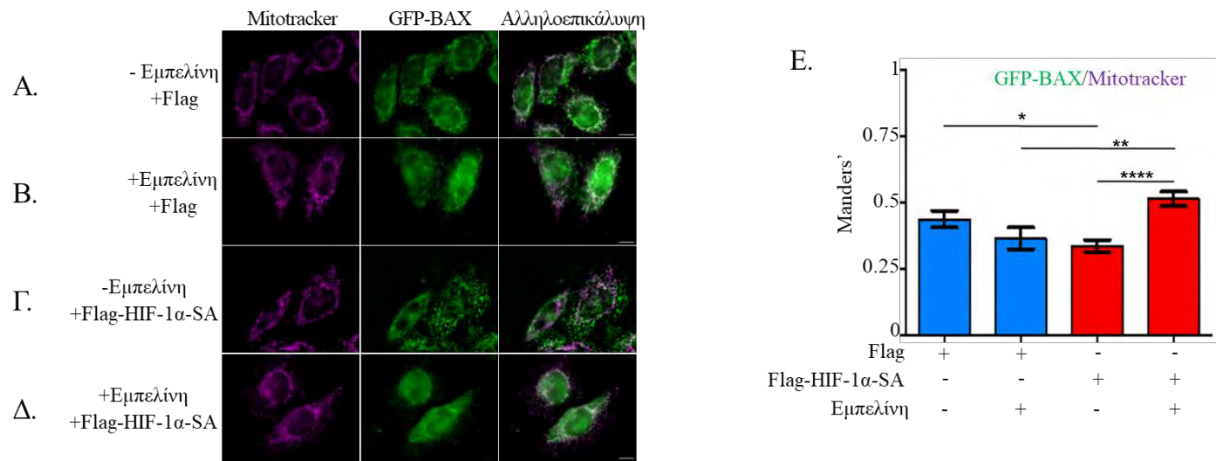
4.5. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού αναστολής της απόπτωσης από το μιτοχονδριακό σύμπλοκο μορταλίνης/HIF-1α

Επόμενο στάδιο ήταν η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου η παρουσία του συμπλόκου HIF-1α/μορταλίνης στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μπορεί να οδηγήσει σε προστασία από την απόπτωση. Για το σκοπό αυτό παρατηρήθηκε ο εντοπισμός της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης πυροδοτείται από τη διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία διαμεσολαβείται από την ικανότητα των πρωτεϊνών Bax και Bak να σχηματίζουν πόρους (289). Για την ενεργοποίηση της Bax, παρακολουθείται η μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, μέσω μικροσκοπίας.

Για να προσεγγιστεί η παραπάνω υπόθεση, κύτταρα HeLa που εκφράζουν τον μιτοχονδριακό Flag-HIF-1A-SA ή που εκφράζουν μόνο Flag (ως συνθήκη ελέγχου), επώαστηκαν με ετοποσίδιο, αφού πρώτα είχαν επωαστεί με την εμπελίνη. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 50**, η Bax συνεντοπίζεται με τα μιτοχόνδρια, σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με ετοποσίδιο, τόσο παρουσία (**Εικόνα 50B**) όσο και απουσία (**Εικόνα 50A**) της εμπελίνης. Από την άλλη, η έκφραση του Flag-HIF-1α-SA ανέστειλε το συνεντοπισμό της Bax με τα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 50Γ**), αλλά παρουσία της εμπελίνης που αναστέλλει την αλληλεπίδραση HIF-1α/μορταλίνης, ο συνεντοπισμός επανήλθε σε επίπεδα παρόμοια με αυτών των συνθηκών ελέγχου (**Εικόνα 50Δ**). Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν εκφράζοντας την πρωτεΐνη GFP-Bax, στις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως, ήταν παρόμοια με αυτά της ενδογενούς Bax (**Εικόνα 51**). Το γεγονός ότι τόσο τα αποτελέσματα που αφορούν τόσο την ενδογενή Bax, όσο την υπερεκφρασμένη είναι παρόμοια, υποδεικνύει ότι το μιτοχονδριακό σύμπλοκο μορταλίνης/HIF-1α δεν αναστέλλει τη στρατολόγηση της Bax, με το να προκαλεί απλά στοιχειομετρική παρεμπόδιση της δέσμευσης της τελευταίας, αλλά μέσω ενός πιο περίπλοκου μηχανισμού που πιθανώς περιλαμβάνει περισσότερους μοριακούς παίκτες που εδράζουν στην μιτοχονδριακή μεμβράνη. Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι κάτω από συνθήκες απόπτωσης που δημιουργούνται από τη χρήση ετοποσιδίου, η συνεργασία μεταξύ μορταλίνης και HIF-1α αποτρέπει την έναρξη του μονοπατιού-καταρράκτη της απόπτωσης, μέσω παρεμπόδισης της στρατολόγησης του Bax στα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 50: Η εμπελίνη καταργεί την ανασταλτική επίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (Flag-HIF-1α-SA) στη στόχευση του ενδογενούς Bax στα μιτοχόνδρια. (A., B., Γ. και Δ.) Παρουσιάζονται εικόνες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού κυττάρων HeLa που καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και συνεκφράζουν τις κατασκευές Flag-HIF-1α-SA ή Flag και τη φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed2-Mito. Μετά το πέρας 24 ωρών από την παροδική διαμόλυνση και την έκφραση των κατασκευών, τα κύτταρα επωάστηκαν με εμπελίνη (10 μM) ή χωρίς (DMSO σαν συνθήκη ελέγχου) για 16 ώρες, και έπειτα με ετοποσίδιο (75 μM) για 4 ώρες. Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του Bax (δεύτερη στήλη εικόνων, πράσινο χρώμα). Ο εντοπισμός της DsRed2-Mito απεικονίζεται με φούξια χρώμα (πρώτη στήλη εικόνων). Η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού των πρωτεϊνών DsRed2-Mito και Bax είναι ενδεικτική του συνεντοπισμού τους (τρίτη στήλη εικόνων, merge, συνεντοπισμός με λευκό χρώμα). Η κλίμακα μεγέθους είναι στα 10 μm. (E.) Οι στήλες του γραφήματος απεικονίζουν το συντελεστή συνεντοπισμού Manders', όπως αυτός υπολογίστηκε σε ένα συνολικό αριθμό 25 μεμονωμένων κυττάρων από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε κάθε συνθήκη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, ****P<0,0001.



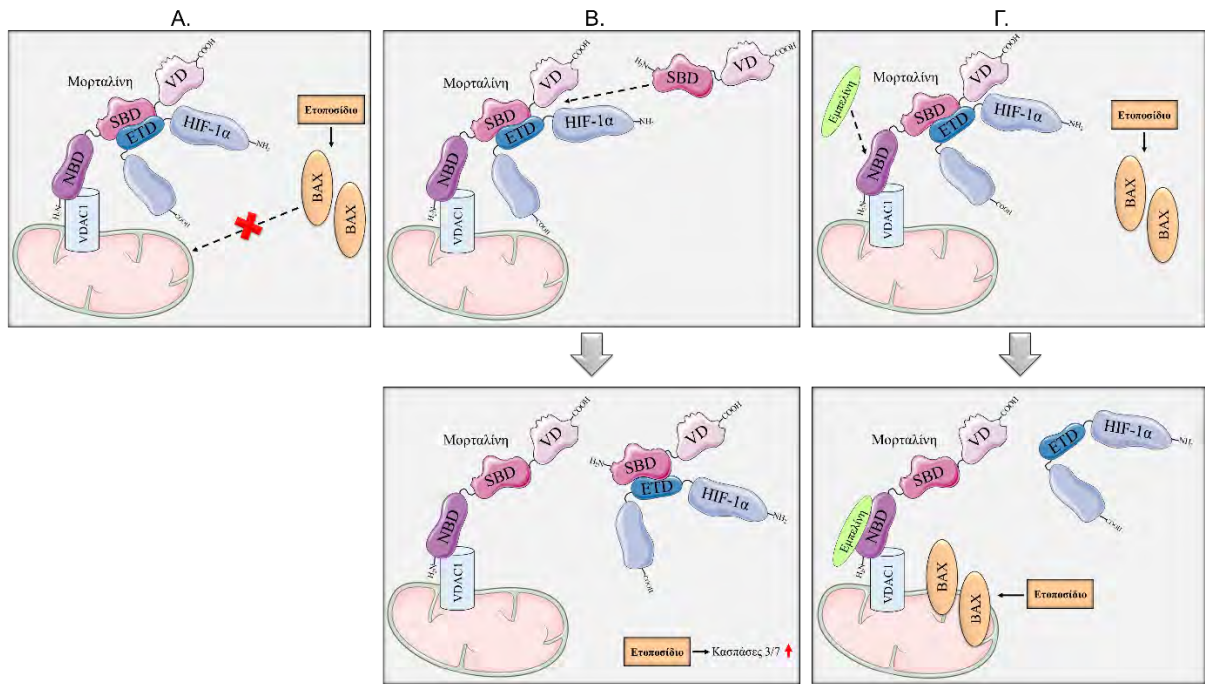
Εικόνα 51: Η εμπελίνη καταργεί την ανασταλτική επίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (Flag-HIF-1α-SA) στη στόχευση του εξωγενούς υπερεκφρασμένου Bax στα μιτοχόνδρια. (A., B., Γ. και Δ.) Παρουσιάζονται εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού κυττάρων HeLa που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) και συνεκφράζουν τις κατασκευές Flag-HIF-1α-SA ή Flag και GFP-Bax. Μετά το πέρας 24 ωρών από την παροδική διαμόλυνση και την έκφραση των κατασκευών, τα κύτταρα επωάστηκαν με εμπελίνη (10 μM) ή χωρίς (DMSO σαν συνθήκη ελέγχου) για 16 ώρες, έπειτα με ετοποσίδιο (75 μM) για 4 ώρες και ακολούθως με Mitotracker (100 nM) για 20 λεπτά με σκοπό την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων. Ο εντοπισμός του Bax παρατηρείται λόγω του φθορισμού της GFP (δεύτερη στήλη εικόνων, πράσινο χρώμα). Τα μιτοχόνδρια απεικονίζονται με φούξια χρώμα (πρώτη στήλη εικόνων). Η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων φθορισμού των Mitotracker και GFP-Bax είναι ενδεικτική του συνεντοπισμού τους (τρίτη στήλη εικόνων, merge, συνεντοπισμός με λευκό χρώμα). Η κλίμακα μεγέθους είναι στα 10 μm. (E.) Οι στήλες του γραφήματος απεικονίζουν το συντελεστή συνεντοπισμού Manders', όπως αυτός υπολογίστηκε σε ένα συνολικό αριθμό 50 μεμονωμένων κυττάρων από ένα πείραμα, σε κάθε συνθήκη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εξής: μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής, ****P<0,0001.

5. Συζήτηση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα οργανίδια που επηρεάζονται σημαντικά σε συνθήκες υποξίας. Η υποξία μπορεί να οδηγήσει τόσο σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, όσο και σε αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Η υπερπαραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές μιτοχονδριακές βλάβες και να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (290-292). Η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου μπορεί να αποφευχθεί μέσω της επαγωγής του HIF-1. Συγκεκριμένα, ο HIF-1 δρα μεταγραφικά επάγοντας την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην αύξηση της απόδοσης μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο που είναι ο τελικός αποδέκτης στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, μέσω της τροποποίησης των υπομονάδων του αναπνευστικού συμπλόκου IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) (64). Επιπροσθέτως, ένας άλλος τρόπος με τον οποίο ο HIF-1 εξισορροπεί τις επιδράσεις των ROS, είναι μέσω της έκφρασης γονιδίων που θα οδηγήσουν σε αναπροσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού, μέσω επαγωγής της LDHA, καθώς και της PDK1, οδηγώντας σε μείωση της εισόδου του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο του Krebs, της παραγωγής αναγωγικών ισοδυνάμων NADH/FADH₂ και της ροής ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (292). Είναι γνωστό ότι ο HIF-1 οδηγεί στην επαγωγή γονιδίων που θα συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση, μέσω παρεμπόδισης του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα προαναφερθέντα γονίδια συνιστούν αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, όπως είναι η Bcl-xL (Bcl lymphoma extra-large) (192), οι BNiP3 και BNiP3L (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 and protein 3-like) (150) και η εξοκινάση II (HK2) (145). Συνεπώς, η αύξηση της πυρηνικής συσσώρευσης και της μεταγραφικής δραστηριότητας του HIF-1 λόγω της φωσφορυλίωσής του από τις κινάσες ERK1/2 (33, 122), εξηγεί σε μεγάλο βαθμό την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης στα υποξικά μικροπεριβάλλοντα των συμπαγών όγκων.

Παρόλα αυτά, προηγούμενη δημοσίευση του Εργαστηρίου Βιοχημείας, ανέδειξε έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο του HIF-1α που δεν βασίζεται στη μεταγραφική του δράση. Συγκεκριμένα, ο ρόλος αυτός του HIF-1α αφορά στη μετακίνησή του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και την επακόλουθη αλληλεπίδραση του με τη μορταλίνη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη κάτω από συνθήκες αναστολής της εξαρτώμενης από τις ERK1/2 φωσφορυλίωσής του (35). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη παρούσα διδακτορική διατριβή αποκαλύπτουν νέες πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται μέσω της άμεσης φυσικής αλληλεπίδρασης της επικράτειας HIF-1α-ETD

(στην οποία περιέχονται τα αμινοξέα σερίνης στις θέσεις 641 και 643 που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2) και της καρβοξυτελικής περιοχής SBD της μορταλίνης. Επίσης, δείχθηκε ότι υπό συνθήκες στρες, η παρεμπόδιση αυτής της αλληλεπίδρασης μέσα σε ζωντανά κύτταρα, είτε μέσω αξιοποίησης φαρμακολογικών μέσων, είτε χρησιμοποιώντας τμήματα των δύο πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν τις θέσεις της μεταξύ τους δέσμευσης (ως ανταγωνιστές), οδήγησε στην απομάκρυνση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α από τα μιτοχόνδρια, στην πυροδότηση της μιτοχονδριακής στόχευσης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και στην επακόλουθη έναρξη της απόπτωσης.



Εικόνα 52: Η άμεση φυσική δέσμευση μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αναστέλλει την στόχευση της Bax στα μιτοχόνδρια υπό συνθήκες στρες. Η άμεση φυσική δέσμευση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α (μέσω των επικρατειών Mortalin-SBD-VD και HIF-1α-ETD αντίστοιχα) οδηγεί στη στόχευση του HIF-1α στα μιτοχόνδρια, όπου αναστέλλει τη στρατολόγηση της Bax στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προστατεύοντας από την έναρξη της απόπτωσης, παρουσία ετοποσιδίου (A). Η χρήση του τμήματος SBD-VD της μορταλίνης (B) ή της ουσίας εμπειλίνης (Γ) οδηγεί στην αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α, οδηγώντας στην αύξηση της δραστηριότητας των εκτελεστικών κασπασών 3/7 και στη μιτοχονδριακή στόχευση της Bax αντίστοιχα, παρουσία ετοποσιδίου.

Αναλυτικότερα έχει δειχθεί πως ενώ η επικράτεια ETD του HIF-1α συνδέεται στα μιτοχόνδρια σε συνθήκες νορμοξίας, δεν είναι ικανή από μόνη της να προστατεύσει από την απόπτωση που προκαλείται από την επίδραση με χημειοθεραπευτικά μέσα, όπως είναι το ετοποσιδίο ή η δοξορουβικίνη (35). Η παρατήρηση αυτή δημιούργησε το ερώτημα εάν εκατέρωθεν της περιοχής ETD, υπάρχουν θέσεις αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αντι-αποπτωτικής δράσης του μιτοχονδριακού HIF-1α. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας

τμήματα της καρβοξυτελικής επικράτειας του HIF-1α που περιέχουν (HIF-1α-530-826) και δεν περιέχουν (HIF-1α-348-616 και HIF-1α-652-826) την επικράτεια ETD, δείχθηκε η αλληλεπίδραση της ενδογενούς μορταλίνης μόνο με το τμήμα HIF-1α-530-826. Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε πως η επικράτεια ETD του HIF-1α είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση με την ενδογενή μορταλίνη (286). Προκειμένου να διερευνηθεί αν η αλληλεπίδραση της μορταλίνης με την ETD είναι άμεση ή διαμεσολαβείται μέσω ενός τρίτου παράγοντα, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα τμήματα: α. της καρβοξυτελικής επικράτειας του HIF-1α, β. της ETD (SA, SE) και γ. της μορταλίνης. Δείχθηκε ότι η μορταλίνη δεσμεύεται άμεσα και εξειδικευμένα μόνο με το τμήμα του HIF-1α που φέρει την επικράτεια ETD αγρίου τύπου (530-826) και μόνο με το μετάλλαγμα της ETD που φέρει μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (Ser641 σε Ala641 και Ser643 σε Ala643). Τα βακτήρια *E. coli* στα οποία παράγονται τα προηγούμενα ανασυνδυασμένα τμήματα, δεν έχουν τις ομόλογες κινάσες ERK1/2 του ανθρώπου και συνεπώς δεν αναμένεται η φωσφορυλίωση της αγρίου τύπου ETD που απομονώνεται από αυτά. Η απουσία αλληλεπίδρασης της ανασυνδυασμένης μορταλίνης με την μη φωσφορυλιωμένη αγρίου τύπου ETD συγκριτικά με την SA, αλλά και συγκριτικά με το ευρύτερο τμήμα HIF-1α-530-826-WT έρχεται σε αντίθεση με τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα. Το εύρημα αυτό μπορεί να εξηγηθεί, διότι η διαφορά στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων σερίνης (πολικό) και αλανίνης (μη πολικό) μεταξύ των δύο μορφών ETD-WT και ETD-SA εντοπίζεται στις ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες μπορεί να παίζουν καταλυτικό ρόλο στη διαμόρφωση που λαμβάνουν τα ανασυνδυασμένα τμήματα *in vitro* και άρα στην αλληλεπίδραση αυτών με την μορταλίνη. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία και με προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, σύμφωνα με την οποία η ενδογενής μορταλίνη κυττάρων HeLa συγκατακρημνίζεται μόνο από την ανασυνδυασμένη ETD-SA και όχι από την αγρίου τύπου μορφή (WT) (35). Δεύτερον, η αλληλεπίδραση της μορταλίνης με το τμήμα HIF-1α-530-826-WT και όχι με την ETD-WT, μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι το μεγαλύτερο τμήμα του HIF-1α περιέχει και επιπρόσθετα αμινοξέα τα οποία μπορεί να είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική αναδίπλωσή του σε σχέση με την μικρού μήκους ETD-WT. Στη συνέχεια, αφού δείχθηκε ότι η σύνδεση μεταξύ της μορταλίνης και του HIF-1α είναι άμεση και διαμεσολαβείται από την επικράτεια HIF-1α-ETD, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση των θέσεων δέσμευσης μεταξύ τους, για να εξακριβωθεί ποια είναι η περιοχή της μορταλίνης που συμμετέχει σε αυτή την αλληλεπίδραση. Χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένα τμήματα τόσο της μορταλίνης όσο και επικρατειών της (NBD, NBD-SBD, SBD-VD) δείχθηκε ισχυρή δέσμευση της καρβοξυτελικής της επικράτειας SBD-VD με την περιοχή HIF-1α-ETD-SA σε σχέση με τη μορταλίνη και τα υπόλοιπα τμήματα (NBD και NBD-SBD). Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD)

της μορταλίνης ρυθμίζει με αλλοστερικό τρόπο την αγγιστεία της επικράτειας SBD για τις πρωτεΐνες-στόχους. Ο τρόπος που πραγματοποιείται αυτή η ρύθμιση έχει να κάνει με την κατάσταση σύνδεσης της NBD με το ATP ή το ADP. Συγκεκριμένα, όταν η μορταλίνη έχει δεσμευμένο ATP, λαμβάνει μία διαμόρφωση στο χώρο στην οποία παρουσιάζει χαμηλή αγγιστεία ως προς την πρωτεΐνη-στόχο, ενώ η υδρόλυση του ATP σε ADP μέσω κατάλληλων ενζύμων, οδηγεί τη μορταλίνη στη διαμόρφωση υψηλής αγγιστείας (197). Το γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη μορταλίνη αλληλεπιδρά ασθενικά με την ETD-SA και σε αυτό το πείραμα με επαναλήψιμο τρόπο, ίσως έχει να κάνει με την διαμόρφωση στην οποία απομονώνεται από τα βακτήρια και το οποίο σχετίζεται με την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Από την άλλη τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η περιοχή NBD από μόνη της, καθώς και η παρουσία της στο τμήμα NBD-SBD σε συνδυασμό με την διαμόρφωση που παρουσιάζει το καθένα από τα τμήματα αυτά με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, αναστέλλει αλλοστερικά την αλληλεπίδραση μορταλίνης-HIF-1α *in vitro*. Εν συνεχεία, δείχθηκε ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της μορταλίνης διατηρεί ως ένα βαθμό την εξειδίκευση που παρουσιάζει η ανασυνδυασμένη μορταλίνη για την επικράτεια HIF-1α-ETD-SA, συγκρίνοντας με το μετάλλαγμα ETD-WT και το φωσφομιμητικό (SE). Ωστόσο, η υπολειμματικότητα που παρατηρείται στη σύνδεση του Mortalin-SBD-VD με τα HIF-1α-ETD-WT και HIF-1α-ETD-SE και η οποία δεν παρατηρήθηκε με το μεγαλύτερο τμήμα της μορταλίνης ίσως να οφείλεται στην υψηλότερη αγγιστεία του SBD-VD για το ETD-SA και/ή τη χαλάρωση της εξειδίκευσης εξαιτίας της αναποτελεσματικής αναδίπλωσης/διαμόρφωσης του μικρότερου τμήματος της μορταλίνης. Παρά το γεγονός ότι περιοχή SBD από μόνη της αρκεί για να αλληλεπιδράσει με την HIF-1α-ETD-SA και άρα να διαμεσολαβήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης, η περιοχή Mortalin-VD φαίνεται να ισχυροποιεί την αγγιστεία της αλληλεπίδρασης.

Εν συνεχεία τα αποτελέσματα έδειξαν: α. την *in vitro* δέσμευσή του ανασυνδυασμένου Mortalin-SBD-VD με ένα μεγαλύτερο τμήμα του HIF-1α (530-826) και β. τη δυνατότητα έκφρασης του τμήματος Mortalin-SBD-VD σε κύτταρα HeLa όπου εμφανίζει διάχυτο κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Ακόμα, δείχθηκε πως το τμήμα SBD-VD της μορταλίνης αλληλεπιδρά εξειδικευμένα μόνο με τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α (HIF-1α-SA) μέσα στα κύτταρα και όχι με τον φωσφορυλιωμένο αγρίου τύπου HIF-1α (HIF-1α-WT). Έπειτα διερευνήθηκε η σημασία της αλληλεπίδρασης μορταλίνης-HIF-1α από λειτουργική σκοπιά, εστιάζοντας στον προσδιορισμό των επιπέδων ενεργότητας των εκτελεστικών κασπασών 3 και 7, ύστερα από επίδραση με το χημειοθεραπευτικό ετοποσίδιο που επάγει την απόπτωση (293). Δείχθηκε ότι το τμήμα Mortalin-SBD-VD αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (HIF-1α-SA) σε κύτταρα HeLa, όπως συνηγορεί η σημαντική

αύξηση στα επίπεδα ενεργότητας των κασπασών 3/7 σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου (απουσία του τμήματος SBD-VD της μορταλίνης). Η υπόθεση που μπορεί να διατυπωθεί στην παρούσα περίπτωση είναι πως το τμήμα SBD-VD της μορταλίνης το οποίο δεν έχει το σήμα μιτοχονδριακής στόχευσης (MTS) και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ανταγωνίζεται την ενδογενή μορταλίνη για τη δέσμευση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α, οδηγώντας σε αναστολή της σύνδεσής του με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Έχει δειχθεί από προηγούμενες δημοσιεύσεις ότι η μορταλίνη δεσμεύεται στην πρωτεΐνη p53 είτε μέσω της επικράτειας NBD (246), είτε μέσω της επικράτειας SBD (247) και πως η ουσία εμπελίνη καταργεί την εν λόγω αλληλεπίδραση, δεσμευόμενη στην επικράτεια NBD και εμποδίζοντας τη δέσμευση της p53 (252). Για να επιβεβαιωθούν τα *in vitro* πειράματα με φαρμακολογικά μέσα, η εμπελίνη χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης HIF-1α-μορταλίνης. Δείχθηκε πως η εμπελίνη ανέστειλε πλήρως την *in vitro* δέσμευση μεταξύ των ανασυνδυασμένων HIF-1α-530-826 και της Mortalin-ΔN, αλλά είχε ελάχιστη επίδραση όταν αντί για την Mortalin-ΔN χρησιμοποιήθηκε το τμήμα Mortalin-SBD-VD. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη, η οποία καταδεικνύει την αγκυροβόληση της εμπελίνης στην επικράτεια NBD της μορταλίνης (252) και υποστηρίζουν την παρατήρηση ότι η NBD ρυθμίζει αλλοστερικά την αλληλεπίδραση μεταξύ SBD και HIF-1α. Έπειτα δείχθηκε ότι η εμπελίνη ανέστειλε την αλληλεπίδραση του ενδογενούς μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α με τη μορταλίνη σε συνθήκες υποξίας (1% O₂), καθώς και του υπερεκφρασμένου HIF-1α-SA με τα μιτοχόνδρια, καταδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει η μορταλίνη στη στόχευση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Στο πλαίσιο διερεύνησης του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου διαμεσολαβείται η αναστολή της έναρξης της απόπτωσης από το μιτοχονδριακό σύμπλοκο μορταλίνης-HIF-1α, δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ανέστειλε τη σύνδεση της ενδογενούς ή της εξωγενώς εκφραζόμενης προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax με τα μιτοχόνδρια. Το γεγονός ότι τόσο τα αποτελέσματα που αφορούν τόσο την ενδογενή Bax, όσο την υπερεκφρασμένη είναι παρόμοια, υποδεικνύει ότι το μιτοχονδριακό σύμπλοκο μορταλίνης/HIF-1α δεν αναστέλλει τη στρατολόγηση της Bax, με το να προκαλεί απλά στοιχειομετρική παρεμπόδιση της δέσμευσης της τελευταίας, αλλά μέσω ενός πιο περίπλοκου μηχανισμού που πιθανώς περιλαμβάνει περισσότερους μοριακούς παίκτες που εδράζουν στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί η σημασία αυτού του μη μεταγραφικού μηχανισμού που χρησιμοποιεί ο HIF-1α για να προστατεύσει τα καρκινικά κύτταρα από την έναρξη της απόπτωσης υπό συνθήκες υποξίας. Η εξαρτώμενη από τον HIF-

1α ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του που σχετίζονται με την αναστολή της απόπτωσης και την προστασία των μιτοχονδρίων καθώς και η παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών είναι μια αργή απόκριση που μπορεί να διαρκέσει μερικές ώρες. Ωστόσο, η στόχευση του HIF-1α στα μιτοχόνδρια μέσω της μορταλίνης θα μπορούσε να συμβεί γρήγορα και άμεσα εφόσον ο παραγόμενος HIF-1α διαφεύγει της οξυγόνο-εξαρτώμενης υδροξυλίωσης και σταθεροποιείται. Η συγκεκριμένη απόκριση θα ήταν δυνατό να συμβαίνει στα πρώιμα στάδια της υποξίας, παρέχοντας με άμεσο τρόπο προστασία στα μιτοχόνδρια, μέχρι την εγκαθίδρυση του μεταγραφικού προγράμματος από τον HIF-1α που θα οδηγήσει στην απομάκρυνση των ROS. Καθώς η αξιοποίηση αυτού του μηχανισμού από το κύτταρο συμβαίνει σε συνθήκες έλλειψης φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2, ίσως να αποκτά επιπρόσθετη σημασία σε καταστάσεις που η σηματοδοτική οδός που εμπλέκει τις ERK είναι ανενεργή, όπως για παράδειγμα στη περίπτωση που μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (quiescent) εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η εξαρτώμενη από τις κινάσες ERK1/2 σηματοδότηση, οδηγεί σε αναστολή του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης (294), το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην υποξία. Συνεπώς, το μιτοχονδριακό σύμπλοκο HIF-1α-μορταλίνης ίσως να έχει κρίσιμη σημασία για την επιβίωση των κυττάρων που υπόκεινται σε συνθήκες υποξίας και καταστολής της ενεργότητας των κινάσων ERK1/2. Ωστόσο, ακόμα και σε κύτταρα που οι κινάσες ERK1/2 είναι ενεργές και ο πυρηνικός σε αυτές τις συνθήκες HIF-1α είναι μεταγραφικά λειτουργικός, υπάρχει μία δυναμική ισορροπία ανταλλαγής του τελευταίου μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίων. Στο πλαίσιο αυτής της ισορροπίας, ένα μικρό και οριακά ανιχνεύσιμο μέρος του HIF-1α εντοπίζεται εκτός πυρήνα και συγκεκριμένα στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, προστατεύοντας τα καρκινικά κύτταρα από την έναρξη της απόπτωσης όταν εκτίθενται σε υποξία και σε χημειοθεραπευτικά κυτταροτοξικά φάρμακα όπως το ετοποσίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα της εν λόγω διδακτορικής διατριβής αποδεικνύουν πως ο μιτοχονδριακός HIF-1α διαμεσολαβεί την προστασία των καρκινικών κυττάρων από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο εμποδίζοντας τη στρατολόγηση του Bax στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την πιθανή επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητάς της. Αυτό δημιουργεί μία εύλογη απορία σε σχέση με το πως μπορεί να επιτευχθεί το παραπάνω. Είναι γνωστό πως η στόχευση του HIF-1α στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω της μορταλίνης, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με τον τασεο-εξαρτώμενο διάυλο ανιόντων VDAC1 (260, 295). Ο VDAC1 είναι ένας διάυλος ο οποίος δημιουργεί έναν πόρο που εξασφαλίζει τη μεταφορά μεταβολιτών, ιόντων και ATP/ADP μέσω της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (296-298). Επιπλέον από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Βιοχημείας, έχει αποδειχθεί η αλληλεπίδραση του VDAC1 με τη μορταλίνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου

(νορμοξία), καθώς και με τη μορταλίνη και τον HIF-1α σε συνθήκες υποξίας (35). Ο VDAC1, πέραν του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει ως πόρος στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, λειτουργεί και ως ρυθμιστής της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, μπορεί να λειτουργήσει ως πλατφόρμα πάνω στην οποία μπορούν να συνδεθούν τόσο προ-αποπτωτικά (Bax) (299-301) όσο και αντι-αποπτωτικά μέλη (Bcl-xL και Bcl-2) (302-305) της οικογένειας Bcl-2. Ακόμα ο VDAC1 αλληλεπιδρά με την εξοκινάση II (HK2), η έκφραση της οποίας αυξάνεται στην υποξία μέσω του HIF-1 (306). Επίσης έχειδειχθεί πως η HK2 ανιχνεύεται σε αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο μορταλίνης-HIF-1α, καθώς και με τον VDAC1 (35). Η HK2 αλληλεπιδρώντας με τον VDAC1 προστατεύει τα κύτταρα από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και τον ολιγομερισμό του Bax (304, 307, 308). Συνεπώς η αρνητική επίδραση του HIF-1α στη μιτοχονδριακή στόχευση της Bax, ίσως να είναι αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης της με τον VDAC1, είτε μέσω σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασης του VDAC1 με ένα αντι-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2, όπως είναι η Bcl-2 ή η HK2. Μία άλλη υπόθεση θα μπορούσε να εμπλέκει την πρωτεΐνη TIGAR (Trp53- induced glycolysis and apoptosis regulator), για την οποία έχειδειχθεί ότι δεσμεύεται στην HK2 σε συνθήκες υποξίας με έναν μηχανισμό που εξαρτάται από τον HIF-1α (309).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η μορταλίνη, η οποία σε συνθήκες υποξίας διαμεσολαβεί τη μιτοχονδριακή στόχευση του HIF-1α. Επίσης, στο πλαίσιο αυτής της μελέτηςδείχθηκε πως η εμπελίνη, ένα φυσικό παράγωγο που αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ της μορταλίνης και της p53, μπορεί επίσης να εμποδίσει την αλληλεπίδραση της μορταλίνης με τον HIF-1α οδηγώντας σε απομάκρυνση του τελευταίου από τα μιτοχόνδρια και σε επακόλουθη μετατόπιση της Bax στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (**Εικόνα 52**). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα της μορταλίνης οδηγούν σε καρκινογένεση (245). Ακόμα η υπερέκφραση της μορταλίνης έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση ασθενών με καρκίνο, αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα και αυξημένη επιθετικότητα καρκινικών όγκων σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως είναι το αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (270, 274), ο καρκίνος των ωοθηκών (270, 310, 311), ο καρκίνος του θυρεοειδούς (312, 313), ο καρκίνος του στομάχου (271), το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (248, 314) και ο καρκίνος του μαστού (267). Σε πολλές από τις παραπάνω μελέτες καθώς και σε άλλες (283, 315-318), η μείωση ή η αναστολή της μορταλίνης σε *in vitro* ή *in vivo* προ-κλινικά μοντέλα καρκίνων είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και τον θάνατο μέσω απόπτωσης (319, 320). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι αναστολές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως στόχο τη διακοπή της αλληλεπίδρασης της μορταλίνης με την p53, υποδεικνύοντας ότι ο κύριος ρόλος της μορταλίνης στην ογκογένεση είναι μέσω της p53 (249). Παρόλο που όλες αυτές οι μελέτες

δεν εμπλέκουν το HIF-1α, δημιουργείται η υπόθεση βάσει των δεδομένων από την παρούσα έρευνα, ότι οι αναστολείς της μορταλίνης θα μπορούσαν να στοχεύσουν εν δυνάμει την αλληλεπίδρασή της με τον HIF-1α. Φαίνεται ότι ο προ-καρκινικός ρόλος της μορταλίνης σχετίζεται με την παρεμπόδιση της έναρξης της απόπτωσης μέσω της αναστολής της μιτοχονδριακής στόχευσης της Bax, τόσο σε κύτταρα που εκτίθενται σε υποξία ή που υπερεκφράζουν τον HIF-1α. Εάν αυτή η υπόθεση είναι βάσιμη η αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη μορταλίνη ίσως αποτελεί ένα σημαντικό και υποσχόμενο στόχο για την αντικαρκινική θεραπεία.

6. Σύνοψη

Επιγραμματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται στα εξής βασικά σημεία:

- Η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και μορταλίνης είναι άμεση και διαμεσολαβείται από τις επικράτειες HIF-1α-ETD και Mortalin-SBD-VD
- Το τμήμα SBD-VD της μορταλίνης αλληλεπιδρά με τον μη φωσφορυλιωμένο HIF-1α μέσα στα κύτταρα
- Το τμήμα SBD-VD της μορταλίνης αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α (HIF-1α-SA) σε κύτταρα HeLa
- Η ουσία εμπελίνη αναστέλλει την *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1α και της μορταλίνης, αλλά όχι του τμήματος SBD-VD
- Η ουσία εμπελίνη αναστέλλει την αλληλεπίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α με τα μιτοχόνδρια ή τη μορταλίνη σε κύτταρα HeLa
- Η εμπελίνη καταργεί την ανασταλτική επίδραση του μη φωσφορυλιωμένου HIF-1α στη στόχευση της Bax στα μιτοχόνδρια, υπό την επίδραση ετοποσιδίου

7. Βιβλιογραφία

1. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* (Bethesda). 2009;24:97-106.
2. Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell*. 2009;17(6):755-73.
3. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):391-402.
4. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1616-26.
5. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:47-71.
6. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest*. 2022;132(11).
7. Lee CC, Wu CY, Yang HY. Discoveries of how cells sense oxygen win the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Biomed J*. 2020;43(5):434-7.
8. Ratcliffe PJ. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol*. 2013;591(8):2027-42.
9. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15.
10. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
11. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*. 1991;252(5008):954-8.
12. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(3):184-97.
13. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4273-8.
14. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*. 1998;7(3):205-13.
15. Luo W, Wang Y. Epigenetic regulators: multifunctional proteins modulating hypoxia-inducible factor- α protein stability and activity. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(6):1043-56.
16. Semenza GL. The Genomics and Genetics of Oxygen Homeostasis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2020;21:183-204.
17. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997;173(2):206-10.
18. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 1997;11(1):72-82.
19. Heikkila M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(23):3885-901.
20. Tolonen JP, Heikkila M, Malinen M, Lee HM, Palvimo JJ, Wei GH, et al. A long hypoxia-inducible factor 3 isoform 2 is a transcription activator that regulates erythropoietin. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(18):3627-42.

21. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J.* 2005;19(11):1396-406.
22. Erbel PJ, Card PB, Karakuzu O, Bruick RK, Gardner KH. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15504-9.
23. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(4):808-13.
24. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001;294(5545):1337-40.
25. Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell.* 2007;18(11):4528-42.
26. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem.* 1997;272(31):19253-60.
27. O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 1999;274(4):2060-71.
28. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17640-7.
29. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(3):394-404.
30. Luo JC, Shibuya M. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene.* 2001;20(12):1435-44.
31. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorlich D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):235-40.
32. Gkotinakou IM, Befani C, Simos G, Liakos P. ERK1/2 phosphorylates HIF-2alpha and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling. *J Cell Sci.* 2019;132(7).
33. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27620-7.
34. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33095-106.
35. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci.* 2017;130(2):466-79.
36. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(4):285-96.
37. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4604-13.
38. Rankin EB, Rha J, Unger TL, Wu CH, Shutt HP, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene.* 2008;27(40):5354-8.

39. Braile M, Marcella S, Cristinziano L, Galdiero MR, Modestino L, Ferrara AL, et al. VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15).
40. Jiang X, Tian W, Tu AB, Pasupneti S, Shuffle E, Dahms P, et al. Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-2alpha Is Required for the Maintenance of Airway Microvasculature. *Circulation.* 2019;139(4):502-17.
41. Melegh Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
42. Quintero-Fabian S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argaez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1370.
43. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC, Russo A, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):E2707-16.
44. Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):809-18.
45. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15(1):351-7.
46. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood.* 2010;116(16):3039-48.
47. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117(4):1068-77.
48. Yeo EJ, Cho YS, Kim MS, Park JW. Contribution of HIF-1alpha or HIF-2alpha to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. *Ann Hematol.* 2008;87(1):11-7.
49. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep.* 2003;2(6):465-70.
50. Petruzzelli R, Christensen DR, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. HIF-2alpha regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox cis regulatory element. *PLoS One.* 2014;9(10):e108309.
51. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 2007;129(3):465-72.
52. Lee HJ, Jung YH, Choi GE, Kim JS, Chae CW, Han HJ. Role of HIF1alpha Regulatory Factors in Stem Cells. *Int J Stem Cells.* 2019;12(1):8-20.
53. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
54. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207-14.
55. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.
56. Katayama Y, Uchino J, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, et al. Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers (Basel).* 2019;11(3).
57. Zanutelli MR, Reinhart-King CA. Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1092:91-112.
58. Campillo N, Falcones B, Otero J, Colina R, Gozal D, Navajas D, et al. Differential Oxygenation in Tumor Microenvironment Modulates Macrophage and Cancer Cell Crosstalk: Novel Experimental Setting and Proof of Concept. *Front Oncol.* 2019;9:43.
59. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):281-90.
60. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-33.

61. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol.* 2021;599(1):23-37.
62. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994;269(38):23757-63.
63. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):187-97.
64. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007;129(1):111-22.
65. Liu Y, Ma Z, Zhao C, Wang Y, Wu G, Xiao J, et al. HIF-1 α and HIF-2 α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 α -mediated fatty acid β -oxidation. *Toxicol Lett.* 2014;226(2):117-23.
66. Han JS, Lee JH, Kong J, Ji Y, Kim J, Choe SS, et al. Hypoxia Restrains Lipid Utilization via Protein Kinase A and Adipose Triglyceride Lipase Downregulation through Hypoxia-Inducible Factor. *Mol Cell Biol.* 2019;39(2).
67. Hu B, Guo Y, Garbacz WG, Jiang M, Xu M, Huang H, et al. Fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol.* 2015;63(4):855-62.
68. Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab.* 2009;9(6):512-24.
69. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, et al. Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer Res.* 2008;68(4):1003-11.
70. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniosoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 14):3485-93.
71. Triantafyllou EA, Georgatsou E, Mylonis I, Simos G, Paraskeva E. Expression of AGPAT2, an enzyme involved in the glycerophospholipid/triacylglycerol biosynthesis pathway, is directly regulated by HIF-1 and promotes survival and etoposide resistance of cancer cells under hypoxia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(9):1142-52.
72. Gimm T, Wiese M, Teschemacher B, Deggerich A, Schodel J, Knaup KX, et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J.* 2010;24(11):4443-58.
73. Qiu B, Ackerman D, Sanchez DJ, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, et al. HIF2 α -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discov.* 2015;5(6):652-67.
74. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408.
75. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature.* 2016;539(7627):112-7.
76. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 2001;107(1):1-3.
77. Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes Dis.* 2019;6(4):328-32.
78. Strowitzki MJ, Cummins EP, Taylor CT. Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? *Cells.* 2019;8(5).

79. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem.* 2004;279(11):9899-904.
80. Chinopoulos C. Which way does the citric acid cycle turn during hypoxia? The critical role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J Neurosci Res.* 2013;91(8):1030-43.
81. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE.* 2005;2005(306):re12.
82. Gorchach A. Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des.* 2009;15(33):3844-52.
83. Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1 alpha mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(2):321-6.
84. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344-62.
85. Gorchach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J.* 2008;412(3):e17-9.
86. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):4691-7.
87. Bonello S, Zahringer C, Belaiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):755-61.
88. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008;412(3):477-84.
89. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2{alpha} Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{alpha}. *Cancer Res.* 2010;70(20):7820-9.
90. Potteti HR, Noone PM, Tamatam CR, Ankireddy A, Noel S, Rabb H, et al. Nrf2 mediates hypoxia-inducible HIF1alpha activation in kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2021;320(3):F464-F74.
91. Kim TH, Hur EG, Kang SJ, Kim JA, Thapa D, Lee YM, et al. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1alpha. *Cancer Res.* 2011;71(6):2260-75.
92. Gkotinakou IM, Kechagia E, Pazaitou-Panayiotou K, Mylonis I, Liakos P, Tsakalof A. Calcitriol Suppresses HIF-1 and HIF-2 Transcriptional Activity by Reducing HIF-1/2alpha Protein Levels via a VDR-Independent Mechanism. *Cells.* 2020;9(11).
93. Gkotinakou IM, Mylonis I, Tsakalof A. Vitamin D and Hypoxia: Points of Interplay in Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(7).
94. Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Front Microbiol.* 2016;7:183.
95. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63.
96. Joshi S, Plataniias LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J Biol Chem.* 2014;5(3):321-33.
97. Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13(3):245-51.
98. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018;109(3):560-71.

99. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, Grunewald TG, Negri GL, Somasekharan SP, et al. Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell*. 2015;27(5):682-97.
100. Liu L, Simon MC. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(6):492-7.
101. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell*. 2002;13(5):1792-801.
102. Albanese A, Daly LA, Mennerich D, Kietzmann T, See V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
103. Flugel D, Gorlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3253-65.
104. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(33):31277-85.
105. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. 2010;40(4):509-20.
106. Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, Nash ZM, DeYoung MP, Sgroi D, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(10):4675-80.
107. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2010;285(50):38944-50.
108. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1alpha via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. 2013;12(23):3689-701.
109. Hubbi ME, Gilkes DM, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Semenza GL. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha to promote cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3325-34.
110. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 17):2976-86.
111. Kourti M, Ikonou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. *Cell Signal*. 2015;27(6):1129-40.
112. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*. 2004;383(Pt. 3):429-37.
113. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer*. 2005;117(5):764-74.
114. Cho H, Ahn DR, Park H, Yang EG. Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett*. 2007;581(8):1542-8.
115. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(2):205-15.
116. Zhang J, Liu Q, Fang Z, Hu X, Huang F, Tang L, et al. Hypoxia induces the proliferation of endothelial progenitor cells via upregulation of Apelin/APLNR/MAPK signaling. *Mol Med Rep*. 2016;13(2):1801-6.

117. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32631-7.
118. Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene.* 2001;20(52):7624-34.
119. Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A. Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(4):657-70.
120. Mylonis I, Lakka A, Tsakalof A, Simos G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(1):74-8.
121. Karagiota A, Kourti M, Simos G, Mylonis I. HIF-1alpha-derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(4):809-25.
122. Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G, et al. ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1alpha interaction with NPM1. *Mol Oncol.* 2021;15(12):3468-89.
123. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):642-9.
124. Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem.* 1991;266(24):15563-6.
125. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(13):5680-4.
126. Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem.* 1998;253(3):771-7.
127. Rossler J, Stolze I, Frede S, Freitag P, Schweigerer L, Havers W, et al. Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem.* 2004;93(1):153-61.
128. Yfantis A, Mylonis I, Chachami G, Nikolaidis M, Amoutzias GD, Paraskeva E, et al. Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators. *Cells.* 2023;12(5).
129. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-17.
130. Andrysik Z, Bender H, Galbraith MD, Espinosa JM. Multi-omics analysis reveals contextual tumor suppressive and oncogenic gene modules within the acute hypoxic response. *Nat Commun.* 2021;12(1):1375.
131. Choudhry H, Schodel J, Oikonomopoulos S, Camps C, Grampp S, Harris AL, et al. Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2. *EMBO Rep.* 2014;15(1):70-6.
132. Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B, et al. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell.* 2013;153(6):1327-39.
133. Platt JL, Salama R, Smythies J, Choudhry H, Davies JO, Hughes JR, et al. Capture-C reveals preformed chromatin interactions between HIF-binding sites and distant promoters. *EMBO Rep.* 2016;17(10):1410-21.
134. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 2005;9(5):617-28.

135. Hubbi ME, Kshitiz, Gilkes DM, Rey S, Wong CC, Luo W, et al. A nontranscriptional role for HIF-1 α as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci Signal*. 2013;6(262):ra10.
136. Waypa GB, Smith KA, Schumacker PT. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Mol Aspects Med*. 2016;47-48:76-89.
137. Liu M, Galli G, Wang Y, Fan Q, Wang Z, Wang X, et al. Novel Therapeutic Targets for Hypoxia-Related Cardiovascular Diseases: The Role of HIF-1. *Front Physiol*. 2020;11:774.
138. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-85.
139. Bouhamida E, Morciano G, Perrone M, Kahsay AE, Della Sala M, Wieckowski MR, et al. The Interplay of Hypoxia Signaling on Mitochondrial Dysfunction and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Approaches. *Biology (Basel)*. 2022;11(2).
140. Wu Z, Zuo M, Zeng L, Cui K, Liu B, Yan C, et al. OMA1 reprograms metabolism under hypoxia to promote colorectal cancer development. *EMBO Rep*. 2021;22(1):e50827.
141. Jin J, Qiu S, Wang P, Liang X, Huang F, Wu H, et al. Cardamonin inhibits breast cancer growth by repressing HIF-1 α -dependent metabolic reprogramming. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):377.
142. Gao YH, Li CX, Shen SM, Li H, Chen GQ, Wei Q, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α mediates the down-regulation of superoxide dismutase 2 in von Hippel-Lindau deficient renal clear cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435(1):46-51.
143. Lu H, Samanta D, Xiang L, Zhang H, Hu H, Chen I, et al. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):E4600-9.
144. Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Perrone M, Mantovani CM, Anania G, et al. Understanding the Role of Autophagy in Cancer Formation and Progression Is a Real Opportunity to Treat and Cure Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22).
145. Chiche J, Rouleau M, Gounon P, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol*. 2010;222(3):648-57.
146. Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, et al. Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell*. 2011;44(4):532-44.
147. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*. 2007;11(5):407-20.
148. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ*. 2015;22(9):1399-401.
149. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14.
150. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*. 2009;29(10):2570-81.
151. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res*. 2001;61(18):6669-73.
152. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):177-85.

153. Araki K, Kawauchi K, Sugimoto W, Tsuda D, Oda H, Yoshida R, et al. Mitochondrial protein E2F3d, a distinctive E2F3 product, mediates hypoxia-induced mitophagy in cancer cells. *Commun Biol.* 2019;2:3.
154. Sandoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda).* 2014;29(3):168-76.
155. Bekker M, Abrahams S, Loos B, Bardien S. Can the interplay between autophagy and apoptosis be targeted as a novel therapy for Parkinson's disease? *Neurobiol Aging.* 2021;100:91-105.
156. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-20.
157. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
158. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis.* 2002;7(5):433-40.
159. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1378-86.
160. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.
161. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996;86(1):147-57.
162. Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):532-42.
163. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 2002;9(2):423-32.
164. Dadsena S, King LE, Garcia-Saez AJ. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2021;1863(12):183716.
165. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
166. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63.
167. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem.* 2014;115(4):632-40.
168. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
169. Gomez-Fernandez JC. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the Bcl-2 family. *Chem Phys Lipids.* 2014;183:77-90.
170. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res.* 2001;306(3):347-61.
171. Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(51):20327-32.
172. Griffiths GJ, Corfe BM, Savory P, Leech S, Esposti MD, Hickman JA, et al. Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the proapoptotic protein Bak. *Oncogene.* 2001;20(52):7668-76.
173. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(4):521-31.
174. Raemy E, Martinou JC. Involvement of cardiolipin in tBID-induced activation of BAX during apoptosis. *Chem Phys Lipids.* 2014;179:70-4.

175. Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell*. 2013;152(3):519-31.
176. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*. 2011;145(1):104-16.
177. Schellenberg B, Wang P, Keeble JA, Rodriguez-Enriquez R, Walker S, Owens TW, et al. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell*. 2013;49(5):959-71.
178. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Youle RJ, Edlich F. The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013;20(2):333-42.
179. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2009;36(3):487-99.
180. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 2005;17(4):525-35.
181. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002;2(3):183-92.
182. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. 2000;14(16):2060-71.
183. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*. 2007;315(5813):856-9.
184. Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis*. 2007;12(5):897-911.
185. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90.
186. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9082-7.
187. Guo K, Searfoss G, Krolkowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*. 2001;8(4):367-76.
188. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*. 2004;199(1):113-24.
189. Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2005;96(7):394-402.
190. Liu XH, Yu EZ, Li YY, Kagan E. HIF-1alpha has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J Cell Biochem*. 2006;97(4):755-65.
191. Palladino MA, Shah A, Tyson R, Horvath J, Dugan C, Karpodinis M. Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) is a candidate target gene of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the testis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:104.
192. Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, et al. BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2009;284(15):10004-12.
193. Menrad H, Werno C, Schmid T, Copanaki E, Deller T, Dehne N, et al. Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*. 2010;51(6):2183-92.

194. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol.* 2004;24(7):2875-89.
195. Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem.* 2003;10(16):1535-51.
196. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 2008;40(3):171-82.
197. Sunil C, Kaul RW. *Mortalin Biology: Life, Stress and Death.* Netherlands: Springer; 2012.
198. Ecroyd H, Carver JA. Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life.* 2008;60(12):769-74.
199. Tatsuta T. Protein quality control in mitochondria. *J Biochem.* 2009;146(4):455-61.
200. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science.* 1986;232(4749):522-4.
201. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84(3):389-98.
202. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3758-69.
203. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
204. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(19):6455-9.
205. Karlin S, Brocchieri L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol.* 1998;47(5):565-77.
206. Wadhwa R, Kaul SC, Sugimoto Y, Mitsui Y. Induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1993;268(30):22239-42.
207. Kaul SC, Duncan EL, Englezou A, Takano S, Reddel RR, Mitsui Y, et al. Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of mot-2 protein. *Oncogene.* 1998;17(7):907-11.
208. Wadhwa R, Akiyama S, Sugihara T, Reddel RR, Mitsui Y, Kaul SC. Genetic differences between the pancytosolic and perinuclear forms of murine mortalin. *Exp Cell Res.* 1996;226(2):381-6.
209. Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol.* 2007;42(4):263-74.
210. Wadhwa R, Kaul SC, Ikawa Y, Sugimoto Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6615-21.
211. Xie H, Hu Z, Chyna B, Horrigan SK, Westbrook CA. Human mortalin (HSPA9): a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on 5q31. *Leukemia.* 2000;14(12):2128-34.
212. Michikawa Y, Baba T, Arai Y, Sakakura T, Kusakabe M. Structure and organization of the gene encoding a mouse mitochondrial stress-70 protein. *FEBS Lett.* 1993;336(1):27-33.
213. Pilzer D, Fishelson Z. Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis. *Int Immunol.* 2005;17(9):1239-48.
214. Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol.* 1993;13(6):3598-610.

215. Massa SM, Longo FM, Zuo J, Wang S, Chen J, Sharp FR. Cloning of rat grp75, an hsp70-family member, and its expression in normal and ischemic brain. *J Neurosci Res.* 1995;40(6):807-19.
216. Dahlseid JN, Lill R, Green JM, Xu X, Qiu Y, Pierce SK. PBP74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein. *Mol Biol Cell.* 1994;5(11):1265-75.
217. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(3):379-404.
218. Webster TJ, Naylor DJ, Hartman DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ. cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. *DNA Cell Biol.* 1994;13(12):1213-20.
219. Amick J, Schlanger SE, Wachnowsky C, Moseng MA, Emerson CC, Dare M, et al. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of mortalin, the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Protein Sci.* 2014;23(6):833-42.
220. Smock RG, Rivoire O, Russ WP, Swain JF, Leibler S, Ranganathan R, et al. An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Mol Syst Biol.* 2010;6:414.
221. Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8471-6.
222. Bhattacharya A, Kurochkin AV, Yip GN, Zhang Y, Bertelsen EB, Zuiderweg ER. Allostery in Hsp70 chaperones is transduced by subdomain rotations. *J Mol Biol.* 2009;388(3):475-90.
223. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):670-84.
224. Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A. The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2006;156:1-21.
225. Kabani M. Structural and functional diversity among eukaryotic Hsp70 nucleotide exchange factors. *Protein Pept Lett.* 2009;16(6):623-60.
226. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell.* 2009;138(4):628-44.
227. Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, et al. Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J.* 2003;22(20):5370-81.
228. van der Laan M, Hutu DP, Rehling P. On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(6):732-9.
229. Manning-Krieg UC, Scherer PE, Schatz G. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* 1991;10(11):3273-80.
230. Rowley N, Prip-Buus C, Westermann B, Brown C, Schwarz E, Barrell B, et al. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell.* 1994;77(2):249-59.
231. Savel'ev AS, Novikova LA, Kovaleva IE, Luzikov VN, Neupert W, Langer T. ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20596-602.
232. Saveliev AS, Kovaleva IE, Novikova LA, Isaeva LV, Luzikov VN. Can foreign proteins imported into yeast mitochondria interfere with PIM1p protease and/or chaperone function? *Arch Biochem Biophys.* 1999;363(2):373-6.
233. Wagner I, van Dyck L, Savel'ev AS, Neupert W, Langer T. Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. *EMBO J.* 1997;16(24):7317-25.

234. Ma Z, Izumi H, Kanai M, Kabuyama Y, Ahn NG, Fukasawa K. Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53. *Oncogene*. 2006;25(39):5377-90.
235. Stearns T. Centrosome duplication. a centriolar pas de deux. *Cell*. 2001;105(4):417-20.
236. Kanai M, Ma Z, Izumi H, Kim SH, Mattison CP, Winey M, et al. Physical and functional interaction between mortalin and Mps1 kinase. *Genes Cells*. 2007;12(6):797-810.
237. Kuwabara H, Yoneda M, Hayasaki H, Nakamura T, Mori H. Glucose regulated proteins 78 and 75 bind to the receptor for hyaluronan mediated motility in interphase microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(3):971-6.
238. Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, et al. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*. 1995;82(1):19-26.
239. Mizukoshi E, Suzuki M, Loupatov A, Uruno T, Hayashi H, Misono T, et al. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. *Biochem J*. 1999;343 Pt 2(Pt 2):461-6.
240. Mizukoshi E, Suzuki M, Misono T, Loupatov A, Munekata E, Kaul SC, et al. Cell-cycle dependent tyrosine phosphorylation on mortalin regulates its interaction with fibroblast growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(4):1203-9.
241. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):104-13.
242. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81-137.
243. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2000;275(21):16202-12.
244. Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(15):7262-6.
245. Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocarís CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, et al. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2006;118(12):2973-80.
246. Kaul SC, Reddel RR, Mitsui Y, Wadhwa R. An N-terminal region of mot-2 binds to p53 in vitro. *Neoplasia*. 2001;3(2):110-4.
247. Iosefson O, Azem A. Reconstitution of the mitochondrial Hsp70 (mortalin)-p53 interaction using purified proteins--identification of additional interacting regions. *FEBS Lett*. 2010;584(6):1080-4.
248. Lu WJ, Lee NP, Kaul SC, Lan F, Poon RT, Wadhwa R, et al. Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. *Int J Cancer*. 2011;129(8):1806-14.
249. Elwakeel A. Abrogating the Interaction Between p53 and Mortalin (Grp75/HSPA9/mtHsp70) for Cancer Therapy: The Story so far. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:879632.
250. Wadhwa R, Sugihara T, Yoshida A, Nomura H, Reddel RR, Simpson R, et al. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res*. 2000;60(24):6818-21.
251. Yoo JY, Ryu J, Gao R, Yaguchi T, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Tumor suppression by apoptotic and anti-angiogenic effects of mortalin-targeting adeno-oncolytic virus. *J Gene Med*. 2010;12(7):586-95.
252. Nigam N, Grover A, Goyal S, Katiyar SP, Bhargava P, Wang PC, et al. Targeting Mortalin by Embelin Causes Activation of Tumor Suppressor p53 and Deactivation of Metastatic Signaling in Human Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138192.



253. Feng S, Huang Q, Deng J, Jia W, Gong J, Xie D, et al. DAB2IP suppresses tumor malignancy by inhibiting GRP75-driven p53 ubiquitination in colon cancer. *Cancer Lett.* 2022;532:215588.
254. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010-4.
255. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11(3):577-90.
256. Bayly-Jones C, Bubeck D, Dunstone MA. The mystery behind membrane insertion: a review of the complement membrane attack complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1726).
257. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol.* 2003;40(2-4):109-23.
258. Rozenberg P, Ziporen L, Gancz D, Saar-Ray M, Fishelson Z. Cooperation between Hsp90 and mortalin/GRP75 in resistance to cell death induced by complement C5b-9. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):150.
259. Sacht G, Brigelius-Flohe R, Kiess M, Sztajer H, Flohe L. ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I. *Biofactors.* 1999;9(1):49-60.
260. Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 2006;175(6):901-11.
261. Takano S, Wadhwa R, Mitsui Y, Kaul SC. Identification and characterization of molecular interactions between glucose-regulated proteins (GRPs) mortalin/GRP75/peptide-binding protein 74 (PBP74) and GRP94. *Biochem J.* 2001;357(Pt 2):393-8.
262. Esfahanian N, Knoblich CD, Bowman GA, Rezvani K. Mortalin: Protein partners, biological impacts, pathological roles, and therapeutic opportunities. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1028519.
263. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):272-82.
264. Massy ZA, Keane WF, Kasiske BL. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet.* 1996;347(8994):102-3.
265. Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Taira K, Kaul SC. Mortalin-MPD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(4):735-42.
266. Sun J, Che SL, Piao JJ, Xu M, Chen LY, Lin ZH. Mortalin overexpression predicts poor prognosis in early stage of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2017;39(3):1010428317695918.
267. Zhang R, Meng Z, Wu X, Zhang M, Zhang S, Jin T. Mortalin promotes breast cancer malignancy. *Exp Mol Pathol.* 2021;118:104593.
268. Cheng W, Zhang B, Zikeliyar M, Wang J, Jian H, Wu K, et al. Elevated Mortalin correlates with poor outcome in hepatocellular carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2019;42:59-63.
269. Putri JF, Bhargava P, Dhanjal JK, Yaguchi T, Sundar D, Kaul SC, et al. Mortaparib, a novel dual inhibitor of mortalin and PARP1, is a potential drug candidate for ovarian and cervical cancers. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):499.
270. Xu M, Jin T, Chen L, Zhang X, Zhu G, Wang Q, et al. Mortalin is a distinct bio-marker and prognostic factor in serous ovarian carcinoma. *Gene.* 2019;696:63-71.
271. Dai Y, Li F, Jiao Y, Wang G, Zhan T, Xia Y, et al. Mortalin/glucose-regulated protein 75 promotes the cisplatin-resistance of gastric cancer via regulating anti-oxidation/apoptosis and metabolic reprogramming. *Cell Death Discov.* 2021;7(1):140.

272. Javid H, Hashemian P, Yazdani S, Sharbaf Mashhad A, Karimi-Shahri M. The role of heat shock proteins in metastatic colorectal cancer: A review. *J Cell Biochem.* 2022;123(11):1704-35.
273. Rozenberg P, Kocsis J, Saar M, Prohaszka Z, Fust G, Fishelson Z. Elevated levels of mitochondrial mortalin and cytosolic HSP70 in blood as risk factors in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2013;133(2):514-8.
274. Dundas SR, Lawrie LC, Rooney PH, Murray GI. Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *J Pathol.* 2005;205(1):74-81.
275. Huang MB, Xia M, Gao Z, Zhou H, Liu M, Huang S, et al. Characterization of Exosomes in Plasma of Patients with Breast, Ovarian, Prostate, Hepatic, Gastric, Colon, and Pancreatic Cancers. *J Cancer Ther.* 2019;10(5):382-99.
276. Sadej R, Grudowska A, Turczyk L, Kordek R, Romanska HM. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. *Lab Invest.* 2014;94(1):41-51.
277. Liu LX, Lu JC, Zeng HY, Cai JB, Zhang PF, Guo XJ, et al. Mortalin stabilizes CD151-dependent tetraspanin-enriched microdomains and implicates in the progression of hepatocellular carcinoma. *J Cancer.* 2019;10(25):6199-206.
278. Sane S, Abdullah A, Nelson ME, Wang H, Chauhan SC, Newton SS, et al. Structural studies of UBXN2A and mortalin interaction and the putative role of silenced UBXN2A in preventing response to chemotherapy. *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(2):313-26.
279. Hu Y, Yang L, Yang Y, Han Y, Wang Y, Liu W, et al. Oncogenic role of mortalin contributes to ovarian tumorigenesis by activating the MAPK-ERK pathway. *J Cell Mol Med.* 2016;20(11):2111-21.
280. Wu PK, Hong SK, Veeranki S, Karkhanis M, Starenki D, Plaza JA, et al. A mortalin/HSPA9-mediated switch in tumor-suppressive signaling of Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biol.* 2013;33(20):4051-67.
281. Yang L, Guo W, Zhang Q, Li H, Liu X, Yang Y, et al. Crosstalk between Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT in suppression of Bax conformational change by Grp75 under glucose deprivation conditions. *J Mol Biol.* 2011;414(5):654-66.
282. Ryu J, Kaul Z, Yoon AR, Liu Y, Yaguchi T, Na Y, et al. Identification and functional characterization of nuclear mortalin in human carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2014;289(36):24832-44.
283. Yun CO, Bhargava P, Na Y, Lee JS, Ryu J, Kaul SC, et al. Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci Rep.* 2017;7:42016.
284. Na Y, Kaul SC, Ryu J, Lee JS, Ahn HM, Kaul Z, et al. Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Cancer Res.* 2016;76(9):2754-65.
285. Wei B, Cao J, Tian JH, Yu CY, Huang Q, Yu JJ, et al. Mortalin maintains breast cancer stem cells stemness via activation of Wnt/GSK3beta/beta-catenin signaling pathway. *Am J Cancer Res.* 2021;11(6):2696-716.
286. Υφαντής Α. Η επίδραση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 στους μηχανισμούς απόπτωσης και σχηματισμού κοκκιδίων του στρες; Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας; 2017.
287. Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr Purif.* 1999;15(1):34-9.
288. Luo WI, Dizin E, Yoon T, Cowan JA. Kinetic and structural characterization of human mortalin. *Protein Expr Purif.* 2010;72(1):75-81.
289. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
290. Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(2):165-74.

291. Hielscher A, Gerecht S. Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free Radic Biol Med.* 2015;79:281-91.
292. Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(5):268-83.
293. Sverchinsky DV, Nikotina AD, Komarova EY, Mikhaylova ER, Aksenov ND, Lazarev VF, et al. Etoposide-Induced Apoptosis in Cancer Cells Can Be Reinforced by an Uncoupled Link between Hsp70 and Caspase-3. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
294. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(10):607-32.
295. Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinnes FP, Hilschmann N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(9):1059-70.
296. Magri A, Reina S, De Pinto V. VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis. *Front Chem.* 2018;6:108.
297. Mazure NM. VDAC in cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017;1858(8):665-73.
298. Shoshan-Barmatz V, Shteinfer-Kuzmine A, Verma A. VDAC1 at the Intersection of Cell Metabolism, Apoptosis, and Diseases. *Biomolecules.* 2020;10(11).
299. Adachi M, Higuchi H, Miura S, Azuma T, Inokuchi S, Saito H, et al. Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(3):G695-705.
300. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(9):7610-8.
301. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999;399(6735):483-7.
302. Geula S, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins. *Biochem J.* 2012;444(3):475-85.
303. Arbel N, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J Biol Chem.* 2012;287(27):23152-61.
304. Abu-Hamad S, Arbel N, Calo D, Arzoine L, Israelson A, Keinan N, et al. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 11):1906-16.
305. Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3100-5.
306. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ.* 2015;22(2):364.
307. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* 2006;25(34):4777-86.
308. Sukumaran SK, Fu NY, Tin CB, Wan KF, Lee SS, Yu VC. A soluble form of the pilus protein FimA targets the VDAC-hexokinase complex at mitochondria to suppress host cell apoptosis. *Mol Cell.* 2010;37(6):768-83.
309. Cheung EC, Ludwig RL, Vousden KH. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(50):20491-6.
310. Ramraj SK, Elayapillai SP, Pelikan RC, Zhao YD, Isingizwe ZR, Kennedy AL, et al. Novel ovarian cancer maintenance therapy targeted at mortalin and mutant p53. *Int J Cancer.* 2020;147(4):1086-97.

311. Yang L, Li H, Jiang Y, Zuo J, Liu W. Inhibition of mortalin expression reverses cisplatin resistance and attenuates growth of ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2013;336(1):213-21.
312. Starenki D, Hong SK, Lloyd RV, Park JI. Mortalin (GRP75/HSPA9) upregulation promotes survival and proliferation of medullary thyroid carcinoma cells. *Oncogene.* 2015;34(35):4624-34.
313. Starenki D, Sosonkina N, Hong SK, Lloyd RV, Park JI. Mortalin (GRP75/HSPA9) Promotes Survival and Proliferation of Thyroid Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
314. Yang Y, Jin M, Dai Y, Shan W, Chen S, Cai R, et al. Involvement and Targeted Intervention of Mortalin-Regulated Proteome Phosphorylated-Modification in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:687871.
315. Park SH, Baek KH, Shin I, Shin I. Subcellular Hsp70 Inhibitors Promote Cancer Cell Death via Different Mechanisms. *Cell Chem Biol.* 2018;25(10):1242-54 e8.
316. Sane S, Hafner A, Srinivasan R, Masood D, Slunecka JL, Noldner CJ, et al. UBXN2A enhances CHIP-mediated proteasomal degradation of oncoprotein mortalin-2 in cancer cells. *Mol Oncol.* 2018;12(10):1753-77.
317. Sari AN, Elwakeel A, Dhanjal JK, Kumar V, Sundar D, Kaul SC, et al. Identification and Characterization of Mortaparib(Plus)-A Novel Triazole Derivative That Targets Mortalin-p53 Interaction and Inhibits Cancer-Cell Proliferation by Wild-Type p53-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cancers (Basel).* 2021;13(4).
318. Wu PK, Hong SK, Starenki D, Oshima K, Shao H, Gestwicki JE, et al. Mortalin/HSPA9 targeting selectively induces KRAS tumor cell death by perturbing mitochondrial membrane permeability. *Oncogene.* 2020;39(21):4257-70.
319. Albakova Z, Mangasarova Y, Albakov A, Gorenkova L. HSP70 and HSP90 in Cancer: Cytosolic, Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Chaperones of Tumorigenesis. *Front Oncol.* 2022;12:829520.
320. Yoon AR, Wadhwa R, Kaul SC, Yun CO. Why is Mortalin a Potential Therapeutic Target for Cancer? *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:914540.

Direct interaction between mortalin and HIF-1 α at the mitochondria inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax

Angelos Yfantis¹, Ilias Mylonis¹  and George Simos^{1,2} 

1 Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

2 Gerald Bronfman Department of Oncology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada

Keywords

Bax; HIF-1 α ; hypoxia; mitochondria; mortalin

Correspondence

G. Simos, Laboratory of Biochemistry,
 Faculty of Medicine, University of Thessaly,
 Biopolis 41500, Larissa, Greece
 Tel: +30 2410 685723
 E-mail: simos@med.uth.gr

(Received 9 November 2022, revised 25
 January 2023, accepted 23 February 2023)

doi:10.1111/febs.16762

Hypoxia-inducible factor-1, a heterodimer of alpha (HIF-1 α) and beta (HIF-1 β or ARNT) subunits, is a major regulator of the transcriptional response to hypoxia. However, HIF-1 α , the oxygen-regulated subunit, also exerts non-transcriptional functions through interaction with proteins other than ARNT. We have previously shown that the subcellular localization and protein interactions of HIF-1 α are controlled by ERK-mediated phosphorylation at Ser641/643. When HIF-1 α is modified at these sites, it is nuclear, binds to ARNT, interacts with nucleophosmin 1 (NPM1) and activates transcription of hypoxia-target genes. On the contrary, unmodified HIF-1 α is bound by chromosomal region maintenance 1 (CRM1), exits the nucleus and, via its association with mortalin, is targeted to the mitochondria to form an anti-apoptotic complex. To further characterize the latter function, recombinant fragments of HIF-1 α and mortalin were used for *in vitro* binding assays and immunoprecipitation experiments to map the respective binding sites and show that their interaction is direct and functional. We could also show that embelin, a natural product and known inhibitor of the mortalin-p53 interaction, also disrupts the mortalin-HIF-1 α association and, furthermore, removes unmodified HIF-1 α from mitochondria. Mitochondrial dissociation of HIF-1 α , either by embelin or overexpression of a HIF-1 α peptide harbouring the mortalin binding site, under stress conditions leads to mitochondrial localization of the pro-apoptotic protein B-cell lymphoma 2-associated X protein (Bax) and induction of apoptosis. We suggest that when ERK activity is low under hypoxia, binding of HIF-1 α to mortalin inhibits mitochondrial recruitment of Bax and protects cells from apoptotic cell death.

Abbreviations

AEBSF, 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra-large; BNiP3, Bcl-2 adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3; BNiP3L, Bcl-2 adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3-like; BSA, bovine serum albumin; CSA, Cockayne syndrome A; DMSO, dimethylsulfoxide; DTT, dithiothreitol; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; ETC, electron transport chain; ETD, ERK-targeted domain; FBS, fetal bovine serum; GFP, green fluorescent protein; GRP75, 75 kDa glucose-regulated protein; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; HKII, hexokinase II; HRE, hypoxia response elements; HSPA9, heat-shock 70 kDa protein 9; IMF, immunofluorescence; IP, immunoprecipitation; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; JACoP, just another co-localization plugin; MEK, mitogen-activated protein kinase; MOM, mitochondrial outer membrane; mtHSP70, mitochondrial 70 kDa heat-shock protein; MTS, mitochondrial targeting signal; NBD, nucleotide-binding domain; NTA, nitrilotriacetic acid; PBP74, peptide-binding protein 74; PBS, phosphate-buffered saline; PHD, prolyl hydroxylase domain; ROS, reactive oxygen species; SBD, substrate-binding domain; SDS/PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; TCA, tricarboxylic acid; TIGAR, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator; VD, variable domain; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1; VHL, Von Hippel Lindau; WB, Western blotting.

Introduction

All large living organisms on earth, face the fundamental need of maintaining oxygen homeostasis, that is, maintaining the balance between oxygen demand and supply. This is not only crucial for their metabolic requirements and oxidative phosphorylation but also for various other cellular biochemical reactions that involve oxygen as a substrate [1]. Oxygen deprivation or hypoxia can be encountered under both physiological situations or processes, such as vigorous muscle exercise, living at high altitudes and embryogenesis and pathological conditions, including ischaemia, anaemia and cancer [2]. The master transcriptional regulators of the cellular response to hypoxia are the heterodimeric hypoxia-inducible factors (HIFs) that stimulate at the transcriptional level angiogenesis, metabolic reprogramming and many other adaptive processes [3]. Survival of normal cells in ischaemic tissues and adaptation of cancer cells to the hypoxic microenvironment of solid tumours greatly depends on the activation of HIFs [4].

Hypoxia-inducible factors comprise a constitutively expressed HIF- β subunit [also called aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)] and a HIF- α subunit, the protein levels of which are regulated by oxygen. In well-oxygenated cells, HIF- α is modified by oxygen-sensing prolyl-hydroxylases (PHDs) and this modification then mediates association with a pVHL-containing E3 ligase complex, subsequent polyubiquitylation of HIF- α and degradation at the 26S proteasome. Under low oxygen conditions, PHDs are inactivated, HIF- α is stabilized, dimerizes with ARNT inside the nucleus, binds to hypoxia response elements of hypoxia-target genes and stimulates their transcription [5–10].

Hypoxia-inducible factor-1 α , the ubiquitously expressed and most studied HIF- α isoform, in addition to its oxygen-dependent regulation, is also controlled by oncogenic signalling pathways, protein interactions and various post-translational modifications not directly involving oxygen [11]. We have previously shown that phosphorylation of HIF-1 α at Ser641 and/or 643 by extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) stimulates its transcriptional activity by masking an adjacent nuclear export signal in HIF-1 α , blocking its nuclear exit and mediating its interaction with the histone chaperone nucleophosmin 1 [12,13].

On the other hand, when modification by ERK1/2 is blocked by chemical ERK1/2 inactivators, mutation of the ERK1/2 phospho-sites or overexpression of a HIF-1 α peptide encompassing the ERK1/2 phospho-sites (amino acids 616–658, termed ERK1/2-targeted

domain or ETD), unmodified HIF-1 α exits the nucleus and is bound by mortalin (also known as HSPA9/PBP74/Grp75/CSA/mtHsp70) [14]. Binding by mortalin targets HIF-1 α to the mitochondrial outer membrane (MOM), where it associates with a complex also containing hexokinase II (HKII) and voltage-dependent anion channel (VDAC1). The formation of this mitochondrial HIF-1 α -containing complex protects cells from apoptosis when ERK1/2 is inhibited concomitant with hypoxia or when normoxic cells are treated with cytotoxic agents such as etoposide [14].

Mortalin is the only heat-uninducible member of the 70 kDa (HSP70) protein family, localized predominantly at mitochondria, although it has also been detected in other subcellular compartments (e.g. nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, cytoplasmic vesicles, etc), with a multitude of proposed functions, among which predominate mitochondrial homeostasis, protection from apoptosis and support of cancer cell survival under radio- or chemotherapy [15,16]. In agreement with its latter role, mortalin is overexpressed in different cancer types at both mRNA and protein levels and has been considered a target of anticancer therapy [17–19].

According to its homology with other members of the HSP70 family, mortalin protein architecture comprises a mitochondrial targeting signal unique in mortalin [mitochondrial targeting signal (MTS); amino acids 1–46], a nucleotide-binding domain (NBD; amino acids 51–431) and a substrate-binding domain (SBD; amino acids 441–597) both conserved in the HSP70 family. The C-terminal part of mortalin is also unique and is called variable domain (VD; 598–679) [20]. One of the major oncogenic and antiapoptotic roles of mortalin is the inactivation of the tumour suppressor protein p53, by forming a protein–protein complex that sequesters p53 in the cytoplasm [21,22]. In the context of developing new anticancer therapeutic approaches, the mortalin/p53 interaction has been targeted by various compounds [19,23], including embelin, a natural quinone that binds to the mortalin-NBD domain and abrogates its interaction with p53 [24].

Activation of p53 under stress conditions can stimulate apoptosis both in the nucleus through transcription of several genes encoding pro-apoptotic proteins of the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family, and in the cytoplasm through physical interaction with members of this family, such as Bcl-2-associated X protein (Bax) and Bak [25–28]. Bax, in particular, resides in the cytosol in healthy cells but under apoptotic conditions, it accumulates at the MOM, where it oligomerizes and mediates MOM permeabilization, leading

to the release of cytochrome c to the cytosol and activation of the caspase cascade [29]. Thus, the translocation of Bax and its accumulation at the mitochondria marks the initiation of the intrinsic or mitochondrial apoptotic pathway.

The aim of this work was the further structural and functional characterization of the association between mortalin and HIF-1 α and its effect on the apoptotic machinery. We have shown that HIF-1 α associates with mortalin through direct physical interaction between the SBD part of mortalin and the ETD part of HIF-1 α , under the control of its phosphorylation by ERK. Furthermore, our results suggest that the HIF-1 α /mortalin complex inhibits apoptosis by blocking the mitochondrial recruitment of Bax, thus revealing novel pro-survival functions of both mortalin and HIF-1 α , which are important for cancer cells grown under low oxygen conditions characterizing the solid tumour microenvironment.

Results

The interaction between HIF-1 α and mortalin is direct and mediated by the HIF-1 α ETD domain and the mortalin-SBD-VD parts

We have previously [14] identified mortalin as a HeLa cell protein associating with HIF-1 α lacking phosphorylation at the ERK sites (Ser641 and Ser643), hereinafter referred to as unmodified HIF-1 α . This association was responsible for targeting unmodified HIF-1 α to the MOM and, subsequently, inhibiting apoptosis under stress conditions. To further characterize this pro-survival function of both mortalin and HIF-1 α , we examined, first, whether their association is through direct physical contact or indirect, through an as yet uncharacterized factor, using *in vitro* binding assays between glutathione-S-transferase (GST)-tagged recombinant fragments of HIF-1 α in wild-type or mutant form (Fig. 1A) and His_{x6}-tagged recombinant fragments of mortalin (Fig. 1B) that had been bacterially expressed and purified. As shown in Fig. 1C (upper two panels), His_{x6}-Mort- Δ N (amino acids 51–679) bound directly to a C-terminal fragment of HIF-1 α (GST-HIF-1 α -530-826) containing the ETD sequence (amino acids 616–652), but no binding could be detected to two fragments of HIF-1 α containing the upstream or downstream of ETD adjoining amino acid sequences (GST-HIF-1 α -348-616 and GST-HIF-1 α -652-826), indicating that the mortalin/HIF-1 α is direct and mediated solely by the ETD. Furthermore, this direct interaction was sensitive to mutations of the ERK sites, as His_{x6}-Mort- Δ N could be detected bound

to ‘phosphodeficient’ mutant (GST-ETD-SA) but not to wild-type or ‘phosphomimetic’ mutant (GST-ETD-SE) form of ETD (Fig. 1C, lower two panels). We, therefore, used GST-ETD-SA as a bait in order to identify the HIF-1 α -interacting site on mortalin. As shown in Fig. 1D, we could detect strong and specific binding of His_{x6}-Mort-SBD-VD (amino acids 439–679) to GST-ETD-SA. We could also detect the binding of His_{x6}-Mort- Δ N and His_{x6}-Mort-NBD-SBD (amino acids 51–597) to GST-ETD-SA (Fig. 1D, long exposure), but it was much weaker than binding of His_{x6}-Mort-SBD-VD under the same conditions, suggesting that the NBD part of mortalin displayed an allosteric inhibitory effect on the ability of the SBD-VD part to interact stably with the ETD part of HIF-1 α . We then tested whether the binding of His_{x6}-Mort-SBD-VD to GST-ETD was dependent on its modification status as shown for full-length mortalin. As shown in Fig. 1E, His_{x6}-Mort-SBD-VD bound more strongly to the ‘phosphodeficient’ mutant (GST-ETD-SA), less strongly to the wild-type and even weaker to the ‘phosphomimetic’ mutant (GST-ETD-SE) form of ETD, suggesting that the specificity of the interaction for the unmodified form of HIF-1 α was maintained by the SBD-VD part of mortalin. There is a residual binding of His-Mort-SBD-VD to GST-ETD-WT and GST-ETD-SE, which was, however, not observed with the bigger mortalin protein fragment (Fig. 1C, lower panel) may be due to the higher affinity of SBD-VD for ETD-SA (Fig. 1D) and/or relaxation of specificity because of inefficient folding/conformation of the smaller mortalin fragment. Finally, Fig. 1F shows that the removal of the VD sequence from His_{x6}-Mort-SBD-VD did not abolish its interaction with GST-ETD-SA. However, binding of His_{x6}-Mort-SBD (amino acids 439–597) to GST-ETD-SA was weaker than that of His_{x6}-Mort-SBD-VD, suggesting that, although the interaction is predominantly mediated by the SBD part of mortalin, the VD part may contribute to the affinity of the interaction.

The free SBD-VD part of mortalin binds to unmodified HIF-1 α inside cells and inhibits its antiapoptotic function

To further validate the data reported above, we first confirmed that, much like His_{x6}-Mort- Δ N (Fig. 1C), His_{x6}-Mort-SBD-VD could also bind *in vitro* to a much larger fragment of HIF-1 α than the ETD, namely GST-HIF-1 α -530-826 (Fig. 2A). To examine whether this association can also take place inside cells retaining its specificity for unmodified HIF-1 α , a green fluorescent protein (GFP)-tagged version of the SBD-

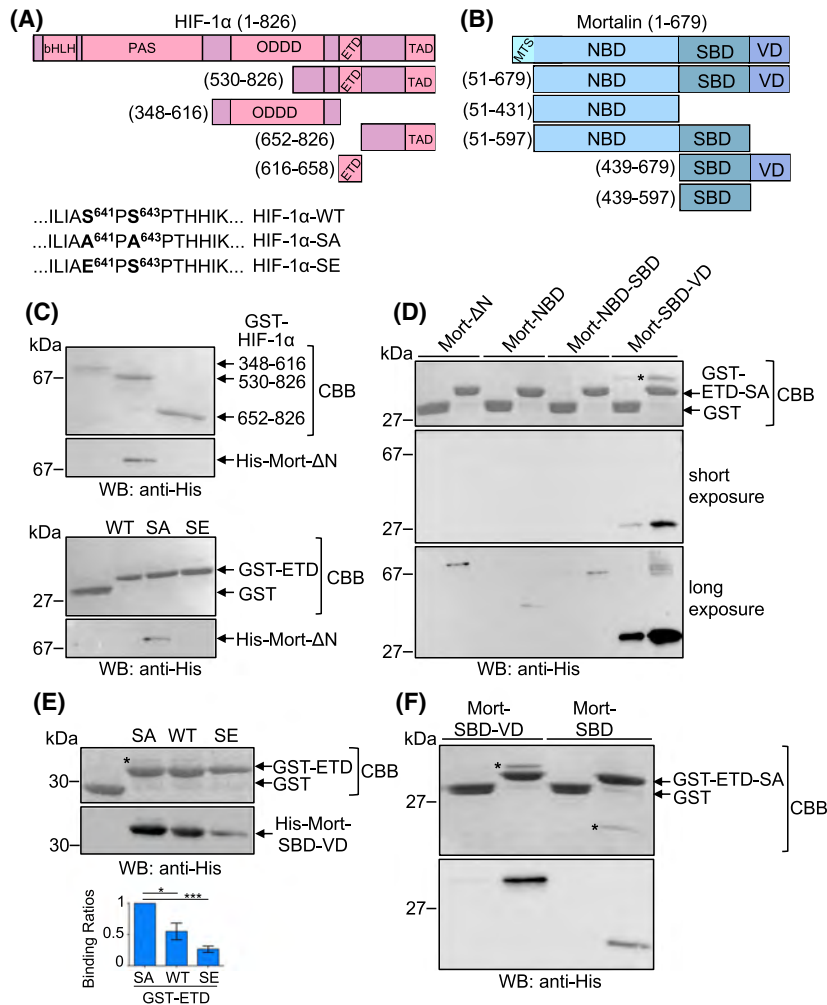


Fig. 1. The interaction between HIF-1 α and mortalin is direct and mediated by HIF-1 α ETD and the mortalin-SBD-VD parts. (A) Schematic representation of the HIF-1 α domain structure and its recombinant fragments used in this study. The amino acid sequence of wild-type (WT) HIF-1 α and its phosphodeficient (SA) or phosphomimetic (SE) mutants at the ERK target sites are also shown. (B) Schematic representation of the mortalin domain structure and its recombinant fragments used in this study. (C) The ETD part (amino acids 616–658) of HIF-1 α is both necessary and sufficient for direct binding to mortalin. SDS/PAGE, 1st and 3rd top panels (stained with Coomassie; CBB) and Western blot analysis, 2nd and 4th top panels (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized recombinant GST-HIF-1 α fragments (1st top panel; 10 μ g of each, marked by arrows) or different GST-ETD forms (3rd top panel; WT, SA, SE, 10 μ g of each) or GST alone as control (3rd top panel; 10 μ g, marked by arrow) after incubation with 3.5 μ g of His_{x6}-Mort- Δ N. (D) Binding to HIF-1 α is mediated by the SBD-VD part of mortalin while the NBD part exerts a negative effect. SDS/PAGE, 1st top panel (stained with Coomassie; CBB) and Western blot analysis, 2nd (short exposure) and 3rd (long exposure) top panels (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized GST-ETD-SA or GST alone (5 μ g of each; marked with arrows) after incubation with different His_{x6}-tagged mortalin fragments (as indicated; 15 μ g of each). The asterisk in the 1st top panel marks the His_{x6}-Mort-SBD-VD band, which is also visible by CBB staining. (E) Binding of the SBD-VD part of mortalin to HIF-1 α ETD is phosphosite specific. Top: SDS/PAGE, upper panel (stained with Coomassie; CBB) and Western blot analysis, lower panel (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized different GST-ETD forms (WT, SA, SE, 5 μ g of each) or GST alone as control after incubation with His_{x6}-Mort-SBD-VD. The asterisk in upper panel marks the His_{x6}-Mort-SBD-VD band, which is also visible by CBB staining. Bottom: Quantitative analysis of immunoblots shown above depicting the relative ratio between His-Mort-SBD-VD and GST-ETD. Columns represent the mean of three independent experiments \pm SEM ($n = 3$; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). (F) The SBD part of mortalin is sufficient for binding to HIF-1 α ETD but the VD part also contributes to their affinity. SDS/PAGE, top panel (stained with Coomassie; CBB) and Western blot analysis, bottom panel (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized GST-ETD-SA or GST alone (10 μ g of each) after incubation with either His_{x6}-Mort-SBD-VD (6 μ g) or His_{x6}-Mort-SBD (5 μ g) as indicated. The asterisks in the top panel mark the His_{x6}-Mort-SBD-VD and His_{x6}-Mort-SBD bands (from left to right), which are also visible by CBB staining.

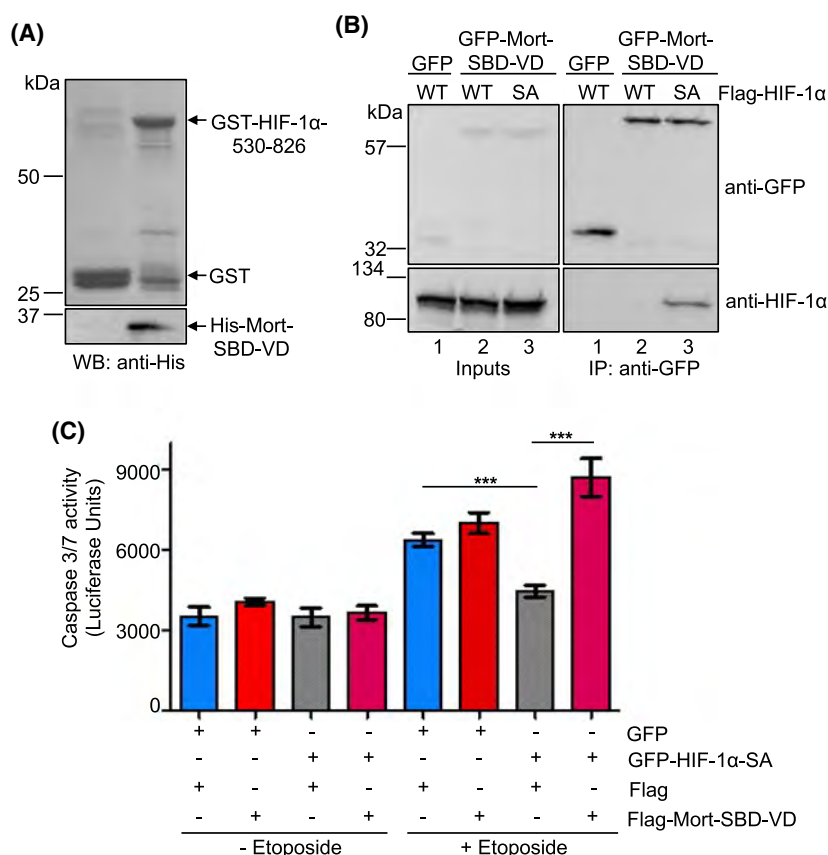


Fig. 2. The free SBD-VD part of mortalin binds to unmodified HIF-1 α inside cells and inhibits its antiapoptotic function. (A) The free SBD-VD part of mortalin binds to recombinant HIF-1 α -530-826 *in vitro*. SDS/PAGE, top panel (stained with Coomassie) and Western blot analysis, bottom panel (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized GST-HIF-1 α -530-826 or GST alone (10 μ g of each; marked with arrows) after incubation with His₆-Mort-SBD-VD (10 μ g). (B) The free SBD-VD part of mortalin associates specifically with the unmodified form of full-length HIF-1 α inside cells. Western blot analysis of soluble extracts (input; left panels) or anti-GFP immunoprecipitates (IP; right panels) of cells co-expressing GFP with Flag-HIF-1 α -WT (lanes 1), GFP-Mort-SBD-VD with Flag-HIF-1 α -WT (lanes 2) or GFP-Mort-SBD-VD with Flag-HIF-1 α -SA (lanes 3) using the indicated antibodies. (C) Overexpression of the free SBD-VD part of mortalin abolishes the protection against etoposide-induced apoptosis by unmodified HIF-1 α . Determination of caspase 3/7 activity in HeLa cells co-expressing GFP or GFP-HIF-1 α -SA with either Flag alone or Flag-mortalin-SBD-VD, as indicated, and treated 24 h post-transfection cells with either DMSO (control) or 75 μ M etoposide for 4 h. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$).

VD part of mortalin was expressed in HeLa cells together with either wild-type (WT) Flag-tagged HIF-1 α or its phosphodeficient mutant form HIF-1 α -SA. The results of immunoprecipitation experiments (Fig. 2B) could show that GFP-Mort-SBD-VD is associated stably with Flag-HIF-1 α -SA, which cannot be modified by ERK but not with Flag-HIF-1 α -WT, which is expected to be in the modified form.

We have previously shown [14] that the unmodified and transcriptionally inactive HIF-1 α -SA form, when overexpressed in normoxic HeLa cells, is targeted to the mitochondria (see also below, Fig. 4C) and inhibits etoposide-induced apoptosis in a nongenomic fashion, a property not shared by the nuclear wild-type and SE mutant forms of HIF-1 α . To test the functional

significance of the interaction between the SBD-VD part of mortalin and HIF-1 α , we assessed how Flag-Mort-SBD-VD overexpression may affect this antiapoptotic function of mitochondrial HIF-1 α . Figure 2C demonstrates that, as reported previously, expression of GFP-HIF-1 α -SA inhibited the activation of caspases 3/7 induced by etoposide treatment. However, co-expression of Flag-Mort-SBD-VD abolished this inhibition and led to the recovery of caspase 3/7 activity, suggesting that Flag-Mort-SBD-VD blocked the antiapoptotic function of mitochondrial HIF-1 α , presumably through competing efficiently with endogenous mitochondrial mortalin for binding to GFP-HIF-1 α -SA and inhibiting its association with mitochondria.

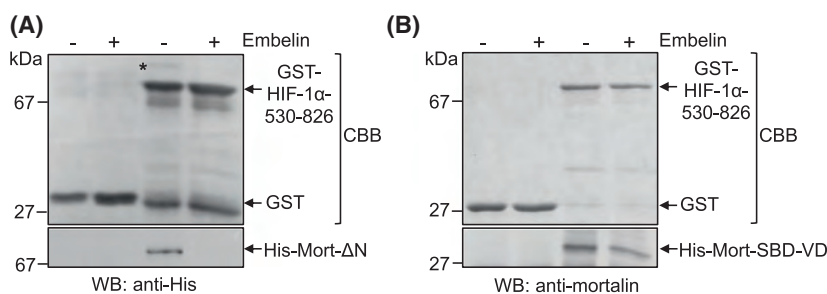


Fig. 3. Embelin inhibits the interaction between HIF-1 α and mortalin but not Mort-SBD-VD, *in vitro*. (A) SDS/PAGE, top panel (stained with Coomassie), and Western blot analysis, bottom panel (with anti-His antibody), of proteins eluted from agarose-GSH beads carrying immobilized GST-HIF-1 α -530-826 or GST alone (10 μ g of each; marked with arrows) after incubation with His_{x6}-Mort- Δ N (3.5 μ g), which has been pretreated with DMSO (control) or embelin (10 μ M) for 2 h at 4 $^{\circ}$ C. The asterisk in top panel marks the His_{x6}-Mort- Δ N band, which is also visible by Coomassie staining. (B) As in (A) but His_{x6}-Mort-SBD-VD was used instead of His_{x6}-Mort- Δ N, and an antimortalin antibody was used for Western blot analysis.

Inhibition of the mortalin/HIF-1 α interaction by embelin removes unmodified HIF-1 α from the mitochondria

It has been previously reported that mortalin binds to p53 either through its NBD [30] or through its SBD [31] and that embelin abolishes this association by interacting with and blocking the binding site on NBD [24]. We, therefore, also tested embelin as pharmacological means of affecting the mortalin/HIF-1 α interaction. As shown in Fig. 3A, embelin strongly inhibited the binding of His_{x6}-Mort- Δ N to GST-HIF-1 α -530-826 *in vitro*. However, when His_{x6}-Mort-SBD-VD was used in the same experiment, the effect of mortalin on its interaction with GST-HIF-1 α -530-826 was much weaker, if any (Fig. 3B). These results are in agreement with a previous report showing docking of embelin to the mortalin-NBD [24] and support our observation (Fig. 1D) that the NBD allosterically affects the interaction between the SBD and HIF-1 α .

We then tested the effect of embelin on the interaction between mortalin and HIF-1 α inside cells. Figure 4A shows that in HeLa cells cultured under hypoxia (1% O₂), endogenous HIF-1 α is localized predominantly inside the nucleus, while mortalin displays a punctate localization in the cytoplasm, consistent with its known predominant localization at the mitochondria. Treatment with embelin did not affect these localizations, while treatment with the mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitor U0126, which leads to ERK1/2 inactivation, as previously reported [14] caused the translocation of a substantial fraction of HIF-1 α to the cytoplasm and its co-localization with mortalin. However, combined treatment with U0126 and embelin largely abolished this co-localization, suggesting that embelin disrupted the

mortalin/HIF-1 α association also inside cells. To confirm this result, embelin was used to treat HeLa cells grown in the absence of serum, a condition previously shown to also lead to ERK1/2 inactivation and HIF-1 α co-localization with mortalin [14]. Indeed, this co-localization was largely abolished under the influence of embelin (Fig. 4B). Furthermore, Fig. 4C shows that embelin, in addition to blocking the mortalin/HIF-1 α interaction, also causes dissociation of GFP-HIF-1 α -SA from the mitochondria in normoxic HeLa cells, confirming the critical role of mortalin in targeting unmodified HIF-1 α to the MOM. Finally, the microscopic data were also verified by immunoprecipitation experiments. As shown in Fig. 4D and in agreement with our previously published results [14], the association between endogenous HIF-1 α and mortalin was clearly observed in HeLa cells grown under hypoxia when ERK1/2 activation was inhibited by U0126 but was almost undetectable in the absence of the inhibitor, demonstrating the specificity of their interaction and subsequent co-immunoprecipitation. However, this association was largely abolished when cells were co-treated with U0126 and embelin, confirming that the mortalin/HIF-1 α interaction can be blocked by embelin inside cells.

Dissociation of unmodified HIF-1 α from the mitochondria under stress conditions causes mitochondrial recruitment of Bax and induction of apoptosis

We next wished to explore the mechanism through which the presence of the mortalin/HIF-1 α complex on the MOM can lead to protection from apoptosis. The intrinsic or mitochondrial apoptotic cascade is

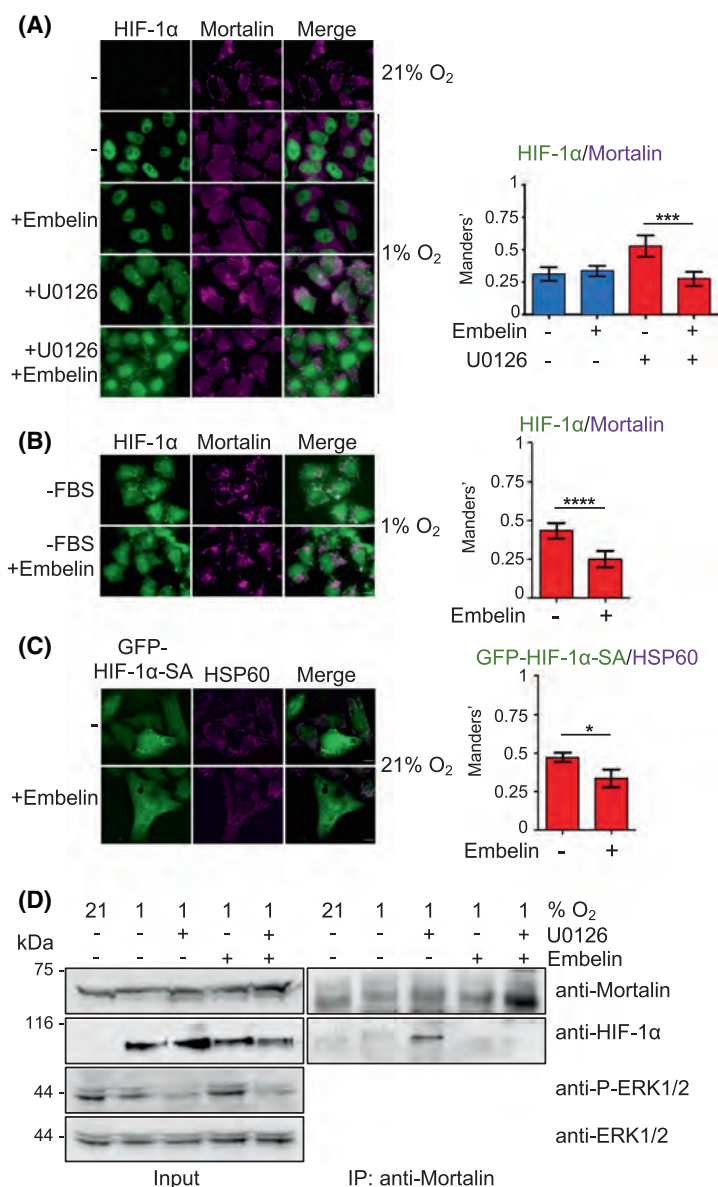


Fig. 4. Embelin inhibits the association between unmodified HIF-1 α and mortalin or the mitochondria inside cells. (A) Embelin inhibits the co-localization between endogenous HIF-1 α and mortalin under hypoxic and ERK-inhibiting conditions. Left panels: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells grown under normoxia (21% O₂; top panel) or under hypoxia (1% O₂) for 16 h without or with 5 μ M U0126 and 10 μ M Embelin alone or in combination, as indicated, using anti-HIF-1 α (green) or antimortalin (magenta) antibodies. Scale bar = 10 μ m. Right panel: Graphs depict the Manders' co-localization coefficient as measured in a total of 50 individual cells from two independent experiments in each condition \pm SEM ($***P < 0.001$). (B) Embelin inhibits the co-localization between endogenous HIF-1 α and mortalin under hypoxic and serum-starvation conditions. Left panels: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells grown under hypoxia (1% O₂) for 16 h in the absence of FBS, without or with embelin (10 μ M), using anti-HIF-1 α (green) or antimortalin (magenta) antibodies. Scale bar = 10 μ m. Right panel: Graphs depict the Manders' co-localization coefficient as measured in a total of 50 individual cells from two independent experiments in each condition \pm SEM ($****P < 0.0001$). (C) Embelin inhibits the co-localization between unmodified HIF-1 α (GFP-HIF-1 α -SA) and mitochondria under normoxia. Left panels: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells expressing GFP-HIF-1 α -SA incubated, 24 h post-transfection, without or with embelin (10 μ M) for 16 h using antibodies against mitochondrial HSP60 (green; GFP-HIF-1 α -SA, magenta). Scale bar = 10 μ m. Right panel: Graphs depict the Manders' co-localization coefficient as measured in a total of 30 individual cells from two independent experiments in each condition \pm SEM ($*P < 0.05$). (D) Embelin disrupts the association between endogenous unmodified HIF-1 α and mortalin under hypoxia. Western blot analysis of soluble extracts (input; left panels) or antimortalin immunoprecipitates (IP; right panels) of HeLa cells grown at 21% or 1% O₂ for 16 h in the absence or presence of 5 μ M U0126 or 10 μ M Embelin alone or in combination, as indicated, using the indicated antibodies.

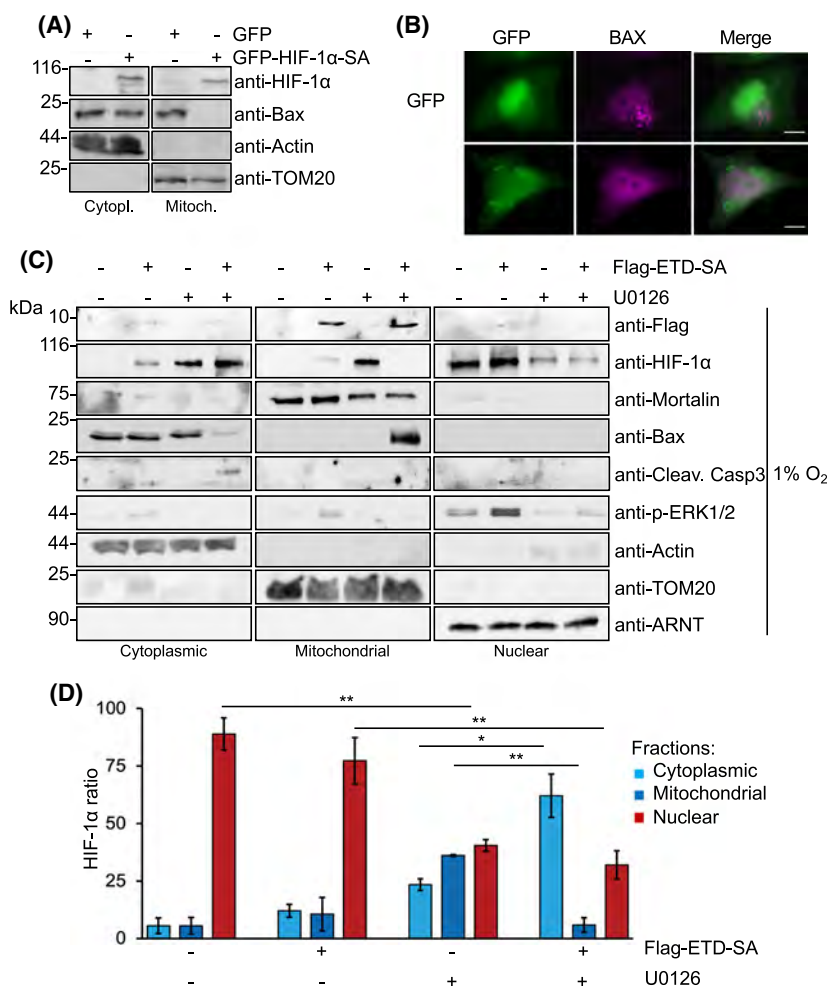


Fig. 5. Dissociation of unmodified HIF-1 α from the mitochondria under stress conditions causes mitochondrial recruitment of Bax and induction of apoptosis. (A) Expression of the unmodified form of HIF-1 α (GFP-HIF-1 α -SA) inhibits the mitochondrial association of Bax under etoposide treatment. Western blot analysis of subcellular fractions derived from HeLa cells expressing either GFP or GFP-HIF-1 α -SA and treated with 75 μ M etoposide for 4 h, using the indicated antibodies. Actin and TOM20 were used as fractionation controls. (B) Expression of the unmodified form of HIF-1 α (GFP-HIF-1 α -SA) reverses translocation of Bax by etoposide. Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells expressing either GFP or GFP-HIF-1 α -SA and incubated, 24 h post-transfection, in the presence of 75 μ M etoposide for 4 h using anti-Bax antibodies (magenta; green: GFP). Scale bar = 10 μ m. (C) Dissociation of endogenous HIF-1 α from the mitochondria under hypoxic and ERK-inhibiting conditions causes mitochondrial recruitment of Bax and caspase 3 activation. Western blot analysis of subcellular fractions derived from HeLa cells expressing Flag or Flag-ETD-SA (as indicated) and grown under hypoxia (1% O₂) for 16 h in the absence or presence of 5 μ M U0126 using the indicated antibodies. Actin, TOM20 and ARNT were used as fractionation controls. (D) Quantitative analysis of the immunoblots shown in C, depicting the HIF-1 α ratio between cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fractions after treatment (as indicated). Columns represent the mean of three independent experiments \pm SEM ($n = 3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

triggered by MOM permeabilization mediated by the pore-forming capacity of proteins Bax and Bak [32]. In the case of Bax, its activation is followed by its translocation from the cytoplasm onto the mitochondria, which can be monitored by microscopy or subcellular fractionation [29]. As shown in Fig. 5A, when control HeLa cells were treated with etoposide under normoxia and subsequently fractionated, Bax could be recovered in both cytoplasmic and mitochondrial fractions, as expected. However, in etoposide-treated cells

expressing the mitochondrially targeted GFP-HIF-1 α -SA, Bax could no longer be detected in the mitochondrial fraction, explaining, thus, the antiapoptotic function of HIF-1 α -SA. These biochemical results were also confirmed microscopically. Fig. 5B shows that in control etoposide-treated cells Bax displays a punctate localization consistent with its accumulation onto mitochondria, but in similarly treated cells expressing GFP-HIF-1 α -SA Bax remains diffuse in the cytoplasm.

To confirm these results with endogenous HIF-1 α , control HeLa cells and HeLa cells overexpressing Flag-ETD-SA (which competes with endogenous unmodified HIF-1 α for binding to mortalin) were grown under hypoxia and treated or not with U0126 in order to inhibit modification of HIF-1 α by ERK1/2 (Fig. 5C,D). Subsequent fractionation, first, showed that treatment with U0126 resulted in translocation of a significant nuclear pool of HIF-1 α (approx. 60%) to the mitochondrial and cytoplasmic fractions (containing approx. 23% and 36% of total HIF-1 α , respectively). However, in the presence of Flag-ETD-SA, the mitochondrial fraction of HIF-1 α was reduced to control levels and almost all non-nuclear HIF-1 α was recovered in the cytoplasm (now containing approx. 60% of total HIF-1 α). Concomitant with the mitochondrial removal of HIF-1 α , Bax was shown to translocate from the cytoplasmic to the mitochondrial fraction and, importantly, under the same conditions cleaved and activated caspase 3 could be detected in the cytoplasm. These data strongly support that ERK1/2 inactivation under hypoxia constitutes an apoptotic stimulus, but the mitochondrially targeted HIF-1 α averts apoptosis by blocking the association of Bax with the MOM.

To confirm the latter by pharmacological means, control HeLa cells and HeLa cells expressing mitochondrially targeted Flag-HIF-1 α -SA were treated with etoposide after incubation with embelin. As shown in Fig. 6A, Bax co-localized with mitochondria in etoposide-treated cells in both the presence and absence of embelin. However, Bax/mitochondria co-localization was impaired by expression of Flag-HIF-1 α -SA but was largely recovered when the same cells were treated with embelin, which disrupts the mortalin/HIF-1 α interaction. Similar results were also obtained, when instead of detecting endogenous Bax, we followed the localization of exogenous overexpressed GFP-Bax in cells co-expressing Flag-HIF-1 α -SA (Fig. 6B), indicating that the mortalin/HIF-1 α complex does not inhibit Bax recruitment by causing simply steric and, therefore, stoichiometric hindrance of Bax binding but rather by a more complex mechanism, possibly involving more mitochondrial membrane components. Therefore, also under etoposide-induced apoptotic conditions, the partnership between mortalin and HIF-1 α deters the initiation of the apoptotic cascade by blocking the mitochondrial recruitment of Bax.

Discussion

In cells exposed to hypoxia, the organelles affected first are the mitochondria. Low supply of oxygen

disrupts the function of the electron transport chain (ETC) and leads to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), which can damage both mitochondria and the rest of the cell and trigger apoptotic cell death [33–35]. This is largely avoided by induction of HIF-1, which activates a number of genes that counterbalance ROS production, either by changing the subunit composition of respiratory complex IV to increase the efficiency of electron transport to oxygen or by inducing lactate dehydrogenase A and pyruvate dehydrogenase kinase 1 to decrease entry of pyruvate into the TCA cycle, generation of NADH/FADH₂ and electron flux through the ETC [35]. Furthermore, HIF-1 is known to also upregulate pro-survival genes that can block the mitochondrial pathway of apoptosis. These include antiapoptotic members of the Bcl-2 family such as B-cell lymphoma-extra-large (Bcl-xL) [36], Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 and 3-like (BNiP3 and BNiP3L) [37,38] and hexokinase II (HK2) [39]. Thus, the nuclear transcriptional activity of HIF-1, which requires its phosphorylation by ERK1/2 [12,13], is thought to be largely responsible for the resistance of cancer cells to apoptosis in the hypoxic microenvironment of solid tumours.

Nevertheless, we have recently uncovered a nontranscriptional antiapoptotic role of HIF-1 α that relies on its translocation to the cytoplasm and its association with mitochondria when HIF-1 α phosphorylation by ERK1/2 is impaired [14]. The results presented in this work provide new mechanistic information by showing that the mitochondrial association of HIF-1 α is mediated by direct physical interaction between the ETD part of HIF-1 α , containing the unmodified ERK1/2 target sites, and the SBD part of mortalin. Furthermore, we could show that, under stress conditions, disruption of this interaction inside living cells, either by pharmacological means or by using recombinant protein fragments containing the binding sites as competitors, not only caused dissociation of HIF-1 α from the mitochondria but, more importantly, triggered the mitochondrial recruitment of Bax and the subsequent onset of apoptosis.

Why would such as HIF-1 α -dependent nontranscriptional mechanism be useful for cells exposed to hypoxia? Transcriptional activation of mitochondrial protective and antiapoptotic genes by HIF-1 α and production of the respective proteins is a ‘late’ response that can take a few hours. By contrast, targeting of HIF-1 α to the mitochondria by mortalin can take place as soon as continually produced HIF-1 α escapes oxygen-dependent hydroxylation and is stabilized. This is an ‘early’ response, in the range of a few minutes after exposure to low oxygen and can almost

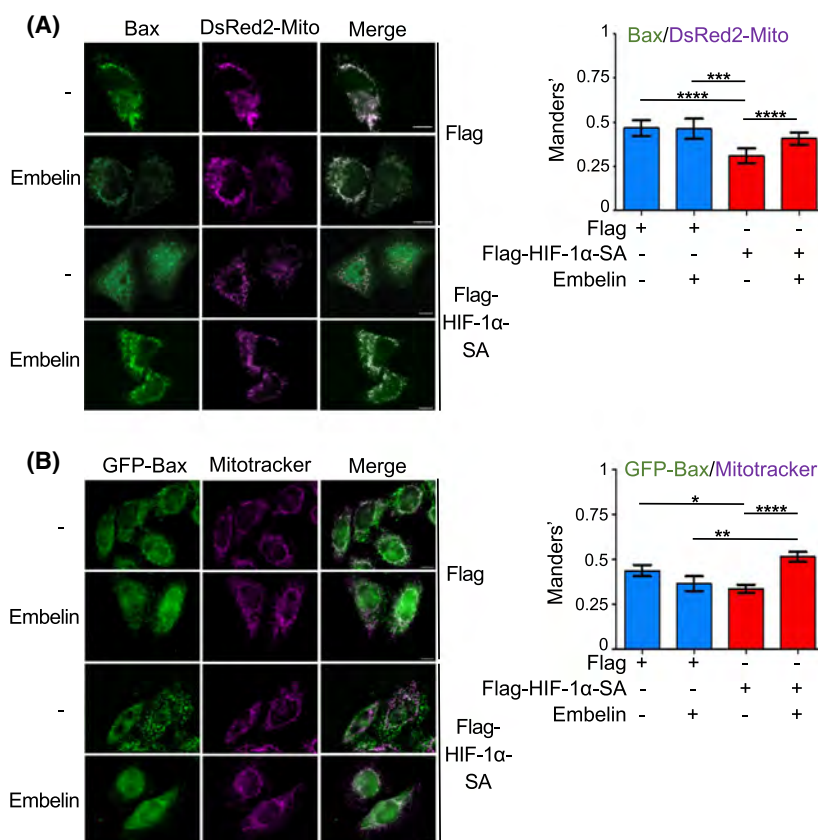


Fig. 6. Embelin counteracts the inhibitory effect of unmodified HIF-1 α on the mitochondrial recruitment of Bax. (A) Embelin abolishes the inhibitory effect of unmodified HIF-1 α (Flag-HIF-1 α -SA) on the mitochondrial recruitment of endogenous Bax. Left panels: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells co-expressing Flag or Flag-HIF-1 α -SA with a mitochondrially targeted red fluorescent protein (DsRed2-Mito), incubated, 24 h post-transfection, without or with embelin (10 μ M) for 16 h and, finally, treated with 75 μ M etoposide for 4 h using an antibody against Bax (green). DsRed2-Mito is shown by magenta. Scale bar: 10 μ m. Right panel: Graphs depict the Manders' colocalization coefficient as measured in a total of 25 individual cells from two independent experiments in each condition \pm SEM (**** P < 0.0001). (B) Embelin abolishes the inhibitory effect of unmodified HIF-1 α (Flag-HIF-1 α -SA) on the mitochondrial recruitment of over-expressed exogenous GFP-Bax. Left panels: Immunofluorescence microscopy images of HeLa cells co-expressing Flag or Flag-HIF-1 α -SA with GFP-Bax, incubated, 24 h post-transfection, without or with embelin (10 μ M) for 16 h, treated with 75 μ M etoposide for 4 h and subsequently with Mitotracker (100 nM) for 20 min to visualize mitochondria. GFP-Bax and mitochondria are shown by green and magenta, respectively. Scale bar: 10 μ m. Right panel: Graphs depict the Manders' colocalization coefficient as measured in a total of 50 individual cells from a single experiment in each condition \pm SEM (**** P < 0.0001).

immediately offer protection to stressed mitochondria until HIF-1-dependent sufficient expression of new adaptive gene products is established. This mechanism can explain the involvement of HIF-1 α in the early protection offered by ischaemic preconditioning to the myocardium [40], as the ischaemic episodes are normally too brief for *de novo* protein synthesis. As this mechanism is manifested when HIF-1 α lacks phosphorylation by ERK1/2, it may become more important when the ERK signalling pathway is inactive, such as when quiescent or nonproliferating cells are exposed to hypoxia. ERK signalling can block the mitochondrial apoptotic pathway [41], which is especially important under hypoxia, so the mortalin/HIF-

1 α complex may be essential for survival in hypoxic cells with suppressed ERK activity (as shown in Fig. 5C). However, even in cells with active ERK1/2 and transcriptionally operating HIF-1, a dynamic exchange of HIF-1 α between nucleus and mitochondria, with only a small and not easily detectable fraction of HIF-1 α residing at the MOM at a particular instance, may offer extra protection against apoptosis in cancer cells exposed to the hypoxic solid tumour microenvironment and chemotherapeutic cytotoxic agents such as etoposide used in this study.

As suggested by our findings, mitochondrial HIF-1 α facilitates escape from apoptosis by blocking Bax recruitment and the subsequent Bax-mediated MOM

permeabilization. This raises the interesting question of how this can be achieved. HIF-1 α is tethered on the MOM by mortalin, which itself physically interacts with VDAC1 [42,43], the pore that mediates the passage of metabolites, ions and ATP/ADP through the MOM [44–46]. We have previously also detected the association of VDAC1 with mortalin under normoxia and with both mortalin and HIF-1 α under hypoxia [14]. VDAC1, in addition to its role as a channel, is also involved in the regulation of apoptosis as it serves as a binding platform for both pro-apoptotic and anti-apoptotic factors, such as Bax [47–49] and Bcl-2 or Bcl-xL [50–53], respectively. In addition, VDAC1 also interacts with HK2, the expression of which is upregulated by HIF-1 under hypoxia [39] and which we have also previously detected in association with the mortalin/HIF-1 α and VDAC1 [14]. Through its interaction with VDAC1, HK2 confers protection against apoptosis by preventing activation and oligomerization of Bax [51,54,55]. Therefore, the negative effect of HIF-1 α on mitochondrial Bax recruitment may be a result of either directly blocking the Bax/VDAC1 interaction or facilitating/stabilizing the association of VDAC1 with pro-survival protein such as Bcl-2 or HK2. A third possibility could involve TIGAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator), binding of which to HK2 under hypoxia has been previously shown to depend on HIF-1 α [56].

Our findings also demonstrate another pro-survival function of mortalin, which is manifested under hypoxia by mediating the close association of HIF-1 α with the mitochondria. We have also shown that embelin, a natural product that was shown previously to inhibit the mortalin-p53 interaction, also blocks the binding of mortalin to HIF-1 α , leading to mitochondrial dissociation of HIF-1 α and recruitment of Bax. Early studies have shown that upregulation of mortalin contributes to carcinogenesis [57] and, in agreement, mortalin overexpression and its correlation with bad patient prognosis, drug resistance or tumour aggressiveness has been observed in different types of cancer including colorectal adenocarcinoma [58,59], ovarian cancer [59–61], thyroid carcinoma [62,63], gastric cancer [64], hepatocellular carcinoma [21,65] and breast cancer [66]. In many of these studies and in others [23,67–70], the depletion or inhibition of mortalin in *in vitro* or *in vivo* preclinical cancer models led to the inhibition of cancer growth and cancer cell apoptosis [16,19]. In several cases, the mortalin inhibitors acted by disrupting its association with p53, suggesting that one of mortalin's major oncogenic roles is the inactivation of p53 [22]. Although all these previous studies have not addressed the involvement of hypoxia and

HIF-1 α , we may assume, given the data presented in this work, that the inhibitors of mortalin could also have impaired its interaction with HIF-1 α and that mortalin's pro-carcinogenic function may also include blocking apoptosis by mediating the HIF-1 α -dependent inhibition of mitochondrial Bax recruitment in cancer cells exposed to hypoxia or overexpressing HIF-1 α . If this is indeed the case, which needs further experimental validation, the mortalin-HIF-1 α interaction may be a promising target for anticancer treatment.

Materials and methods

Plasmid constructions

Plasmids based on the pGEX-4T1 bacterial expression vector and encoding for wild-type (WT), phosphodeficient (SA) or phosphomimetic (SE) forms of GST-HIF-1 α -ETD (amino acids 616–658), GST-HIF-1 α -530-826 and GST-HIF-1 α -652-826 or based on the pEGFP-C1 mammalian expression vector and encoding for phosphodeficient GFP-HIF-1 α -SA were previously described [12]. To construct Flag-HIF-1 α or Flag-HIF-1 α -SA the respective cDNA fragment was subcloned as BamHI insert into pCDNA3.1-FLAG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) after digesting with BamHI the previously reported pEGFP-HIF-1 α plasmid [71]. The cDNA sequence that corresponds to HIF-1 α -348-616 was obtained from pGEX-4T1-HIF-1 α -1-652 [71] by PCR and cloned as a 5'-BamHI/BamHI-3' fragment into the pGEX-4T1 vector in frame with a N-terminal GST tag to produce plasmid pGEX-4T1-HIF-1 α -348-616. The cDNA coding for Mort- Δ (1–51) cloned into pET28b(+), a generous gift by Dr. Cowan [72], was used as a template to PCR amplify the sequences coding for mortalin-NBD (amino acids 51–431), mortalin-NBD-SBD (amino acids 51–597), mortalin-SBD-VD (amino acids 439–679) and mortalin-SBD (amino acids 439–597) as 5-NdeI/XhoI-3' fragments, which were subsequently cloned into the pET28b(+) vector in frame with a N-terminal histidine tag (His₆). The cDNA for mortalin-SBD-VD protein was also cloned as a 5'-BamHI/BamHI-3' fragment into pEGFP-C1 in frame with the sequence for N-terminal GFP. All relevant oligonucleotide primers were purchased from Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany, and are listed in Table 1. The plasmid (hBax C3-EGFP) encoding for human wild-type Bax fused N-terminally with GFP and based on the pC3-EGFP mammalian expression vector was purchased from Addgene (#19741, Watertown, MA, USA).

Protein overexpression and purification

The above-described plasmids encoding for GST-tagged HIF-1 α wild-type or mutant fragments or encoding for

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study.

Name	Sequence (5'-3')	Cloned fragments
HIF-1-348F	TTTTT GGATCC ATGCACGACTTGATTTTCTCCCTTC	HIF-1 α - 348-616
HIF-1-616R	TTTTT GGATCC CTGCAGTCAAGTGGTGGCATTAGCAGTAGG	
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG	Mortalin-NBD
Xhol431R	TTT CTCGAG TTAATCGCCGCCAACACACCTCC	
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG	Mortalin-NBD-SBD
Xhol597R	TTT CTCGAG TTATCCATCTTGTTTCTGTGTCC	
Nde1439F	TTT CATATG GATGTCACTCCCCTGTCTCTGG	Mortalin-SBD-VD
T7 terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
Nde1439F	TTT CATATG GATGTCACTCCCCTGTCTCTGG	Mortalin-SBD
Xhol597R	TTT CTCGAG TTATCCATCTTGTTTCTGTGTCC	
Mort-S-B439F	TTTTT GGATCC GATGTCACTCCCCTGTCTCTGG	Mortalin-SBD-VD
Mort-V-B679R	TTTTT GGATCC TACTGTTTTCTCCTTTTGATC	

Bold or underlined sequences indicate restriction endonuclease sites as follows: **GGATCC**, BamHI; **CTCGAG**, XhoI; **CATATG**, NdeI (for cloning); **CTCCAG**, PstI (for identification of the correct insert orientation).

His_{x6}-tagged mortalin fragments were used for the transformation of the BL21(RIL) strain of *Escherichia coli*. Overexpression and purification of the GST-HIF-1 α -ETD forms, GST-HIF-1 α -530-826 and GST-HIF-1 α -652-826 were performed as described previously [71,73]. Overexpression of GST-HIF-1 α -348-616 was induced by 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubation of the bacterial culture at 27 °C, for 2 h. Overexpression of all His_{x6}-tagged mortalin domains was induced by 0.3 mM IPTG, at 30 °C, for 4 h. Bacterial cells expressing GST-HIF-1 α -348-616 were lysed by sonication in buffer A [20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)] and soluble bacterial extracts were applied onto glutathione (GSH)-agarose beads (Macherey-Nagel, Düren, Germany), from which bound proteins were eluted with 10 mM reduced L-glutathione dissolved in 25 mM Tris-HCl pH 8.5. Bacterial cells expressing the His_{x6}-tagged mortalin fragments were lysed by sonication in buffer B (50 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 0.1 mM AEBSF) and soluble bacterial extracts were applied onto Agarose-NTA-Ni²⁺ beads (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) from which bound proteins were eluted with 300 mM imidazole dissolved in Buffer B. Recombinant proteins were aliquoted and kept at -20 °C.

In vitro binding assays

Purified GST, GST-HIF-1 α -ETD, in WT or mutant SA or SE forms, and GST-HIF-1 α -530-826, -348-616 and -652-826 were immobilized on GSH-agarose-beads (30 μ L 1 : 1 slurry) equilibrated with Buffer A (supplemented with 0.5 μ M leupeptin and pepstatin) in a final volume of 0.5 mL by mixing for 1 h at 4 °C. After washing the beads carrying the GST-tagged proteins three times by centrifugation and resuspension in 0.5 mL of Buffer A, they were

equilibrated with Buffer B (supplemented with 0.5 μ M leupeptin and pepstatin), mixed with His_{x6}-tagged mortalin fragments in a final volume of 0.5 mL and incubated for 3 h at 4 °C under rotation. After washing away unbound material as above, bound proteins were eluted with 10 mM reduced L-glutathione in 25 mM Tris-HCl pH 8.5 for 10 min at 4 °C in a final volume of 100 μ L and analysed by SDS/PAGE and immunoblotting. To test the effect of embelin, His_{x6}-mortalin- Δ (1-51) and His_{x6}-mortalin-SBD-VD were preincubated with 10 μ M embelin in Buffer B for 2 h at 4 °C before incubation with the beads carrying GST-tagged proteins.

Cell culture, transfection and fractionation

HeLa_S3 cells (CVCL_0058; ATCC) regularly tested for mycoplasma were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Biosera, Nuaille, France) by adding heat-inactivated (30 min, 56 °C) fetal bovine serum (FBS) (FC: 10% v/v, Gibco, Dublin, Ireland) and an antibiotic mix of penicillin-streptomycin (Biosera) at a final concentration of 100 U·mL⁻¹. Cells were grown in a CO₂ humidified incubator at 37 °C or in an INVIVO₂ 200 hypoxia workstation (Baker Ruskinn, Sanford, ME, USA) at 1% O₂ (for hypoxia). To inactivate the ERK pathway cells were serum-deprived or treated with the MEK inhibitor U0126 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; 5 μ M, 16 h). Cells were transiently transfected with 0.4, 1.5 or 10 μ g plasmid DNA according to cell numbers at each experiment using Turbofect (Thermo Fisher Scientific; 0.8, 3, 20 μ g, respectively) or polyethylenimine (CELLnTEC, 0.8, 3, 20 μ g, respectively) as transfection reagents. To induce apoptosis, cells were treated for 4 h with 75 μ M etoposide (Sigma-Aldrich, St Louis) or dimethyl sulfoxide as solvent control. Cells were treated with embelin (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) for 16 h at a final concentration of 10 μ M. To stain mitochondria, cells were treated with Mitotracker dye

(Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 20 min at a final concentration of 100 nM. Biochemical fractionation was achieved as previously reported [14]. Briefly, cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized and pelleted after centrifugation at 100 RCF at 4 °C. The pellet was resuspended in 400 μ L of hypotonic buffer (10 mM Hepes-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT and 0.1 mM AEBSF), allowed to swell for 20 min and soluble cytoplasmic proteins were collected by centrifugation at 2000 g at 4 °C [74]. To recover mitochondrial fractions, the pellet was resuspended in 400 μ L of the same hypotonic buffer supplemented with 100 μ g·mL⁻¹ digitonin for 30 min in ice and centrifuged at 7000 g at 4 °C [75]. Finally, the nuclear pellet was resuspended in 400 μ L of HNMT buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.5 mM DTT and 0.2 mM AEBSF), incubated in ice for 30 min before collection of nuclear soluble fractions by centrifugation at 7000 RCF at 4 °C.

Immunoprecipitation

Hela cells either grown under hypoxia and treated with U0126 or/and embelin or co-expressing GFP-tagged and Flag-tagged proteins were harvested in IP buffer (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT and 0.1 mM AEBSF) and incubated at 4 °C for 20 min. After centrifugation, the soluble fraction was diluted to a final volume of 0.5 mL with IP buffer and mixed with 25 μ L of pre-equilibrated in IP buffer GFP-TRAP Agarose 1 : 1 bead slurry (ChromoTek GmbH, Planegg, Germany) and incubated for 3 h, at 4 °C under rotation or incubated with 1 μ g of antimortalin rabbit polyclonal antibody for 2 h and precipitated with protein A-agarose slurry for 16 h at 4 °C. After washing away unbound material with IP buffer, bound proteins were eluted with Laemmli loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2.3% w/v SDS, 10% v/v glycerol, 0.2% w/v bromophenol blue) and analysed by SDS/PAGE and immunoblotting.

Fluorescence and immunofluorescence microscopy

To test the effect of embelin on Hela cells transiently over-expressing GFP-HIF-1 α -SA, cells grown on coverslips, after treatment with embelin (10 μ M) or dimethylsulfoxide (DMSO) as solvent control for 16 h, were fixed with 3.7% v/v formaldehyde (in PBS) for 5 min at room temperature, washed with PBS, followed by permeabilization with 0.1% v/v Triton X-100 (in PBS) for 15 min at 4 °C, washed again with PBS and subsequently incubated with blocking solution [1% w/v bovine serum albumin (BSA), 0.1% v/v Tween-20 in PBS] for 1 h at room temperature. Cells were then incubated with anti-HSP60 primary rabbit antibody

(in blocking solution) for 16 h, at 4 °C, washed with 0.1% v/v Tween-20 in PBS and incubated with secondary donkey anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 568 (in blocking solution) for 1 h at room temperature. Finally, cells were washed again with 0.1% v/v Tween-20 in PBS, treated with 4,6-diamidino-2-phenylindole to stain nuclei and mounted on a coverslip using Mowiol (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). Images were collected with a Zeiss Axio Imager.Z2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with AxioCam MRm or AxioCam IcC5 sensor and a 40 \times objective or 100 \times oil immersion lens. To test the effect of embelin on endogenous Hela cell proteins, the same procedure was followed as above with the difference of using a mixture of the two primary antibodies, a rabbit antimortalin and a mouse anti-HIF-1 α antibody, and a mixture of two secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 568 (anti-rabbit) or Alexa Fluor 488 (anti-mouse). To test the effect of embelin on Bax localization, Hela cells transiently co-expressing Flag or Flag-HIF-1 α -SA and pDsRed2-Mito (Clontech Laboratories, San Jose, CA, USA) were treated with embelin or DMSO and then incubated with etoposide (75 μ M) for 4 h, at 37 °C/5% CO₂, fixed and processed as above using a primary mouse anti-Bax antibody. Details for the antibodies used and their dilutions are described in Table 2.

IMAGEJ (NIH, Bethesda, MD, USA) software analysis

To analyse co-localization between proteins the just another co-localization plugin (JACoP) plugin was used. Briefly, the whole area of individual cells was used as the region of interest and JACoP plugin with Costes' automatic threshold was applied to calculate Manders' co-localization coefficient.

SDS/PAGE and Western blotting

Proteins were resolved by 8–15% SDS/PAGE and analysed by Western blotting. The antibodies used and their dilutions are described in Table 2. Western blot images were taken by using the Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System (Uvitec Cambridge, England, UK) supplied with ALLIANCE SOFTWARE (ver. 16.06) and quantified by UVIBAND SOFTWARE (ver. 15.03) supplied by the instrument manufacturer (Uvitec Cambridge).

Caspase 3/7 activity assays

HeLa cells were seeded into 96-well plates (2000 cells per well) and co-transfected with the proper plasmid combinations. 24 h post-transfection, cells were treated with either 75 μ M etoposide or DMSO as solvent control for 4 h under normoxia and Caspase 3/7 activity was measured with the

Table 2. Antibodies used in this study.

Antibodies	Species	Dilution	Catalogue number	Company
antimortalin	Rabbit polyclonal	1 : 1000 (WB, IMF)	sc-13967	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
anti-TOM20	Rabbit polyclonal	1 : 1000 (WB)	sc-11415	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
anticleaved caspase 3	Rabbit polyclonal	1 : 500 (WB)	9664S	Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
anti-ERK1/2	Rabbit polyclonal	1 : 1000 (WB)	9102S	Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
anti-phospho-ERK1/2	Rabbit polyclonal	1 : 1000 (WB)	9101S	Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
anti-HSP60	Rabbit polyclonal	1 : 1000 (WB)	4870	Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
		1 : 800 (IMF)		
anti-beta actin	Mouse monoclonal	1 : 5000 (WB)	3700	Cell Signalling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
anti-HIF-1 α	Mouse monoclonal	1 : 500 (WB, IMF)	610959	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
anti-HIF-1 β /ARNT	Mouse monoclonal	1 : 500 (WB)	611079	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
anti-Bax	Mouse monoclonal	1 : 1000 (WB)	581-1P160531	Acris GmbH (Herford, Germany)
		1 : 500 (IMF)		
anti-His	Rabbit monoclonal	1 : 1000 (WB)	04-1664	Merck KGaA, (Darmstadt, Germany)
anti-Flag	Mouse monoclonal	1 : 10000 (WB)	F4042	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany)
anti-GFP	Rabbit polyclonal	1 : 2000 (WB)	A6455	Thermo Fisher Scientific

IMF, immunofluorescence microscopy; WB, western blotting.

'Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Kit' (Promega, Madison, WI, USA).

Statistical analysis

Statistical differences were assessed using the GRAPH PAD PRISM version 6 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm SEM. Differences were examined by Student's *t*-test (two-tailed) between two groups or by one-way analysis of variance (ANOVA) within multiple groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; n.s.—not significant).

Acknowledgments

We are grateful to Prof James A. Cowan (Department of Chemistry, The Ohio State University, Columbus) for offering the plasmid pET28b(+)-mortalin- Δ (1-51). IM was partially supported by Fondation Santé (5360). AY received scholarships from the Bodossaki Foundation, the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI; grant No 6244) and the States Scholarship Foundation [Sub-action 2: IKY Scholarship Programme for PhD candidates in the «Greek Universities», grant No 511394, in the context of the Act 'Enhancing Human Resources Research Potential by undertaking a Doctoral Research', co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning»].

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

AY performed experiments; IM performed and planned experiments; GS planned experiments and wrote the paper.

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/febs.16762>.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available in the Figures and Tables of this article.

References

- Ratcliffe PJ (2013) Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol* **591**, 2027–2042.
- Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* **24**, 97–106.
- Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 207–214.

- 4 Keith B, Johnson RS & Simon MC (2011) HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* **12**, 9–22.
- 5 Schofield CJ & Ratcliffe PJ (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 617–626.
- 6 Wicks EE & Semenza GL (2022) Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest* **132**, e159839.
- 7 Claesson-Welsh L (2020) Oxygen sensing; a stunningly elegant molecular machinery hijacked in cancer. *Ups J Med Sci* **125**, 205–210.
- 8 Lee CC, Wu CY & Yang HY (2020) Discoveries of how cells sense oxygen win the 2019 Nobel prize in physiology or medicine. *Biom J* **43**, 434–437.
- 9 Bosco MC, D’Orazi G & Del Bufalo D (2020) Targeting hypoxia in tumor: a new promising therapeutic strategy. *J Exp Clin Cancer Res* **39**, 8.
- 10 Semenza GL (2021) Intratumoral hypoxia and mechanisms of immune evasion mediated by hypoxia-inducible factors. *Physiology (Bethesda)* **36**, 73–83.
- 11 Dengler VL, Galbraith M & Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 1–15.
- 12 Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E & Simos G (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by MAPK. *J Biol Chem* **283**, 27620–27627.
- 13 Koukoulas K, Giakountis A, Karagiota A, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G & Mylonis I (2021) ERK signaling controls productive HIF-1 binding to chromatin and cancer cell adaptation to hypoxia through HIF-1 α interaction with NPM1. *Mol Oncol* **15**, 3468–3489.
- 14 Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G & Simos G (2017) Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1 α to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *J Cell Sci* **130**, 466–479.
- 15 Londono C, Osorio C, Gama V & Alzate O (2012) Mortalin, apoptosis, and neurodegeneration. *Biomolecules* **2**, 143–164.
- 16 Albakova Z, Mangasarova Y, Albakov A & Gorenkova L (2022) HSP70 and HSP90 in cancer: cytosolic, endoplasmic reticulum and mitochondrial chaperones of tumorigenesis. *Front Oncol* **12**, 829520.
- 17 Lee AS (2014) Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* **14**, 263–276.
- 18 Kabakov AE & Gabai VL (2021) HSP70s in breast cancer: promoters of tumorigenesis and potential targets/tools for therapy. *Cell* **10**, 3446.
- 19 Yoon AR, Wadhwa R, Kaul SC & Yun CO (2022) Why is mortalin a potential therapeutic target for cancer? *Front Cell Dev Biol* **10**, 914540.
- 20 Radons J (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379–404.
- 21 Lu WJ, Lee NP, Kaul SC, Lan F, Poon RT, Wadhwa R & Luk JM (2011) Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. *Int J Cancer* **129**, 1806–1814.
- 22 Elwakeel A (2022) Abrogating the interaction between p53 and mortalin (Grp75/HSPA9/mtHsp70) for cancer therapy: the story so far. *Front Cell Dev Biol* **10**, 879632.
- 23 Park SH, Baek KH, Shin I & Shin I (2018) Subcellular Hsp70 inhibitors promote cancer cell death via different mechanisms. *Cell Chem Biol* **25**, 1242–1254.e8.
- 24 Nigam N, Grover A, Goyal S, Katiyar SP, Bhargava P, Wang PC, Sundar D, Kaul SC & Wadhwa R (2015) Targeting mortalin by embelin causes activation of tumor suppressor p53 and deactivation of metastatic signaling in human breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0138192.
- 25 Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M & Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010–1014.
- 26 Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME & George DL (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**, 443–450.
- 27 Perfettini JL, Kroemer RT & Kroemer G (2004) Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat Cell Biol* **6**, 386–388.
- 28 Green DR & Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**, 1127–1130.
- 29 Pena-Blanco A & Garcia-Saez AJ (2018) Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* **285**, 416–431.
- 30 Kaul SC, Reddel RR, Mitsui Y & Wadhwa R (2001) An N-terminal region of mot-2 binds to p53 in vitro. *Neoplasia* **3**, 110–114.
- 31 Iosefson O & Azem A (2010) Reconstitution of the mitochondrial Hsp70 (mortalin)-p53 interaction using purified proteins – identification of additional interacting regions. *FEBS Lett* **584**, 1080–1084.
- 32 Singh R, Letai A & Sarosiek K (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 175–193.
- 33 Chandel NS & Budinger GR (2007) The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med* **42**, 165–174.
- 34 Hielscher A & Gerecht S (2015) Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships. *Free Radic Biol Med* **79**, 281–291.

- 35 Lee P, Chandel NS & Simon MC (2020) Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 268–283.
- 36 Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, Lu Y, Zhao F, Wang L & Zhou Q (2009) BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1 {alpha}. *J Biol Chem* **284**, 10004–10012.
- 37 Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J & Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**, 2570–2581.
- 38 Chiche J, Rouleau M, Gounon P, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J & Mazure NM (2010) Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* **222**, 648–657.
- 39 Roberts DJ & Miyamoto S (2015) Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ* **22**, 364.
- 40 Semenza GL (2022) Hypoxia-inducible factors: roles in cardiovascular disease progression, prevention, and treatment. *Cardiovasc Res* doi: [10.1093/cvr/cvac089](https://doi.org/10.1093/cvr/cvac089)
- 41 Lavoie H, Gagnon J & Therrien M (2020) ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 607–632.
- 42 Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinnes FP & Hilschmann N (2002) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1059–1070.
- 43 Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T & Rizzuto R (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* **175**, 901–911.
- 44 Mazure NM (2017) VDAC in cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1858**, 665–673.
- 45 Magri A, Reina S & De Pinto V (2018) VDAC1 as pharmacological target in cancer and neurodegeneration: focus on its role in apoptosis. *Front Chem* **6**, 108.
- 46 Shoshan-Barmatz V, Shteinfer-Kuzmine A & Verma A (2020) VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases. *Biomolecules* **10**, 1485.
- 47 Shimizu S, Narita M & Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487.
- 48 Pastorino JG, Shulga N & Hoek JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 7610–7618.
- 49 Adachi M, Higuchi H, Miura S, Azuma T, Inokuchi S, Saito H, Kato S & Ishii H (2004) Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G695–G705.
- 50 Shimizu S, Konishi A, Kodama T & Tsujimoto Y (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3100–3105.
- 51 Abu-Hamad S, Arbel N, Calo D, Arzoine L, Israelson A, Keinan N, Ben-Romano R, Friedman O & Shoshan-Barmatz V (2009) The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci* **122**, 1906–1916.
- 52 Arbel N, Ben-Hail D & Shoshan-Barmatz V (2012) Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J Biol Chem* **287**, 23152–23161.
- 53 Geula S, Ben-Hail D & Shoshan-Barmatz V (2012) Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins. *Biochem J* **444**, 475–485.
- 54 Mathupala SP, Ko YH & Pedersen PL (2006) Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25**, 4777–4786.
- 55 Sukumaran SK, Fu NY, Tin CB, Wan KF, Lee SS & Yu VC (2010) A soluble form of the pilus protein FimA targets the VDAC-hexokinase complex at mitochondria to suppress host cell apoptosis. *Mol Cell* **37**, 768–783.
- 56 Cheung EC, Ludwig RL & Vousden KH (2012) Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 20491–20496.
- 57 Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocariss CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR & Kaul SC (2006) Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer* **118**, 2973–2980.
- 58 Dundas SR, Lawrie LC, Rooney PH & Murray GI (2005) Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *J Pathol* **205**, 74–81.
- 59 Xu M, Jin T, Chen L, Zhang X, Zhu G, Wang Q & Lin Z (2019) Mortalin is a distinct bio-marker and prognostic factor in serous ovarian carcinoma. *Gene* **696**, 63–71.
- 60 Yang L, Li H, Jiang Y, Zuo J & Liu W (2013) Inhibition of mortalin expression reverses cisplatin resistance and attenuates growth of ovarian cancer cells. *Cancer Lett* **336**, 213–221.
- 61 Ramraj SK, Elayapillai SP, Pelikan RC, Zhao YD, Isingizwe ZR, Kennedy AL, Lightfoot SA & Benbrook DM (2020) Novel ovarian cancer maintenance therapy targeted at mortalin and mutant p53. *Int J Cancer* **147**, 1086–1097.
- 62 Starenki D, Hong SK, Lloyd RV & Park JI (2015) Mortalin (GRP75/HSPA9) upregulation promotes

- survival and proliferation of medullary thyroid carcinoma cells. *Oncogene* **34**, 4624–4634.
- 63 Starenki D, Sosonkina N, Hong SK, Lloyd RV & Park JI (2019) Mortalin (GRP75/HSPA9) promotes survival and proliferation of thyroid carcinoma cells. *Int J Mol Sci* **20**, 2069.
- 64 Dai Y, Li F, Jiao Y, Wang G, Zhan T, Xia Y, Liu H, Yang H, Zhang J & Tang L (2021) Mortalin/glucose-regulated protein 75 promotes the cisplatin-resistance of gastric cancer via regulating anti-oxidation/apoptosis and metabolic reprogramming. *Cell Death Discov* **7**, 140.
- 65 Yang Y, Jin M, Dai Y, Shan W, Chen S, Cai R, Yang H, Tang L & Li L (2021) Involvement and targeted intervention of mortalin-regulated proteome phosphorylated-modification in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol* **11**, 687871.
- 66 Zhang R, Meng Z, Wu X, Zhang M, Zhang S & Jin T (2021) Mortalin promotes breast cancer malignancy. *Exp Mol Pathol* **118**, 104593.
- 67 Yun CO, Bhargava P, Na Y, Lee JS, Ryu J, Kaul SC & Wadhwa R (2017) Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci Rep* **7**, 42016.
- 68 Sane S, Hafner A, Srinivasan R, Masood D, Slunecka JL, Noldner CJ, Hanson AD, Kruisselbrink T, Wang X, Wang Y *et al.* (2018) UBXN2A enhances CHIP-mediated proteasomal degradation of oncoprotein mortalin-2 in cancer cells. *Mol Oncol* **12**, 1753–1777.
- 69 Wu PK, Hong SK, Starenki D, Oshima K, Shao H, Gestwicki JE, Tsai S & Park JI (2020) Mortalin/HSPA9 targeting selectively induces KRAS tumor cell death by perturbing mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* **39**, 4257–4270.
- 70 Sari AN, Elwakeel A, Dhanjal JK, Kumar V, Sundar D, Kaul SC & Wadhwa R (2021) Identification and characterization of Mortaparib(plus)-a novel triazole derivative that targets mortalin-p53 interaction and inhibits cancer-cell proliferation by wild-type p53-dependent and -independent mechanisms. *Cancers (Basel)* **13**, 835.
- 71 Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S & Simos G (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* **281**, 33095–33106.
- 72 Luo WI, Dizin E, Yoon T & Cowan JA (2010) Kinetic and structural characterization of human mortalin. *Protein Expr Purif* **72**, 75–81.
- 73 Chachami G, Paraskeva E, Georgatsou E, Bonanou S & Simos G (2005) Bacterially produced human HIF-1 α is competent for heterodimerization and specific DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 464–470.
- 74 Andrews NC & Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**, 2499.
- 75 Holden P & Horton WA (2009) Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Res Notes* **2**, 243.