



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α από τις ERK1/2»

Θάνος Δημήτριος-Φοίβος, του Δημητρίου

Λάρισα, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

«The biological role of HIF-1 α transcription factor
phosphorylation by ERK1/2»

Thanos Dimitrios - Foivos

Larissa, 2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μυλωνής Ηλίας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπων)

Χαχάμη Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Μοριακό οξυγόνο (O ₂) και υποξία	9
1.2 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	9
1.3 Η δομή των μεταγραφικών παραγόντων HIF	10
1.4 Η δομή και η λειτουργία της υπομονάδας HIF-1α.....	11
Α) Ο ανθρώπινος HIF-1α.....	11
Β) Ο HIF-1α του ποντικού (mHIF-1α).....	13
1.5 Η ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α από το οξυγόνο	14
1.6 Ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α ανεξάρτητα από το οξυγόνο.....	15
α) Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής	15
β) Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης.....	16
γ) Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες	17
δ) Ρύθμιση μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	19
1.7 Η σημασία του HIF-1 στον καρκίνο.....	24
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	27
3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
A. ΥΛΙΚΑ.....	28
A1) Βακτηριακά στελέχη.....	28
A2) Θρεπτικό υλικό βακτηριακών κυττάρων	28
A3) Πλασμιδιακοί φορείς	28
A4) Αντιβιοτικά.....	30
A5) Ένζυμα	30
A6) Κυτταρικές σειρές.....	32
A7) Θρεπτικά μέσα/Διαλύματα στις κυτταροκαλλιέργειες.....	32
A8) Αντισώματα.....	33
A9) Αντιδραστήρια.....	34
A10) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA	35
A11) Συστατικά/διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western	35
A12) Συστατικά/διαλύματα έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	36
A13) Εκκινητές	37
A13) Διαλύματα από kit	38
B. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	38
B1) Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υλικού LB	38
B2) Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	39
Top10.....	39
B3) Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας με βακτηριακά κύτταρα.....	39
B4) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση	39

B5) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Isolation of high-copy plasmid DNA from <i>E. coli</i>).....	40
B6) Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	41
B7) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	41
B8) Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	42
B9) Αντίδραση λιγάσης (ligation).....	43
B11) Καθαρισμός προϊόντων PCR και πλασμιδιακού DNA (PCR clean-up)....	45
B12) Κυτταροκαλλιέργειες	46
B13) Μικροσκοπία φθορισμού	48
B14) Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού	49
B15) Λύση των κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	50
B16) Δοκιμασία Bradford.....	51
B17) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western	51
B18) Μέτρηση αριθμού κυττάρων.....	54
B19) Δοκιμασία λουσιφεράσης.....	54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
4.1. Απομόνωση πλασμιδίου pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A) από βακτηριακές καλλιέργειες.....	56
4.2. Έλεγχος πλασμιδίου pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A) με ενδονουκλεάσες περιορισμού (KpnI, BamHI-HF, BglII και PstI-HF) και ηλεκτροφόρηση DNA.....	56
4.3. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α-Myc σε κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pcDNA3 mHIF-1α-MYC	57
4.4. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης mHIF-1α MYC σε κύτταρα HeLa με ανοσοαποτύπωση κατά Western	59
4.5. Κλωνοποίηση του mHIF-1α σε φορείς έκφρασης βακτηριακών (pGEX-4T1) και ευκαρυωτικών κυττάρων (pEGFP-C1).....	59
4.6. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α Myc με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα HeLa	63
4.7. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α Myc με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα 3T3-L1	65
4.8. Δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων στη θέση φωσφορυλίωσης Ser-652 του μεταγραφικού παράγοντα mHIF-1α.....	66
4.9. Υποκλωνοποίηση των μορφών mS652A και mS652D στον φορέα έκφρασης pcDNA3	68
4.10. Έλεγχος έκφρασης των μορφών wt, mS652A και mS652D του mHIF-1α με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα HeLa. .	71
4.11. Μέτρηση δραστηριότητας των μορφών mHIF-1α wt, S652A και S652D σε κύτταρα HeLa με τη μέθοδο της λουσιφεράσης.....	74
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας κ. Ηλία Μυλωνή για την ανάθεση αυτού του ενδιαφέροντος θέματος αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Η στήριξη και η συνεχής καθοδήγησή του για την διεκπεραίωση των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων αλλά και οι θεωρητικές γνώσεις που έλαβα, υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στον συνεπιβλέποντα της πτυχιακής εργασίας κ. Αντώνιο Γιακουντή για τις σημαντικές γνώσεις που έλαβα ως φοιτητής του στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, αλλά και για τις υποδείξεις του όσον αφορά στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Γεωργία Χαχάμη για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιοχημείας και Διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Γεώργιο Σίμο που με δέχθηκε ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας. Οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια της εργασίας υπήρξαν πραγματικά καθοριστικές.

Κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας αποκόμισα σημαντικές γνώσεις και εργαστηριακή εμπειρία ανεκτίμητης αξίας και αυτό το οφείλω στον μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου κ. Κρέοντα Κουκουλά ο οποίος ήταν δίπλα μου και με συμβούλευε σε κάθε μου βήμα. Η καθοδήγησή του, από την αρχή ως το τέλος, αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας και θέλω να του εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ. Παρά την μικρή εργαστηριακή μου εμπειρία λόγω της πανδημίας COVID-19, με εμπιστεύτηκε από την πρώτη στιγμή και πλέον αισθάνομαι μεγαλύτερη αυτοπεποίθηση στον χώρο του εργαστηρίου. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας για τη βοήθεια, που απλόχερα προσέφεραν και τις πολύτιμες συμβουλές τους εντός και εκτός εργαστηριακού πάγκου.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και σε όλους τους ανθρώπους που μου στάθηκαν και με στήριξαν καθ'όλη τη διάρκεια του δύσκολου, αλλά ταυτόχρονα όμορφου ταξιδιού της τετραετούς φοίτησής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υποξία καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο το κύτταρο ή και οι ιστοί εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου. Το κύτταρο, προκειμένου να επιτελέσει βασικές διεργασίες (π.χ παραγωγή ενέργειας, οξειδωτική φωσφορυλίωση, μεταβολισμός μακρομορίων) που απαιτούν την παρουσία οξυγόνου, επάγει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HIFs (Hypoxia Inducible Factors). Οι HIFs ενεργοποιούνται αφού σχηματίσουν ετεροδιμερή σύμπλοκα και επάγουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η ερυθροποίηση, ο μεταβολισμός ή και η ανάπτυξη των κυττάρων. Η καλύτερα μελετημένη υπομονάδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF είναι η υπομονάδα HIF-1α και στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η HIF-1α υπομονάδα του ποντικού (mHIF-1α). Η ρύθμιση της λειτουργίας του HIF-1α επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα του διαθέσιμου οξυγόνου αλλά και με άλλους τρόπους όπως είναι μέσω μεταγραφής, μετάφρασης, ή μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η καλύτερα μελετημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-1α είναι η φωσφορυλίωση. Παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν ταυτοποιήσει δύο (2) κατάλοιπα σερίνης (Ser-641 και Ser-643) του ανθρώπινου HIF-1α που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 με αποτέλεσμα την συσσώρευση του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του λόγω αποκλεισμού της εξόδου από τον πυρήνα μέσω της εξπορτίνης CRM-1. Η δημιουργία μεταλλάξεων που καταργούν την θέση φωσφορυλίωσης του HIF-1α έχει αποδειχθεί ότι επιτρέπει την έξοδο της πρωτεΐνης στον κυτταρόπλασμα, ενώ φωσφομιμητικές μεταλλάξεις την διατηρούν στον πυρήνα. Προκειμένου να μελετηθεί ο ακριβής βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α από τις ERK1/2 πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας το cDNA του mHIF-1α με απώτερο σκοπό την μελλοντική χρήση πειραματόζων και την εφαρμογή των γνωστικών εργαλείων για την ανάπτυξη θεραπευτικών επιλογών. Εφόσον πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των αμινοξέων του ανθρώπινου HIF-1α με αυτόν του ποντικού και διαπιστώθηκε υψηλός βαθμός συντήρησης σε κρίσιμες επικράτειες του μεταγραφικού παράγοντα, ελέγχθηκε η έκφραση του mHIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις που αναστέλλουν ή μιμούνται την φωσφορυλίωση από τις ERK1/2. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έρχονται σε συμφωνία με αυτά που αφορούν τον ανθρώπινο HIF-1α αλλά με μικρότερη ένταση, καθώς αποδείχθηκε ότι μορφή S652A του mHIF1α μοιράζεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ενώ η S652D είναι αποκλειστικά πυρηνική. Συνολικά, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι οι λειτουργίες και οι οδοί σηματοδότησης στις οποίες εμπλέκεται ο ανθρώπινος HIF-1α είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες και στον ποντικό.

ABSTRACT

Hypoxia describes the condition in which cells or tissues are deprived of adequate oxygen. Oxygen deprivation can severely affect various body cells that perform essential biological processes (e.g., energy production, oxidative phosphorylation, macromolecule metabolism), all of which require oxygen. Cells respond to hypoxia by inducing the HIF (Hypoxia Inducible Factor) family of transcription factors. HIFs are activated by forming stable heterodimeric complexes in the nucleus and induce the expression of their target genes that encode proteins involved in various cellular functions such as erythropoiesis, metabolism, cell growth, etc. The best-studied subunit of HIF is the oxygen-regulated HIF-1 α subunit, which forms heterodimers with the stably expressed HIF beta subunit. In this thesis, we have examined the regulation and function of the murine HIF-1 α subunit (mHIF-1 α). In addition to oxygen-dependent regulation, HIF-1 α is also regulated at the transcription, translation, or by various post-translational modifications. The best-studied post-translational modification of HIF-1 α is phosphorylation. Previous studies in the Biochemistry laboratory of the School of Medicine of the University of Thessaly have identified two (2) serine residues (Ser-641 and Ser-643) in the human HIF-1 α that are phosphorylated by ERK1/2 resulting in its nuclear accumulation and subsequently in the activation of transcription of its target genes. Nuclear accumulation of HIF-1 α is accomplished by blocking export from the nucleus via the exportin CRM-1. Mutations that abolish these HIF-1 α phosphorylation sites have been shown to diminish nuclear accumulation, thus allowing the protein to exit the nucleus, whereas, on the other hand, phosphomimetic mutations retain the protein inside the nucleus. To study the precise biological role of the HIF-1 α phosphorylation by ERK1/2, we carried out experiments using the mHIF-1 α with the ultimate goal of studying its biological functions in the context of the whole organism aiming to apply cognitive tools for the development of therapeutic options. To do so, we first conducted amino acid sequence comparisons between the human and the mouse HIF-1 α proteins. We identified a high degree of sequence conservation in functionally critical transcription factor domains. Importantly, we found that one of the ERK1/2 Ser phosphorylation sites is conserved between mice and humans (Ser652). Next, we introduced point mutations in mHIF-1 α that either abolish or mimic serine 652 phosphorylation and tested their effects on HIF-1 functionality after transfecting the mutant constructs in mouse cells. We have found that in agreement with the human HIF-1 α (although with less potency), the S652A mutant form of mHIF1 α is shared between the cytoplasm and the nucleus, whereas the mimetic S652D is found exclusively in the nucleus. Taken together, our preliminary results suggest that the mouse and human HIF1-a functions and signaling pathways are partially conserved.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μοριακό οξυγόνο (O₂) και υποξία

Το μοριακό οξυγόνο (O₂) είναι το κύριο μόριο στο οποίο βασίζονται οι οργανισμοί για την επιβίωσή τους [1]. Η επιβίωση των κυττάρων επιτυγχάνεται με την παραγωγή ενέργειας στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω του οξυγόνου, το οποίο είναι ύψιστης σημασίας για τη διατήρηση του μεταβολισμού και της ομοιοστασίας του οργανισμού. Εν προκειμένω, σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, είναι αναγκαία η ύπαρξη μηχανισμών που αντιλαμβάνονται και ανταποκρίνονται σε αλλαγές στα φυσιολογικά επίπεδα μοριακού οξυγόνου που κυμαίνονται από 2-9 %, αναλόγως τον ιστό [2], [3]. Η κατάσταση κατά την οποία τα επίπεδα οξυγόνου στα κύτταρα είναι χαμηλότερα από το φυσιολογικό χαρακτηρίζεται ως υποξία [4]. Το φαινόμενο της υποξίας είναι δυνατό να εμφανιστεί τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις [5]. Η υποξία διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην εμβρυογένεση (π.χ στον σχηματισμό του πλακούντα) [5], ενώ εμφανίζεται και σε περιπτώσεις έντονης μυϊκής άσκησης [6], ή σε μεγάλο υψόμετρο [7]. Παράλληλα μελέτες έχουν καταδείξει ότι εμφανίζεται και σε διαταραχές όπως είναι η ισχαιμία [8] και ο καρκίνος, όπου η υποξία είναι βασικό χαρακτηριστικό για τους συμπαγείς όγκους [9]. Τα κύτταρα, προκειμένου να αντιμετωπίσουν την έλλειψη οξυγόνου και να ρυθμίσουν την ομοιοστασία και τον μεταβολισμό τους, στηρίζονται στη λειτουργικότητα των μεταγραφικών παραγόντων **HIFs (Hypoxia-Inducible-Factors)** οι οποίοι δρουν προσαρμοστικά ενεργοποιώντας μια πληθώρα γονιδίων στόχων της υποξίας [10].

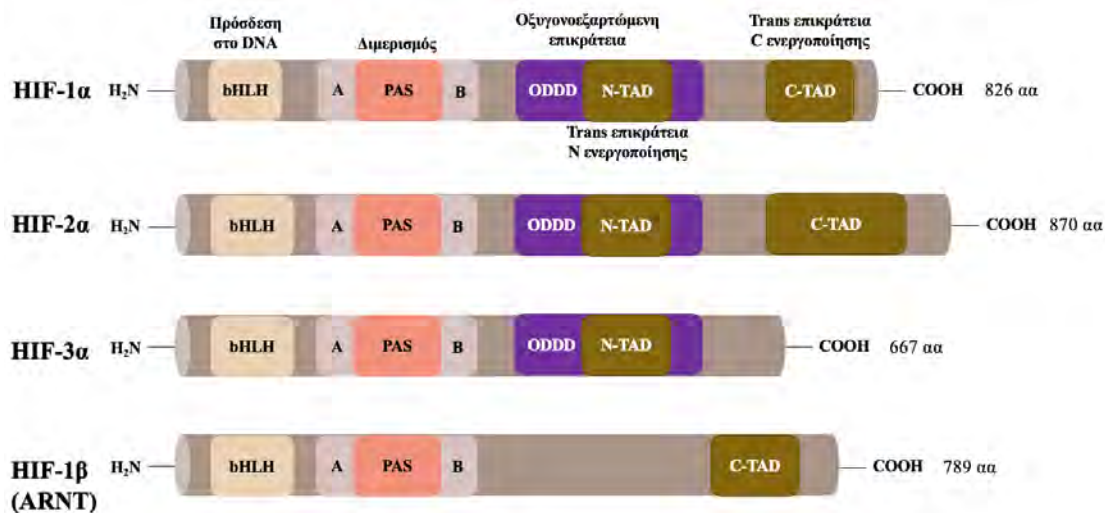
1.2 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι HIF είναι μεταγραφικοί παράγοντες με μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα (bHLH) και ανήκουν στην οικογένεια που περιέχουν το μοτίβο Per-ARNT-Sim (PAS). Πρόκειται για ετεροδιμερείς μεταγραφικούς παράγοντες που αποτελούνται από δύο (2) υπομονάδες, την **HIF α** υπομονάδα και την **HIF β** ή αλλιώς ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [11]. Σε αντίθεση με την HIF β υπομονάδα που εκφράζεται σταθερά, υπάρχουν τρεις (3) HIF α ισομορφές που είναι οι HIF-1 α , HIF-2 α και HIF-3 α (εικόνα 1) οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *HIF1A*, *EPAS1* και *HIF3A* αντίστοιχα και η σταθεροποίηση τους εξαρτάται από την συγκέντρωση του οξυγόνου [12]. Ο ετεροδιμερής, ενεργός, μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στους υποκινητές ή τους ενισχυτές των γονιδίων στόχων που ρυθμίζουν και αυτές ονομάζονται HREs (Hypoxia Response Elements) [11].

Η κύρια υπομονάδα που αποκρίνεται στην υποξία είναι η HIF α , στην οποία, εν τέλει, βασίζεται η σταθερότητα του μεταγραφικού παράγοντα σε σχέση με την υπομονάδα ARNT [13]. Η καλύτερα μελετημένη ισομορφή των μεταγραφικών παραγόντων HIF είναι η υπομονάδα HIF-1 α , η οποία εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων και αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας [11]. Η ισομορφή HIF-2 α κωδικοποιείται από το γονίδιο *EPAS1*, εκφράζεται σε συγκεκριμένους ιστούς όπως είναι ο πνεύμονας, το ήπαρ, η καρδιά και ο πλακούντας [14] και ρυθμίζει πληθώρα λειτουργιών που αφορούν την αγγειογένεση [15]. Τέλος, η ισομορφή HIF-3 α είναι η λιγότερο καλά μελετημένη και εξυπηρετεί λειτουργίες που αφορούν την μεταγραφική ενεργοποίηση των στόχων των HIF ή ακόμα (κάποια προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος) και την αναστολή του HIF-1 α [11].

1.3 Η δομή των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Η ισομορφή HIF-1α αποτελείται από διακριτές δομικές και λειτουργικές περιοχές και συνιστά μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων. Στο αμινοτελικό άκρο περιλαμβάνει την περιοχή **bHLH** (μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, εικόνα 1) η οποία συμμετέχει στην πρόσδεση του ενεργού μεταγραφικού παράγοντα στις περιοχές HREs στο DNA για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Οι επικράτειες **PAS-A** και **PAS-B** (εικόνα 1) είναι υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με την υπομονάδα ARNT για τη δημιουργία του ενεργού μεταγραφικού συμπλόκου. Η καρβοξυτελική περιοχή του HIF-1α περιλαμβάνει σημαντικές επικράτειες για τη ρύθμιση και λειτουργία της πρωτεΐνης που αφορούν την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση του (**ODDD**, εικόνα 1), η οποία επάγεται σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου και αναστέλλεται κατά την υποξία. Η συγκεκριμένη επικράτεια παρουσιάζει αλληλοεπικάλυψη με την περιοχή **N-TAD** (εικόνα 1) του HIF-1α η οποία είναι υπεύθυνη για την επιλεκτικότητα που εμφανίζει ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α στη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Τέλος, η επικράτεια **C-TAD** (εικόνα 1) βρίσκεται στο τέλος της καρβοξυτελικής περιοχής και εξυπηρετεί την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές CBP/p300 [16] και την μεταγραφική του ενεργότητα.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής και των χαρακτηριστικών επικρατειών των τριών ισομορφών HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α και της υπομονάδας τους ARNT.

Η ισομορφή HIF-2α παρουσιάζει ομολογία με τον HIF-1α σε ποσοστό 48%, επομένως εμφανίζονται οι ίδιες επικράτειες όπου οι bHLH και PAS φαίνεται να εμφανίζουν αρκετά υψηλό ποσοστό αμινοξικής ομολογίας με τον HIF-1α (83% και 70% αντίστοιχα) [15], [17]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη πρόσδεση τους σε κοινές αλληλουχίες DNA (στοιχεία HRE) στα γονίδια στόχους. Το συνολικό μέγεθος του HIF2-α είναι 870 αμινοξέα [18].

Η ισομορφή HIF3-α είναι μικρότερου μεγέθους (667 αμινοξέα) καθώς από αυτή απουσιάζει η επικράτεια συνενεργοποίησης C-TAD στο καρβοξυτελικό άκρο [18]. Το μετάγραφο του γονιδίου *HIF3A* υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα την δημιουργία ποικίλων HIF3-α ισομορφών [19].

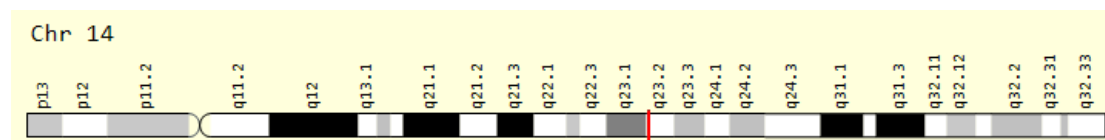
Τέλος, η υπομονάδα HIF1-β (ARNT) περιλαμβάνει τις επικράτειες bHLH και PAS-A και PAS-B για την πρόσδεση στο DNA και τον ετεροδιμερισμό αντίστοιχα αλλά και

την περιοχή C-TAD στο καρβοξυτελικό άκρο [18]. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην σχηματική αναπαράσταση στην εικόνα 1.

1.4 Η δομή και η λειτουργία της υπομονάδας HIF-1α

Α) Ο ανθρώπινος HIF-1α

Η πιο καλά μελετημένη ισομορφή της HIF-α υπομονάδας είναι η HIF-1α. Ο HIF-1α κωδικοποιείται από το γονίδιο *HIF1A* το οποίο στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 στην περιοχή 14q23.2 (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Η χρωμοσωμική περιοχή στην οποία χαρτογραφείται το γονίδιο του *HIF1A* [20].

Το γονίδιο του *HIF1A* αποτελείται από 52.747 βάσεις και οργανώνεται σε 15 εξόνια ενώ η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει μοριακή μάζα ίση με 92,67 kDa και η αμινοξική της αλληλουχία, η οποία αποτελείται από 826 αμινοξέα, παρουσιάζεται στην εικόνα 3 [20], [21].

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MEGAGGANDK	KKISSERRKE	KSRDAARSR	SKESEVFYEL	AHQPLPHNV	SSHLDKASVM	RLTISYLRVR	KLLDAGDLDI	EDDMKAQMNC
100	110	120	130	140	150	160	170	180
FYKALDGFV	MVLTDDGDMI	YISDNVNKYM	GLTQFELTGH	SVFDFTHPCD	HEEMREMLTH	RNGLVKKGKE	QNTQRSFFLR	MKCTLTSRGR
190	200	210	220	230	240	250	260	270
TMNIKSATWK	VLHCTGHIHV	YDTNSNQPOC	GYKKPPMTCL	VLICEPIPHP	SNIEIPLDSK	TFLSRHSLDM	KFSYCDERIT	ELMGYEPEEL
280	290	300	310	320	330	340	350	360
LGRSIYEVYH	ALDSDHLTKT	HDMFTKGQV	TTGQYRMLAK	RGYVWVETQ	ATVIYNTKNS	QPQCIVCVNY	VVSGIIQHDL	IFSLQQTECV
370	380	390	400	410	420	430	440	450
LKPVESSDMK	MTQLFTKVES	EDTSSLFDKFL	KKEPDALTLL	APAAGDTIIS	LDFGSNDTET	DDQQLEEVPL	YNDVMLFSPN	EKLQINLAM
460	470	480	490	500	510	520	530	540
SPLPTAETPK	PLRSSADPAL	NQEVALKLEP	NPESLELSFT	MPQIQDQTPS	PSDGSTROSS	PEPNSPSEYC	FYVDSMDVNE	FKLELVEKLF
550	560	570	580	590	600	610	620	630
AEDTEAKNPF	STQDTDLGLE	MLAPYIPMDD	DFQLRSFDQL	SPLLESSASP	ESASPQSTVT	VFQQTQIQEP	TANATTTTAT	TDELKTVTKD
640	650	660	670	680	690	700	710	720
RMEDIKILIA	SPSPTHIHKE	TTSATSSPYR	DTQSRASP	RAGKGVIEQT	EKSHPRSPNV	LSVALSQRTT	VPEEELNPKI	LALQNAQRKR
730	740	750	760	770	780	790	800	810
KMEHDGSLFQ	AVGIGTLLQQ	PDDHAATTSL	SWKRVKGCKS	SEQNGMEQKT	IILIPSDLAC	RLLGQSMDES	GLPQLTSDYC	EVNAPIQGSR
820								
NLLQGEELLR	ALDQVN							

Εικόνα 3: Η αμινοξική αλληλουχία του ανθρώπινου μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α [21].

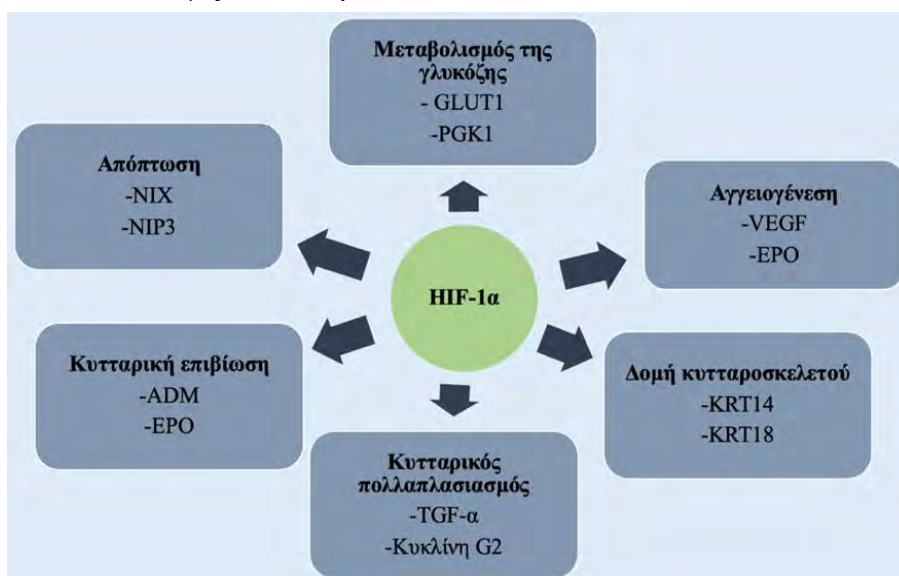
Όπως αναλύθηκε παραπάνω, ο HIF-1α περιλαμβάνει τις εξής διακριτές επικράτειες [22]:

- την επικράτεια bHLH (αμινοξέα 17-71) η οποία συμμετέχει στην πρόσδεση της πρωτεΐνης στις περιοχές HREs στο DNA για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Η περιοχή bHLH περιλαμβάνει ενδιάμεσα (αμινοξέα 17-33) αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης (NLS, Nuclear Localization Sequence),
- την περιοχή PAS με τις επικράτειες PAS-A (αμινοξέα 85-198) και PAS-B (αμινοξέα 228-298) η οποία ελέγχει τον ετεροδιμερισμό του HIF-1α με την ARNT υπομονάδα,

- την επικράτεια ODDD (επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης). Η συγκεκριμένη περιοχή (αμινοξέα 401-603) περιλαμβάνει κατάλοιπα αμινοξέων που σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου υδροξυλιώνονται και ο HIF-1α αποικοδομείται,
- την επικράτεια συν-ενεργοποίησης N-TAD (αμινοξέα 531-575) η οποία ευθύνεται για την επιλεκτικότητα των γονιδίων στόχων και
- την επικράτεια συν-ενεργοποίησης C-TAD στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 786-826) που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες συν-ενεργοποιητές όπως οι CBP/p300.

Σε συνθήκες που το οξυγόνο είναι επαρκές, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης στην ODDD επικράτεια από εξειδικευμένες υδροξυλάσες και αποικοδομείται. Κατά την υποξία, οι υδροξυλάσες δεν είναι ενεργές και έτσι η πρωτεΐνη HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης με τις ιμφορτίνες 4/7. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της ιμφορτίνης 7 με τον HIF-1α πραγματοποιείται στο αμινοτελικό άκρο μέσω των επικρατειών bHLH και PAS-A του HIF-1α και οδηγεί στην πυρηνική συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα [23]. Η είσοδος στον πυρήνα είναι πολύπλοκη καθώς έχει αναφερθεί και αλληλεπίδραση με τις ιμφορτίνες α/β στο καρβοξυτελικό άκρο [11]. Επιπλέον, ο HIF-1α στην καρβοξυτελική επικράτεια (aa 631-639) διαθέτει και σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES, Nuclear Export Signal) [11]. Εφόσον ο HIF-1α εισέλθει στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με την ARNT υπομονάδα και συνδέεται στο DNA στα στοιχεία HREs σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (5'-RCGTG-3') στους υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων στόχων του [24].

Τα γονίδια που ενεργοποιούνται μεταγραφικά από τον HIF-1 επηρεάζουν ποικίλες λειτουργίες και σχετίζονται άμεσα με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως και η καρκινογένεση. Γενικά, ο HIF-1α επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, την παραγωγή ερυθροκυττάρων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, τη δομή του κυτταροσκελετού κ.α [25]. Μερικές από τις σημαντικότερες διεργασίες που ενεργοποιούνται συνοψίζονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Οι κυτταρικές διεργασίες που ρυθμίζει ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α.

B) Ο HIF-1α του ποντικού (mHIF-1α)

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α του **ποντικού**. Στο ποντίκι το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον HIF-1α βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 και είναι ορθόλογο του ανθρώπινου *HIF1A*. Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 836 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 93,156 kDa. Η αλληλουχία των αμινοξέων του mHIF-1α φαίνονται στην εικόνα 5 [26].

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MEGAGGENEK	KKMSSERRKE	KSRDAARRR	SKSEVFPYEL	AHQPLPHNV	SSHLDKASVM	RLTISYLRVR	KLLDAGGLDS	EDEMKAQMDC
100	110	120	130	140	150	160	170	180
FYLKALDGFV	MVLTDGDMV	YISDNVVKYM	GLTQFELTGH	SVPDFTHPCD	HEEMREMLTH	RNGFVRKKE	LNTQRSFFLR	MKCTLTSRGR
190	200	210	220	230	240	250	260	270
TMNIKSATWK	VLHCTGHIHV	YDTNSNQPC	GKKPPMTCL	VLICEPIHP	SNIEIPLDSK	TFLSRHSLDM	KFSYCDERIT	ELMGYEPEEL
280	290	300	310	320	330	340	350	360
LGRSIYEYH	ALDSDHLTKT	HDMFTKGQV	TTGQYRLAK	RGYVWVETQ	ATVIYNTKNS	QPQCIVCVNY	VVSGIIQHDL	IFSLQQTESV
370	380	390	400	410	420	430	440	450
LKPVESSDMK	MTQLFTKVES	EDTSCLFDKL	KKEPDALTLL	APAAGDTIIS	LDGSDDTET	EDQQLQEDVPL	YNDVMFPSSN	EKLNINLAMS
460	470	480	490	500	510	520	530	540
PLPSSETPKP	LRSSADPALN	QEVALKLESS	PESLGLSFTM	PQIQDQPASP	SDGSTROSSP	ERLLQENVNT	PNFSPQNSPS	EYCFDVSDDM
550	560	570	580	590	600	610	620	630
VNVFKLELVE	KLFAEDTEAK	NPFSTQDIDL	DLEMLAPYIP	MDDDFQLRSF	DQLSPLESNS	PSPPSMSTVT	GFQQTQLQKP	TITATATTTA
640	650	660	670	680	690	700	710	720
TTDESKTETK	DNKEDIKILI	ASPSSTQVPO	ETTTAKASAY	SGTHSRTASP	DRAGKRVIEQ	TDKAHPRSLN	LSATLNQRNT	VPEEELNPKT
730	740	750	760	770	780	790	800	810
IASQNAQRKR	KMEHDGSLFQ	AAGIGTLQQ	PGDCAPTMSL	SWKRVKGFIS	SEQNGTEQKT	IILIPSDLAC	RLGQSMDES	GLPQLTSYDC
820	830							
EVNAPIQGSR	NLLQGEELLR	ALDQVN						

Εικόνα 5: Η αμινοξική αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα mHIF-1α [26].

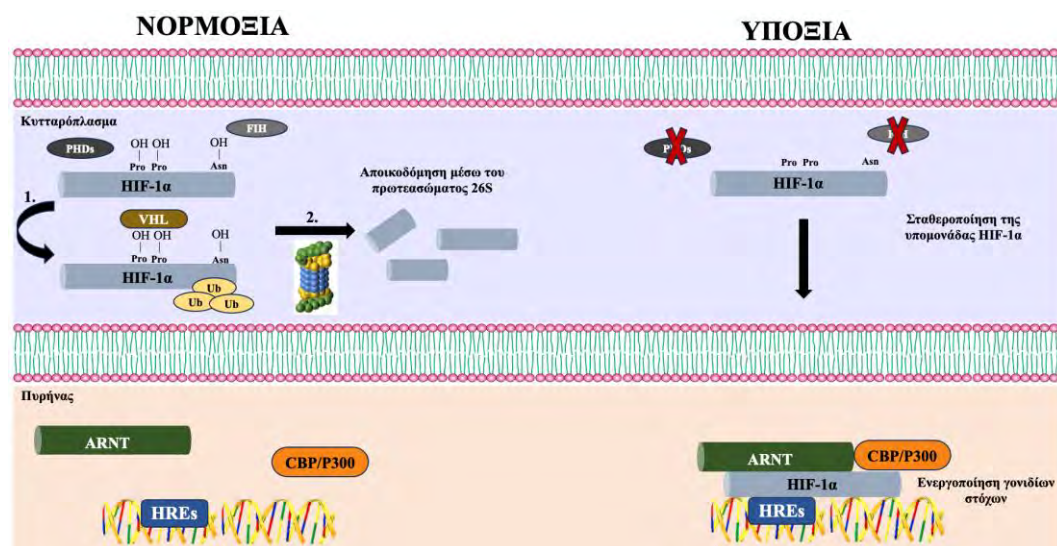
Μετά από ευθυγράμμιση της ανθρώπινης και ποντικής αμινοξικής αλληλουχίας βρέθηκε ότι το ποσοστό των θέσεων όπου τα αμινοξέα και στις δύο αλληλουχίες είναι ίδια είναι περίπου 90% [27]. Παράλληλα, μελέτες σύγκρισης που διενεργήθηκαν, αποκαλύπτουν ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία σε ποσοστό 95% και 99% στις περιοχές bHLH και PAS αντίστοιχα [28]. Τέλος, υπάρχουν δεδομένα που αναφέρουν υψηλό ποσοστό συντήρησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στους υποκινητές που κωδικοποιούν για το γονίδιο του HIF-1α και mHIF-1α, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη σημαντικής εξελικτικής επιλογής για τη διατήρηση της δομής, της λειτουργίας και της ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα [29].

Πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, απέδειξαν τη σημασία του mHIF-1α σε έμβρυα ποντικών. Πιο συγκεκριμένα, έμβρυα ποντικών που εμφανίζουν πλήρη ανεπάρκεια του HIF-1α και είναι HIF-1α^{-/-} οδηγούνται σε εμβρυική θνησιμότητα την E11.5 (11.5 ημέρες μετά την γονιμοποίηση) λόγω νευρικών και καρδιαγγειακών διαταραχών γεγονός που υπερτονίζει τη σημασία του HIF-1α για τη διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής και αναπτυξιακής ομοιοστασίας του O₂ και σε μοντέλο ποντικού [30]. *In vitro* μελέτες στην ποντική κυτταρική σειρά 3T3-L1, συσχετίζουν την ενεργοποίηση του mHIF-1α με μεταβολικές ασθένειες, όπως είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά και με τον καρκίνο [31]. Όσον αφορά την καρκινογένεση, πειράματα σε κύτταρα ποντικού έχουν αποδείξει ότι ο mHIF-1α προωθεί την ανάπτυξη του όγκου [32]. Αναστολή του HIF-1α σε ποντική κύτταρα καρκίνου του μαστού οδήγησε σε μείωση των επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 και VEGF [33]. Ο Foxp3 ρυθμίζει την μετατροπή των T-βοηθητικών κυττάρων του ανοσοποιητικού σε T-ρυθμιστικά γεγονός που προάγει την καρκινογένεση [34] ενώ

ο VEGF είναι το κυρίαρχο μόριο της νέο-αγγειογένεσης και γονίδιο στόχος του HIF-1α [35]. Τέλος, η απώλεια του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον mHIF-1α σε ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού μείωσε σημαντικά τον ρυθμό μετάστασης των καρκινικών κυττάρων [36].

1.5 Η ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α από το οξυγόνο

Η μεταγραφική ενεργότητα της υπομονάδας HIF-1α εξαρτάται από τα επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο. Οι G. Semenza, Sir P. Ratcliffe και W. Kaelin απέδειξαν ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου πραγματοποιείται υδροξυλίωση σε δύο (2) συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης της υπομονάδας του ανθρώπινου HIF-1α (Pro-402/Pro-564) [11]. Η υδροξυλίωση αυτή συμβαίνει εντός της επικράτειας ODDD και καταλύεται από τις υδροξυλάσες προλίνης PHD-1, PHD-2 και PHD-3 (prolyl hydroxylases) οι οποίες χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το μοριακό οξυγόνο και περιέχουν Fe^{2+} [16], [37]. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL (Von Hippel-Lindau), η οποία είναι μέρος του συμπλόκου E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, να αναγνωρίζει και να πολυουβικουιτίνώνει τον HIF-1α. Έτσι η υπομονάδα HIF-1α οδηγείται στο πρωτεόσωμα 26S (κύρια πρωτεολυτική μηχανή των ευκαρυωτικών κυττάρων [38]) όπου και αποικοδομείται με αποτέλεσμα την μεταγραφική καταστολή των γονιδίων στόχων του HIF-1α (εικόνα 6). Παράλληλα, το ένζυμο FIH (Factor Inhibiting HIF) καταλύει ένα ακόμη συμβάν υδροξυλίωσης σε ένα κατάλοιπο ασπαργίνης (Asn-803) στην επικράτεια C-TAD και αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τους συν-ενεργοποιητές CBP/p300 και άρα τη μεταγραφική του δράση [39].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του HIF-1α. Εμφανίζονται η υδροξυλίωση του HIF-1α από τις υδροξυλάσες PHD και FIH, η αλληλεπίδραση του υδροξυλιωμένου (στις προλίνες) HIF-1α με τον VHL και η καταστροφή του στο πρωτεάσωμα. Στην υποξία λόγω έλλειψης οξυγόνου οι PHD δεν λειτουργούν και ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT, συνδέεται με συνενεργοποιητές και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων στόχων της υποξίας.

Αντίθετα, σε κατάσταση υποξίας παρατηρείται η σταθεροποίηση του HIF-1α (εικόνα 6). Αρχικά, λόγω της έλλειψης οξυγόνου, τα ένζυμα PHDs και FIH είναι ανενεργά με αποτέλεσμα ο HIF-1α να μην υδροξυλιώνεται. Αυτό οδηγεί στην σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1α καθώς ξεφεύγει από την πρωτεολυτική διάσπαση από το πρωτεόσωμα 26S. Ο HIF-1α, εισέρχεται στον πυρήνα (με συμμετοχή των μμπορτινών 4/7) και δημιουργεί ετεροδιμερές με την συστατικά εκφραζόμενη υπομονάδα ARNT.

Μέσω της επικράτειας bHLH ο μεταγραφικός παράγοντας συνδέεται στα στοιχεία HREs των υποκινητών και ενισχυτών των γονιδίων στόχων με αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση τους. Πέρα από τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς, απαιτείται και η πρόσδεση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών CBP/300 στην επικράτεια C-TAD της HIF-1α υπομονάδας, πρόσδεση που ευνοείται από την απουσία υδροξυλίωσης στο κατάλοιπο Asn-803 από την FIH [11], [16].

Οι παραπάνω θέσεις υδροξυλίωσης από τις υδροξυλάσες PHDs και FIH είναι συντηρημένες και υπάρχουν και στο ποντίκι. Μετά από ευθυγράμμιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών με τη χρήση της ιστοσελίδας VectorBuilder (<https://en.vectorbuilder.com>) διαπιστώθηκε η παρουσία των παραπάνω αμινοξέων στο ποντίκι. Στην εικόνα 7 φαίνεται η ευθυγράμμιση των δύο (2) αλληλουχιών, όπου στη σειρά 1 αναπαρίσταται η ανθρώπινη αλληλουχία και στην σειρά 2 αυτή του ποντικού. Τα συντηρημένα αμινοξέα σημειώνονται με μαύρο περίγραμμα και όπως φαίνεται η θέση της Pro-564 του ανθρώπου αντιστοιχεί στην θέση Pro-577 στο ποντίκι ενώ η θέση Asn-803 στην Asn-813. Στοιχεία από τη βάση δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q61221/entry>) αποδεικνύουν την υδροξυλίωση των τριών (3) παραπάνω καταλοίπων από τις PHDs και FIH, τροποποιήσεις που αφορούν την ρύθμιση της υπομονάδας mHIF-1α από το οξυγόνο.



Εικόνα 7: Ευθυγράμμιση της ανθρώπινης (1) και ποντικής (2) αμινοξικής αλληλουχίας όσον αφορά τις θέσεις υδροξυλίωσης από τις υδροξυλάσες PHDs και FIH.

1.6 Ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α ανεξάρτητα από το οξυγόνο

Τελευταίες μελέτες καταδεικνύουν την ύπαρξη μηχανισμών που ρυθμίζουν τον HIF-1α ανεξάρτητα από το οξυγόνο, δηλαδή και σε καταστάσεις νορμοξίας και υποξίας. Αυτοί οι μηχανισμοί αφορούν τη σύνθεση του μεταγραφικού παράγοντα, την σταθερότητα του και την μεταγραφική ενεργότητα και πραγματοποιούνται τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και μετάφρασης. Τέλος, ο HIF-1α είναι δυνατόν να ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες ή μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [40].

α) Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Μελέτες υποδεικνύουν την ρύθμιση του HIF-1α από τις δραστικές μορφές οξυγόνου ή ROS (Reactive Oxygen Species) και από το μονοξείδιο του αζώτου (NO) σε επίπεδο μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι σε καταστάσεις νορμοξίας η προσθήκη H₂O₂ ενισχύει την μεταγραφή του HIF-1α σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές [41]. Παρομοίως, κατά την νορμοξία, το NO είναι δυνατόν να ενισχύει την έκφραση του HIF-1α είτε μέσω αναστολής της δράσης των υδροξυλασών, είτε μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και MAPK [42]. Ο μεταγραφικός παράγοντας που ενέχεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση του *HIF1A* είναι ο NRF2 που επάγεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες [16].

Ο παράγοντας NF-κB ανήκει στην οικογένεια των προφλεγμονοδών μεταγραφικών παραγόντων και η έκφραση του έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Η δράση του σχετίζεται, μεταξύ άλλων, και με τον HIF-1α καθώς δεδομένα αναφέρουν ότι αποτελεί κύριο ρυθμιστή του HIF-1α επάγοντας την έκφραση του σε καταστάσεις φλεγμονής και υποξίας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-1α και NF-κB προωθεί την καρκινογένεση μέσω της ενεργοποίησης αντι-αποπτωτικών γονιδίων όπως το *BCL2* [43].

Τέλος, ένας ακόμη τρόπος ρύθμισης της HIF-1α υπομονάδας σε επίπεδο μεταγραφής γίνεται μέσω των πρωτεϊνών STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Οι STAT είναι οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που ανταποκρίνονται σε εξωγενή σήματα, ενεργοποιούνται αφού φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες JAK (Janus Kinases) και στη συνέχεια εισέρχονται στον πυρήνα ρυθμίζοντας την μεταγραφή γονιδίων. Πειραματικά αποτελέσματα αναφέρουν την πρωτεΐνη STAT3 ως ρυθμιστή του HIF-1α ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του γονιδίου του [44]. Επιπλέον μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές κατέδειξαν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης STAT3 με τον HIF-1α ως αιτία για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HIF-1α προωθώντας την ογκογένεση [45].

β) Ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης

Η ρύθμιση του HIF-1α σε επίπεδο μετάφρασης πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο μέσω δύο (2) σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια αυτά είναι το PI3K/AKT/mTOR και αυτό των MAPK κινασών.

▪ Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR

Η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς EGFRs, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπιδικής κινάσης PI3K η οποία φωσφορυλιώνει τη 4,5 - διφωσφορική φωσφατιδυλνινοσιτόλη (PIP2) για τη δημιουργία της 3,4,5 - τριφωσφορικής φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PIP3). Στη συνέχεια η Akt κινάση αναστέλλοντας το σύμπλοκο TSC1/2, ενεργοποιεί την κινάση mTOR, διεγείροντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή/και αναστέλλοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες [46]. Στόχος της πρωτεΐνης mTOR αποτελεί και ο παράγοντας 4E-BP1, φωσφορυλίωση του οποίου οδηγεί σε διαταραχή της αλληλεπίδρασης του με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-4E. Φυσιολογικά η αλληλεπίδραση των παραπάνω οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης και άρα η φωσφορυλίωση του 4E-BP1 έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της μετάφρασης της υπομονάδας HIF-1α. Ταυτόχρονα, η κινάση mTOR φωσφορυλιώνει την S6K κινάση (p70 S6 κινάση) η οποία ενεργοποιεί την πρωτεΐνη S6 του ριβοσώματος οδηγώντας στην μετάφραση των πρωτεϊνών όπως ο HIF-1α [38].

▪ Σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK κινασών

Η αύξηση έκφρασης του HIF-1α μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK είναι δυνατόν να προωθεί την ογκογένεση. Η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στους υποδοχείς RTKs έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη φωσφορυλίωσης. Ο καταρράκτης αυτός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της GTPάσης Ras η οποία αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί μέσω αλληλεπίδρασης την κινάση

Raf. Με τη σειρά της η Raf ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την MEK και αυτή τις ERK1/2 κινάσες. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μετάφρασης του mRNA που κωδικοποιεί για τον HIF-1α μέσω ρύθμισης της λειτουργίας των πρωτεϊνών p70 S6, 4E-BP1, και MNK [47].

γ) Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες

▪ *Αλληλεπίδραση με την υπομονάδα HIF-1β (ARNT)*

Όπως αναφέρθηκε, η υπομονάδα ARNT ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLH (έλικα-στροφή-έλικα) - PAS (Per-ARNT-Sim). Η εν λόγω πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε δύο (2) σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν απόκριση σε συγκεκριμένες συνθήκες. Το ένα αφορά την υποξία ενώ το δεύτερο την απόκριση σε τοξικές χημικές ουσίες (π.χ. διοξίνες). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται συστατικά, κάτι που σημαίνει ότι τα επίπεδα mRNA ή αυτά της πρωτεΐνης δεν εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε καταστάσεις υποξίας, στις οποίες ο HIF-1α διαφεύγει από την αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα, εισέρχεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με την υπομονάδα ARNT και δημιουργείται ένα ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται στις περιοχές HREs του DNA και αφού προσελκυσθούν οι συνενεργοποιητές p300/CBP ξεκινά η μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-1α [48].

▪ *Αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο συνενεργοποίησης p300/CBP*

Οι παράγοντες συνενεργοποίησης είναι πρωτεΐνες πολλαπλών επικρατειών που δεσμεύονται σε μια μεγάλη ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας την δραστηριότητα τους και την μεταγραφή γονιδίων στόχων τους [49]. Η αλληλεπίδραση των συνενεργοποιητών p300/CBP και του HIF-1α γίνεται μέσω των επικρατειών CH1 και C-TAD αντίστοιχα και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II των γονιδίων στόχων του HIF-1α. Εφόσον ο HIF-1α επάγει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση ή την μετάσταση και προωθεί την καρκινογένεση, μια στρατηγική για την αναστολή της έκφρασης τέτοιων γονιδίων είναι ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με τους συνενεργοποιητές p300/CBP [50].

▪ *Αλληλεπίδραση με τον μεταγραφικό παράγοντα Myc*

Ο μεταγραφικός παράγοντας Myc συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και είναι μια ογκοπροωθητική πρωτεΐνη καθώς επηρεάζει μια σειρά γονιδίων που αφορούν την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των κυττάρων [51]. Η ρύθμιση του HIF-1α από τον μεταγραφικό παράγοντα Myc είναι πολυεπίπεδη και αφορά την σταθεροποίηση και τη συσσώρευση του στον πυρήνα μέσω αναστολής της αποικοδόμησης του HIF-1α από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL, ή μέσω αύξησης των επιπέδων ROS του κυττάρου γεγονός που οδηγεί στην αναστολή δράσης των PHDs. Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας Myc συμμετέχει στην χαλάρωση της χρωματίνης μέσω ακετυλίωσης και προσελκύει την RNA πολυμεράση II για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων στόχων και την αύξηση της δραστηριότητας του HIF-1α [52].

- *Αλληλεπίδραση με τον μοριακό συνοδό HSP90 και την πρωτεΐνη RACK1*

Η πρωτεΐνη HSP90 (heat shock protein 90) είναι μια πρωτεΐνη συνοδός που ρυθμίζει μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η προστασία τους από την αποικοδόμηση ή η επιδιόρθωση του DNA και ενεργοποιείται σε καταστάσεις θερμικού σοκ [53]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συνδέεται στην PAS επικράτεια του HIF-1α και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του. Ωστόσο, η αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αποικοδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα. Ο υποδοχέας της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C (RACK1) ανταγωνίζεται την πρόσδεση του HIF-1α με την HSP90 και μέσω ενός μονοπατιού οδηγεί στην αποικοδόμηση του HIF-1α [54]. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την RACK1 με την μετανάστευση και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων [55].

- *Αλληλεπίδραση με την p53*

Η p53 είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Η δράση της είναι θεμελιώδης καθώς είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53*, μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν στον ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην προώθηση της ογκογένεσης [56]. Κατά την υποξία, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται και επάγει την απόπτωση, ωστόσο δεδομένα υποστηρίζουν ότι η υποξία και ο HIF-1α είναι δυνατόν και να απενεργοποιούν την πρωτεΐνη, αναλόγως τον τύπο των κυττάρων και τις εκάστοτε υποξικές συνθήκες [57]. Στα φυσιολογικά κύτταρα τα επίπεδα της p53 είναι χαμηλά και ελέγχονται μέσω της πρωτεΐνης MDM2 η οποία έχει δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης και οδηγεί την p53 για αποικοδόμηση [58]. Πειραματικές μελέτες σε καρκινικά κύτταρα αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη p53 λειτουργεί ως ικρίωμα, ρυθμίζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ MDM2 και HIF-1α γεγονός που οδηγεί τον τελευταίο στην αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [59]. Γενικά οι γνώσεις όσον αφορά την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την p53 είναι ανεπαρκείς για τον καθορισμό ενός καθολικού μοντέλου που αφορά τις δύο (2) πρωτεΐνες [59].

- *Αλληλεπίδραση με την μορταλίνη*

Η μορταλίνη παρόλο που είναι μη επαγόμενη από το θερμικό σοκ πρωτεΐνη, αλλά επάγεται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών (γλυκόζη), ανήκει στην οικογένεια των HSP70 πρωτεϊνών, λόγω μεγάλης ομοιότητας στην αλληλουχία. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια αλλά και σε άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα όπως είναι ο πυρήνας, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο καθώς επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την αγγειογένεση και τη βλαστικότητα τους [60]. Όταν η τροποποίηση του HIF-1α από τις ERK1/2 ανασταθεί μέσω χημικών παραγόντων ή μέσω μεταλλαξιγένεσης, τότε ο HIF-1α εξέρχεται από τον πυρήνα, δεσμεύεται στην μορταλίνη και συνδέεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου σχηματίζει σύμπλοκο με την εξοκινάση-II (HKII) και την VDAC (voltage-dependent anion channel). Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα την άμεση αναστολή της απόπτωσης του κυττάρου [61]. Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την μορταλίνη μεσολαβείται από τις επικράτειες ETD και SBD-VD

αντίστοιχα. Η αναστολή της αλληλεπίδρασης της μορταλίνης με τον HIF-1α με φαρμακολογικά μέσα (εμπελίνη) είναι δυνατό να μετατοπίσει τον μη τροποποιημένο HIF-1α από τα μιτοχόνδρια, επιβεβαιώνοντας τον κρίσιμο ρόλο της μορταλίνης να στοχεύει τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [62].

- *Αλληλεπίδραση με την νουκλεοφοσμίνη (NPM1)*

Η νουκλεοφοσμίνη (NPM1) είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να μετατοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα και να επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες. Ανήκει στην οικογένεια των μοριακών συνοδών ιστονών και οι διεργασίες στις οποίες εμπλέκεται αφορούν την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή του DNA, την βιογένεση των ριβοσωμάτων κ.α. [63]. Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ανέδειξαν τη νουκλεοφοσμίνη ως μία κύρια πρωτεΐνη με την οποία αλληλεπιδρά ο HIF-1α, όταν αυτός είναι φωσφορυλιωμένος από τις ERK1/2 στον πυρήνα σε συνθήκες χαμηλού μοριακού οξυγόνου. *In vitro* πειράματα απέδειξαν ότι η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεσολαβείται μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της NPM1 και της φωσφορυλιωμένης επικράτειας ETD του HIF-1α. Η σύνδεση της NPM1 με τον HIF-1α ρυθμίζεται από τις ERK1/2 κινάσες και αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α μέσω της πρόσδεσης της με το ετεροδιμερές HIF-1α/ARNT. Πιο συγκεκριμένα, η NPM1 είναι υπεύθυνη για την σταθερή πρόσδεση του ενεργού μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 στα στοιχεία HREs. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση καρκινικών κυττάρων κάτω από υποξικές συνθήκες μέσω επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού τους. Σίγηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την νουκλεοφοσμίνη οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού [64].

δ) Ρύθμιση μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια ή αφού έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της μετάφρασης. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό που συμμετέχει στη ρύθμιση του HIF-1α αλλά και των πρωτεϊνών ολόκληρου του πρωτεώματος [65]. Η ρύθμιση του HIF-1α από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις περιλαμβάνει την ακετυλίωση, την μεθυλίωση, την σουμοϋλίωση, την S-νιτροζυλίωση και την **φωσφορυλίωση** [16] που αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

- *Ακετυλίωση*

Η ακετυλίωση του HIF-1α έχει ποικίλα (και κάποιες φορές αντικρουόμενα) αποτελέσματα όσον αφορά την λειτουργικότητα του. Αρχικά, πειράματα έχουν αποδείξει την ικανότητα του συνενεργοποιητή p300 να ακετυλιώνει τον HIF-1α στην λυσίνη-709 οδηγώντας στην σταθεροποίηση του και στην αποφυγή της πολυουβικουιτίνωσης και της αποικοδόμησης του [66]. Αντίθετα, η αποακετυλίωση του HIF-1α από την HDAC4 έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργότητα του μέσω αναστολής της αποικοδόμησης του από το πρωτεάσωμα, σε έναν μηχανισμό μη εξαρτώμενο από την p-VHL [16]. Πειραματικές μελέτες που αφορούν την ποντικίσια πρωτεΐνη mARD1 (mouse arrest defective-1), μια ακυλοτρανσφεράση το mRNA της οποίας υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα, φαίνεται να απέδειξαν την

ικανότητα της μέσω αυτοακετυλίωσης, να συνδέεται στον HIF-1α και να μειώνει την σταθερότητα του σε υποξικές συνθήκες. Ακόμη, η mARD1 επάγει την ακετυλίωση του HIF-1α στην επικράτεια ODD (Lys-532) γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του μέσω του πρωτεασώματος [67].

- *Μεθυλίωση*

Η μονομεθυλο-τρανσφεράση SET7/9 αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και τον μεθυλιώνει σε δύο λυσίνες (Lys-32 και Lys-391). Οι παραπάνω τροποποιήσεις ρυθμίζουν αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α οδηγώντας τον προς αποικοδόμηση. Η LSD1 απομεθυλάση ανταγωνίζεται τις μεθυλίώσεις αυτές και είναι δυνατόν να επάγει την σταθεροποίηση του HIF-1α [68], [16].

- *Σουμοϋλίωση*

Οι πρωτεΐνες SUMO (SUMO-1 - SUMO-4) ομοιάζουν με την ουβικουιτίνη και τροποποιούν τις πρωτεΐνες μετα-μεταφραστικά σε λυσίνες ρυθμίζοντας μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών [69]. Τα αποτελέσματα της σουμοϋλίωσης του HIF-1α δεν είναι σαφή. Για παράδειγμα υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι τα σουμοϋλιωμένα κατάλοιπα K391 και K477 του HIF-1α οδηγούν σε αυξημένη σταθερότητα και ενεργότητα του ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την πολυουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση του [70]. Μελέτες που χρησιμοποιούν ποντίκια ως *in vivo* μοντέλο αποδεικνύουν την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της SUMO-1 σε καταστάσεις υποξίας. Η SUMO-1 αλληλεπιδρά και συνεντοπίζεται στον πυρήνα με τον HIF-1α σε νευρικά και καρδιομυοκύτταρα ενήλικου ποντικού *in vivo*. [71].

- *S-νιτροζυλίωση*

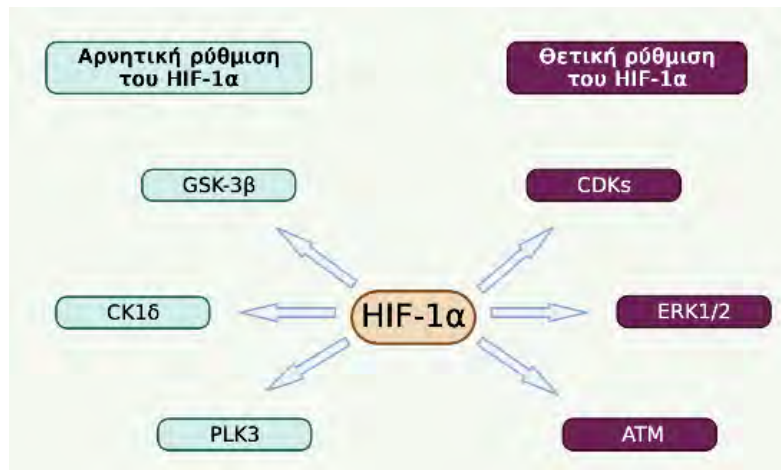
Η S-νιτροζυλίωση, δηλαδή η προσθήκη μιας ομάδας NO, είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών που πραγματοποιείται σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου ενώ εμπλέκεται και στην καρκινογένεση προωθώντας ή καταστέλλοντας την [72]. Η νιτροζυλίωση της Cys-800 στον ανθρώπινο HIF-1α έχει συσχετιστεί τόσο με την προσέλκυση των συνενεργοποιητών p300/CBP και την ενεργοποίηση της μεταγραφής όσο και με την αναστολή της πρόσδεσης τους [16]. Ακόμη, πειράματα σε καρκινικά κύτταρα ποντικού, η S-νιτροζυλίωση της Cys-533 στην επικράτεια ODDD του mHIF-1α φαίνεται να τον σταθεροποιεί και αναστέλλει την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα [73].

- *Επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις*

Έχουν ταυτοποιηθεί επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α όπως η γλυκοζυλίωση, η S-γλουταθειονυλίωση και η νεντυλίωση. Ωστόσο, λείπουν δεδομένα που να εξηγούν το αποτέλεσμα των παραπάνω τροποποιήσεων στην ρύθμιση της λειτουργίας του HIF-1α [16].

- Φωσφορυλίωση

Η πιο καλά μελετημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του HIF-1α είναι η φωσφορυλίωση. Έχουν χαρακτηριστεί πολυάριθμες κινάσες που μπορούν να προσθέτουν φωσφορικές ομάδες σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης και να ρυθμίζουν την λειτουργία του HIF-1α είτε θετικά είτε αρνητικά [16]. Στην εικόνα 8 συνοψίζονται οι πιο διαδεδομένες κινάσες που συμμετέχουν στην ρύθμιση της υπομονάδας HIF-1α.



Εικόνα 8: Η ρύθμιση του HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης. Εμφανίζονται κάποιες από τις πιο χαρακτηριστικές κινάσες πρωτεϊνών που τροποποιούν τον HIF-1α και προκαλούν είτε την αναστολή (αριστερά) ή την ενεργοποίηση του (δεξιά). Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του Biorender.

- Η φωσφορυλίωση από την GSK-3β

Η GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase 3) συμμετέχει στην ρύθμιση μιας ποικιλίας μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων και ο HIF-1α. Η χρήση αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του HIF-1α στο κύτταρο ενώ η υπερέκφραση της GSK-3β τον μειορρυθμίζει [74]. Στον άνθρωπο έχουν χαρακτηριστεί μια πληθώρα αμινοξέων του HIF-1α που φωσφορυλιώνονται από την GSK3-β (S551, T555, S589, T498, S502, S505, T506 και S510) με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του HIF-1α [16]. Όμοια στον ποντικό, η φωσφορυλίωση του mHIF-1α στα κατάλοιπα S564, T568 και S602 οδηγεί στην αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα [75].

- Η φωσφορυλίωση από την PLK3

Η PLK3 (Polo-like Kinase 3) ανήκει στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης και διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας του κυττάρου [75]. Ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια κυτταρικού στρες και ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί η αλληλεπίδραση των δύο (2) πρωτεϊνών και η φωσφορυλίωση του HIF-1α στα κατάλοιπα S576 και S657. Η δημιουργία μεταλλαγμάτων του HIF-1α στις δύο (2) θέσεις φωσφορυλίωσης αποκάλυψαν ότι ο HIF-1α ρυθμίζεται αρνητικά και αποικοδομείται μετά από τροποποίηση από την PLK3. Τα ίδια αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και στον mHIF-1α στα κατάλοιπα S589 και S668 [75].

ο *Η φωσφορυλίωση από την CK1δ*

Η CK1δ (Casein Kinase 1δ) ανήκει στην οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης και συμμετέχει σε βασικές κυτταρικές διεργασίες των ευκαρυωτικών κυττάρων όπως η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση [76]. Η CK1δ αποτελεί ρυθμιστή του HIF-1α και τα προηγούμενα χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς η δράση της από το εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έχει αποδειχθεί η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την CK1δ στην Ser-247 στην επικράτεια PAS, γεγονός που οδηγεί στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού με την ARNT, άρα και στην αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF [77]. Αναλυτικότερα, η CK1δ ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας μειώνοντας την δραστηριότητα του HIF-1α μέσω μείωσης της έκφρασης της λιπίνης-1 [78].

ο *Η φωσφορυλίωση από CDKs και ATM*

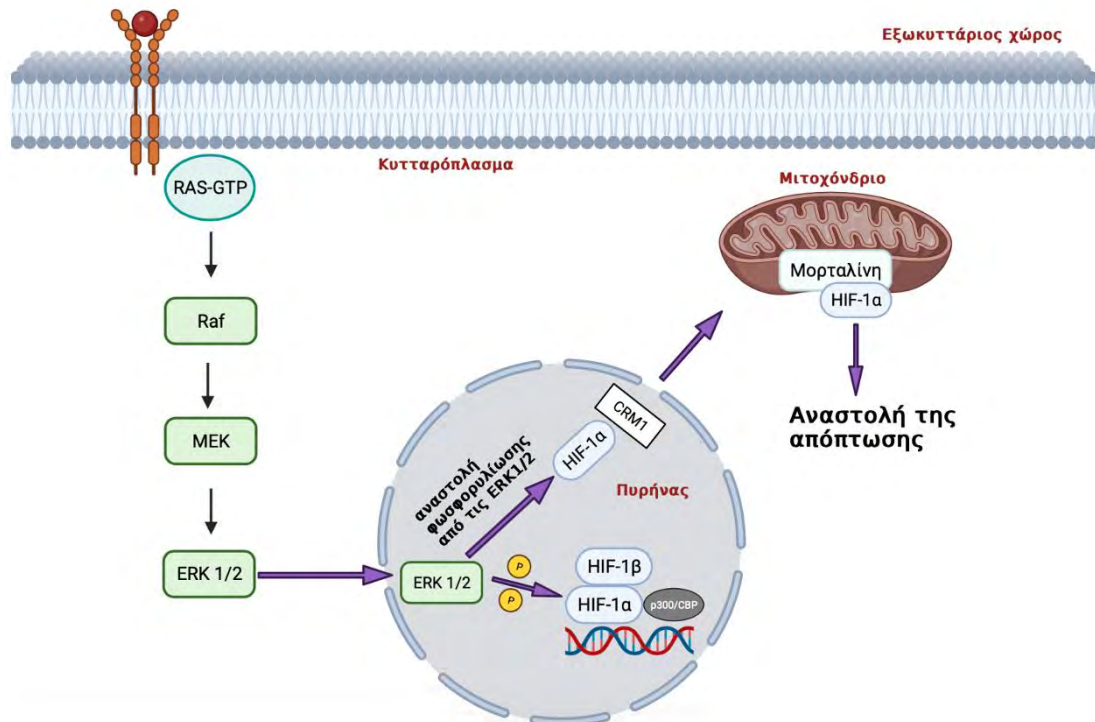
Οι κινάσες CDKs και ATM είναι κινάσες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν θετικά την ρύθμιση του HIF-1α [16]. Πιο συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στα κατάλοιπα Ser-668 και Ser-696 αντίστοιχα και αυξάνουν την σταθερότητα και την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα [79].

ο *Η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2*

Η μελέτη του βιολογικού ρόλου της φωσφορυλίωσης του mHIF-1α από τις ERK1/2 κινάσες είναι ο βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι κινάσες ERK1/2 ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών MAP (Mitogen-Activated Protein) οι οποίες διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες και ρυθμίζουν σημαντικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των κυττάρων [80]. Το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει θετικά την ενεργότητα του HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 κινάσες [81], [82].

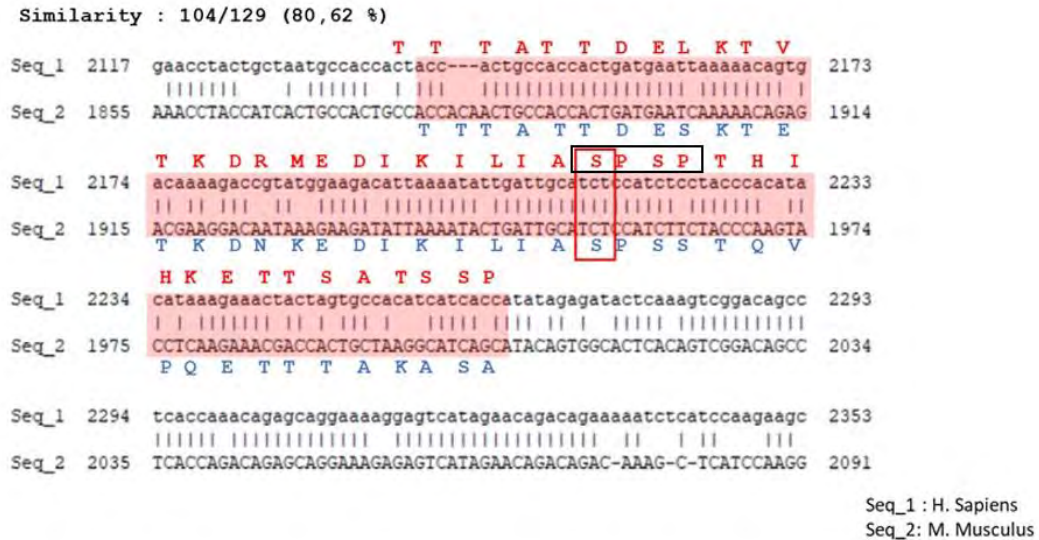
Όπως αναφέρθηκε, ο καταρράκτης σηματοδότησης ενεργοποιείται με την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους στην κυτταρική μεμβράνη. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν δράση κινάσης τυροσίνης και αυτοφωσφορυλιώνονται με αποτέλεσμα την προσέλκυση της πρωτεΐνης Ras (GTPάση) στην μεμβράνη. Η Ras αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί την κινάση Raf. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη Raf φωσφορυλιώνει την πρωτεϊνική κινάση MEK (MAP/ERK Kinase), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις ERK1/2 κινάσες. Οι ERK κινάσες δρουν τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα φωσφορυλιώντας πολυάριθμες πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες. Ανάμεσα στους στόχους της είναι και ο HIF-1α [80]. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας έχουν ταυτοποιήσει δύο (2) θέσεις φωσφορυλίωσης του ανθρώπινου HIF-1α από τις ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser-641 και Ser-643 μέσω φασματομετρίας μάζας. Οι τροποποιήσεις αυτές ενισχύουν τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α ο οποίος προσδέεται με την υπομονάδα ARNT και ενεργοποιεί μια ομάδα γονιδίων στόχων. Ωστόσο, μεταλλάξεις στις παραπάνω θέσεις φωσφορυλίωσης (από σερίνη σε αλανίνη) έχουν ως αποτέλεσμα την κατάργηση της φωσφορυλίωσης σε μεγάλο ποσοστό. Παράλληλα παρατηρήθηκε και αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α [83]. Ο HIF-1α μέσω ενός σήματος

εξαγωγής από τον πυρήνα στα κατάλοιπα 631-639 (Nuclear Export Signal, NES) που εμπεριέχονται σε μία μικρή επικράτεια (616-658) που καλείται ETD (ERK1/2 Target Domain) αλληλεπιδρά με την CRM1 (Chromosomal Maintenance 1) ή εξπορτίνη 1 και εξέρχεται από τον πυρήνα. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρά με την μορταλίνη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγώντας σε αναστολή της απόπτωσης του κυττάρου. Μεταλλάξεις στα κατάλοιπα του HIF-1α που μεσολαβούν στην έξοδο του από τον πυρήνα μέσω της CRM1 (NES) οδηγούν σε συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι περιγράφεται στην εικόνα 9 [84].



Εικόνα 9: Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras → Raf → MEK → ERK1/2. Οι ERK1/2 κινάσες φωσφορυλιώνουν τον ανθρώπινο HIF-1α σε δύο κατάλοιπα σερίνης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του. Σε περίπτωση αναστολής της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2 αυτός εξέρχεται από τον πυρήνα μέσω της CRM1 και μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου και αλληλεπιδρά με την μορταλίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης με μη γονιδιωματικό τρόπο. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του Biorender.

Η επικράτεια στην οποία συμβαίνει η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης στον άνθρωπο και αποτελεί στόχο των ERK κινάσων (ETD, ERK Target Domain) και είναι αρκετά συντηρημένη στον ποντικό. Μάλιστα, συντηρημένη είναι και η ακριβής θέση φωσφορυλίωσης Ser-641 από τις ERK1/2, όπου στον mHIF-1α αντιστοιχεί στη θέση Ser-652. Αντίθετα, το διπεπτίδιο Ser-Pro (που αποτελεί πρότυπο αναγνώρισης-φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2) στις θέσεις 643-644 του ανθρώπινου HIF-1α δεν υπάρχει στην αλληλουχία mHIF-1α του ποντικού καθώς αντικαθίσταται από το διπεπτίδιο Ser-Ser. Έτσι, πιθανότατα, στο ποντίκι ο mHIF-1α φωσφορυλιώνεται μόνο σε μία θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Στην εικόνα 10 απεικονίζεται η ευθυγράμμιση των δύο (2) αλληλουχιών (η Seq_1 αντιστοιχεί στον ανθρώπινο HIF-1α ενώ η Seq_2 στον mHIF-1α) όπου με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται η επικράτεια ETD ενώ με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι συντηρημένες θέσεις Ser-641 (HIF-1α) και Ser-652 (mHIF-1α) και η αλληλουχία SPSP που υπάρχει μόνο στον ανθρώπινο HIF-1α (μαύρο πλαίσιο, εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η ευθυγράμμιση των αλληλοχονίων ανθρώπου (1) και ποντικού (2) στην επικράτεια ETD αποκάλυψε μια συντηρημένη θέση φωσφορύλιωσης (εκεί όπου συμπίπτουν το κόκκινο με το μαύρο παραλληλόγραμμο) από τις ERK1/2 κινάσες.

1.7 Η σημασία του HIF-1 στον καρκίνο

Ο ενεργός μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (ετεροδιμερές HIF-1α και ARNT) επάγει την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται με την καρκινογένεση. Τα γονίδια αυτά αφορούν την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, την προώθηση της αγγειογένεσης, την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων κ.α. Ο ρόλος του HIF-1α στον καρκίνο συνοψίζεται στην εικόνα 11.

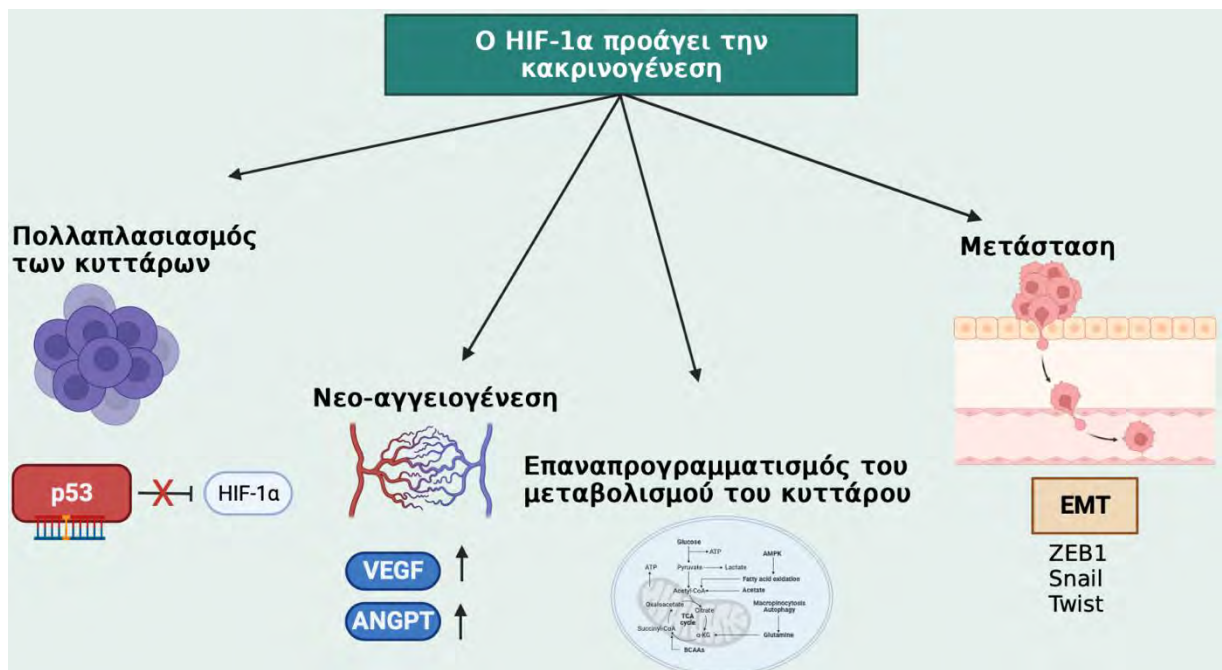
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.6.γ, η p53 σε καταστάσεις υποξίας συσσωρεύεται και οδηγεί στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση, λόγω βλαβών στα μιτοχόνδρια. Η σταθερότητα και η δράση της p53 ενισχύεται μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον HIF-1α, αλληλεπίδραση η οποία οδηγεί το υποξικό κύτταρο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μελέτες υποδεικνύουν την ικανότητα της p53 να ρυθμίζει αρνητικά τον HIF-1α. Ωστόσο, στα καρκινικά κύτταρα το γονίδιο TP53 υφίσταται πολυάριθμες μεταλλάξεις με αποτέλεσμα τη διαταραγμένη αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και HIF-1α. Το γονίδιο p53 δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με τον HIF-1α και να τον καταστέλλει και έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας είναι ενεργός και ρυθμίζει την έκφραση ενός δικτύου γονιδίων που αφορούν την αναστολή της απόπτωσης και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου αλλά και τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, προωθώντας την ογκογένεση [85].

Τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να είναι σε θέση να τροφοδοτούν τον όγκο με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά αλλά και να πολλαπλασιάζονται με υψηλούς ρυθμούς, ελέγχουν την σύνθεση ενός ανώμαλου αγγειακού δικτύου [86]. Αυτό προωθείται μέσω δημιουργίας μιας ανισορροπίας μεταξύ των μορίων προ-αγγειογένεσης και αντι-αγγειογένεσης [87]. Έρευνες αποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο του HIF-1α στην αγγειογένεση και στην ανάπτυξη του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών HIF-1α-VEGF-Notch σε υποξικές καταστάσεις προωθεί την αγγειογένεση [88]. Ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα όπου

σχηματίζει τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα (HIF-1 α -ARNT) και με τη δράση μεταγραφικών συνενεργοποιητών επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση (π.χ. *VEGF*, *EGF*, *ANGPT*, *VEGFR1* κ.α.) [89].

Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να προωθήσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους χρειάζονται παροχή ενέργειας. Έτσι λοιπόν, μέσω του φαινομένου Warburg, επαναπρογραμματίζουν τον μεταβολισμό τους για να στηρίξουν τις ανάγκες τους. Κατά το φαινόμενο Warburg, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την πρόσληψη γλυκόζης και τροφοδοτούν τον σχηματισμό γαλακτικού οξέος ως πηγή ενέργειας (παρόλο που τα μιτοχόνδρια είναι πλήρως λειτουργικά) για την παραγωγή βιομορίων (νουκλεοτίδια, λιπίδια, αμινοξέα κ.α.) [90]. Λειτουργικά, ο HIF-1 α επάγει την έκφραση γονιδίων προκαλώντας αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου και θρεπτικών από τον όγκο αλλά και συζητημένη χρήση του οξυγόνου από τα καρκινικά κύτταρα στον μεταβολισμό τους. Παράλληλα ο ενεργός HIF-1 α ρυθμίζει την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT1 και GLUT3) επιφέροντας μεγαλύτερη πρόσληψη γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα [85], [91]. Παράλληλα, διαταράσσεται και ο μεταβολισμός των λιπιδίων με μείωση της β -οξειδωσης και επαγωγής του μονοπατιού της παραγωγής τριακυλογλυκερολών και λιποσταγονιδίων μέσω της επαγωγής γονιδίων όπως της *LPINI* και *AGPAT2* [92].

Η ενεργοποίηση του HIF-1 α σε μεταγραφικό επίπεδο έχει συσχετιστεί με την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η μετάσταση στηρίζεται στην μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (EMT) και ο HIF-1 α έχει βρεθεί ότι επηρεάζει αυτό το χαρακτηριστικό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ρυθμίζει την έκφραση κρίσιμων μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην EMT όπως είναι οι ZEB1, Snail και Twist. Τέλος, επάγει την EMT μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών Notch, TGF- β , Wnt και Hedgehog [93].



Εικόνα 11: Ο HIF-1 α προωθεί την καρκινογένεση μέσω της ενεργοποίησης γονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τον σχηματισμό νέων αγγείων, τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των κυττάρων μέσω του φαινομένου Warburg και την μετάσταση. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του Biorender.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η βλαστικότητα τους. Όσο πιο φτωχός είναι ένας όγκος ως προς τη διαφοροποίηση του, τόσο χειρότερη είναι η κλινική εικόνα για τον ασθενή καθώς δίνεται η δυνατότητα περεταίρω διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Ο HIF-1α, μέσω συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως Oct4, Notch και JAK-STAT, ρυθμίζει τον φαινότυπο των βλαστοκυττάρων και αλλάζει την διαφοροποίηση τους [85].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε μοντέλα ποντικού και έχουν συνδέσει τον HIF-1α με την καρκινογένεση. Έρευνες σε διαγονιδιακά ποντίκια με καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι η σίγηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον mHIF-1α είχε ως αποτέλεσμα την καθυστερημένη εμφάνιση του όγκου και την μειωμένη ανάπτυξη του, λόγω της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα εμφάνισαν μικρότερο ποσοστό νέο-αγγειογένεσης αλλά και μειωμένη πνευμονική μετάσταση υπερτονίζοντας τον ρόλο του HIF-1α στην καρκινογένεση [94]. Επιπλέον πειράματα σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού με σίγηση του HIF-1α, υποδηλώνουν ότι ο HIF-1α ενισχύει το φαινόμενο Warburg για να αποφύγει μια θανατηφόρα παραγωγή μιτοχονδριακών ROS σε καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας [95]. Στον ίδιο τύπο κυττάρων έχει αποδειχθεί η μεγαλύτερη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε χημικές ουσίες και ακτινοβολία σε συνθήκες έλλειψης του mHIF-1α σε σχέση με κύτταρα ελέγχου [96]. Τέλος, η σίγηση του HIF-1α σε συνδυασμό με τον εμβολιασμό δενδριτικών κυττάρων σε ποντικούς με καρκίνο του μαστού οδήγησε σε μειωμένη έκφραση των μεταγράφων Foxp3 και VEGF, σε αυξημένη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού και σε μείωση των T-ρυθμιστικών κυττάρων που προωθούν την καρκινογένεση [97].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο HIF-1α είναι ένας από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προωθούν την καρκινογένεση με ποικίλους μηχανισμούς. Άρα, η στόχευση του HIF-1α μέσω μοριακών μηχανισμών, κρίνεται απαραίτητη για την αναπτυξη θεραπευτικών αντικαρκινικών προσεγγίσεων. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από πληθώρα γενετικών τροποποιήσεων οι οποίες περιλαμβάνουν και μεταλλάξεις σε κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια. [98].

Στην παρούσα διπλωματική μελετάται η μη οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α μέσω φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ταυτοποίησαν δύο (2) θέσεις φωσφορυλίωσης του ανθρώπινου HIF-1α (Ser-641 και Ser-643) από τις ERK1/2 οι οποίες επάγουν την συσσώρευση του στον πυρήνα και την μεταγραφική του ενεργότητα. Μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα και την μειωμένη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Για την εξακρίβωση του ακριβούς βιολογικού ρόλου της φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 είναι απαραίτητη η μελέτη της τροποποίησης αυτής σε ζωικό μοντέλο. Το πιο κοινό από αυτά είναι ο ποντικός.

Για να αξιολογηθεί η δυνατότητα μοριακής παρέμβασης στη ρύθμιση του HIF-1α από την φωσφορυλίωση, ως τρόπος θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου, κρίθηκε αναγκαία η μεταφορά όλων των εργαλείων και των παρατηρήσεων που αφορούν τον ανθρώπινο HIF-1α στο cDNA του ποντικού (mHIF-1α) και η έκφραση του σε ανθρώπινα κύτταρα και κύτταρα ποντικού.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση του mHIF-1α σε φορείς που δέχονται μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 και σε φορείς για την έκφραση του σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Σκοπός ήταν η παραγωγή των δύο (2) μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D (στο mS652A η σερίνη μετατρέπεται σε αλανίνη η οποία αναστέλλει την φωσφορυλίωση και στο mS652D η σερίνη μετατρέπεται σε ασπαραγινικό και μιμείται την φωσφορυλίωση) και η σύγκριση του φαινοτύπου των κυττάρων αγρίου τύπου (ως προς τη θέση φωσφορυλίωσης) με αυτόν των δύο (2) μεταλλαγμάτων τόσο σε επίπεδο εντοπισμού του μεταγραφικού παράγοντα όσο και σε επίπεδο έκφρασης και ενεργότητας του.

3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΥΛΙΚΑ

A1) Βακτηριακά στελέχη

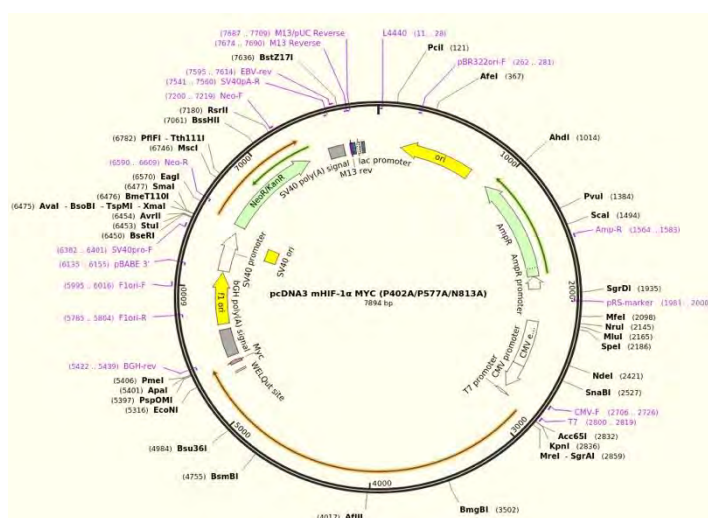
Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία για τον πολλαπλασιασμό των διάφορων φορέων και πλασμιδίων είναι το *Escherichia coli* **TOP10**. Τα TOP10 *E. coli* βακτήρια είναι ιδανικά για κλωνοποίηση υψηλής απόδοσης και πολλαπλασιασμό πλασμιδιακών φορέων δίνοντας πολλά αντίγραφα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και αποθηκεύονται στους -80 °C.

A2) Θρεπτικό υλικό βακτηριακών κυττάρων

Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB): Για την παρασκευή του απαιτούνται τα εξής χημικά: 1% Bacto-Tryptone, 0,5% Bacto-Yeast Extract και 0,5% NaCl. Σε περίπτωση που πρόκειται να στρωθούν τρυβλία καλλιέργειας προστίθεται 2% άγαρ. Η διαδικασία αναλύεται στις μεθόδους (παράγραφος Β1).

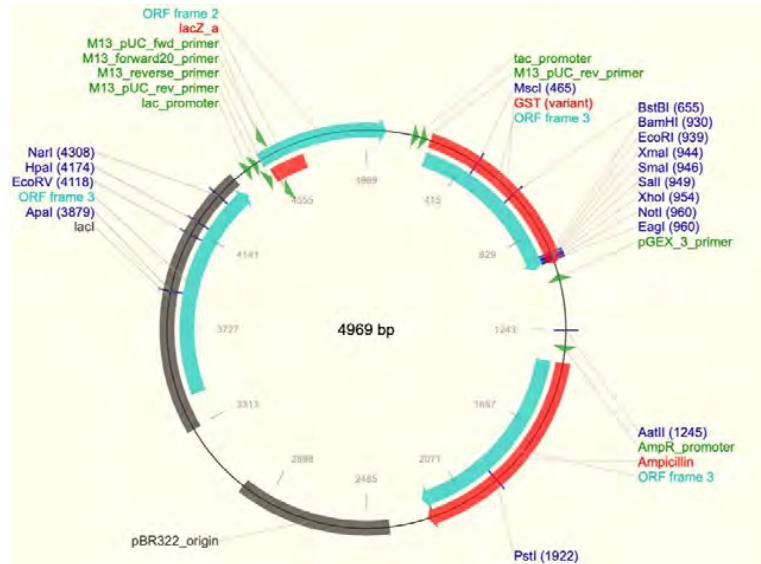
A3) Πλασμιδιακοί φορείς

- **pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A):** Το συγκεκριμένο πλασμίδιο, μεγέθους 7894 bp, κωδικοποιεί για τον ποντικόςιο HIF-1α (mHIF-1α) και προέρχεται από την Addgene. Το cDNA του mHIF-1α είναι μεγέθους 2541 bp και οριοθετείται στις θέσεις 2850 – 5390 του πλασμιδίου. Κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μεγέθους 846 αμινοξέων, δηλαδή 94,6 kDa. Ο φορέας περιλαμβάνει και τον επίτοπο Myc (30bp, 10 αμινοξέα, 1,2 kDa) ο οποίος βρίσκεται αμέσως μετά τον mHIF-1α στο πλασμίδιο και εκφράζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το ένθεμα mHIF-1α και ο επίτοπος Myc είναι κλωνοποιημένοι σε θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο BamHI-HF και στα δύο άκρα. Το πλασμίδιο περιλαμβάνει και γονίδια για ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμικικιλίνη, νεομυκίνη και καναμυκίνη. Ο χάρτης του φαίνεται στην εικόνα 12.



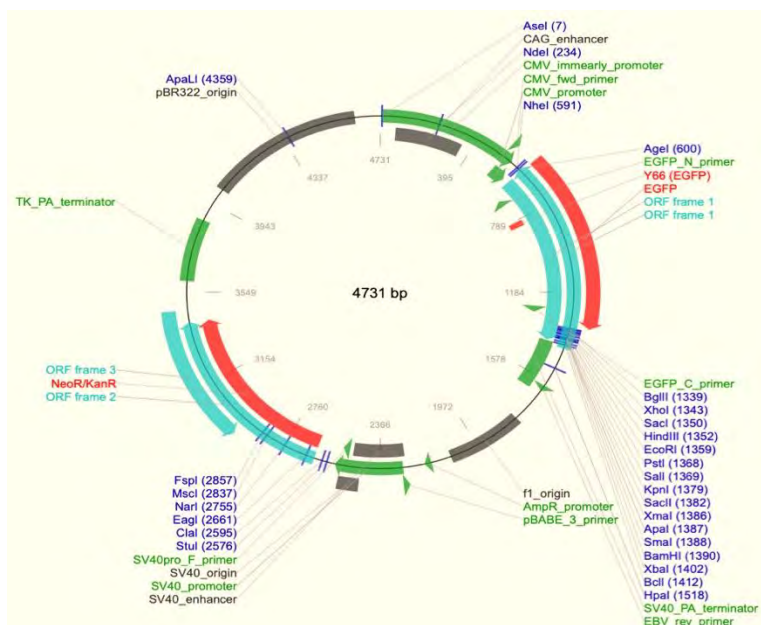
Εικόνα 12: Ο χάρτης του πλασμιδίου pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A) από <https://www.addgene.org>.

- pGEX-4T1:** Ο συγκεκριμένος φορέας, με προέλευση από την Addgene, χρησιμοποιήθηκε για την σημειακή μεταλλαξιγένεση του mHIF-1α. Πρόκειται για φορέα μεγέθους 4969 bp ο οποίος περιλαμβάνει γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό αμικιλίνη. Τέλος, όπως φαίνεται στην εικόνα 13, διαθέτει σπερόνιο λακτόζης και περιοχή που κωδικοποιεί για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).



Εικόνα 13: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 από <https://www.addgene.org>.

- pEGFP-C1:** Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 είναι μεγέθους 4731 bp και προέρχεται από την Addgene. Χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του mHIF-1α και την μετέπειτα διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών (HeLa και 3T3-L1) για την έκφραση της πρωτεΐνης και την παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού. Ο χάρτης του φορέα φαίνεται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1 από <https://www.addgene.org>.

- ***pGL3-VEGF-5XHRE-Luc***: Το συγκεκριμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε κατά τη μέτρηση δραστηριότητας των μορφών του mHIF-1α με τη δοκιμασία λουσιφεράσης. Περιλαμβάνει πέντε (5) επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (5X HREs) από τον υποκινητή του γονιδίου *VEGF* τα οποία ελέγχουν την μεταγραφή του γονιδίου της Firefly λουσιφεράσης. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικιλίνη.
- ***pCI-Renilla***: Το συγκεκριμένο πλασμίδιο κωδικοποιεί την λουσιφεράση της Renilla και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μέτρησης δραστηριότητας της λουσιφεράσης. Το γονίδιο της Renilla εκφράζεται συνεχώς και εξυπηρετεί τόσο τον έλεγχο της επιτυχίας της επιμόλυνσης των κυττάρων όσο και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας.
- ***pcDNA3.1-HA***: Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας στην ανοσοαποτύπωση κατά Western και στην μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης. Πρόκειται για έναν άδειο φορέα που φέρει μεταξύ άλλων επίτοπο HA (influenza hemagglutinin) και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη.

A4) Αντιβιοτικά

- ***Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη***: Ο συνδυασμός των αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο DMEM προκειμένου να αποτραπεί η βακτηριακή επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων στις κυτταροκαλλιέργειες. Η συνδυαστική δράση τους εμποδίζει την ανάπτυξη των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.
- ***Αμικιλίνη***: Πρόκειται για αντιβιοτικό β-λακτάμης. Τέτοιου τύπου αντιβιοτικά είναι αναστολείς της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Είναι μια ημισυνθετική πενικιλίνη και αποτελεσματική έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων [99]. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη καλλιεργειών βακτηριακών κυττάρων και την επιλογή μετασηματισμένων κυττάρων.
- ***Καναμυκίνη***: Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό ανήκει στην κατηγορία των αμινογλυκοζιτών. Οι αμινογλυκοζίτες αναστέλλουν την σύνθεση των πρωτεϊνών των βακτηρίων στοχεύοντας στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος. Χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη καλλιεργειών βακτηριακών κυττάρων [99].

A5) Ένζυμα

- ***Περιοριστικές ενδονουκλεάσες***

Τα ένζυμα περιορισμού τύπου II (ενδονουκλεάσες), είναι ένζυμα που προέρχονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να προστατεύουν το βακτήριο από την εισβολή ξένου DNA. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο δίκλωνο DNA και κόβουν αφήνοντας μονόκλινα άκρα γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για τη διαδικασία κλωνοποίησης [100]. Τα περιοριστικά ένζυμα (πίνακας 1) χρησιμοποιήθηκαν για πέψεις των πλασμιδιακών φορέων, απομόνωση του mHIF-1α

από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 (παρασκευαστική πέψη) και για τον έλεγχο ενσωμάτωσης του ενθέματος στους φορείς.

Ένζυμο	Buffer	Εταιρία	Χρήση
BamHI-HF 20.000 units/ml	10X CutSmart	NEB	Πέψη εκατέρωθεν του ενθέματος/ παρασκευαστικές πέψεις
PstI-HF 20.000 units/ml	10X CutSmart	NEB	Έλεγχος προσανατολισμού
KpnI 10 units/μl	Buffer KpnI ⁺	Fermentas	Πέψη σε μια αλληλουχία/ έλεγχος μεγέθους του φορέα
BglII 10.000 units/ml	10X CutSmart	NEB	Έλεγχος προσανατολισμού
Sall 20.000 units/ml	10X CutSmart	NEB	Έλεγχος προσανατολισμού
DpnI 10 units/μl	10X CutSmart	NEB	Μεταλλαξιγένεση

Πίνακας 1: Τα περιοριστικά ένζυμα και χρήση τους.

- ***T4 DNA λιγάση (400.000 units/ml)***

Η T4 DNA λιγάση είναι ένζυμο που καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5' φωσφορικών και 3' υδροξυλικών ομάδων στο δίκλωνο DNA. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε για την κατάλυση της αντίδρασης λιγάσης (ligation) και την κλωνοποίηση του mHIF-1α σε πλασμιδιακούς φορείς (παράγραφος B9).

- ***Φωσφατάση Quick CIP (5.000 units/ml)***

Η φωσφατάση Quick CIP χρησιμοποιήθηκε κατά τις παρασκευαστικές πέψεις (παράγραφος B6) των πλασμιδιακών φορέων προκειμένου να υδρολυθεί η φωσφορική ομάδα των άκρων και οι πλασμιδιακοί φορείς να μην επανακυκλοποιηθούν χωρίς να λάβουν το ένθεμα.

- ***PfuUltra HF DNA polymerase (2,5 units/μl)***

Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε κατά την κατευθυνόμενη, από τους εκκινητές, μεταλλαξιγένεση των πλασμιδιακών κλώνων παρέχοντας υψηλή πιστότητα (παράγραφος B10).

A6) Κυτταρικές σειρές

- **HeLa**

Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν το 1951 από γυναίκα που έπασχε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Είναι τα πρώτα αθάνατα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και αποτελούν, μέχρι και σήμερα, θεμελιώδες στοιχείο για την έρευνα του καρκίνου [101]. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο έκφρασης όλων των μορφών του mHIF-1α στον φορέα pcDNA3 αλλά και για τον έλεγχο έκφρασης του wt mHIF-1α στον φορέα pEGFP-C1.

- **3T3-L1**

Πρόκειται για κυτταρική σειρά που προέρχεται από εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού. Είναι «δυναμικά» κύτταρα καθώς έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται από ινοβλάστες σε λιποκύτταρα [102]. Χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός ισογονικού φαινότυπου το οποίο περιλαμβάνει την έκφραση του ποντικίσιου HIF-1α σε ποντικίσια κυτταρική σειρά.

A7) Θρεπτικά μέσα/Διαλύματα στις κυτταροκαλλιέργειες

- **Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):** Πρόκειται για ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο που εξυπηρετεί την ανάπτυξη πολλών και διαφορετικών κυττάρων που προέρχονται από θηλαστικά.
- **Θρεπτικό μέσο DMEM +/- (Πλήρες):** Παρασκευάζεται με την προσθήκη 10% βόειου ορού και του συνδυασμού των αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη στο DMEM.
- **Ορός εμβρύου βοός (FBS) 10%:** Παρέχει στα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και άλλα μόρια που απαιτούνται για τη διατήρηση και την ανάπτυξη τους.
- **Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη:** Με την προσθήκη του συνδυασμού των συγκεκριμένων αντιβιοτικών αποτρέπεται η βακτηριακή επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων.
- **Θρυψίνη:** Χρησιμοποιείται κατά την ανακαλλιέργεια και δρα πρωτελύοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας όσο και σε γειτονικά κύτταρα. Το ένζυμο εμφανίζει μέγιστη δράση στους 37 °C και συνήθως απαιτεί 3 με 5 λεπτά επώασης στην καλλιέργεια (ανάλογα τον τύπο των κυττάρων).
- **PBS 1X:** Χρησιμοποιείται κατά τις πλύσεις των κυττάρων. Απαιτείται η αποστείρωση του πριν τη χρήση του για την αποφυγή επιμολύνσεων των κυττάρων. Παρασκευάζεται μετά από αραιώση του PBS 10X και τα συστατικά του φαίνονται στον πίνακα 2.

Συστατικά PBS 1X
137 mM NaCl
2,68 mM KCl
100 mM Na ₂ HPO ₄
1,76 mM KH ₂ PO ₄

Πίνακας 2: Τα συστατικά του PBS 1X.

- **Dimethyl Sulfoxide (DMSO):** Είναι μια κρυοπροστατευτική ουσία που χρησιμοποιείται για την ψύξη (κρυοσυντήρηση) των κυττάρων μειώνοντας την πιθανότητα θανάτου τους.
- **Lysis Buffer για απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος:** Το lysis Buffer περιέχει τα συστατικά που φαίνονται στον πίνακα 3.

Συστατικά Lysis Buffer
25mM, Hepes pH 7,5
150mM, NaCl
2mM, MgCl ₂
0,1mM, AEBSF
0,5mM, DTT
Triton 1%
ddH ₂ O

Πίνακας 3: Τα συστατικά του Lysis Buffer.

A8) Αντισώματα

Τα **πρωτογενή αντισώματα** που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των αντίστοιχων πρωτεϊνών σε πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western φαίνονται στον πίνακα 4.

Αντίσωμα	Οργανισμός Ανάπτυξης	Αραίωση	Πρωτεΐνη Στόχος	Πείραμα
anti-HIF-1α	Ποντίκι και κουνέλι	1:5000	Ανθρώπινος HIF-1α	Western Blot
anti-a-actin	ποντίκι	1:5000	Ακτίνη	Western Blot
anti-GFP	αίγα	1:2000	GFP (Green Fluorescent Protein)	Western Blot
anti-Myc	κουνέλι	1:5000	Επίτοπος Myc	Western Blot
anti-tubulin	ποντίκι	1:5000	Τουμπουλίνη	Western Blot
anti-HIF-1α	ποντίκι	1:500 (BSA)	Ανθρώπινος HIF-1α	Ανοσοφθορισμός
anti-Myc	κουνέλι	1:250 & 1:500 (BSA)	Επίτοπος Myc	Ανοσοφθορισμός

Πίνακας 4: Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοφθορισμού.

Τα *δευτερογενή αντισώματα* (αντισώματα ειδικά έναντι των πρωτογενών αντισωμάτων, σημασμένα με ειδικό προσδέτη) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία φαίνονται στον πίνακα 5.

Αντίσωμα	Οργανισμός Ανάπτυξης	Αραίωση	Λειτουργία	Πείραμα	Εταιρία
anti-mouse HRP	άλογο	1:5000	Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP	Western Blot	Cell Signaling
anti-rabbit HRP	αίγα	1:5000	Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP	Western Blot	Cell Signaling
anti-goat HRP	κουνέλι	1:3000	Δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP	Western Blot	Sigma Aldrich
anti-mouse Alexa Fluor 555	αίγα	1:500 BSA	Δευτερογενές αντίσωμα Φθορισμός: εκπέμπει στην κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος	Μικροσκοπία Ανοσοφθορισμού	Cell Signaling
anti-rabbit Alexa Fluor 488	αίγα	1:500 BSA	Δευτερογενές αντίσωμα Φθορισμός: εκπέμπει στην πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος	Μικροσκοπία Ανοσοφθορισμού	Cell Signaling

Πίνακας 5: Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοφθορισμού.

A9) Αντιδραστήρια

- **Χημικά αντιδραστήρια:** Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προέρχονται από τις εταιρίες Sigma-Aldrich και την AppliChem.
- **DNAfectinTM Plus Transfection Reagent:** Πρόκειται για αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με εξωγενές DNA. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο παρουσιάζει μια ειδική σύνθεση πολυκατιόντων και λιποσωμάτων η οποία επιτρέπει υψηλή αποτελεσματικότητα διαμόλυνσης ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων
- **TurboFect Transfection Reagent:** Χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με εξωγενές DNA. Πρόκειται για ένα διάλυμα κατιονικών πολυμερών σε νερό, το οποίο διαμορφώνει σύμπλοκο με το DNA, διευκολύνοντας την μεταφορά των πλασμιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα.
- **Αντιδραστήριο Bradford:** Με τη χρήση του έγινε δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με μέτρηση της απορρόφηση του συμπλόκου που σχηματίζει με αυτές, για να φορτωθούν ίσες ποσότητες κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της έκφρασης των πρωτεϊνών στις διαφορετικές συνθήκες.

A10) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA

- **Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X:** Διατηρεί σταθερό το pH και παρέχει ιόντα για αύξηση της αγωγιμότητας. Διασφαλίζεται έτσι η ροή του ηλεκτρικού ρεύματος μέσω της πηκτής. Παρασκευάζεται μέσω αραιώσης του TAE 50X και τα συστατικά του φαίνονται στον πίνακα 6.

Συστατικά TAE 1X
40 mM Tris-Cl pH 8,5
20 mM CH ₃ COOH
1 mM EDTA

Πίνακας 6: Τα συστατικά του TAE 1X.

- **Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr):** Παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και έτσι αυτό φθορίζει βοηθώντας στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.
- **Gel Loading Dye, Purple (6X) NEB:** Εξυπηρετεί την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης.
- **GeneRuler 1 kb DNA ladder Thermo Scientific:** Μάρτυρας που εξυπηρετεί τον προσδιορισμό του μεγέθους των τμημάτων DNA.

A11) Συστατικά/διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western

- **Sample (loading) Buffer δειγμάτων 4X:** Η συγκέντρωση χρήσης του είναι 1X. Τα συστατικά του φαίνονται στον πίνακα 7.

Συστατικά 4X Sample (loading) buffer
250 mM Tris-HCl
9,2 % SDS
40% γλυκερόλη
0,2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης
100 mM, DTT (προστίθεται πριν τη χρήση)

Πίνακας 7: Τα συστατικά του 4X Sample (loading) buffer.

- **Πηκτή συσσώρευσης (stacking gel):** Επιτρέπει σε όλες τις πρωτεΐνες να ξεκινήσουν την κίνηση τους από το ίδιο σημείο λόγω της συσσώρευσης τους σε λεπτές ζώνες. Τα συστατικά της είναι: α) ακρυλαμίδιο 40% (μονομερές σε αναλογία 30:1 με bis-ακρυλαμίδιο), β) ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής συσσώρευσης (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 2mM EDTA και 0,1% SDS), γ) APS 10% (παρέχει ελεύθερες ρίζες για την έναρξη του πολυμερισμού), δ) TEMED (καταλύτης της αντίδρασης) και ε) ddH₂O.
- **Πηκτή διαχωρισμού (separating gel):** Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει μεγέθους τους. Τα συστατικά της είναι: α) ακρυλαμίδιο 40% (μονομερές σε αναλογία 30:1

με bis-ακρυλαμίδιο), β) ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (0,375 M Tris-HCl pH 8,9, 2 mM EDTA και 0,1% SDS), γ) APS 10% (παρέχει ελεύθερες ρίζες για την έναρξη του πολυμερισμού), δ) TEMED (καταλύτης της αντίδρασης) και ε) ddH₂O.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (Running Buffer):** Τα συστατικά του διαλύματος είναι: α) 50 mM Tris, β) 0,38 M γλυκίνη, γ) 2 mM EDTA και δ) 0,1% SDS.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer):** Ρυθμίζει τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το διάλυμα αυτό περιέχει 125mM Tris με Boric Acid με pH=8,5, 0,2% SDS, 0,5mM DTT.
- **Χρωστική Ponceau:** Χρησιμοποιείται για τη χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για την ανίχνευση των ζωνών των πρωτεϊνών.
- **PBS-Tween:** Χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης. Αποτελείται από PBS 1X και Tween σε αραιώση 1:1000.
- **5 % αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη:** Εξυπηρετεί τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης. Είναι διαλυμένο σε PBS-Tween.
- **Διάλυμα χημειοφωταύγειας:** Συστατικά: 10ml λουμινόλη, 100μl κουμαρικού και 30μl H₂O₂ 3%. Η λουμινόλη, η οποία είναι το υπόστρωμα της αντίδρασης της χημειοφωταύγειας, οξειδώνεται από το HRP (Horseradish Peroxidase) παρουσία H₂O₂, με αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας. Το κουμαρικό λειτουργεί ως ενισχυτής της αντίδρασης.
- **Color Prestained Protein Standard, Broad Range:** Χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

A12) Συστατικά/διαλύματα έμμεσου ανοσοφθορισμού

- **Triton-PBS 1X 0,1%:** Η συγκεκριμένη ποσότητα Triton, διαλυμένη σε PBS 1X επιτρέπει το πρωτογενές αντίσωμα να περάσει τη μεμβράνη χωρίς να λύσει τα κύτταρα.
- **Bovine Serum Albumin (BSA) 1%:** Το BSA είναι αλβουμίνη βοός επιτρέποντας τον αποκλεισμό μη ειδικών θέσεων. Διαλύεται σε PBS-Tween.
- **Διάλυμα MOWIOL-DAPI:** Το MOWIOL χρησιμοποιείται ως διάλυμα διατήρησης ενώ το DAPI δεσμεύεται στο DNA και επιτρέπει την σήμανση των πυρήνων κατά τη μικροσκοπία.

- **Φορμαλδεΰδη 3,7 %:** Η φορμαλδεΰδη σταθεροποιεί τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις δίνοντας μία στατική «εικόνα» για το τι συμβαίνει μέσα στο κύτταρο τη στιγμή της μονιμοποίησης. Χρησιμοποιείται για την μονιμοποίηση των κυττάρων.

A13) Εκκινητές

- **Εκκινητές σημειακής μεταλλαξίγνεσης**

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τη δημιουργία του μεταλλάγματος S652A φαίνονται στον πίνακα 8. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται το νουκλεοτίδιο που μεταλλάχθηκε με σκοπό την αντικατάσταση της σερίνης σε αλανίνη.

Primer length: 40	Μετάλλαγμα S652A
Forward primer	5' GATATTA AA ATACTGATTGCAG CT CCATCTTCTACCCAAG 3'
Reverse primer	5'CTTGGGTAGAAAGATGGAG CT GCAATCAGTATTTTAATATC 3'

Πίνακας 8: Οι εκκινητές του μεταλλάγματος S652A.

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τη δημιουργία του μεταλλάγματος S652D φαίνονται στον πίνακα 9. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα νουκλεοτίδια που μεταλλάχθηκαν με σκοπό την αντικατάσταση της σερίνης σε ασπαραγινικό.

Primer length: 44	Μετάλλαγμα S652D
Forward primer	5' GATATTA AA ATACTGATTGCAG AT CCATCTTCTACCCAAGTACC 3'
Reverse primer	5'GGTACTTGGGTAGAAAGATGGAT CT GCAATCAGTATTTTAATATC 3'

Πίνακας 9: Οι εκκινητές του μεταλλάγματος S652D.

Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών ελέγχθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Το μέγεθος των εκκινητών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 25 και 45 βάσεων.
- Εκατέρωθεν της τριπλέτας στην οποία εισάγεται η μετάλλαξη, το μέγεθος των εκκινητών να είναι περίπου ίσο.
- Για την εξασφάλιση μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας υβριδισμού, προτιμάται τα άκρα των εκκινητών να καταλήγουν σε G ή C καθώς τα νουκλεοτίδια αυτά δημιουργούν μεταξύ τους τρεις (3) δεσμούς υδρογόνου.
- Primer Melting Temperature (Tm): Η συγκεκριμένη παράμετρος, σύμφωνα με το πρωτόκολλο πρέπει να έχει τιμή ≥ 78 . Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τα μεταλλάγματα S652A και S652D έχουν τιμές 77.5 και 76.5 αντίστοιχα και είναι αποδεκτές.

A13) Διαλύματα από kit

Isolation of high-copy plasmid DNA from <i>E. coli</i>	Buffer A1 Buffer A2 Buffer A3 Buffer A4 Buffer AE
DNA extraction from agarose gels	Buffer NT1 Buffer NT3 Buffer NE
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	10X reaction buffer dNTPs PfuUltra HF DNA polymerase (2,5 units/μl) 70% αιθανόλη (EtOH)

Πίνακας 10: Τα kit που χρησιμοποιήθηκαν και τα διαλύματα που περιλαμβάνουν.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ

B1) Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υλικού LB

- **Υγρό θρεπτικό υλικό**

Αρχικά ζυγίζονται οι ποσότητες των χημικών που απαιτούνται για την παρασκευή του επιθυμητού όγκου θρεπτικού υλικού LB (1% Bacto-Tryptone, 0,5% Bacto-Yeast Extract και 0,5% NaCl). Στη συνέχεια, οι σκόνες τοποθετούνται σε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσεως με ddH₂O, χωρίς να προστεθεί ολόκληρος ο τελικός όγκος. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται για ανάδευση με μαγνήτη μέχρι την ομογενοποίηση του περιεχομένου και έπειτα προστίθεται ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο. Τέλος, πραγματοποιείται αποστείρωση του θρεπτικού υλικού.

- **Στερεό θρεπτικό υλικό**

Για την παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό ακολουθείται αρχικά η παραπάνω διαδικασία, με τη διαφορά ότι πριν την αποστείρωση, το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε γυάλινο μπουκάλι στο οποίο έχει προστεθεί 2% άγαρ. Στη συνέχεια, στο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό με το άγαρ προστίθεται αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη) σε αραιώση 1:1000 και πραγματοποιείται ανάδευση. Τέλος, πραγματοποιείται επίστρωση του θρεπτικού σε τρυβλία (περίπου 20 ml στο καθένα) με το γκαζάκι ανοιχτό για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις.

B2) Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Top10

Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Top10 είναι τα εξής:

- Ξεπάγωμα των κυττάρων Top10 από τους -80 °C όπου συντηρούνται.
- Προσθήκη του πλασμιδιακού DNA, με το οποίο πρόκειται να γίνει ο μετασχηματισμός, στον σωλήνα τύπου errendorf που βρίσκονται τα κύτταρα Top10.
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Σύντομο (90 δευτερόλεπτα) θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42 °C ώστε οι μεμβράνες των βακτηρίων να γίνουν διαπερατές.
- Προσθήκη περίπου 700 μl θρεπτικού μέσου LB για την εξουδετέρωση του στρες των βακτηρίων.
- Ελαφριά ανάδευση με την αυτόματη πιπέττα.
- Επώαση για 45 λεπτά στους 37 °C. Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (3-4 min) στις 4000 rpm όπου τα βακτήρια καθιζάνουν.
- Αφαιρούνται περίπου 600 μl και πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος.
- Επίστρωση των βακτηρίων σε πιάτο καλλιέργειας με αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη) με τη χρήση μιας γυάλινη πιπέττας.
- Το πιάτο καλλιέργειας αφήνεται για ολονύκτια επώαση στον κλίβανο στους 37 °C. Να σημειωθεί ότι το πιάτο καλλιέργειας πρέπει να έχει αποστειρωθεί με UV πριν τη χρήση του, ενώ καθ'όλη την πειραματική διαδικασία συνίσταται η ύπαρξη στείρων συνθηκών.

B3) Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας με βακτηριακά κύτταρα

Το πιάτο καλλιέργειας αφαιρείται από τον κλίβανο. Εφόσον υπάρχουν βακτηριακές αποικίες ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Σε δοκιμαστικό/ούς σωλήνα/ες προστίθεται αντιβιοτικό αμπικιλίνη και βακτηριακό θρεπτικό υλικό LB σε αναλογία 1:1000.
- Με ένα ρύγχος πιπέττας επιλέγεται ο επιθυμητός αριθμός αποικιών από το πιάτο καλλιέργειας.
- Η/Οι αποικία/ες αφήνονται μέσα στον/στους δοκιμαστικό/ούς σωλήνα/ες.
- Οι βακτηριακές καλλιέργειες αφήνονται για ολονύκτια ανάδευση (168 RPM) στους 37 °C.

Η διαδικασία απαιτεί την αποστείρωση του χώρου εργασίας για να αποφευχθούν επιμολύνσεις.

B4) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Η απομόνωση DNA με αλκαλική λύση επιτρέπει την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής καθαρότητας. Πραγματοποιείται πριν την χρήση του kit «Isolation of high-copy

plasmid DNA from E.Coli» για τον έλεγχο των αποικιών σχετικά με την παρουσία και τον προσανατολισμό του ενθέματος.

Αρχικά το υλικό από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της υγρής καλλιέργειας συλλέγεται σε σωλήνες τύπου erppendorf και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 4.000 rpm για τρία (3) λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται σε ποτήρι ζέσεως με αραιή χλωρίνη ενώ στη συνέχεια προστίθενται 150 μl διαλύματος P1 και πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος με την αυτόματη πιπέττα και vortex. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει Tris το οποίο ρυθμίζει το pH, EDTA το οποίο αναστέλλει τη δράση των ενζύμων που υδρολύουν το DNA (DNAάσες) και RNAάση για την αποικοδόμηση του RNA. Στη συνέχεια προστίθενται 150 μl διαλύματος P2. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει SDS το οποίο οδηγεί στη λύση της κυτταρικής μεμβράνης και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και NaOH που μετατρέπει το δίκλωνο DNA σε μονόκλωνο και διασπά το κυτταρικό τοίχωμα. Οι σωλήνες αναδεύονται ήπια και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 250 μl από το διάλυμα P3 (2,8 M CH₃COOK) με αποτέλεσμα την αντίδραση εξουδετέρωσης. Το διάλυμα P3 μειώνει την αλκαλικότητα του διαλύματος και μετατρέπει το πλασμιδιακό DNA σε δίκλωνο. Έπειτα πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 11.000 X g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες τύπου erppendorf και το ίζημα (πρωτεΐνες, λιπίδια και χρωμοσωμικό DNA) απορρίπτεται. Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται για την πλήρη απομάκρυνση του ιζήματος. Στη συνέχεια προστίθεται 0,7 X τον συνολικό όγκο από ισοπροπανόλη. Οι σωλήνες επωάζονται στους -20 °C για 20 λεπτά και μετά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.300 rpm. Το πλασμιδιακό DNA χάνει το υδατικό του περίβλημα και κατακρημνίζεται επειδή η ισοπροπανόλη είναι πιο πολικό μόριο από το H₂O. Τέλος, προστίθενται περίπου 15 μl ddH₂O και ακολουθεί vortex για την διάλυση του ιζήματος (πλασμιδιακό DNA) στο H₂O. Το DNA φωτομετρείται με τη χρήση nanodrop.

B5) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρωτοκόλλου «Isolation of high-copy plasmid DNA from E.Coli» της εταιρίας Macherey-Nagel. Για τον σκοπό αυτό γίνεται συλλογή της βακτηριακής καλλιέργειας σε σωλήνες τύπου erppendorf και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 x g. Έπειτα προστίθενται κατά σειρά τα ρυθμιστικά buffer A1, A2 και A3. Το A1 περιέχει Tris που είναι ρυθμιστικό διάλυμα, EDTA που συμβάλλει στην αναστολή των DNAασών και τέλος RNAάση για την πέψη των μορίων RNA. Το A2 buffer περιέχει SDS, το οποίο είναι απορρυπαντικό, που απομακρύνει τα λιπίδια από τις μεμβράνες και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και NaOH το οποίο ρυθμίζει το pH και μετατρέπει όλο το DNA σε μονόκλωνο. Τέλος, το buffer A3 προκαλεί την αντίδραση της εξουδετέρωσης. Είναι όξινο διάλυμα και έτσι οι πρωτεΐνες μετά την φυγοκέντρηση (5 min στις 11.000 x g) «πέφτουν» στο ίζημα μαζί με το χρωμοσωμικό DNA λόγω του μεγέθους του. Στο διαλυτό μέρος βρίσκεται το πλασμιδιακό DNA.

Στη συνέχεια προστίθεται το πλασμιδιακό DNA στη στήλη η οποία περιλαμβάνει μια φορτισμένη μεμβράνη και το pH της είναι τέτοιο ώστε το αρνητικά φορτισμένο πλασμίδιο, λόγω αλληλεπιδράσεων, να παραμένει προσκολλημένο πάνω της. Μετά τη

φυγοκέντρωση (1 min 11.000 x g) απορρίπτεται ό,τι έχει διαπεράσει τη στήλη. Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος A4 (wash buffer) το οποίο με την προσθήκη αιθανόλης (EtOH) συγκρατεί το πλασμίδιο στη στήλη απομακρύνοντας τις προσμίξεις. Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρωση (1 min 11.000 x g) και προσθήκη του διαλύματος AE (elution buffer) για την έκλυση του πλασμιδιακού DNA σε σωλήνα τύπου erppendorf. Τέλος, με τη χρήση nanodrop μετράται η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA.

B6) Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

I. Παρασκευαστικές πέψεις

Μέσω των παρασκευαστικών πέψεων δίνεται η δυνατότητα κλωνοποίησης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς της επιλογής μας.

Κατά τις παρασκευαστικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστίθενται σε σωλήνα τύπου erppendorf οι παρακάτω ποσότητες:

- 5 µg πλασμιδίου
- 0,5 µl περιοριστικού ενζύμου (units αναλόγως το ένζυμο που χρησιμοποιείται)
- Buffer ενζύμου
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 µl

Οι πέψεις επώζονται για τρεις (3) ώρες στους 37 °C. Στα τελευταία 30 min της επώασης προστίθεται 1 µl (5 units) από την φωσφατάση Quick CIP για την αποκοπή των φωσφορικών ομάδων.

II. Πέψεις ελέγχου

Οι πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού δίνουν πληροφορίες (μετά την ηλεκτροφόρηση DNA) σχετικά με την ύπαρξη και τον προσανατολισμό τμημάτων DNA σε πλασμίδια. Τέτοιου τύπου πέψεις ονομάζονται πέψεις ελέγχου. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται πέψη μικρότερης ποσότητας DNA (συνήθως 0,5 µg) και προσθήκη 0,2 µl περιοριστικού ενζύμου (units αναλόγως το ένζυμο που χρησιμοποιείται). Ο τελικός όγκος είναι τα 20 µl και η επώαση στους 37 °C διαρκεί 1 ώρα.

B7) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης είναι μια τεχνική διαχωρισμού τμημάτων DNA. Είναι αποτελεσματική για ένα μεγάλο εύρος μεγεθών μορίων DNA. Στηρίζεται στην κίνηση του αρνητικά φορτισμένου DNA, διαμέσου των πόρων αгарόζης, από τον αρνητικό πόλο (άνοδος) προς τον θετικό πόλο (κάθοδος) μετά την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Ανάλογα με το εκάστοτε μέγεθος μορίων DNA που διαχωρίζονται επιλέγεται και η αντίστοιχη συγκέντρωση αгарόζης. Πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης (0,5 – 1%) ευνοούν τον διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA. Αντιθέτως, πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης αгарόζης (έως και 2%) εξυπηρετούν τον διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA. Η κίνηση των μορίων DNA εξαρτάται από το μέγεθος τους. Λόγω του μεγέθους τους, τα μεγάλα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα σε σχέση με τα μικρότερα μόρια καθώς συναντούν μεγάλη αντίσταση στους πόρους

της πηκτής. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης περιγράφεται παρακάτω:

- **Προετοιμασία δειγμάτων DNA προς ηλεκτροφόρηση:** Στα δείγματα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται loading buffer (6X σε τελική συγκέντρωση 1X) που εξυπηρετεί την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης.
- **Κατασκευή πηκτής αγαρόζης:** Αρχικά ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης για την επιθυμητή περιεκτικότητα της πηκτής (στην παρούσα διπλωματική, όλες οι πηκτές είχαν περιεκτικότητα 1% σε αγαρόζη). Η αγαρόζη θα διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA). Οι κατάλληλες ποσότητες αγαρόζης και TAE τοποθετούνται σε κωνική φιάλη και θερμαίνονται μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και πραγματοποιείται σύντομη ανάδευση της κωνικής φιάλης. Το μίγμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, γίνεται έλεγχος για την απουσία φυσαλίδων και τέλος τοποθετούνται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων DNA. Η πηκτή σχηματίζεται αφού περάσουν περίπου 20 λεπτά.
- **Φόρτωση δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση:** Επαρκής ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TAE προστίθεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλύψει πλήρως την πηκτή. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φόρτωση του μάρτυρα GeneRuler 1 kb DNA ladder και των δειγμάτων DNA στην πηκτή και η συσκευή ηλεκτροφόρησης ασφαρίζεται βάζοντας τα ηλεκτρόδια στις κατάλληλες θέσεις. Με τη χρήση του τροφοδοτικού, εφαρμόζεται τάση περίπου 100 Volt.
- **Παρατήρηση των αποτελεσμάτων:** Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται στο Imager Uvitec Cambridge με τη χρήση λάμπας UV.

B8) Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση της πηκτής στην υπεριώδη ακτινοβολία και στην αποκοπή του τμήματος ενδιαφέροντος από την πηκτή αγαρόζης. Έπειτα ακολουθείται το πρωτόκολλο «DNA extraction from agarose gel» με τη χρήση του kit PCR clean up & gel extraction της εταιρίας Macherey-Nagel.

Μετά την αποκοπή του τμήματος από την πηκτή, αυτό ζυγίζεται και αναλόγως τη μάζα προστίθεται ποσότητα διαλύματος NT1. Το kit αναφέρει ότι για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης γίνεται προσθήκη 200 μl διαλύματος NT1. Το συγκεκριμένο buffer χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης και περιλαμβάνει δείκτη pH εξασφαλίζοντας βέλτιστες συνθήκες δέσμευσης κατά την εκχύλιση DNA που προέρχεται από πηκτή αγαρόζης. Μετά την προσθήκη του buffer το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 50 °C και παράλληλα πραγματοποιείται vortex μέχρις ότου να δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα (κίτρινου χρώματος) το οποίο θα σημαίνει ότι η πηκτή έχει διαλυθεί πλήρως. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση (11.000 x g για 30 sec) με σκοπό τη δέσμευση του DNA στη στήλη. Στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 στη στήλη, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, αποχύνεται το υγρό που

διαπερνά τη στήλη και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για καλύτερο καθαρισμό. Το διάλυμα NT3, είναι wash buffer, το οποίο με την προθήκη αιθανόλης (EtOH) απομακρύνει τις προσμίξεις συγκρατώντας το DNA στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (11.000 x g για 1 min) για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3 και για τον σκοπό αυτό συνήθως πραγματοποιείται επώαση του δείγματος στους 70 °C για 2-5 λεπτά. Τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η έκλυση του DNA από τη στήλη του kit σε σωλήνα τύπου erpendorf. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση του διαλύματος NE το οποίο περιέχει Tris/HCl, pH 8.5 και συμβάλλει στην απομάκρυνση του δεσμευμένου DNA από την στήλη. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 1 λεπτό. Τέλος, με τη χρήση nanodrop μετράται η συγκέντρωση του DNA.

B9) Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Η αντίδραση λιγάσης (ligation) περιλαμβάνει την ανάμειξη του ενθέματος (τμήμα DNA που κωδικοποιεί για τον mHIF-1α) και του εκάστοτε επιθυμητού φορέα στον οποίο πρόκειται να ενσωματωθεί. Είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται μετά την απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης και αφορά τμήματα DNA που κόπηκαν με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

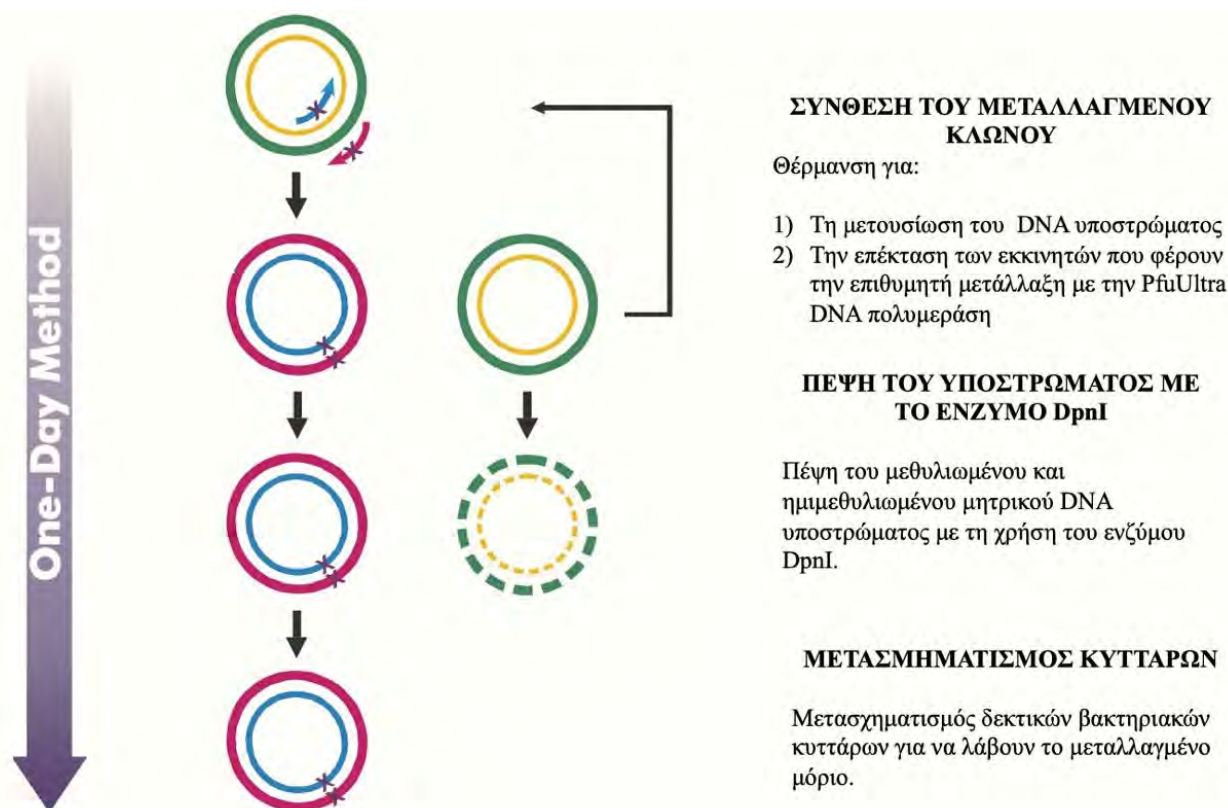
Η ανάμειξη ενθέματος-φορέα έγινε σε αναλογία 3:1. Η ποσότητα φορέα που χρησιμοποιείται είναι 50 ng και μέσω της ιστοσελίδας NEBioCalculator γίνεται ο υπολογισμός του ενθέματος που απαιτείται για την αντίδραση. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η T4 DNA λιγάση (400.000 units/ml) και στην παρούσα διπλωματική προστέθηκε 1 μl σε κάθε αντίδραση λιγάσης, δηλαδή 400 units ενζύμου.

B10) Σημειακή μεταλλαξιγένεση (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit)

Για τη δημιουργία των μεταλλαγμάτων S652A (αντικατάσταση της σερίνης σε αλανίνη) και S652D (αντικατάσταση σερίνης σε ασπαραγινικό οξύ) χρησιμοποιήθηκε το kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Πρόκειται για μια διαδικασία τριών (3) σταδίων.

Κατά το πρώτο στάδιο, η θέρμανση έχει ως αποτέλεσμα τη μετουσίωση του πλασμιδίου, δηλαδή τη μετατροπή του από δίκλωνο σε μονόκλωνο. Η αλλαγή στη διαμόρφωση του πλασμιδίου, δίνει τη δυνατότητα στους εκκινητές να υβριδίσουν, λόγω συμπληρωματικότητας, στο μητρικό μόριο DNA. Στη συνέχεια, η πολυμεράση PfuUltra HF DNA polymerase συμπληρώνει του κλώνους σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας τα dNTPs που περιλαμβάνονται στο kit. Κατά το δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται πέψη των μεθυλωμένων και ημιμεθυλωμένων μορίων DNA με την προσθήκη του ενζύμου DpnI. Τα βακτήρια, προκειμένου να προστατέψουν το DNA τους από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το μεθυλιώνουν μέσω συγκεκριμένων ενζύμων που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες [103]. Στον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, τα πλασμίδια που παράγονται έχουν έναν μητρικό κλώνο και έναν μεταλλαγμένο και είναι ημιμεθυλωμένα ενώ στους επόμενους δημιουργούνται πλασμίδια που έχουν και τους δύο κλώνους με τις μεταλλάξεις. Τα μεταλλαγμένα πλασμίδια έχουν δημιουργηθεί in vitro από την PfuUltra HF DNA polymerase ενώ τα μητρικά έχουν δημιουργηθεί στο κύτταρο. Επομένως, τα μητρικά πλασμίδια περιέχουν μεθυλικές ομάδες γεγονός που τα διαφοροποιεί σε σχέση με τα μεταλλαγμένα μόρια DNA. Το ένζυμο DpnI αναγνωρίζει μεθυλικές ομάδες και πέπτει

τα μόρια DNA που τις φέρουν, καταστρέφοντας με αυτόν τον τρόπο τα μητρικά πλασμίδια (μεθυλιωμένα) ή αυτά που φέρουν μεθύλια μόνο στον έναν από τους δύο κλώνους (ημιμεθυλιωμένα). Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Top10 όπως περιγράφεται στην παράγραφο B2.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της σημειακής μεταλλαξιγένεσης (Δεξιά εμφανίζεται η λειτουργία του κάθε σταδίου) [104].

Το κλωνοποιημένο πλασμίδιο pGEX-4T1 που χρησιμοποιήθηκε κατά την μεταλλαξιγένεση έχει συγκέντρωση 0,22 μg/μl. Το πρωτόκολλο αναφέρει ότι για την πειραματική διαδικασία απαιτούνται 15 ng, επομένως προστίθενται 0,7μl. Το Reaction Buffer είναι 10X, άρα για μια αντίδραση όγκου 50 μl απαιτούνται 5 μl. Τέλος, προστίθενται το mix dNTPs και η *PfuUltra* HF DNA polymerase από τα οποία απαιτούνται από 1 μl. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O.

Προετοιμασία των εκκινητών:

Το πρωτόκολλο αναφέρει ότι απαιτούνται 125 ng από κάθε εκκινητή.

- **S652A_Forward:** 10 μM αντιστοιχούν σε 0,124 μg/μl
- **S652A_Reverse:** 10 μM αντιστοιχούν σε 0,125 μg/μl
- **S652D_Forward:** 10 μM αντιστοιχούν σε 0,137 μg/μl
- **S652D_Reverse:** 10 μM αντιστοιχούν σε 0,138 μg/μl

Στην αντίδραση προστέθηκε 1 μl από κάθε εκκινητή.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στην PCR και τα συστατικά της συνοψίζονται στον πίνακα 11.

	S652A μετάλλαγμα	S652D μετάλλαγμα
10X Reaction Buffer	5 µl	5 µl
Forward Primer	1 µl	1 µl
Reverse Primer	1 µl	1 µl
pGEX-4T1 (15ng)	0,7 µl	0,7 µl
dNTPs	1 µl	1 µl
ddH₂O	41,3 µl	41,3 µl
<i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase (2,5 units/µl)	1 µl (2,5 units)	1 µl (2,5 units)

Πίνακας 11: Οι απαιτούμενες ποσότητες για τη δημιουργία των μεταλλαγμάτων S652A και S652D.

Οι παράμετροι της PCR ρυθμίζονται σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτόκολλου και παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	30 seconds
2	12–18	95°C	30 seconds
		55°C	1 minute
		68°C	1 minute/kb of plasmid length*

Πίνακας 12: Οι παράμετροι της PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR ακολουθεί προσθήκη του ενζύμου DpnI (1 µl για κάθε μετάλλαγμα, δηλαδή 10 units) και επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 1 ώρα. Για την λήψη καθαρότερου DNA ακολουθείται η πειραματική διαδικασία κατακρήμνισης με αιθανόλη (EtOH) 70%. Τα βήματα είναι τα εξής:

- Μεταφορά των δειγμάτων σε σωλήνες τύπου eppendorf.
- Προσθήκη 100 µl αιθανόλης 70% και ήπια ανάδευση των δειγμάτων.
- Επώαση των δειγμάτων στην κατάψυξη για 20 min.
- Φυγοκέντρηση για 30 min στους 4 °C στις 13.300 rpm.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται εκ νέου αιθανόλη 70% και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στους 4 °C στις 13.300 rpm.
- Τέλος, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 50 µl ddH₂O στα δείγματα DNA

Ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* Top10 όπως περιγράφεται στην παράγραφο B2.

B11) Καθαρισμός προϊόντων PCR και πλασμιδιακού DNA (PCR clean-up)

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο «PCR clean up» με τη χρήση του kit PCR clean up & gel extraction της εταιρίας Macherey-Nagel. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι αναγκαία για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR καθώς απομακρύνει το ένζυμο, τα νουκλεοτίδια, τους εκκινητές και το buffer. Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των πλασμιδιακών DNA μετά από απομόνωση με αλκαλική λύση. Τα βήματα που ακολουθούνται σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι τα εξής:

- Ανάμειξη 1:2 όγκου δείγματος με όγκο διαλύματος NT1.
- Προστίθενται σε στήλη μέχρι 700 μl δείγματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 X g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Στη στήλη προστίθενται 700 μl διαλύματος NT3, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 sec στις 11.000 X g και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για τη λήψη καθαρότερου DNA.
- Για την απομάκρυνση του buffer NT3 ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 x g ενώ για την πλήρη αφαίρεση της αιθανόλης προτείνεται επώαση της στήλης στους 70 °C για 2-5 min.
- Τελευταίο βήμα αποτελεί η έκλυση του DNA. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf και προστίθεται buffer NE. Αφού επωαστεί για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 x g.
- Μέτρηση συγκέντρωσης του δείγματος με τη χρήση nanodrop.

Η δράση των διαλυμάτων NT1, NT3 και NE περιγράφεται στην παράγραφο B7.

B12) Κυτταροκαλλιέργειες

Όλα τα πειράματα που αφορούσαν κυτταροκαλλιέργειες διενεργήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων.

- **Παρασκευή θρεπτικού υλικού DMEM +/-:** Το DMEM +/- που βρίσκεται σε δοχείο και προέρχεται από την εταιρία Gibco/Thermo Fischer Scientific έχει συνολικό όγκο 500 ml. Ποσότητα (περίπου 50 ml) από το δοχείο αφαιρείται και προστίθεται σε ένα falcon των 50 ml για μελλοντική χρήση του DMEM +/- . Στο δοχείο προστίθεται συνδυασμός αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (5ml) και ορός FBS 10% (50 ml). Έτσι παρασκευάζεται το θρεπτικό μέσο DMEM +/-.
- **Ξεπάγωμα ευκαρυωτικών κυττάρων από το υγρό άζωτο (-120 °C):** Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε φιαλίδια μέσα σε δεξαμενή υγρού αζώτου και η συντήρησή τους επιτυγχάνεται μέσω της κρυοπροστατευτικής ουσίας DMSO η οποία μειώνει την πιθανότητα θανάτου τους. Κατά το ξεπάγωμα τα κύτταρα αφαιρούνται από την δεξαμενή με τη χρήση ειδικών γαντιών και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο (37 °C) για περίπου 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται λίγη ποσότητα DMEM +/- στο φιαλίδιο με τα κύτταρα, ακολουθεί ανάδευση με την αυτόματη πιπέτα και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 1000 rpm για την πλήρη απομάκρυνση του DMSO. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αφαιρείται και πραγματοποιείται επαναιώρηση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Τέλος, τα κύτταρα προστίθενται σε πιάτο καλλιέργειας ή σε μια μικρή φλάσκα που περιέχουν πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM +/- και αφήνονται για ολονύκτια επώαση στους 37 °C.
- **Θρυψινοποίηση:** Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου 90% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας (10cm) τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Για τον σκοπό αυτό, η θρυψίνη και το PBS

1X αφήνονται στο υδατόλουτρο (37 °C) για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφαιρούνται από τον επωαστήρα στον οποίο αναπτύσσονται (37 °C), το παλιό θρεπτικό τους υλικό αναρροφάται και πραγματοποιούνται δύο (2) πλύσεις με το διάλυμα PBS 1X. Ακολουθεί η προσθήκη 1 ml θρυψίνης η οποία για τη δράση της απαιτεί την τοποθέτηση του πιάτου καλλιέργειας στον επωαστήρα (37 °C) για τρία (3) με πέντε (5) λεπτά ανάλογα με τον τύπο κυτταρικής σειράς (τα HeLa που είναι καρκινικά κύτταρα και προσκολλώνται πιο ισχυρά στην επιφάνεια του πιάτου χρειάζονται 5 λεπτά σε σχέση με τα 3T3-L1 που είναι ινοβλάστες και η θρυψίνη δρα αποτελεσματικά και στα 3 λεπτά). Μετά το πέρας του χρόνου δράσης του ενζύμου προστίθενται 5 ml πλήρους θρεπτικού DMEM +/- στα κύτταρα και πραγματοποιείται επαναιώρηση τους για την πλήρη αποκόλληση τους από το πιάτο καλλιέργειας. Τέλος, σε νέο πιάτο καλλιέργειας (10cm) το οποίο περιέχει 7 ml DMEM +/- προστίθενται 600 μl (σε σταγόνες) από τα κύτταρα καλύπτοντας μεγάλο μέρος της επιφάνειας του.

- **Διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με το αντιδραστήριο DNAtectin™ Plus Transfection Reagent ή TurboFect Transfection Reagent:** Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης mHIF-1α wt αλλά και των μεταλλαγμάτων S652A και S652D σε ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση τους με τα πλασμίδια που τις εκφράζουν. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο περιέχει μικρά πολυμερή που είναι θετικά φορτισμένα (κατιόντα) και αλληλεπιδρούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα διαμόλυνσης. Έπειτα, το σύμπλεγμα αυτό εγκοιλπώνεται στην αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των κυττάρων μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και απελευθερώνει το πλασμίδιο στο κύτταρο. Στην παρούσα διπλωματική η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Προετοιμασία των κυττάρων (ημέρα 1^η)

- Σε μικρά πιάτα καλλιέργειας τοποθετούνται 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και 2 καλυπτρίδες.
- Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως stock υποβάλλονται σε κατεργασία με θρυψίνη όπως περιγράφεται παραπάνω.
- Από το εναιώρημα των κυττάρων προστίθενται 250 μl στα μικρά πιάτα καλλιέργειας.
- Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα (37 °C) για ολονύκτια επώαση.

Διαμόλυνση των κυττάρων (ημέρα 2^η)

Η διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται με 5 μg/μl πλασμιδιακού DNA

- Αναλόγως τη συγκέντρωση του πλασμιδίου προστίθεται σε σωλήνα eppendorf ο απαραίτητος όγκος του και 250 μl DMEM -/-. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται με την αυτόματη πιπέττα.

- Σε δεύτερο σωλήνα τύπου erppendorf προστίθενται 10 μl αντιδραστηρίου DNA fectin και 250 μl DMEM -/-. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται με την αυτόματη πιπέττα.
- Το περιεχόμενο των erppendorf ενώνεται και αναδεύεται με την αυτόματη πιπέττα.
- Επώαση για 20 λεπτά.
- Το θρεπτικό των κυττάρων που πρόκειται να διαμολυνθούν αφαιρείται και πραγματοποιούνται δύο (2) πλύσεις με PBS 1X. Στα πιάτα καλλιέργειας προστίθενται 2 ml DMEM -/-.
- Μετά το πέρας των 20 λεπτών το περιεχόμενο του σωλήνα τύπου erppendorf προστίθεται στο πιάτο καλλιέργειας καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του.
- Ήπια ανάδευση του πιάτου.
- Επώαση των κυττάρων στους 37 °C για 3-4 ώρες.
- Μετά το πέρας της επώασης το DMEM -/- αφαιρείται, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS 1X και προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM +/-.
- Ολονύκτια επώαση των κυττάρων στους 37 °C.

B13) Μικροσκοπία φθορισμού

Είναι μια τεχνική που επιτρέπει την παρατήρηση συστατικών του κυττάρου (π.χ DNA, πρωτεΐνες) που σημαίνονται με ειδικές φθορίζουσες ουσίες. Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει συγκεκριμένα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης και όταν δέχεται φωτεινή ενέργεια ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος το εκπέμπει σε μεγαλύτερο μήκος [106].

Στην παρούσα διπλωματική, για την παρατήρηση του mHIF-1α wt, S652A και S652D, αξιοποιήθηκε η φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP η οποία εκφράζεται από τον φορέα pEGFP-C1 και φθορίζει στην πράσινη περιοχή του φάσματος. Για την προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδες και την μετέπειτα παρακολούθηση σε μικροσκόπιο φθορισμού ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Αφού έχει προηγηθεί διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DNA fectin, σε 16 well-plates προστίθεται PBS 1X.
- Στα πιάτα καλλιέργειας που διαμολύνθηκαν πραγματοποιείται πλύση με PBS 1X αφού πρώτα αφαιρεθεί το παλιό θρεπτικό υλικό των κυττάρων.
- Οι καλυπτρίδες, με τη χρήση τσιμπίδας και βελόνας τοποθετούνται στα 16 well-plates.

- Το PBS 1X αναρροφάται από τα 16 well-plates και σε αυτά προστίθεται φορμαλδεΰδη 3,7 % (διαλυμένη σε PBS) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια αφαιρείται η φορμαλδεΰδη και προστίθεται PBS 1X στα 16 well-plates.
- Σε αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθενται 4 μl MOWIOL-DAPI.
- Οι καλυπτρίδες, με τη χρήση τσιμπίδας και βελόνας τοποθετούνται στη σταγόνα MOWIOL-DAPI αφού πρώτα έχουν ξεπλυθεί με ddH₂O και μετά στεγνώσει σε χαρτί.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες φυλάσσονται στο σκοτάδι και αποθηκεύονται στο ψυγείο (4 °C).

B14) Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού αντιγόνων σε ιστούς ή σε κύτταρα. Υπάρχουν δύο (2) τύποι ανοσοφθορισμού, ο άμεσος και ο έμμεσος. Κατά τον άμεσο ανοσοφθορισμό το αντίσωμα τοποθετείται στο παρασκευάσμα και συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο δημιουργώντας φθορίζον σύμπλεγμα. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό η σύνδεση του αντισώματος στο αντιγόνο οπτικοποιείται με την προσθήκη ενός δευτέρου αντισώματος (το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο) που φθορίζει [107].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3. Ειδικότερα, ελέγχθηκε η έκφραση του mHIF-1α στα κύτταρα HeLa και 3T3-L1 με τη χρήση αντισώματος anti-Myc και anti-HIF-1α και στη συνέχεια επώαση με δευτερογενή αντισώματα που φθορίζουν στο πράσινο και στο κόκκινο φάσμα χρώματος αντίστοιχα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα (ημέρα 1^η)

- Αφού έχει προηγηθεί διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DNA fectin, σε 16 well-plates προστίθεται PBS 1X.
- Στα πιάτα καλλιέργειας που διαμολύνθηκαν πραγματοποιείται πλύση με PBS 1X αφού πρώτα αφαιρεθεί το παλιό θρεπτικό υλικό των κυττάρων.
- Οι καλυπτρίδες, με τη χρήση λαβίδας και βελόνας τοποθετούνται στα 16 well-plates.
- Το PBS 1X αναρροφάται από τα 16 well-plates και σε αυτά προστίθεται φορμαλδεΰδη 3,7 % (διαλυμένη σε PBS) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια αφαιρείται η φορμαλδεΰδη και προστίθεται 1 ml Triton-PBS 0,1%.

- Οι καλυπτρίδες επωάζονται για 20 λεπτά στο ψυγείο.
- Μετά το πέρας των 20 λεπτών πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 5 λεπτών, υπό ανάδευση, με PBS 1X.
- *Αποκλεισμός των μη ειδικών θέσεων:* Σε κάθε καλυπτρίδα στα 16 well-plates προστίθεται 1% BSA διαλυμένο σε PBS-Tween για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων.
- Οι καλυπτρίδες επωάζονται για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση με το BSA.
- Μετά το πέρας της 1 ώρας πραγματοποιείται μια πλύση με PBS-Tween.
- *Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα:* Σε πλαστικό υπόστρωμα στρώνεται παράφιλμ και σημειώνονται πάνω του οι θέσεις κάθε καλυπτρίδας. Στις θέσεις αυτές προστίθεται μια σταγόνα πρωτογενούς αντισώματος (διαλυμένο σε 1% BSA) και οι καλυπτρίδες αφήνονται ανάποδα (με τα κύτταρα προς τα κάτω) πάνω στη σταγόνα. Οι καλυπτρίδες επωάζονται στους 4 °C ολονύκτια.

Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (ημέρα 2^η)

- Οι καλυπτρίδες αφαιρούνται από το στατώ και τοποθετούνται στα 16 well-plates στα οποία προστίθεται και PBS-Tween και πραγματοποιούνται τρεις (3) πλύσεις των 5 λεπτών, υπό ανάδευση.
- Σε παράφιλμ στο πλαστικό υπόστρωμα τοποθετείται δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (διαλυμένο σε 1% BSA) σε αραιώση 1:500 και οι καλυπτρίδες αφήνονται ανάποδα.
- Ακολουθεί επώαση των καλυπτρίδων για 1 ώρα υπό ανάδευση στο σκοτάδι.
- Οι καλυπτρίδες επανατοποθετούνται στα 16 well-plates και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS-Tween.
- Τέλος, ακολουθεί τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρες πλάκες (που περιέχουν MOWIOL-DAPI) όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο B13.
- Οι αντικειμενοφόρες πλάκες φυλάσσονται στο σκοτάδι και αποθηκεύονται στο ψυγείο (4 °C).

B15) Λύση των κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για τον σκοπό αυτό, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από το πιάτο καλλιέργειας των κυττάρων και πραγματοποιούνται δύο (2) πλύσεις με PBS 1X. Στη συνέχεια προστίθενται στο πιάτο 80 μl από το lysis buffer (παράγραφος A7). Με το cell scraper αποκολλώνται τα κύτταρα από την πλαστική επιφάνεια του πιάτου και το εκχύλισμα

συλλέγεται σε σωλήνες τύπου erpendorf. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά και αμέσως μετά φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά στις 13.300 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorf και σε αυτά προστίθεται sample buffer το οποίο περιέχει SDS 4X (αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις προσδίδει αρνητικό φορτίο) και DTT (διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς). Ακολουθεί vortex των δειγμάτων και θέρμανση τους στους 95 °C για 5 λεπτά για πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη (-20 °C) για επακόλουθα πειράματα.

B16) Δοκιμασία Bradford

Πρόκειται για μια γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που βασίζεται στην αλλαγή του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 όταν συνδέεται με πρωτεΐνες [108]. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης και χρησιμεύει στο ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση προκειμένου να διερευνηθούν οι πραγματικές διαφορές στην μεταξύ τους έκφραση. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Σε δύο (2) σωλήνες τύπου erpendorf προστίθενται 100 μl ddH₂O και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford (τυφλά δείγματα). Σε αριθμό σωλήνων τύπου erpendorf που αντιστοιχεί στον αριθμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων, προστίθενται 95 μl ddH₂O, 5 μl δείγματος και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα τυφλά δείγματα σε πλαστικές κυψελίδες και αυτές στο φωτόμετρο το οποίο μηδενίζεται. Το ένα τυφλό παραμένει συνεχώς στο φωτόμετρο ενώ στην άλλη κυψελίδα τοποθετούνται τα δείγματα και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης τους στα 595nm. Με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που έχει φτιαχτεί από το Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

B17) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ποσότητες πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε ένα σύνολο κυττάρων μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αρχικά, το δείγμα ηλεκτροφορείται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει μεγέθους και στη συνέχεια μεταφέρεται σε μεμβράνη, η οποία θα επωαστεί με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα. Η διαδικασία που ακολουθείται για την πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επώαση με πρωτογενές αντίσωμα (ημέρα 1^η)

- Οι πλάκες στις οποίες πρόκειται να πολυμεριστεί η πηκτή καθαρίζονται με αιθανόλη και κλείνονται στεγανά προκειμένου να αποφευχθούν οι διαρροές (συνιστάται ο έλεγχος απωλειών με τη χρήση ddH₂O). Εφόσον δεν υπάρχουν απώλειες, το νερό αποχύνεται και τα τζάμια στεγνώνονται με ένα χαρτί τύπου Whatman.

- Αρχικά, σε ένα ποτήρι ζέσεως, παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού (πυκνότητας ανάλογης με το μέγεθος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος) με τα υλικά που αναλύονται στην παράγραφο A11. Στην παρούσα διπλωματική οι πηκτές που παρασκευάστηκαν ήταν 10% και οι ποσότητες φαίνονται στον πίνακα 13.

	Πηκτή συσσώρευσης	Πηκτή διαχωρισμού
Ακρυλαμίδιο-bis 40%	0,45 ml	1,25 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα 4X pH6,8	1 ml	-
Ρυθμιστικό διάλυμα 4X pH8,9	-	1,25 ml
ddH₂O	2,5 ml	2,5 ml
APS 10%	25 μl	30 μl
TEMED	25 μl	15 μl

Πίνακας 13: Τα συστατικά και οι ποσότητες τους για τις πηκτές συσσώρευσης και διαχωρισμού.

- Πρώτα προστίθενται το ddH₂O, το ακρυλαμίδιο (συνίσταται η χρήση γαντιών λόγω της νευροτοξικής δράσης του) και το ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού. Στη συνέχεια, προστίθενται το APS 10% και το TEMED προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία του πολυμερισμού. Η προσθήκη τους στην διάταξη της ηλεκτροφόρησης πρέπει να γίνει με γρήγορες κινήσεις προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος πήξης του gel εκτός της διάταξης. Αμέσως μετά, προστίθεται από πάνω ddH₂O για να δημιουργηθεί ένα ευθύ μέτωπο.
- Αφού πήξει το gel, το ddH₂O αποχύνεται και τα τζάμια σκουπίζονται με ένα χαρτί. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή συσσώρευσης, ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, με τα συστατικά που φαίνονται στον πίνακα 13. Τα συστατικά της πηκτής συσσώρευσης τοποθετούνται πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και αμέσως τοποθετούνται τα πηγαδάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των πρωτεϊνών.
- Μέχρι να πήξει η πηκτή συσσώρευσης πραγματοποιείται προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα βράζουν για 5 λεπτά στους 95 °C και μετά φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά.
- Αφού το gel πήξει, τα πηγαδάκια αφαιρούνται με προσοχή, γίνεται έλεγχος για την απουσία φυσαλίδων και πραγματοποιείται μεταφορά του στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (running buffer) το οποίο πρέπει να καλύψει την πηκτή και μετά ο μάρτυρας και τα δείγματα πρωτεϊνών φορτώνονται στα πηγαδάκια (περίπου 20-30 μl πρωτεΐνης, αναλόγως τη συγκέντρωση). Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης ασφαρίζεται και συνδέεται με το τροφοδοτικό το οποίο ρυθμίζεται στα 120 Volt. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 60 λεπτά.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η ηλεκτρο-μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή στη μεμβράνη λόγω του φορτίου τους και προσδένονται λόγω της υψηλής ικανότητας δέσμησης και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που συμβάλλουν

στην ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Για τον σκοπό αυτό φτιάχνεται η εξής διάταξη:

-2 χαρτιά Whatman (βρέχονται σύντομα στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς)

-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (βρέχεται για 5 λεπτά στο ρυθμιστικό διάλυμα)

-πηκτή

-2 χαρτιά Whatman (βρέχονται σύντομα στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς)

Κατά τη δημιουργία της παραπάνω διάταξης απαραίτητη είναι η απουσία του αέρα κάτι που εξασφαλίζεται με μια γυάλινη ράβδο που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση φυσαλίδων που θα εμποδίσουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η διάταξη τοποθετείται σε ειδική συσκευή στην οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζεται στα 10 Volt για 60 λεπτά.

- Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιείται χρώση της με την Ponceau S., χρωστική η οποία προσδίδει κόκκινο χρώμα στις πρωτεΐνες και κάνει δυνατή την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα η χρωστική απομακρύνεται με πλύσεις της μεμβράνης με ddH₂O.
- Στη συνέχεια η μεμβράνη επώάζεται (υπό ανάδευση) με 5% αποβουτυρωμένο γάλα το οποίο είναι διαλυμένο σε PBS-Tween. Η επώαση διαρκεί 60 λεπτά και εξυπηρετεί στον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης μέσω της καζεΐνης του γάλακτος.
- Μετά το πέρας των 60 λεπτών προστίθεται στη μεμβράνη το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο συνδέεται ειδικά στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και η μεμβράνη επώάζεται ολονύκτια υπό ανάδευση στους 4 °C.
- Επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα (ημέρα 2^η) και εμφάνιση μέσω χημειοφωταύγειας
- Η μεμβράνη αφαιρείται από τους 4 °C και το πρωτογενές αντίσωμα αποθηκεύεται για επόμενες χρήσεις.
- Πραγματοποιούνται τρεις (3) πλύσεις της μεμβράνης των 10 λεπτών με PBS-Tween υπό συνεχή ανάδευση.
- Στη συνέχεια προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε PBS-Tween με γάλα 5% (η αραιώση εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα που χρησιμοποιείται). Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό για το πρωτογενές και είναι συζευγμένο με ένζυμο που δημιουργεί χημειοφωταύγεια επιτρέποντας την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.
- Η μεμβράνη επώάζεται για 60 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιούνται τρεις (3) πλύσεις της μεμβράνης των 5 λεπτών με PBS-Tween υπό συνεχή ανάδευση.

- Τέλος, παρασκευάζεται το διάλυμα χημειοφωταύγειας (παράγραφος A11) το οποίο περιέχει λουμινόλη (υπόστρωμα αντίδρασης), κουμαρικό (ενισχυτής αντίδρασης) και H₂O₂. Η μεμβράνη παραμένει περίπου για 1-2 λεπτά στο διάλυμα χημειοφωταύγειας πριν την τοποθέτηση της στο Imager Uvitec Cambridge για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης.

B18) Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιήθηκε για την μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων με σκοπό την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας τους στα βοθρία για την μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Για τον υπολογισμό του συνολικού αριθμού των κυττάρων απαιτείται η χρήση του αιματοκυτταρόμετρου (αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer) το οποίο περιέχει ένα δίκτυο γραμμών και μια ειδική καλυπτρίδα. Στις θέσεις υποδοχής του αιματοκυτταρόμετρου προστίθενται περίπου 20 μl από το εναιώρημα των κυττάρων. Στη συνέχεια με τη χρήση μικροσκοπίου πραγματοποιείται καταμέτρηση των κυττάρων από τα τέσσερα (4) κύρια τετράγωνα που διαμορφώνονται και είναι εντός των τριπλών γραμμών που σχηματίζονται. Έπειτα, για τον υπολογισμό των κυττάρων ανά ml, πραγματοποιείται η εξής πράξη:

$$\frac{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων από τα 4 τετράγωνα}}{4} * 10^4 = \text{αριθμός κυττάρων ανά ml}$$

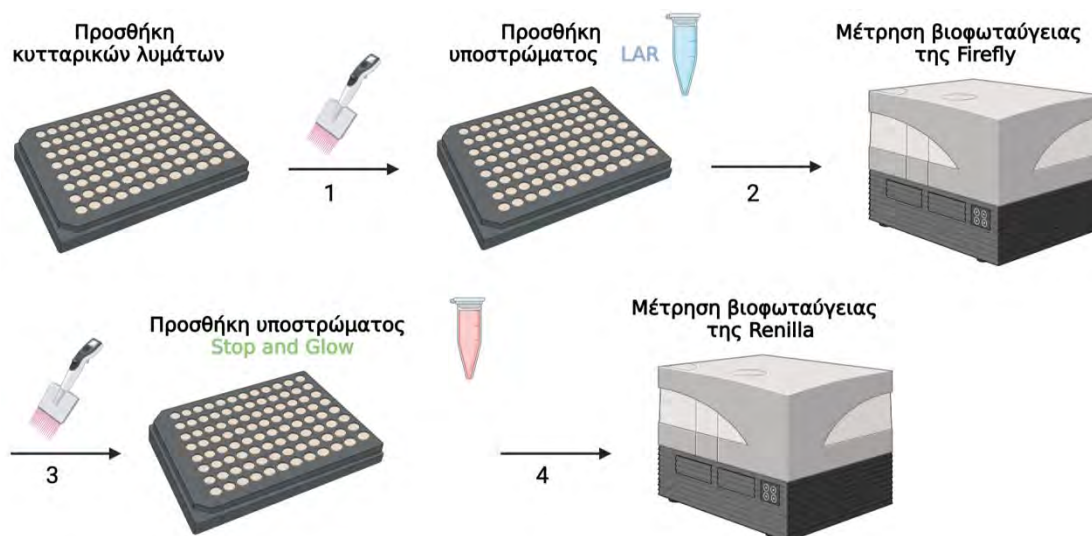
Ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων ανά βοθρίο, κατά την δοκιμασία λουσιφεράσης, είναι περίπου 10.000.

B19) Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η συγκεκριμένη μέθοδος διενεργήθηκε για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργότητας του mHIF-1α (wt, mS652A και mS652D). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGL3-VEGF-5XHRE-Luc το οποίο περιλαμβάνει πέντε (5) επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (5X HREs) από τον υποκινητή του γονιδίου *VEGF* τα οποία ελέγχουν την μεταγραφή του γονιδίου της Firefly λουσιφεράσης. Όταν πραγματοποιηθεί επιμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις μορφές του mHIF-1α, ο μεταγραφικός παράγοντας θα προσδεθεί στον υποκινητή που περιέχει τα στοιχεία HREs και θα ενεργοποιήσει την μεταγραφή της Firefly. Μέσω βιοφωταύγειας είναι δυνατός ο υπολογισμός της ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων μετά την προσθήκη υποστρώματος LAR (Luciferase Assay Reagent) το οποίο περιέχει τη λουσιφερίνη την οποία το παραγόμενο ένζυμο, (λουσιφεράση) οξειδώνει σε οξυλουσιφερίνη παρουσία ATP, Mg²⁺ και O₂. Η παραπάνω αντίδραση προκαλεί την έκλυση φωτός η οποία μετράται με την χρήση κατάλληλου λουμινόμετρου. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί την λουσιφεράση της Renilla και εκφράζεται συνεχώς. Η λουσιφεράση της Renilla οξειδώνει διαφορετικό υπόστρωμα το οποίο ονομάζεται Stop & Glow και σταματά την αντίδραση που καταλύει η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας.

Στα βοθρία του 96 well plate προστέθηκε συνολικά 1μg DNA το οποίο περιλαμβάνει 0,75 μg πλασμιδίου που εκφράζει την εκάστοτε μορφή του mHIF-1α (wt, S652A ή S652A), 0,2 μg του πλασμιδίου που κωδικοποιεί για την λουσιφεράση της πυγολαμπίδας και 0,05 μg του πλασμιδίου pCI-Renilla. Στο 1 μg συνολικού DNA προστίθενται 3 μl αντιδραστηρίου επιμόλυνσης TurboFect και ποσότητα DMEM -/- για την δημιουργία του συμπλόκου επιμόλυνσης. Στη συνέχεια, σε κάθε βοθρίο προστίθενται 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων, 80 μl DMEM -/- και 20 μl από το σύμπλοκο επιμόλυνσης. Το 96 well plate με τα κύτταρα επώάζονται στους 37 °C για 4 ώρες και μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται αλλαγή του DMEM -/- με πλήρες θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια ολονύκτια επώαση.

Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη προσθήκη του Passive Lysis Buffer 1X (το οποίο προκύπτει από αραιώση του 5X) και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, σε νέο 96 well plate, ειδικό για την τοποθέτηση του στο λουμινόμετρο Tecan προστίθενται 20 μl κυτταρικού λύματος. Στα 20 μl κυτταρικού λύματος προστίθενται 10 μl υποστρώματος LAR και πραγματοποιείται η πρώτη μέτρηση από το Tecan. Αφού ολοκληρωθεί, το 96 well plate αφαιρείται από την συσκευή και προστίθενται 10 μl υποστρώματος Stop and Glow το οποίο θα σταματήσει την αντίδραση της Firefly και θα μετρηθεί η βιοφωταύγεια του πλασμιδίου Renilla για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, η οποία πραγματοποιείται με τον υπολογισμό του λόγου της βιοφωταύγειας της Firefly/Renilla. Η πειραματική διαδικασία για τη μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης συνοψίζεται στην εικόνα 16.

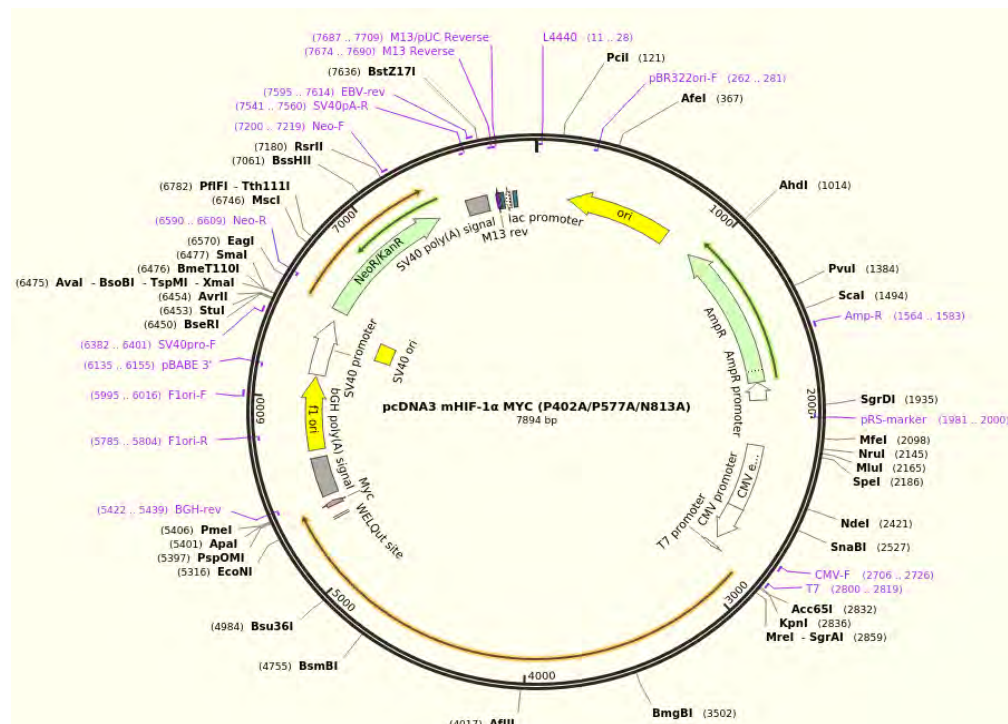


Εικόνα 16: Τα βήματα για την μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με το kit προσδιορισμού Dual luciferase assay kit της εταιρίας Promega. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του Biorender.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Απομόνωση πλασμιδίου *pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A)* από βακτηριακές καλλιέργειες.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα mHIF-1α στην Ser-652 αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα *pcDNA3*, που φέρει το cDNA του mHIF-1α (P402A/P577A/N813A) και επιτόπο Myc, από βακτηριακή καλλιέργεια *E.coli*, ακολουθώντας το πρωτόκολλο «Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. Coli*» της εταιρίας Macherey-Nagel, όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του πλασμιδίου έγινε με τη χρήση nanodrop και βρέθηκε 0,5μg/μl.



Εικόνα 17: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα *pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A)* από την Addgene.

4.2. Έλεγχος πλασμιδίου *pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A)* με ενδονουκλεάσες περιορισμού (*KpnI*, *BamHI-HF*, *BglIII* και *PstI-HF*) και ηλεκτροφόρηση DNA

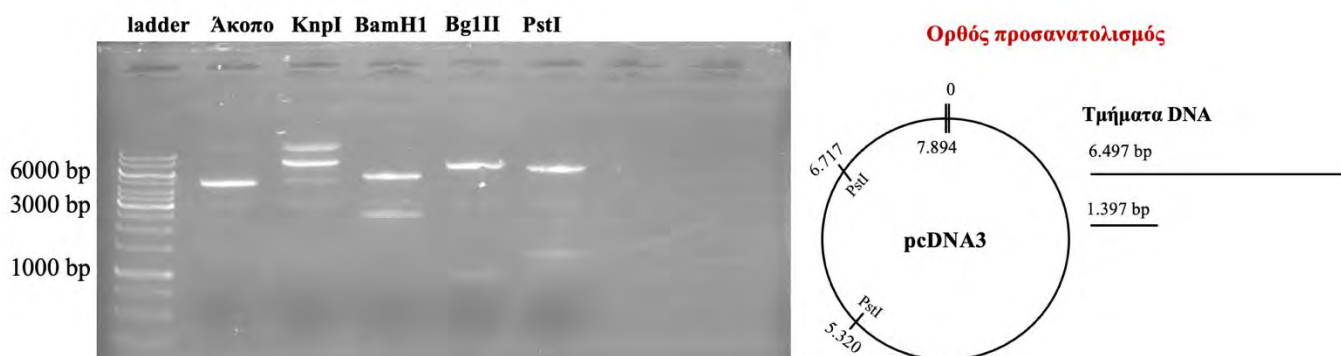
Καθώς το πλασμίδιο *pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A)* θα χρησιμοποιηθεί για δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων στη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 αρχικά έγινε επιβεβαίωση τόσο της ύπαρξης, όσο και του σωστού προσανατολισμού του cDNA του γονιδίου *mHIF1A* στον πλασμιδιακό φορέα *pcDNA3*. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πέψεις ελέγχου με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI*, *BamHI-HF*, *BglIII* και *PstI-HF*. Το ένζυμο *KpnI* κόβει σε μία (1) θέση στο πλασμίδιο δίνοντας γραμμικό μόριο. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI-HF* κόβει εκατέρωθεν του mHIF-1α και του επιτόπου MYC στις θέσεις 2.844 και 5.391, δίνοντας δύο (2) τμήματα DNA μεταξύ των οποίων και το cDNA που κωδικοποιεί για τον mHIF-1α. Τέλος, τα ένζυμα *BglIII* και *PstI-HF* χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του

προσανατολισμού του mHIF-1α. Το Bg1II κόβει σε δύο (2) θέσεις (1.949 και 2.928) δηλαδή πριν και μέσα στην περιοχή που κωδικοποιεί για τον mHIF-1α. Η πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση PstI-HF σε δύο (2) θέσεις στο πλασμίδιο (5.320 και 6.717) επαληθεύει τη σωστή κατεύθυνση του cDNA mHIF-1α.

	Άκοπο	KnpI	BamHI-HF	Bg1II	PstI-HF
Plasmid DNA (1000 ng)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Buffer 10X	-	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Ένζυμο	-	0,2 μl (2 units)	0,2 μl (4 units)	0,2 μl (2 units)	0,2 μl (4 units)
ddH₂O	18 μl	15,8 μl	15,8 μl	15,8 μl	15,8 μl

Πίνακας 14 : Πέψεις ελέγχου για το pcDNA3 mHIF-1α MYC (P402A/P577A/N813A).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% ώστε να ελεγχθούν τα μεγέθη των τμημάτων DNA που προκύπτουν από τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού. Στην 1^η διαδρομή φορτώθηκε μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην 2^η διαδρομή απεικονίζεται το άκοπο πλασμιδιακό DNA ενώ στην 3^η φαίνεται το γραμμικό DNA μετά την πέψη με το ένζυμο KnpI.



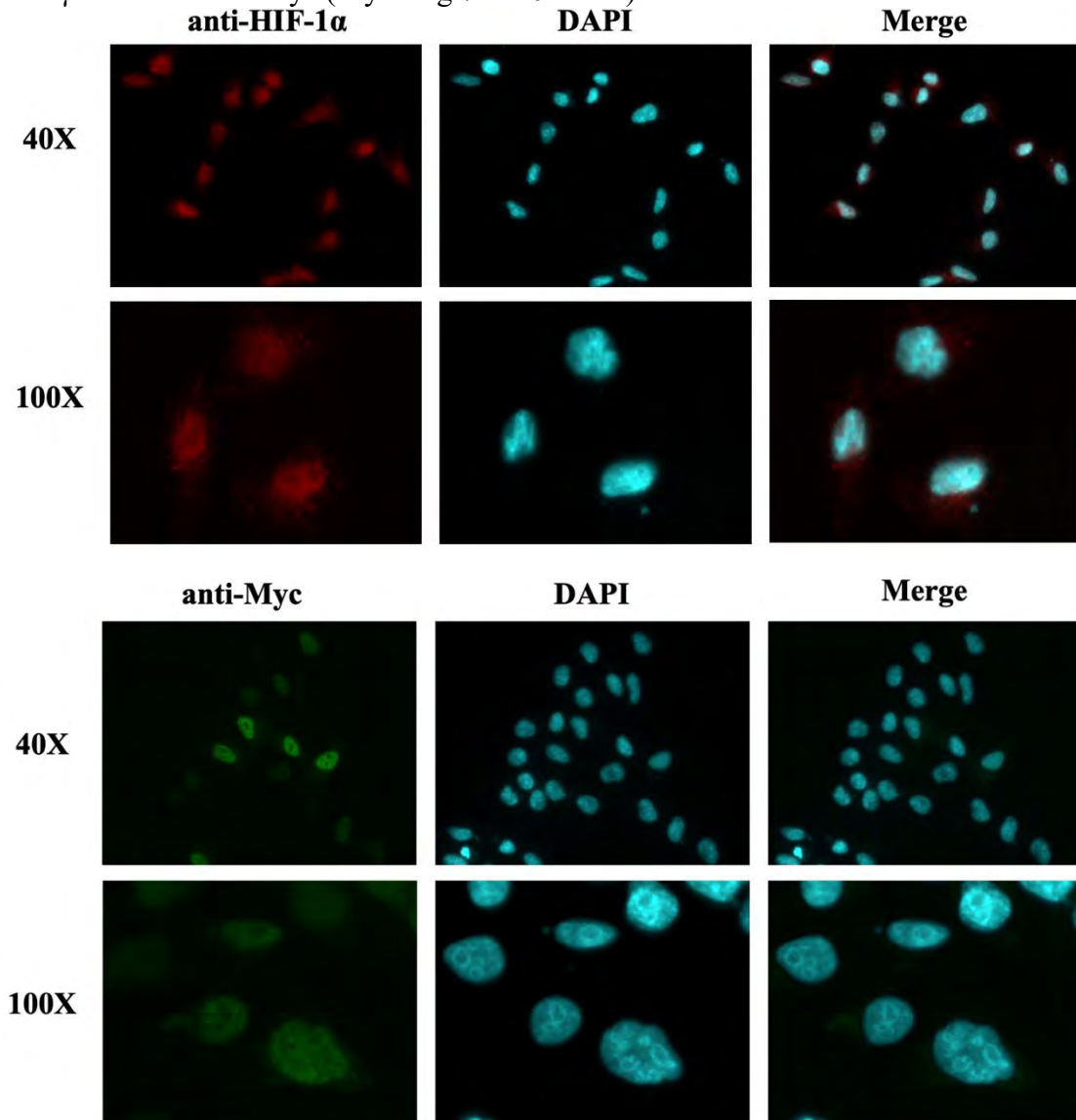
Εικόνα 18 : Ηλεκτροφόρηση DNA για τις πέψεις ελέγχου.

Το άκοπο DNA μεταναστεύει ταχύτερα σε σχέση με το γραμμικό μόριο λόγω της συμπαγούς υπερελικοειδούς διαμόρφωσής του. Η πέψη με το ένζυμο BamHI-HF (διαδρομή 4^η) δίνει δύο (2) τμήματα DNA μεγέθους 2.541 bp (mHIF-1α-MYC) και 5.347 bp. Τέλος, τα ένζυμα Bg1II και PstI (διαδρομές 5^η και 6^η) δίνουν τμήματα DNA 979 bp, 6.915 bp και 1.397 bp, 6.497 bp αντίστοιχα, δηλαδή κοντά στα αναμενόμενα μεγέθη. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 18 και επιβεβαιώνουν αφενός μεν την ύπαρξη και αφετέρου τον σωστό προσανατολισμό του mHIF-1α MYC στον πλασμιδιακό φορέα.

4.3. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α-Myc σε κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό μετά από επιμόλυνση με το πλασμίδιο pcDNA3 mHIF-1α-Myc

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης mHIF-1α-MYC στον φορέα που φέρει το cDNA που κωδικοποιεί για τον mHIF-1α-MYC πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυττάρων HeLa με το πλασμίδιο pcDNA3 mHIF-1α MYC, όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι και στη συνέχεια επώαση των καλυπτριδών με δύο (2) διαφορετικά πρωτογενή αντισώματα. Διενεργήθηκαν δύο (2) πειράματα

ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τον mHIF-1α και για τον επίτοπο Myc (Myc-Tag 71D10 rabbit).

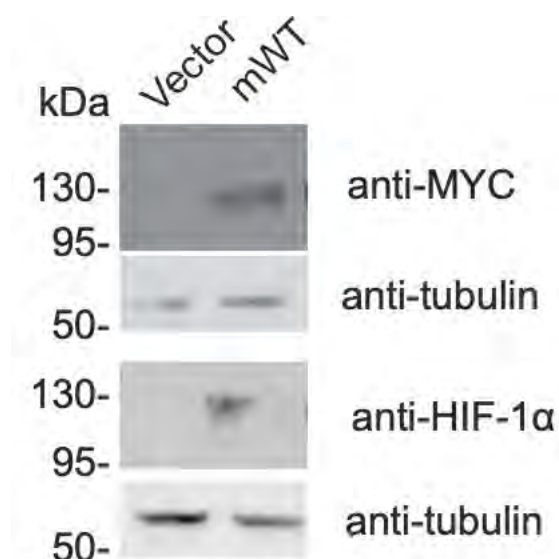


Εικόνα 19: Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-HIF-1α (κόκκινο χρώμα) και Anti-Myc (πράσινο χρώμα). Με μπλε χρώμα φαίνεται η χρωστική DAPI που σημαίνει τους πυρήνες των κυττάρων.

Όσον αφορά το πείραμα ανοσοφθορισμού για τον mHIF-1α χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα, ειδικό για τον HIF-1α (anti-HIF-1α) και το δεύτερο αντίσωμα που επιλέχθηκε φθορίζει στην κόκκινη περιοχή του φάσματος. Με μπλε χρώμα σημαίνεται η φθορίζουσα DAPI που χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, ο mHIF-1α εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα παρουσιάζοντας όμως και μια μικρή διάχυση στο κυτταρόπλασμα. Ο ανοσοφθορισμός για τον επίτοπο Myc, επιλέγοντας δευτερογενές αντίσωμα που φθορίζει στην πράσινη περιοχή του φάσματος, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τον εντοπισμό του mHIF-1α στο κύτταρο, επιβεβαιώνοντας έτσι την εγκυρότητα των πειραμάτων.

4.4. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης mHIF-1α MYC σε κύτταρα HeLa με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η έκφραση της πρωτεΐνης mHIF-1α MYC από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA mHIF-1α MYC στα ανθρώπινα κύτταρα HeLa ελέγχθηκε και με ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 20). Παρασκευάστηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα (παράγραφος B16 Υλικά-Μέθοδοι) από κύτταρα HeLa που είχαν διαμολυνθεί με το pcDNA mHIF-1α MYC και στη συνέχεια το δείγμα αναλύθηκε σε πηκτή ακρυλαμίδιου. Η ζώνη της πρωτεΐνης mHIF-1α-MYC εντοπίζεται περίπου στα 120-130 kDa και για την ανίχνευση της χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-human HIF1-α λόγω της μεγάλης συντήρησης του επιτόπου που αναγνωρίζει το αντίσωμα μεταξύ της ανθρώπινης και της ποντικίσιας πρωτεΐνης. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης τουμπουλίνης του κυτταροσκελετού, η οποία εντοπίζεται στα 42 kDa. Όπως καταδεικνύεται στην εικόνα 20 η έκφραση της πρωτεΐνης mHIF-1α MYC έχει επιτευχθεί σε σημαντικό βαθμό.



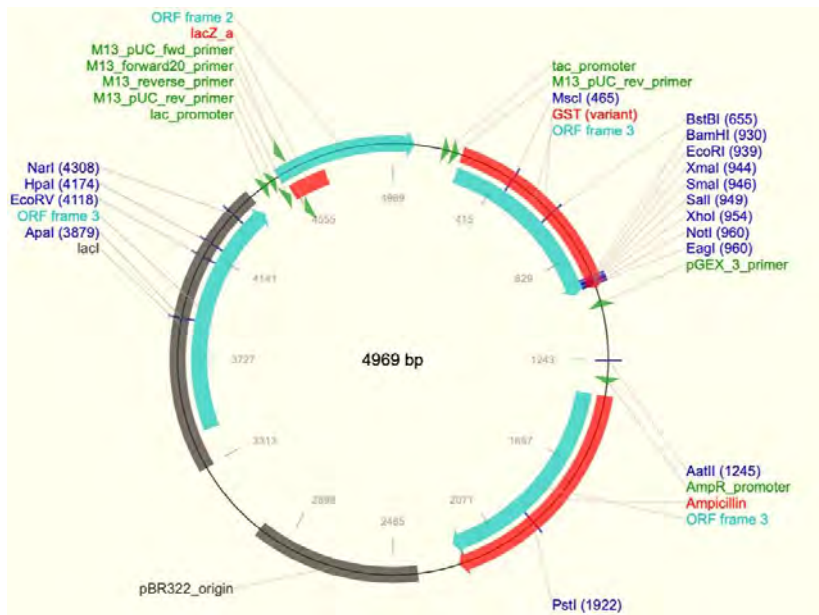
Εικόνα 20 : Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον HIF-1α και την τουμπουλίνη σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που εκφράζουν τον mHIF-1α Myc.

Τα παραπάνω αποτελέσματα από τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κύτταρα HeLa, επιβεβαιώνουν την έκφραση της πρωτεΐνης mHIF-1α Myc από τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει ενσωματωμένο το γονίδιο του mHIF-1α.

4.5. Κλωνοποίηση του mHIF-1α σε φορείς έκφρασης βακτηριακών (pGEX-4T1) και ευκαρυωτικών κυττάρων (pEGFP-C1)

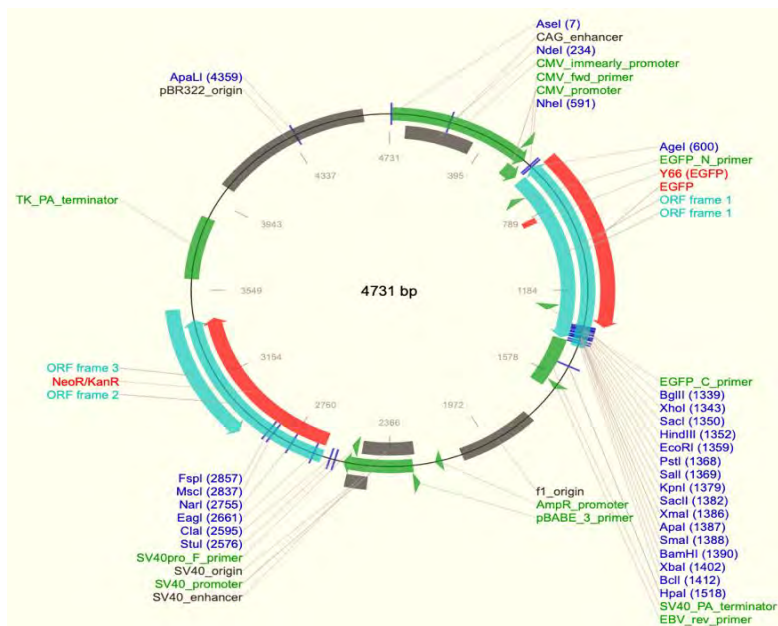
Όπως έχει αναφερθεί σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθεί ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του mHIF-1α από τις κινάσες ERK1/2 στην Ser-652 εισάγοντας μεταλλάξεις που αναιρούν (μετάλλαγμα mS652A) ή μιμούνται (μετάλλαγμα mS652D) τη φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο. Για τον σκοπό αυτό, με τις κατάλληλες πέψεις, ο mHIF-1α που φέρει τον επίτοπο Myc κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα έκφρασης για τη χρήση του ως εργαλείο σε

περταίρω πειράματα αλλά και την ευκολότερη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων. Ένας τέτοιος φορέας, όπως έχει δειχθεί από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, είναι ο pGEX-4T1, ο χάρτης του οποίου φαίνεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 από την Addgene.

Ο έλεγχος έκφρασης του wt mHIF-1α σε κύτταρα HeLa έγινε μετά από κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 συγκέντρωσης 1μg/μl, ο οποίος φέρει κωδική περιοχή για την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP γεγονός που βοηθά στην μετέπειτα παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ο χάρτης του πλασμιδίου φαίνεται στην εικόνα 22.



Εικόνα 22: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1 από την Addgene.

Τα τρία (3) πλασμίδια (βλ. Πίνακα 15) υποβλήθηκαν σε πέψεις με το ένζυμο BamHI-HF ώστε να δημιουργηθούν τμήματα DNA που έχουν συμπληρωματικά άκρα και σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να ενωθούν σε αντίδραση λιγάσης.

	pcDNA3 mHIF-1α MYC	pGEX-4T1	pEGFP-C1
Plasmid DNA	10 μl (5000 ng)	8,3 μl (5000ng)	5 μl (5000 ng)
Buffer 10X	5 μl	5 μl	5 μl
BamHI-HF	1 μl (20 units)	0,5 μl (10 units)	0,5 μl (10 units)
ddH₂O	34 μl	36,2 μl	39,5 μl
Quick CIP	-	1 μl (5 units)	1 μl (5 units)

Πίνακας 15 : Πέψεις των φορέων pcDNA3 mHIF-1α MYC, pGEX-4T1 και pEGFP-C1 με το ένζυμο BamHI-HF.

Οι αντιδράσεις επωάζονται για 3h στους 37°C και στα τελευταία 30 min προστίθεται η φωσφατάση Quick CIP (M0525S). Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 1% στην οποία φορτώνονται κατά σειρά μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, το pcDNA3 mHIF-1α MYC, ο φορέας pGEX-4T1 και ο pEGFP-C1. Έπειτα πραγματοποιείται απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης, όπως περιγράφεται στα Υλικά-Μέθοδοι με τη χρήση κατάλληλου kit. Η πηκτή κόβεται στις σωστές ζώνες μοριακού βάρους προκειμένου να απομονωθούν τα τμήματα DNA που αντιστοιχούν στον mHIF-1α Myc και στους ανοιχτούς φορείς pGEX-4T1 και pEGFP-C1. Ακολουθεί φωτομέτρηση των τμημάτων DNA που απομονώθηκαν με τη χρήση nanodrop για την μέτρηση των συγκεντρώσεων οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 16.

	mHIF-1α Myc	pGEX-4T1	pEGFP-C1
Συγκέντρωση	15,6 ng/μl	22,7 ng/μl	125 ng/μl

Πίνακας 16 : Συγκεντρώσεις ενθέματος mHIF-1α και φορέων pGEX-4T1 και pEGFP-C1.

Έπειτα με τη χρήση της ιστοσελίδας NEBioCalculator γίνεται υπολογισμός της μάζας του ενθέματος που απαιτείται για ανάμειξη ενθέματος – φορέα 50 ng σε αναλογία 3:1. Όσον αφορά την αντίδραση με τον φορέα pGEX-4T1 μεγέθους 4.969 kb απαιτείται ποσότητα 76.89 ng ενθέματος ενώ στην περίπτωση της αντίδρασης με τον φορέα pEGFP-C1 μεγέθους 4.731 kb απαιτείται ποσότητα 80.75 ng ενθέματος. Οι ποσότητες για την αντίδραση λιγάσης, σε τελικό όγκο 20 μl, φαίνονται στον πίνακα 17.

	pGEX-4T1	pEGFP-C1
Vector	2,2 μl (50 ng)	0,4 μl (50 ng)
DNA insert	4,9 μl (76.89 ng)	5,2 μl (80.75 ng)
Buffer 10X	2 μl	2 μl
T4 DNA ligase	1 μl (400 units)	1 μl (400 units)
ddH₂O	9,9 μl	11,4 μl

Πίνακας 17 : Οι ποσότητες για τις αντιδράσεις λιγάσης.

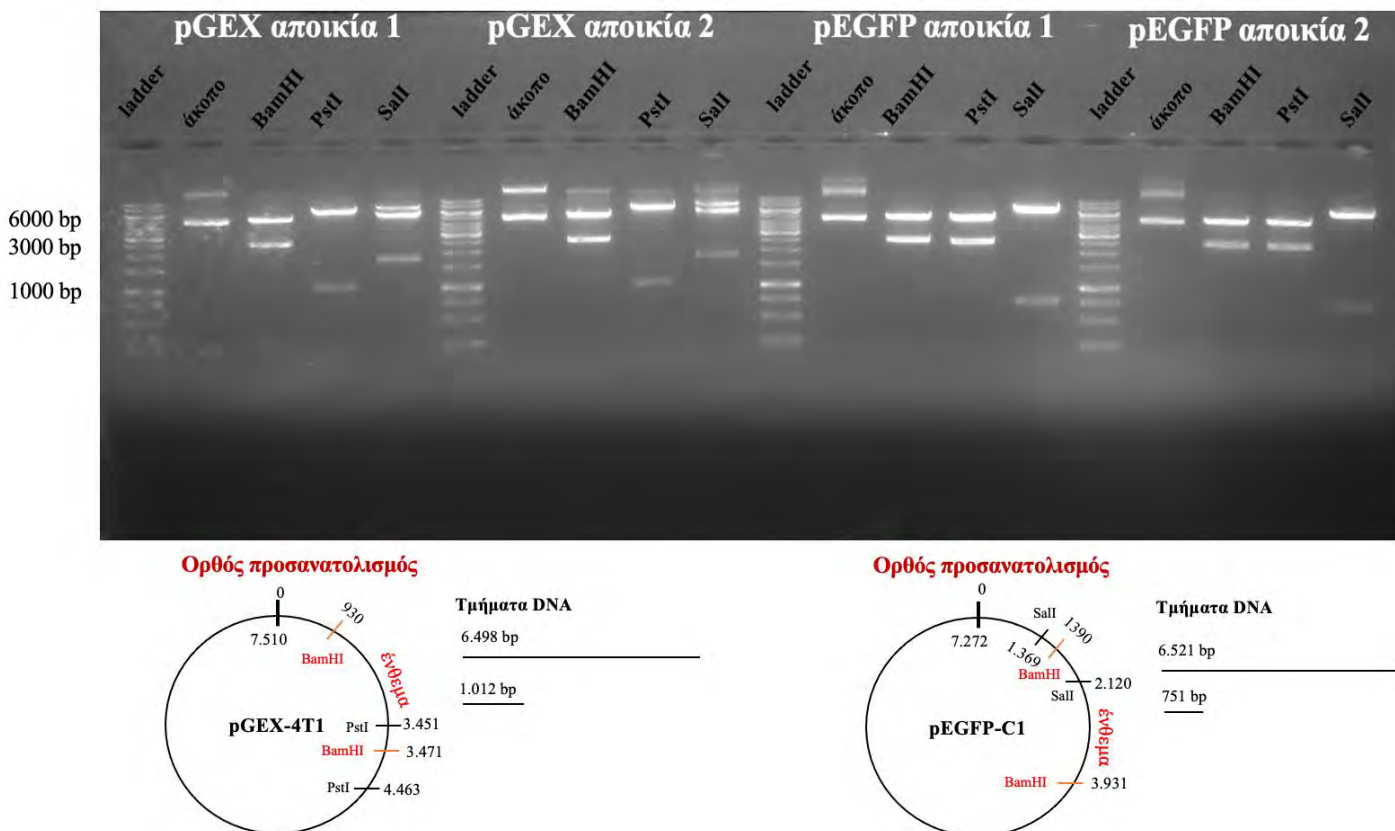
Τα ligation αφήνονται O/N στο μηχάνημα της PCR στους 16 °C για την πραγματοποίηση της αντίδρασης λιγάσης και την επόμενη ημέρα ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.Coli* Top10 προκειμένου να αναπτυχθούν στα τρυβλία βακτήρια που εκφράζουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν δύο (2) αποικίες από κάθε φορέα και πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από βακτηριακή καλλιέργεια *E.coli*, ακολουθώντας το πρωτόκολλο «Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.Coli*» της εταιρίας Macherey-Nagel, όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι. Με τη χρήση nanodrop μετρήθηκε η συγκέντρωση DNA για κάθε αποικία.

pGEX-4T1₁: 0,22 µg/µl
pGEX-4T1₂: 0,16 µg/µl

pEGFP-C1₁: 0,5 µg/µl
pEGFP-C1₂: 0,55 µg/µl

Προκειμένου να ελεγχθεί αν οι φορείς έχουν λάβει το ένθεμα DNA (mHIF-1α Myc) ακολούθησαν πέψεις με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζη. Το πρώτο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι το BamHI-HF το οποίο, όπως έχει αναφερθεί, κόβει εκατέρωθεν του ενθέματος, δίνοντας πληροφορίες για το αν οι φορείς έχουν λάβει το ένθεμα καθώς η μια (1) ζώνη εμφανίζεται στις 2.541 bp. Το ένζυμο PstI, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του προσανατολισμού του mHIF-1α στον φορέα pGEX-4T1, κόβει μια (1) φορά μέσα στο ένθεμα και μια (1) φορά στον φορέα, μετά το ένθεμα. Αν το ένθεμα είναι με τη σωστή κατεύθυνση τότε τα τμήματα DNA που προκύπτουν είναι μεγέθους 1.012 bp και 6.498 bp. Τέλος, το ένζυμο SalI που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του προσανατολισμού του mHIF-1α στον φορέα pEGFP-C1, κόβει μια (1) φορά μέσα στο ένθεμα και μια (1) φορά στον φορέα, πριν το ένθεμα. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν αν το ένθεμα είναι με τον σωστό προσανατολισμό είναι μεγέθους 6.521 bp και 751 bp.

Για όλες τις αποικίες πραγματοποιήθηκε πέψη 0,5 µg πλασμιδιακού DNA σε τελικό όγκο 20 µl. Από το Buffer 10X CutSmart προστίθενται 2 µl, ενώ από κάθε ένζυμο 0,2 µl. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην εικόνα 23.



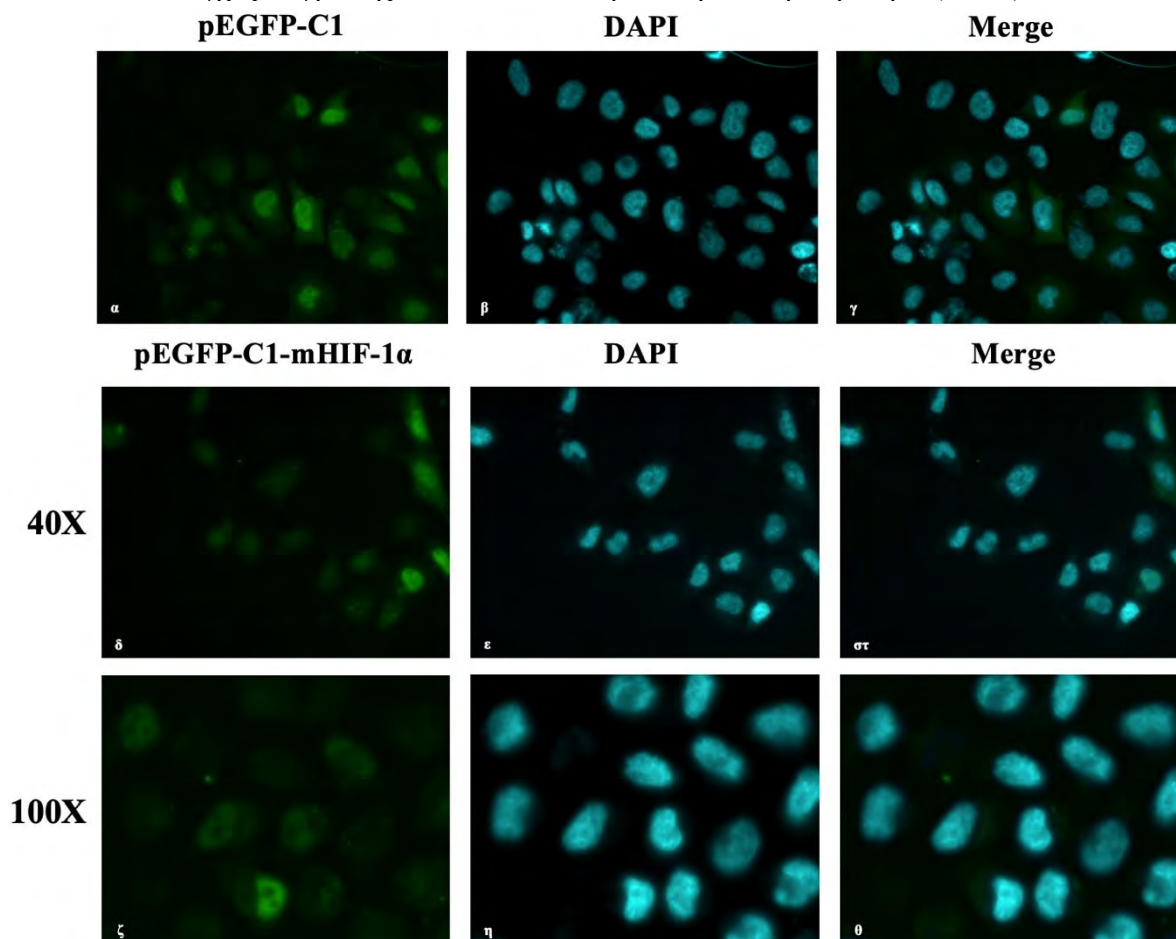
Εικόνα 23 : Πέψεις ελέγχου για τις αποικίες pGEX-4T1₁, pGEX-4T1₂, pEGFP-C1₁ και pEGFP-C1₂ με τα ένζυμα BamHI-HF, PstI και SalI.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 23 όλες οι αποικίες που ελέγχθηκαν έχουν λάβει το ένθεμα καθώς εμφανίζουν ζώνη στις 2.500 bp μετά από πέψη με το ένζυμο BamHI-HF. Οι αποικίες pGEX-4T1 μετά την πέψη με PstI εμφανίζουν ζώνες σε αναμενόμενα μοριακά βάρη που υποδεικνύουν ότι οι αποικίες αυτές έχουν λάβει το ένθεμα με σωστό προσανατολισμό. Παρομοίως, οι αποικίες pEGFP-C1 εφόσον εμφανίζουν ζώνες στις 6.521 bp και 757 bp μετά από πέψη με το ένζυμο Sall, γεγονός που σημαίνει ότι έχουν λάβει το ένθεμα του mHIF-1α με τον σωστό προσανατολισμό.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι κλωνοποιήθηκε με επιτυχία το ένθεμα που φέρει τον mHIF-1α Myc στους φορείς pGEX-4T1 και pEGFP-C1 επιτρέποντας σε επόμενα πειράματα τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης σε κύτταρα HeLa και 3T3-L1 και την δημιουργία των μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D.

4.6. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α Myc με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα HeLa

Όπως έχει αναφερθεί, στόχος της κλωνοποίησης του mHIF-1α στον φορέα pEGFP-C1 είναι ο έλεγχος έκφρασης του τόσο σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά (HeLa) όσο και σε

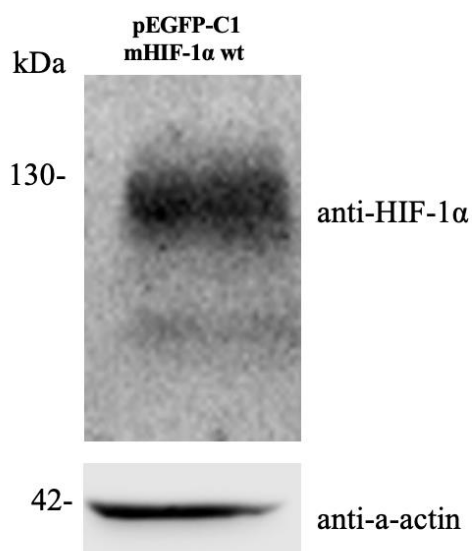


Εικόνα 24: Φθορισμός κυττάρων HeLa μετά την επιμόλυνση τους με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 και pEGFP-C1 mHIF-1α. Στις εικόνες α-γ απεικονίζονται κύτταρα HeLa που επιμολύνθηκαν με τον φορέα ελέγχου pEGFP-C1. Η πρωτεΐνη GFP φθορίζει στην πράσινη περιοχή. Στις εικόνες δ-θ φαίνεται η επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τον φορέα pEGFP-C1 mHIF-1α. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η έκφραση του mHIF-1α στα κύτταρα και η κατανομή της πρωτεΐνης mHIF-1α είναι κυρίως πυρηνική. Με μπλε φαίνονται οι πυρήνες μετά από χρώση με τη φθορίζουσα DAPI.

ποντικού (3T3-L1). Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των παραπάνω κυτταρικών σειρών με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 – mHIF-1α χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο «DNAfectin™ Plus Transfection Reagent» όπως περιγράφεται αναλυτικά στα Υλικά – Μέθοδοι. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έγινε για το πράσινο χρώμα εφόσον ο mHIF-1α εκφράζεται μαζί με τον επίτοπο της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1. Επομένως, ο πράσινος φθορισμός σηματοδοτεί και την έκφραση του mHIF-1α. Με μπλε χρώμα σημαίνεται η φθορίζουσα DAPI που χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων. Τα αποτελέσματα της επιμόλυνσης των κυττάρων HeLa παρουσιάζονται στην εικόνα 24.

Στις εικόνες α-γ απεικονίζονται κύτταρα HeLa που χρησιμοποιήθηκαν ως control (μάρτυρες) και διαμολύνθηκαν με τον φορέα pEGFP-C1. Η GFP βρέθηκε κατανεμημένη τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα λόγω του μικρού μεγέθους της. Στις εικόνες δ-θ φαίνονται κύτταρα τα οποία έχουν λάβει το πλασμίδιο pEGFP-C1 mHIF-1α και εκφράζουν την πρωτεΐνη mHIF-1α. Ο μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζει εντοπισμένη πυρηνική κατανομή με ελάχιστη διάχυση στο κυτταρόπλασμα όπως και στην περίπτωση του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα που αφορούν την κατανομή του αγρίου τύπου ως προς τις θέσεις φωσφορυλίωσης mHIF-1α σε κύτταρα HeLa συμφωνούν τόσο με τα παραπάνω πειράματα ανοσοφθορισμού όσο και με τα αντίστοιχα για τον wt human HIF-1α, καθώς προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σχετικά με την ανθρώπινη πρωτεΐνη, έχει δείξει παρόμοια αποτελέσματα.

Η έκφραση του mHIF-1α του φορέα pEGFP-C1 ελέγχθηκε και με ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 25). Η ανίχνευση της έκφρασης του EGFP- mHIF-1α-Myc έγινε με αντίσωμα anti-human HIF1-α (από mouse) και εντοπίζεται περίπου στα 125 kDa. Ως ιδιοσύστατο γονίδιο χρησιμοποιήθηκε αυτό της α-actin και η ζώνη της εμφανίζεται στα 42 kDa.

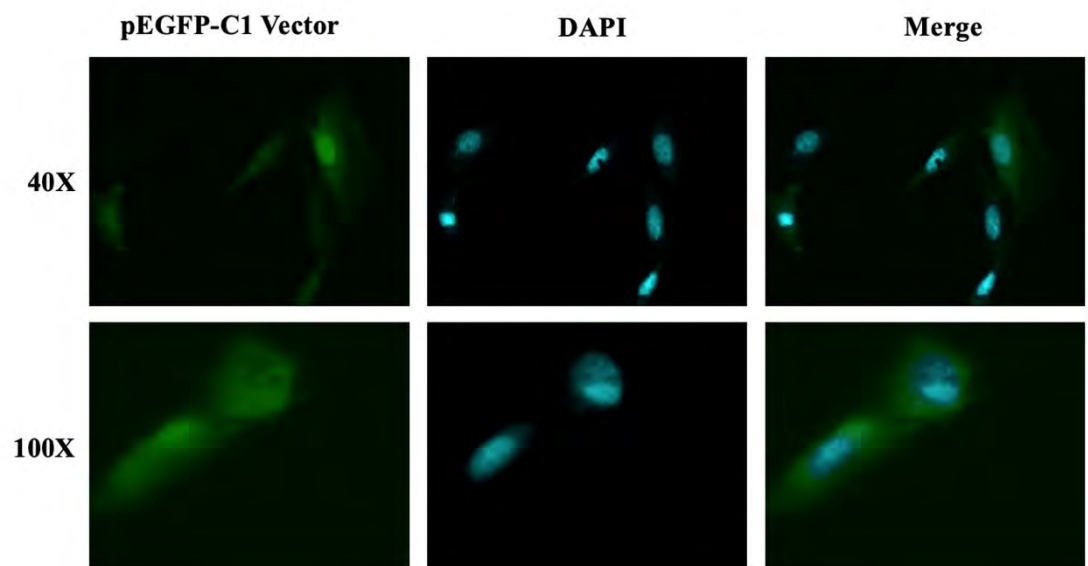


Εικόνα 25: Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa που έχουν διαμολυνθεί με pEGFP-C1 mHIF-1α παρασκευάστηκε και φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο. Τα κύτταρα HeLa εκφράζουν την πρωτεΐνη mHIF-1α, η οποία εντοπίζεται περίπου στα 125 kDa. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η α-actin.

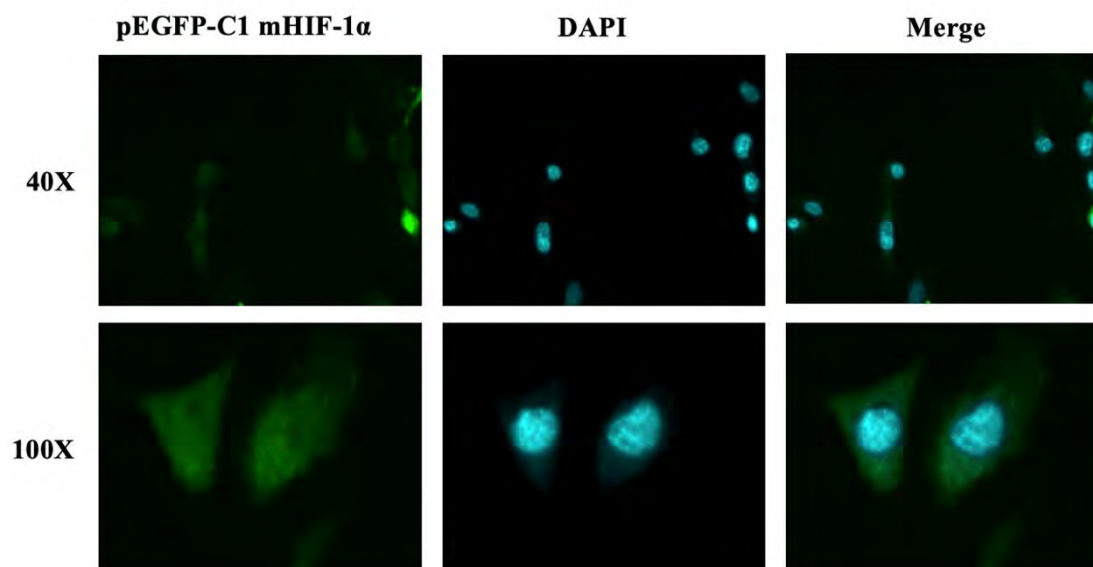
Τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαίωσαν την επιτυχία των πειραμάτων κλωνοποίησης του mHIF-1α στον φορέα pEGFP-C1. Κύτταρα HeLa που διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα που παρασκευάστηκε (pEGFP-C1 mHIF-1α), εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος σύμφωνα με τα πειράματα φθορισμού εντοπίζεται στον πυρήνα.

4.7. Έλεγχος έκφρασης του mHIF-1α Myc με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα 3T3-L1

Η έκφραση του mHIF-1α ελέγχθηκε και στην κυτταρική σειρά 3T3-L1 (εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού). Στην εικόνα 26 παρουσιάζονται 3T3-L1 κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με pEGFP-C1 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως control. Η πρωτεΐνη GFP εμφανίζει μια διάχυτη υποκυτταρική κατανομή, καθώς στην πλειοψηφία των κυττάρων υπάρχει τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στην εικόνα 27 φαίνονται 3T3-L1 κύτταρα που έχουν λάβει τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1-mHIF-1α Myc.

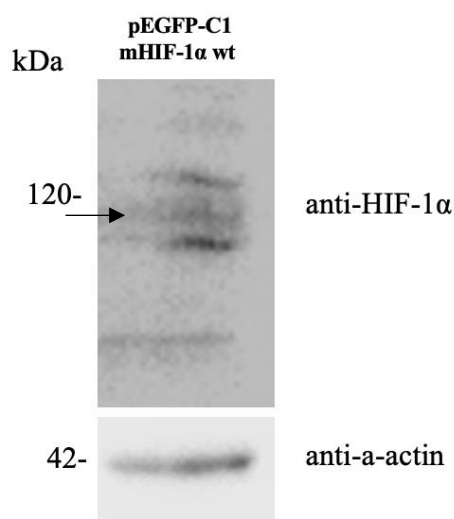


Εικόνα 26: Έκφραση της πρωτεΐνης GFP σε 3T3-L1 κύτταρα.



Εικόνα 27: Έκφραση της GFP-mHIF-1α MYC μετά από επιμόλυνση των 3T3-L1 κυττάρων με το πλασμίδιο pEGFP-C1 mHIF-1α MYC.

Ο mHIF-1α εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο ποσοστό στον πυρήνα. Στην εικόνα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western που πραγματοποιήθηκε, για τον έλεγχο της έκφρασης του mHIF-1α στην κυτταρική σειρά 3T3-L1.



Εικόνα 28: Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων 3T3-L1 που έχουν διαμολυνθεί με pEGFP-C1 mHIF-1α παρασκευάστηκε και φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο. Τα κύτταρα 3T3-L1 εκφράζουν την πρωτεΐνη mHIF-1α, η οποία εντοπίζεται περίπου στα 125 kDa. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η α-actin.

4.8. Δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων στη θέση φωσφορυλίωσης Ser-652 του μεταγραφικού παράγοντα mHIF-1α

Για τη μελέτη του βιολογικού ρόλου της φωσφορυλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα mHIF-1α από τις ERK1/2 κινάσες πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στην θέση Ser-652 που είναι η αντίστοιχη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 στον ποντικό σε σχέση με την ανθρώπινη μορφή. Η πρώτη σημειακή μετάλλαξη (μετάλλαγμα S652A) αφορά τη μετατροπή της σερίνης (Ser) (5' TCT 3') σε αλανίνη (Ala) (5 GCT 3'). Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στη μετατροπή ενός πολικού-υδρόφιλου αμινοξέος που διαθέτει ομάδα υδροξυλίου (σερίνη) σε ένα μη πολικό-υδρόφοβο που η ομάδα υδροξυλίου (αλανίνη) εκλείπει. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μορφής του mHIF-1α που δεν θα μπορεί να φωσφορυλιωθεί από τις ERK1/2 στη συγκεκριμένη θέση. Η δεύτερη σημειακή μετάλλαξη (μετάλλαγμα S652D) αφορά τη μετατροπή της σερίνης σε (5' TCT 3') ασπαραγινικό (Asp) (5' GAT 3'). Η αλλαγή σε ασπαραγινικό το οποίο λόγω της β-καρβοξυλικής ομάδας που διαθέτει μμείται το φορτίο φωσφορικής ομάδας που προστίθεται από τις ERK1/2 και αποτελεί το φωσφομιμητική μορφή του mHIF-1α. Η μεταλλαξιγένεση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το kit «QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit» με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τις σημειακές μεταλλάξεις είναι ο pGEX-4T1.

	mS652A μετάλλαγμα	mS652D μετάλλαγμα
10X Reaction Buffer	5 µl	5 µl
Forward Primer	1 µl	1 µl
Reverse Primer	1 µl	1 µl
pGEX-4T1 (220 ng/µl)	0,7 µl (15 ng)	0,7 µl (15 ng)
dNTPs	1 µl (2,5 units)	1 µl (2,5 units)
ddH₂O	41,3 µl	41,3 µl
PfuUltra HF DNA polymerase	1 µl	1 µl

Πίνακας 18: Οι απαιτούμενες ποσότητες για τη δημιουργία των μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 με τα δύο (2) μεταλλάγματα και σε επόμενο στάδιο απομόνωση DNA του πλασμιδιακού φορέα από βακτηριακή καλλιέργεια *E.coli*, ακολουθώντας το πρωτόκολλο «Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.Coli*». Με τη χρήση nanodrop μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις για τα δύο (2) μεταλλάγματα οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 19.

	mS652A	mS652D
Συγκέντρωση	0,19 µg/µl	0,34 µg/µl

Πίνακας 19: Οι συγκεντρώσεις των μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D.

Έπειτα, τα μεταλλάγματα mS652A και mS652D στάλθηκαν για αλληλούχηση προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία των πειραμάτων που αφορούν τη μεταλλαξιγένεση. Στην εικόνα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το μέταλλαγμα mS652A. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με αξιοπιστία για περίπου 1.000 βάσεις και αποκάλυψε ότι η μεταλλαξιγένεση ήταν επιτυχής καθώς πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή της τριπλέτας 5' TCT 3' (Ser) σε 5 GCT 3' (Ala). Η μεταλλαγμένη θέση απεικονίζεται με μπλε χρώμα και η αλληλουχία διαβάζεται από 5' → 3' από δεξιά προς τα αριστερά.



Εικόνα 29: Αποτελέσματα αλληλούχησης μεταλλαγματος mS652A. Το αμινοξύ Ser έχει μετατραπεί σε Ala, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της σημειακής μεταλλαξιγένεσης.

Στην εικόνα 30 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το μετάλλαγμα S652D. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με αξιοπιστία για περίπου 1.000 βάσεις και αποκάλυψε ότι η μεταλλαξιγένεση ήταν επιτυχής καθώς πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή της τριπλέτας 5' TCT 3' (Ser) σε 5 GAT 3' (Asp). Η μεταλλαγμένη θέση απεικονίζεται με μπλε χρώμα και η αλληλουχία διαβάζεται από 5' → 3' από δεξιά προς τα αριστερά.



Εικόνα 30: Αποτελέσματα αλληλούχησης μετάλλαγματος mS652D. Το αμινοξύ Ser έχει μετατραπεί σε Asp, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία της σημειακής μεταλλαξιγένεσης.

Οι παραπάνω εικόνες από την αλληλούχηση επιβεβαιώνουν την επιτυχία των πειραμάτων της μεταλλαξιγένεσης και την παρασκευή των μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την σύγκριση τους με τον wt mHIF-1α σχετικά με τον ρόλο του καταλοίπου σερίνης 652 στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης στο κύτταρο.

4.9. Υποκλωνοποίηση των μορφών mS652A και mS652D στον φορέα έκφρασης pCDNA3

Αφού έχει πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 με τα πλασμίδια pCDNA3 mHIF-1α MYC, pGEX-4T1-mS652A και pGEX-4T1-mS652D και απομόνωση DNA από τις καλλιέργειες για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας DNA, ακολουθεί η διαδικασία υποκλωνοποίησης των μεταλλαγμάτων του mHIF-1α στον φορέα pCDNA3.

Οι συγκεντρώσεις των DNA (μετά την μέτρηση στο nanodrop) που θα χρησιμοποιηθούν για την διαδικασία της υποκλωνοποίησης φαίνονται στον πίνακα 20.

	pcDNA3 mHIF-1α MYC	pGEX-4T1-mS652A	pGEX-4T1-mS652D
Συγκέντρωση	3,5 µg/µl	0,16 µg/µl	0,14 µg/µl

Πίνακας 20: Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων pcDNA3 mHIF-1α MYC, pGEX-4T1-mS652A και pGEX-4T1-mS652D.

Τα τρία (3) πλασμίδια (βλ. πίνακα 21) υποβλήθηκαν σε παρασκευαστικές πέψεις με το ένζυμο BamHI-HF ώστε να δημιουργηθούν τμήματα DNA που έχουν συμπληρωματικά άκρα και σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να ενωθούν σε αντίδραση λιγάσης.

	pcDNA3 mHIF-1α MYC	pGEX-4T1-mS652A	pGEX-4T1-mS652D
Plasmid DNA	1,43 µl (5000 ng)	31,25 µl (5000ng)	35,7 µl (5000 ng)
Buffer 10X	5 µl	5 µl	5 µl
BamHI-HF	0,5 µl (10 units)	0,5 µl (10 units)	0,5 µl (10 units)
ddH₂O	43,07 µl	13,25 µl	8,8 µl
Quick CIP	1 µl (5 units)	-	-

Πίνακας 21: Οι πέψεις των πλασμιδίων pcDNA3 mHIF-1α MYC, pGEX-4T1-mS652A και pGEX-4T1-mS652D με το ένζυμο BamHI-HF.

Οι αντιδράσεις επωάζονται για 3h στους 37°C και στα τελευταία 30 min προστίθεται η φωσφατάση Quick CIP (M0525S). Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης στην οποία φορτώνονται κατά σειρά μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, και τα πλασμίδια pcDNA3 mHIF-1α MYC, pGEX-4T1-mS652A, pGEX-4T1-mS652D. Έπειτα πραγματοποιείται απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης, όπως περιγράφεται στα Υλικά-Μέθοδοι με τη χρήση κατάλληλου kit. Η πηκτή κόβεται στις σωστές ζώνες μοριακού βάρους προκειμένου να απομονωθούν τα τμήματα DNA που αντιστοιχούν στον φορέα pcDNA3 χωρίς το ένθεμα mHIF-1α-Myc wt και στα ενθέματα HIF-1α mS652A και HIF-1α mS652D. Ακολουθεί φωτομέτρηση των τμημάτων DNA που απομονώθηκαν με τη χρήση nanodrop για την μέτρηση των συγκεντρώσεων οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 22.

	pcDNA3	HIF-1α mS652A	HIF-1α mS652D
Συγκέντρωση	74,5 ng/µl	41,7 ng/µl	25,3 ng/µl

Πίνακας 22: Οι συγκεντρώσεις των τμημάτων, HIF-1α mS652A και HIF-1α mS652D.

Έπειτα με τη χρήση της ιστοσελίδας NEBioCalculator γίνεται υπολογισμός της μάζας του ενθέματος που απαιτείται για ανάμειξη ενθέματος – φορέα (pcDNA3) 50 ng σε αναλογία 3:1 και ποσότητα είναι 71.2 ng από κάθε ένθεμα.

Οι ποσότητες για την αντίδραση λιγάσης σε τελικό όγκο 20 µl φαίνονται στον πίνακα 23.

	HIF-1α mS652A	HIF-1α mS652D
pcDNA3	0,67 µl (50 ng)	0,67 µl (50 ng)
DNA insert	1,7 µl (71,2 ng)	2,8 µl (71,2 ng)
Buffer 10X	2 µl	2 µl
T4 DNA ligase	1 µl (400 units)	1 µl (400 units)
ddH₂O	14,63 µl	13,53 µl

Πίνακας 23: Οι ποσότητες για τις αντιδράσεις λιγάσης

Οι αντιδράσεις αφήνονται Ο/Ν στο μηχανήμα της PCR στους 16 °C για την πραγματοποίηση της αντίδρασης δεσμοποίησης και την επόμενη ημέρα ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.Coli Top10 προκειμένου να αναπτυχθούν στα τρυβλία βακτήρια που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν δύο (2) αποικίες από κάθε μεταλλαγμένο πλασμίδιο και πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από βακτηριακή καλλιέργεια E.coli με αλκαλική λύση και πέψεις ελέγχου με τα ένζυμα BamHI και PstI. Αφού διαπιστώθηκε η παρουσία και ο ορθός προσανατολισμός των ενθεμάτων HIF-1α mS652A και HIF-1α mS652D στο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο «Isolation of high-copy plasmid DNA from E.Coli» της εταιρίας Macherey-Nagel, όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι. Με τη χρήση nanopdrop μετρήθηκε η συγκέντρωση DNA για κάθε αποικία (πίνακας 24) .

	pcDNA-mS652A	pcDNA-mS652D
Συγκέντρωση	0,6 µg/µl	0,75 µg/µl

Πίνακας 24: Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων pcDNA-mS652A και pcDNA-mS652D.

Στην εικόνα 31 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 1% όπου πραγματοποιήθηκε πέψη 0,5 µg πλασμιδιακών DNA (pcDNA-mS652A και pcDNA-mS652D) σε τελικό όγκο 20 µl. Από το Buffer 10X CutSmart προστίθενται 2 µl, ενώ από κάθε ένζυμο (BamHI και PstI) 0,2 µl, δηλαδή 4 units. Πέψη με το ένζυμο KpnI (2 units) δίνει γραμμικό μόριο DNA.. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην εικόνα 31. Πέψη των πλασμιδίων pcDNA-mS652A και pcDNA-mS652A με το ένζυμο BamHI δίνει τα μεταλλαγμένα cDNA του mHIF-1α στις 2.541 bp ενώ πέψη με το ένζυμο PstI δίνει δύο (2) διακριτά τμήματα DNA (6.497 και 1.397).

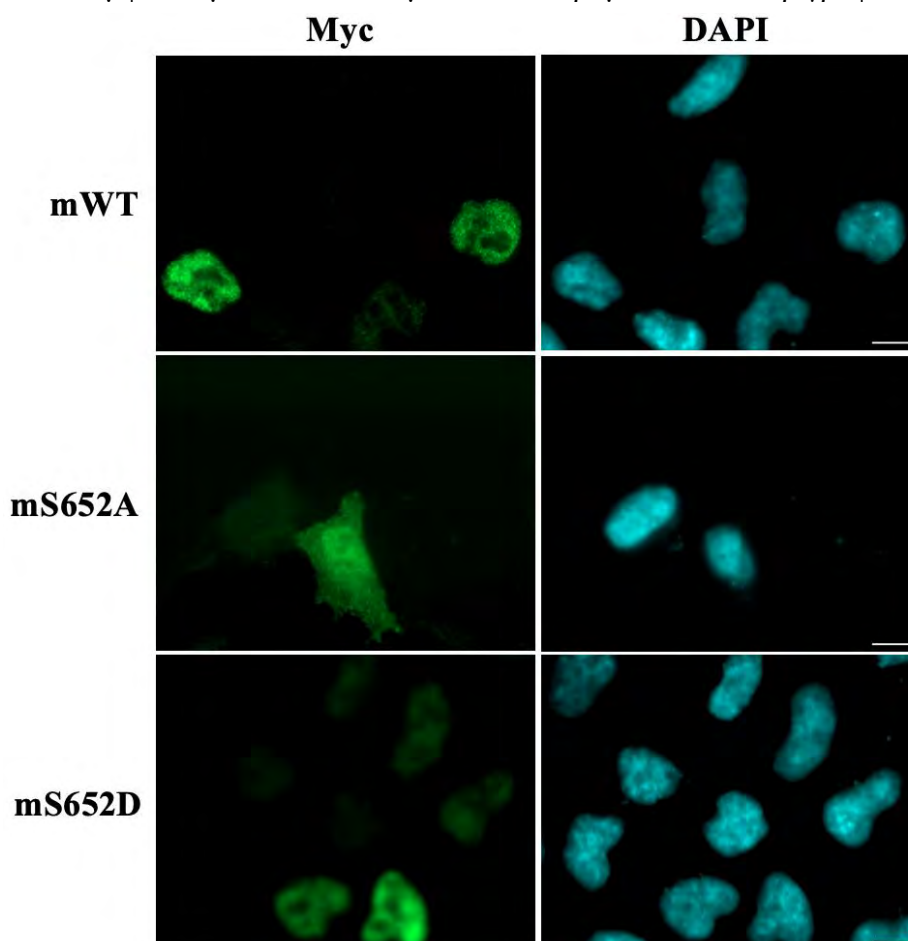


Εικόνα 31: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 1% για τα πλασμίδια pcDNA-mS652A και pcDNA-mS652D.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την επιτυχία της υποκλωνοποίησης των μεταλλαγμάτων mS652A και mS652D του mHIF-1α στον φορέα pcDNA3 (παρουσία ενθέματος και ορθός προσανατολισμός), επιτρέποντας σε επόμενα πειράματα την μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των μεταλλαγμάτων, την σύγκριση της έκφρασης τους σε κυτταρική σειρά HeLa αλλά και την μέτρηση της ενεργότητας του mHIF-1α με πείραμα λουσιφεράσης.

4.10. Έλεγχος έκφρασης των μορφών wt, mS652A και mS652D του mHIF-1α με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα HeLa .

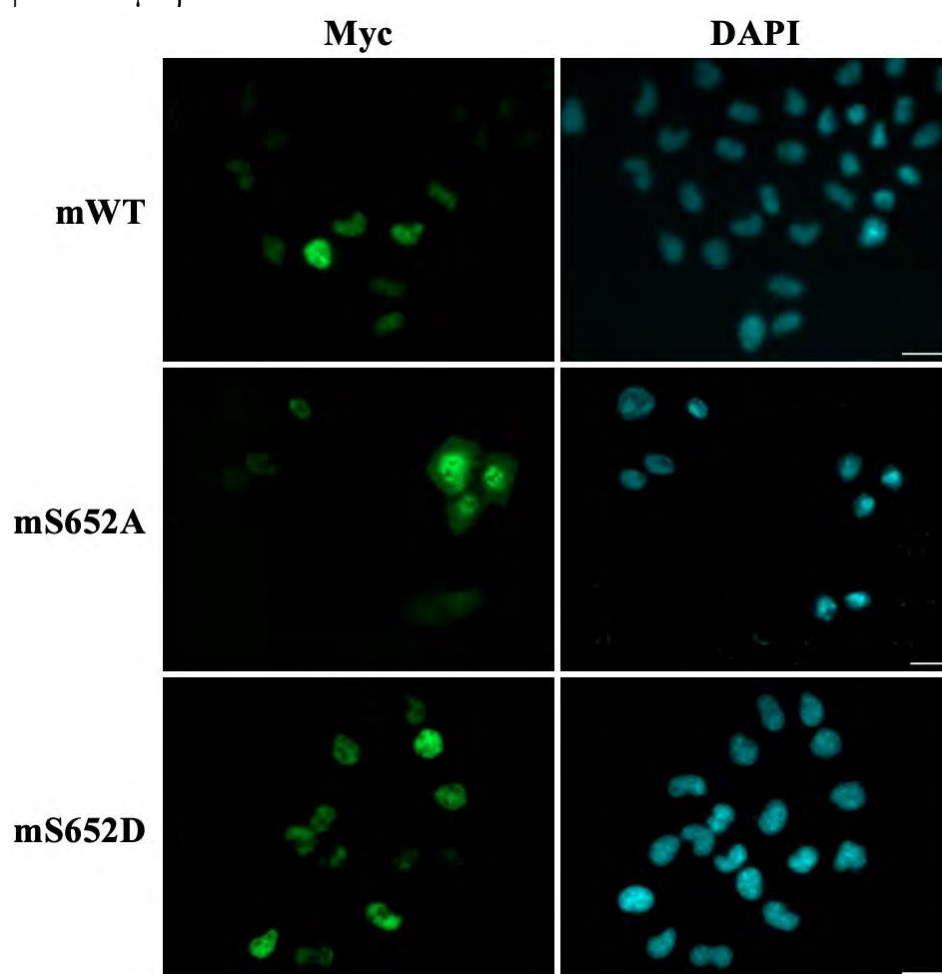
Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών mHIF-1α-Myc (wt, S652A και S652D) πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με τη χρήση του αντιδραστηρίου επιμόλυνσης TurboFect, όπως περιγράφεται στα Υλικά – Μέθοδοι και στη συνέχεια επώαση των καλυπτρίδων πρωτογενές αντίσωμα anti-Myc από κουνέλι. Το δευτερογενές αντίσωμα που επιλέχθηκε (από αίγα) εκπέμπει στην πράσινη περιοχή του φάσματος. Με μπλε χρώμα σημαίνεται η φθορίζουσα DAPI που χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 32 μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, ο mHIF-1α-Myc-wt εντοπίζεται στον πυρήνα και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που περιγράφονται παραπάνω.



Εικόνα 32: Έκφραση του mHIF-1α-Myc wt, S652A και S652D σε κύτταρα HeLa (μεγέθυνση 100X). Στην πράσινη περιοχή του φάσματος εκπέμπει το δευτερογενές αντίσωμα για τον επίτοπο Myc, ενώ με μπλε σημαίνεται η φθορίζουσα DAPI.

Ο φαινότυπος των κυττάρων που εκφράζουν τον mHIF-1α-Myc-S652A φαίνεται να είναι μεικτός και λιγότερο ξεκάθαρος σε σχέση με αυτόν του ανθρώπινου HIF-1α (με την ίδια μετάλλαξη) όπως έχει δείχθει από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας [83]. Στις μελέτες αυτές, μεταλλάγματα του ανθρώπινου HIF-1α στη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (από Ser σε Ala) παρουσίασαν μικρότερη μεταγραφική ενεργότητα και εντοπισμό εκτός του πυρήνα.

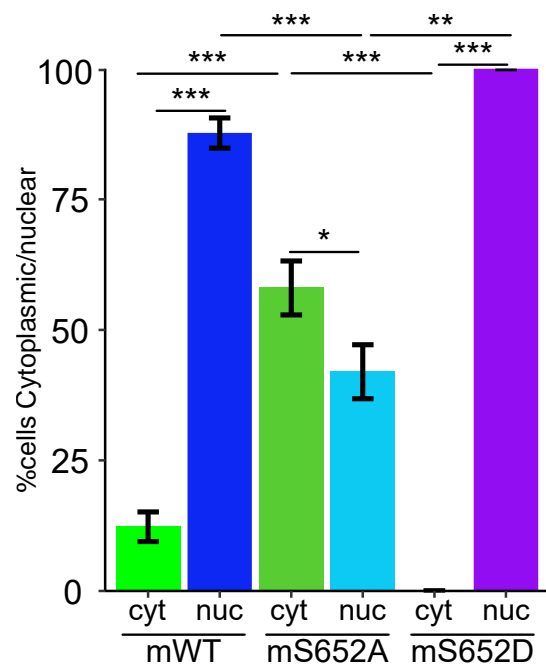
Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος τουλάχιστον 100 κυττάρων ($n > 100$) ως προς τον εντοπισμό του mHIF-1α και στις τρεις μορφές του (wt, mS652A, mS652D) με τη χρήση του μικροσκοπίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση από όλες τις εικόνες που λήφθηκαν και κυρίως στις εικόνες με μεγέθυνση 40X. Στην εικόνα 33 φαίνονται κύτταρα που εκφράζουν τις τρεις μορφές του mHIF-1α στον 40X φακό του μικροσκοπίου



Εικόνα 33: Έκφραση του mHIF-1α-Myc wt, S652A και S652D σε κύτταρα HeLa (μεγέθυνση 40X). Στην πράσινη περιοχή του φάσματος εκπέμπει το δευτερογενές αντίσωμα για τον επίτοπο Myc, ενώ με μπλε σημαίνεται η φθορίζουσα DAPI.

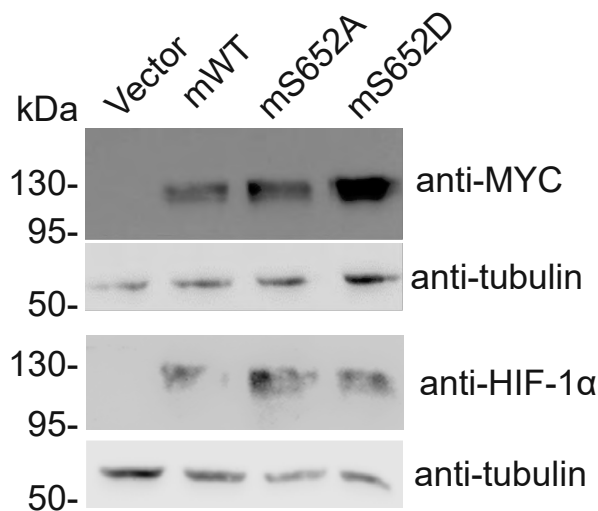
Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 33, ο φαινότυπος των κυττάρων που εκφράζουν τον mHIF-1α-Myc-S652A επαναλαμβάνεται και στις εικόνες μικροσκοπίου με μεγέθυνση 40X (μεικτός φαινότυπος). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η μορφή S652A του mHIF1α μοιράζεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ενώ η S652D είναι αποκλειστικά πυρηνική.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ποσοτικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση του προγράμματος R (> από 100 κύτταρα ανά συνθήκη) μετά από deconvolution, δηλαδή διόρθωση του «θορύβου» της εικόνας για να ληφθεί υπόψη το πραγματικό σήμα. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης συνοψίζονται στην εικόνα 34. Όσον αφορά τον mHIF-1α-Myc wt παρατηρείται ότι είναι κυρίως πυρηνικός ενώ σε ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων αυτών (περίπου 12%) εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση του πλασμιδίου pcDNA3-mHIF-1α-Myc mS652A, ο μεταγραφικός παράγοντας παρουσιάζει σημαντική μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα (στο 60% των κυττάρων) με τις συνθήκες να παρουσιάζουν (όπως συμβολίζεται στην εικόνα 34) μεταξύ τους στατιστική σημαντικότητα. Ξεκάθαρος φαινότυπος παρατηρείται στο πλασμίδιο pcDNA3-mHIF-1α-Myc mS652D, όπου η πρωτεΐνη παρουσιάζει αποκλειστικά πυρηνική κατανομή.



Εικόνα 34: Ποσοτικοποίηση κυτταροπλασματικής και πυρηνικής κατανομής των μορφών mWT, mS652A και mS652D. $N > 100$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Η έκφραση των τριών (3) μορφών του mHIF-1α (wt, mS652A και mS652D) ελέγχθηκε και με ανοσοαποτύπωση κατά Western για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών. Η ανίχνευση της έκφρασης τους πραγματοποιήθηκε με πρωτογενές αντίσωμα τόσο anti-Myc, όσο και anti-HIF-1α και όπως φαίνεται από την εικόνα 35 οι πρωτεΐνες εντοπίζονται περίπου στα 120 kDa. Ως ιδιοσύστατο γονίδιο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτό της τουμπουλίνης, η ζώνη της οποίας εμφανίζεται περίπου στα 55 kDa.

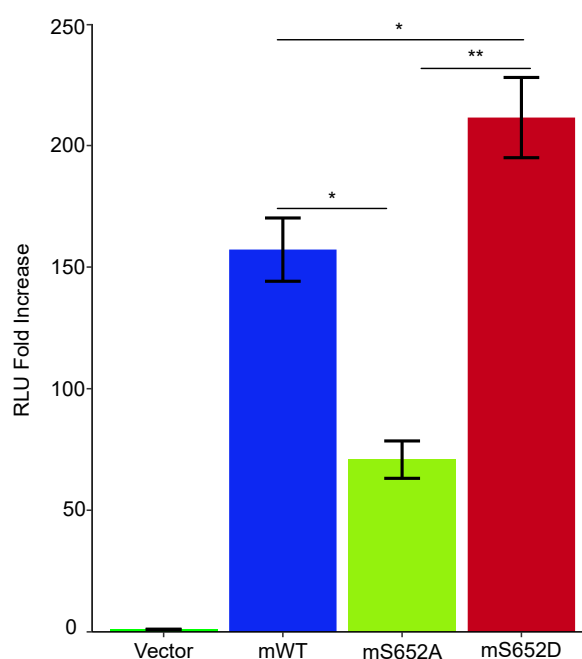


Εικόνα 35: Ανοσοαποτύπωση κατά western για τις μορφές mWT, S652A και mS652D (~120 kDa) χρησιμοποιώντας αντισώματα απέναντι στον επίτοπο myc και τον HIF-1α. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό της τουμπουλίνης (~55 kDa.)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 35 από τα πειράματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western οι τρεις (3) μορφές του mHIF-1α εκφράστηκαν με επιτυχία σε κύτταρα HeLa. Τα παραπάνω πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαιώνουν έδειξαν ότι όλες οι μορφές του HIF-1α εκφράζονται σε ίδια περίπου επίπεδα (η μορφή mS652D έχει εντονότερο σήμα λόγω φορτώματος) και ότι εμφανίζουν διαφορές στην υποκυτταρική τους κατανομή ανάλογα με το αν η μετάλλαξη καταργεί ή μιμείται τη φωσφορυλίωση.

4.11. Μέτρηση δραστηριότητας των μορφών mHIF-1α wt, S652A και S652D σε κύτταρα HeLa με τη μέθοδο της λουσιφεράσης

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχουν διαφορές στην μεταγραφική ενεργότητα του mHIF-1α wt και των δύο (2) μεταλλαγμάτων (S652A και S652D) διενεργήθηκαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς αυτό της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των HRE και μετρήθηκε η δραστηριότητα της. Η δραστηριότητα της αντιπροσωπεύει την δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων mHIF-1α wt, S652A και S652D καθώς το γονίδιο της υπόκειται σε έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων HIF, όπως αναλύθηκε στα Υλικά-Μέθοδοι. Τα κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τρία (3) είδη πλασμιδίων. Το πρώτο είδος (pcDNA3-mHIF-1α) αφορά την έκφραση του mHIF-1α (pcDNA vector χωρίς ένθεμα ή wt ή S652A ή S652D αναλόγως την εκάστοτε συνθήκη), ενώ το δεύτερο αφορά την έκφραση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (pGL3-VEGF-5XHRE-Luc) κάτω από τον έλεγχο των HIF. Τέλος, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν και με το πλασμίδιο pCI3-Renilla για την μέτρηση της λουσιφεράσης της Renilla και την κανονικοποίηση της ικανότητας επιμόλυνσης και των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της λουσιφεράσης παρουσιάζονται στην εικόνα 36.



Εικόνα 36: Ποσοτικοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας των μορφών mWT, S652A και mS652D με τη μέθοδο λουσιφεράσης. Οι τιμές εμφανίζονται ως επαγωγή σε σχέση με το άδειο πλασμίδιο. N=12, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Συνολικά οι τιμές που μετρήθηκαν για κάθε συνθήκη (Vector, mWT, mS652A και S652D) είναι 12 (n=12) και πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του προγράμματος R. Όπως φαίνεται στην εικόνα 36, ο φαινότυπος των μορφών mWT, mS652A και S652D, δηλαδή η κατανομή πυρήνα/κυτταρόπλασμα που παρατηρήθηκε με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού (εικόνες 32, 33 και 34) αντικατοπτρίζεται και στα αποτελέσματα της δοκιμασίας λουσιφεράσης. **Πιο συγκεκριμένα, ο mHIF-1α wt παρουσιάζει υψηλή μεταγραφική ενεργότητα ενώ αυτή του mHIF-1α S652A στατιστικώς σημαντικά μειωμένη (~3 φορές μικρότερη σε σχέση με το wt).** Αντιθέτως, μετά τη δοκιμασία της λουσιφεράσης, διαπιστώθηκε μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργότητα του μεταλλάγματος mHIF-1α S652D, λόγω της αποκλειστικής κατανομής της μορφής αυτής στον πυρήνα

των κυττάρων. Τέλος, ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο pcDNA vector-HA, στον οποίο, όπως είναι αναμενόμενο, δεν παρατηρείται μεταγραφική ενεργότητα ενώ η κανονικοποίηση της διαμόλυνσης έγινε μετρώντας τη βιοφωταύγεια της Renilla.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά ου έμμεσου ανοσοφθορισμού καθώς η μορφή που μιμείται τη φωσφορυλίωση mHIF-1α S652D παρουσιάζει την μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργότητα, ενώ η mHIF-1α S652A την μικρότερη, δεδομένα που αντικατοπτρίζονται και στην ποσοτικοποίηση των κυττάρων που εμφανίζουν κυτταροπλασματικό και πυρηνικό σήμα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κύτταρο, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις είναι δυνατόν η συγκέντρωση του οξυγόνου να παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα, με την κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως υποξία [4]. Προκειμένου το κύτταρο να αντιμετωπίσει την κατάσταση αυτή και να επιτελέσει βασικές λειτουργίες που απαιτούν φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, επάγει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων HIFs (Hypoxia Inducible Factors) [10]. Οι HIFs είναι ετεροδιμερείς και στοχεύουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που αφορούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγειογένεση, τον μεταβολισμό της γλυκόζης κ.α. Η πιο καλά μελετημένη υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα είναι η υπομονάδα HIF-1α. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η HIF-1α υπομονάδα του ποντικού (mHIF-1α) [25].

Η ρύθμιση της λειτουργίας της HIF-1α υπομονάδας είναι πολυεπίπεδη και περιλαμβάνει πολύπλοκους μηχανισμούς. Ο κυριότερος τρόπος ρύθμισης αφορά την ρύθμιση από τα επίπεδα του διαθέσιμου οξυγόνου [11], ενώ είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες (μορταλίνη, νουκλεοσομίνη κ.α.) ή μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η καλύτερα μελετημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η φωσφορυλίωση του HIF-1α [40].

Προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν χαρακτηρίσει δύο (2) κατάλοιπα σερίνης (Ser-641 και Ser-643) του ανθρώπινου HIF-1α που φωσφορυλιώνονται από τις ERK1/2 κινάσες με αποτέλεσμα την συσσώρευση του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του. Η δημιουργία του μεταλλάγματος S641/3A έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της σερίνης σε αλανίνη και την αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK1/2. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα και την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του [83]. Η πρωτεΐνη κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια όπου αλληλεπιδρά με την μορταλίνη και αναστέλλει τον αποπτωτικό μηχανισμό του κυττάρου. Αντιθέτως, η δημιουργία μεταλλάγματος που μιμείται την φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την επαναφορά του φαινότυπου και την συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα [83].

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα παραπάνω ευρήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι του καρκίνου, επιχειρήσαμε να μεταφέρουμε όλα τα γνωστικά εργαλεία του ανθρώπινου HIF-1α σε αυτόν του ποντικού και να μελετηθεί και σε ένα ζωικό μοντέλο ο βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του mHIF-1α από τις ERK1/2. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας είναι η κλωνοποίηση του mHIF-1α σε φορείς για την δημιουργία μεταλλάξεων στις θέσεις φωσφορυλίωσης από της ERK1/2 αλλά και για την έκφραση του σε ανθρώπινα και ποντικίσια κύτταρα (HeLa και 3T3-L1). Πραγματοποιήθηκαν οι μεταλλάξεις mS652A (αναστολή φωσφορυλίωσης) και mS652D (φωσφομιμητική μετάλλαξη) και συγκρίθηκε ο φαινότυπος των κυττάρων αγρίου τύπου σε σύγκριση με αυτόν των δύο (2) μεταλλαγμάτων. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε τόσο σε επίπεδο εντοπισμού του μεταγραφικού παράγοντα στο κύτταρο, όσο και σε επίπεδο έκφρασης και ενεργότητας του.

Τα πειράματα που διενεργήθηκαν αφορούσαν:

1) Την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των αμινοξέων του ανθρώπινου HIF-1α με αυτόν του ποντικού. Η ευθυγράμμιση αυτή αποκάλυψε ότι ο HIF-1α του ανθρώπου είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένος και στον ποντικό. Αρκετά υψηλή ομοιότητα μεταξύ των δύο αλληλουχιών παρατηρείται και στην περιοχή ETD, στην οποία στοχεύουν οι ERK1/2 και φωσφορυλιώνουν. Καθώς οι ERK1/2 αναγνωρίζουν το διπεπτίδιο Ser-Pro θεωρήθηκε πιθανό ότι μόνο η μια θέση φωσφορυλίωσης στον ποντικό είναι συντηρημένη και αυτή είναι η Ser-652, καθώς η Ser-654 (που αντιστοιχεί στην Ser-643 της ανθρώπινης πρωτεΐνης) δεν ακολουθείται από προλίνη.

2) Τον έλεγχο έκφρασης του mHIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Προτού πραγματοποιηθούν οι σημειακές μεταλλάξεις mS652A (αναστολή φωσφορυλίωσης) και mS652D (φωσφομιμητική μετάλλαξη) ελέγχθηκε η έκφραση του αγρίου τύπου mHIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιμολύνθηκαν αρχικά HeLa κύτταρα και τα αποτελέσματα έδειξαν την εντοπισμένη πυρηνική κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα όπως συμβαίνει και με τον ανθρώπινο. Στη συνέχεια, για τη δημιουργία ενός ισογονικού φαινοτύπου επιμολύνθηκαν και εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (3T3-L1) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο mHIF-1α παρουσιάζει κυτταροπλασματική κατανομή. Μια εξήγηση για τον λόγο που παρατηρείται η διαφορά αυτή σε σχέση με τα HeLa κύτταρα, είναι οι διαφορές στην κυτταρική σηματοδότηση μεταξύ των δύο (2) κυτταρικών σειρών. Τα HeLa κύτταρα είναι καρκινικά κύτταρα, στα οποία υπάρχει υπερενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης ERK1/2 [109] με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του mHIF-1α και τη συσσώρευση του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Τα 3T3-L1 κύτταρα είναι μη καρκινικοί ινοβλάστες και το μονοπάτι των ERK1/2 είναι λιγότερο ενεργό με αποτέλεσμα η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης να πραγματοποιείται σε μικρότερο βαθμό και έτσι αυτή πιθανά να εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα.

3) Την δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων. Με την χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών πραγματοποιήθηκε σημειακή μεταλλαξιγένεση στην θέση φωσφορυλίωσης Ser-652 από τις ERK1/2. Τα μεταλλάγματα mS652A και mS652D δημιουργήθηκαν στον φορέα pGEX-4T1 και η αλληλούχηση τους επιβεβαίωσε την επιτυχία της σημειακής μεταλλαξιγένεσης.

4) Τον έλεγχο έκφρασης των μεταλλαγμάτων σε κύτταρα HeLa. Μετά την μεταλλαξιγένεση τα cDNA των mS652A και mS652D υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pcDNA3. Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αγρίου τύπου και με τα δύο (2) μεταλλάγματα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι οι τρεις (3) μορφές του mHIF-1α εκφράζονται κανονικά στα κύτταρα HeLa ενώ αυτά του έμμεσου ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν ότι η μορφή S652A του mHIF1α μοιράζεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ενώ η S652D είναι αποκλειστικά πυρηνική.

Τα αποτελέσματα που αφορούν το μετάλλαγμα S652A αν και συμφωνούν δεν εμφανίζουν τόσο ισχυρό φαινότυπο σε σχέση με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου που σχετίζονται με το ανθρώπινο μετάλλαγμα S641/3A στο οποίο ο φαινότυπος των κυττάρων που επιμολύνθηκαν ήταν περισσότερο ξεκάθαρος λόγω του ότι εμφάνιζαν κυρίαρχο κυτταροπλασματικό εντοπισμό [83]. Ένας πιθανός λόγος που παρατηρείται αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο (2) οργανισμών είναι η πιο μεγάλη

σταθερότητα του mHIF-1α σε σύγκριση με τον ανθρώπινο μεταγραφικό παράγοντα. Το cDNA του mHIF-1α από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 mHIF-1α Myc που είχαμε στη διάθεση μας ήταν ήδη μεταλλαγμένο στις θέσεις υδροξυλίωσης από τις PHDs (που είναι υπεύθυνες για την σταθερότητα του) στα κατάλοιπα προλίνης αλλά και στην θέση υδροξυλίωσης από την FIH στο κατάλοιπο ασπαραγίνης (που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση με τις CBP/p300) [11, 16]. Επομένως, η ποσότητα του mHIF-1α που σταθεροποιείται να είναι αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα η έξοδος του από το κύτταρο να περιορίζεται σε σχέση με τον ανθρώπινο, καθώς κορεννύεται ο μηχανισμός εξόδου. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι ότι εφόσον εκλείπει η θέση φωσφορυλίωσης από τις FIH ο συγκεκριμένος κλώνος να εμφανίζει μεγαλύτερη αγχιστεία με τις CBP/p300 [11, 16] και άρα μεγαλύτερη συγκράτηση σε στοιχεία της χρωματίνης και καθυστερημένη έξοδο. Αντιθέτως, ο ανθρώπινος HIF-1α είναι αγρίου τύπου με αποτέλεσμα να υπόκειται σε ρύθμιση από το οξυγόνο σε σύγκριση με τον mHIF-1α ο οποίος δεν υδροξυλιώνεται και έτσι δεν αποικοδομείται μέσω του πρωτεασώματος και ούτε έχει διαταραχθεί η σχέση του με την FIH. Έτσι πιθανόν, ο ανθρώπινος HIF-1α που φαίνεται με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού να είναι αυτός που υπόκειται σε ελεγχόμενη εξαγωγή από τον πυρήνα και συνδέεται με την μορταλίνη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τέλος, ένας ακόμη λόγος είναι ο βαθμός συντήρησης της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-1α καθώς όπως αναφέρθηκε, μόνο η μια (1) από τις δύο (2) θέσεις φωσφορυλίωσης του hHIF-1α είναι συντηρημένη και στον ποντικό (Ser-652) με αποτέλεσμα την μειωμένη έξοδο του mHIF-1α S652A λόγω της μικρότερης αγχιστείας της περιοχής του σήματος NES με την CRM1 [83].

Όσον αφορά το μετάλλαγμα S652D ο φαινότυπος είναι ξεκάθαρος, και όμοιος με τον ανθρώπινο, καθώς ο mHIF-1α παρουσιάζει αποκλειστικά πυρηνική κατανομή. Μια πιθανή εξήγηση που συμβαίνει αυτό είναι αφενός μεν η παρεμπόδιση της εξόδου του μεταγραφικού παράγοντα από τον πυρήνα αλλά και αφετέρου η δέσμευση σε στοιχεία της χρωματίνης [64]. Τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού συμβαδίζουν με αυτά της μέτρησης της δραστηριότητας της λουσιφεράσης στα οποία ο mHIF-1α wt παρουσιάζει υψηλή μεταγραφική ενεργότητα, ο mHIF-1α S652A στατιστικώς σημαντικά μειωμένη και ο mHIF-1α S652D την υψηλότερη λόγω μεγαλύτερης κατανομής της μορφής αυτής στον πυρήνα των κυττάρων.

Σε εξέλιξη βρίσκονται πειράματα που αφορούν την υποκλωνοποίηση των μεταλλαγμάτων S652A και S652D στον φορέα pEGFP-C1 για την μελέτη έκφρασης του μέσω μικροσκοπίας φθορισμού όπως έγινε και στην περίπτωση του pcDNA3 mHIF-1α-Myc.

Μελλοντικά, είναι δυνατή η απόκτηση του αγρίου τύπου mHIF-1α, δηλαδή χωρίς τις μεταλλάξεις στις θέσεις υδροξυλίωσης, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος που θα προκύψει, έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα που αφορούν τον ανθρώπινο HIF-1α. Ακόμη, ο έλεγχος της έκφρασης των μεταλλαγμάτων είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί και σε κυτταρικές σειρές ποντικού όπως η 3T3-L1 αλλά κυρίως σε καρκινικά κύτταρα ποντικού στα οποία το μονοπάτι των ERK1/2 είναι υπερενργό. Τέλος, αφού συλλεχθούν όλα τα απαραίτητα δεδομένα και στοιχεία που αφορούν τον mHIF-1α μπορούν να πραγματοποιηθούν και *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα ώστε να αναπτυχθούν θεραπευτικές επιλογές που θα χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση του καρκίνου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Gupta, K., Madan, E., Sayyid, M., Arias-Pulido, H., Moreno, E., Kuppusamy, P., & Gogna, R. (2014). Oxygen regulates molecular mechanisms of cancer progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 33(1), 183–215. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9464-2>
- 2) Wilson, J. W., Shakir, D., Batic, M., Frost, M., & Rocha, S. (2020). Oxygen-sensing mechanisms in cells. *The FEBS journal*, 287(18), 3888–3906. <https://doi.org/10.1111/febs.15374>
- 3) Jagannathan, L., Cuddapah, S., & Costa, M. (2016). Oxidative stress under ambient and physiological oxygen tension in tissue culture. *Current pharmacology reports*, 2(2), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0050-5>
- 4) MacIntyre N. R. (2014). Tissue hypoxia: implications for the respiratory clinician. *Respiratory care*, 59(10), 1590–1596. <https://doi.org/10.4187/respcare.03357>
- 5) Fajersztajn, L., & Veras, M. M. (2017). Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth defects research*, 109(17), 1377–1385. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1142>
- 6) Quindry, J., Dumke, C., Slivka, D., & Ruby, B. (2016). Impact of extreme exercise at high altitude on oxidative stress in humans. *The Journal of physiology*, 594(18), 5093–5104. <https://doi.org/10.1113/JP270651>
- 7) Luks, A. M., Swenson, E. R., & Bärtsh, P. (2017). Acute high-altitude sickness. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 26(143), 160096. <https://doi.org/10.1183/16000617.0096-2016>
- 8) Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., & Du, G. (2018). PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular medicine reports*, 18(4), 3547–3554. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>
- 9) Bao, M. H., & Wong, C. C. (2021). Hypoxia, Metabolic Reprogramming, and Drug Resistance in Liver Cancer. *Cells*, 10(7), 1715. <https://doi.org/10.3390/cells10071715>
- 10) Choudhry, H., & Harris, A. L. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell metabolism*, 27(2), 281–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>
- 11) Mylonis, I., Chachami, G., & Simos, G. (2021). Specific Inhibition of HIF Activity: Can Peptides Lead the Way?. *Cancers*, 13(3), 410. <https://doi.org/10.3390/cancers13030410>
- 12) Dengler, V. L., Galbraith, M., & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(1), 1–15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- 13) Elzakra, N., & Kim, Y. (2021). HIF-1 α Metabolic Pathways in Human Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1280, 243–260. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_17
- 14) Tian, H., McKnight, S. L., & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*, 11(1), 72–82. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.72>
- 15) Befani, C., & Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233(12), 9087–9098. <https://doi.org/10.1002/jcp.26805>
- 16) Albanese, A., Daly, L. A., Mennerich, D., Kietzmann, T., & Sée, V. (2020). The Role of Hypoxia-Inducible Factor Post-Translational Modifications in Regulating Its Localisation, Stability, and Activity. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 268. <https://doi.org/10.3390/ijms22010268>

- 17) Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells*, 29(5), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>
- 18) Davis, C. K., Jain, S. A., Bae, O. N., Majid, A., & Rajanikant, G. K. (2019). Hypoxia Mimetic Agents for Ischemic Stroke. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 175. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00175>
- 19) Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A., & Ohh, M. (2005). Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(11), 1396–1406. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3788com>
- 20) Retrieved from GeneCards THE HUMAN GENE DATA BASE <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HIF1A>
- 21) Retrieved from UniProt <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q16665/entry#sequences>
- 22) Kietzmann, T., Mennerich, D., & Dimova, E. Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00011>
- 23) Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J. M., Braliou, G. G., Görlich, D., & Simos, G. (2009). Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(2), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.093>
- 24) Kaelin, W. G., Jr, & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*, 30(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- 25) Semenza G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc11871>
- 26) Retrieved from UniProt <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q61221/entry#function>
- 27) Görlach A. (2009). Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Current pharmaceutical design*, 15(33), 3844–3852. <https://doi.org/10.2174/138161209789649420>
- 28) Luo, G., Gu, Y. Z., Jain, S., Chan, W. K., Carr, K. M., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (1997). Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus. *Gene expression*, 6(5), 287–299.
- 29) Iyer, N. V., Leung, S. W., & Semenza, G. L. (1998). The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics*, 52(2), 159–165. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5416>
- 30) Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development*, 12(2), 149–162. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.149>
- 31) Gonzalez, F. J., Xie, C., & Jiang, C. (2018). The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0096-z>
- 32) Ryan, H. E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J. M., & Johnson, R. S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer research*, 60(15), 4010–4015.
- 33) Kheshtchin, N., Arab, S., Ajami, M., Mirzaei, R., Ashourpour, M., Mousavi, N., Khosravianfar, N., Jadidi-Niaragh, F., Namdar, A., Noorbakhsh, F., & Hadjati, J. (2016). Inhibition of HIF-1α

- enhances anti-tumor effects of dendritic cell-based vaccination in a mouse model of breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : *CII*, 65(10), 1159–1167. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1879-5>
- 34) Gong, Z., Jia, H., Xue, L., Li, D., Zeng, X., Wei, M., Liu, Z., Tong, M. C. F., & Chen, G. G. (2022). The emerging role of transcription factor FOXP3 in thyroid cancer. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 23(3), 421–429. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09684-8>
 - 35) Itatani, Y., Kawada, K., Yamamoto, T., & Sakai, Y. (2018). Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1232. <https://doi.org/10.3390/ijms19041232>
 - 36) Branco-Price, C., Zhang, N., Schnelle, M., Evans, C., Katschinski, D. M., Liao, D., Ellies, L., & Johnson, R. S. (2012). Endothelial cell HIF-1 α and HIF-2 α differentially regulate metastatic success. *Cancer cell*, 21(1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.017>
 - 37) Jelkmann W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology*, 589(Pt 6), 1251–1258. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057>
 - 38) Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual review of biochemistry*, 87, 697–724. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
 - 39) Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 5(5), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
 - 40) Albadari, N., Deng, S., & Li, W. (2019). The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert opinion on drug discovery*, 14(7), 667–682. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613370>
 - 41) Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *Journal of cellular biochemistry*, 116(5), 696–703. <https://doi.org/10.1002/jcb.25074>
 - 42) Olson, N., & van der Vliet, A. (2011). Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 25(2), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.12.010>
 - 43) D'Ignazio, L., Bandarra, D., & Rocha, S. (2016). NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS journal*, 283(3), 413–424. <https://doi.org/10.1111/febs.13578>
 - 44) Papadakis, A. I., Paraskeva, E., Peidis, P., Muaddi, H., Li, S., Raptis, L., Pantopoulos, K., Simos, G., & Koromilas, A. E. (2010). eIF2 $\{\alpha\}$ Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 $\{\alpha\}$. *Cancer research*, 70(20), 7820–7829. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0215>
 - 45) Pawlus, M. R., Wang, L., & Hu, C. J. (2014). STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene*, 33(13), 1670–1679. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.115>
 - 46) Molinari, F., & Frattini, M. (2014). Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*, 3, 326. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00326>
 - 47) Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., & Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *The Journal of biological chemistry*, 278(16), 14013–14019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209702200>
 - 48) Mandl, M., & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 β): is it a rare exception?. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 20(1), 215–220. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00032>

- 49) Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., & Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.1>
- 50) Wu, D., Zhang, R., Zhao, R., Chen, G., Cai, Y., & Jin, J. (2013). A novel function of novobiocin: disrupting the interaction of HIF 1 α and p300/CBP through direct binding to the HIF 1 α C-terminal activation domain. *PloS one*, 8(5), e62014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062014>
- 51) Farrell, A. S., & Sears, R. C. (2014). MYC degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(3), a014365. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014365>
- 52) Li, Y., Sun, X. X., Qian, D. Z., & Dai, M. S. (2020). Molecular Crosstalk Between MYC and HIF in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 590576. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.590576>
- 53) Schopf, F. H., Biebl, M. M., & Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(6), 345–360. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>
- 54) Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R. N., & Semenza, G. L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Molecular cell*, 25(2), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.001>
- 55) Duff, D., & Long, A. (2017). Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. *Cellular signalling*, 35, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.005>
- 56) Kanapathipillai M. (2018). Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers*, 10(6), 154. <https://doi.org/10.3390/cancers10060154>
- 57) Obacz, J., Pastorekova, S., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2013). Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Molecular cancer*, 12(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-93>
- 58) Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of biomedical research*, 27(4), 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>
- 59) Zhang, C., Liu, J., Wang, J., Zhang, T., Xu, D., Hu, W., & Feng, Z. (2021). The Interplay Between Tumor Suppressor p53 and Hypoxia Signaling Pathways in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 648808. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648808>
- 60) Yoon, A. R., Wadhwa, R., Kaul, S. C., & Yun, C. O. (2022). Why is Mortalin a Potential Therapeutic Target for Cancer?. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 914540. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.914540>
- 61) 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. *Journal of cell science*, 130(2), 466–479. <https://doi.org/10.1242/jcs.195339>
- 62) Yfantis, A., Mylonis, I., & Simos, G. (2023). Direct interaction between mortalin and HIF-1 α at the mitochondria inhibits apoptosis by blocking recruitment of Bax. *The FEBS journal*, 10.1111/febs.16762. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/febs.16762>
- 63) Box, J. K., Paquet, N., Adams, M. N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC molecular biology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12867-016-0073-9>

- 64) 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. *Molecular oncology*, 15(12), 3468–3489. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13080>
- 65) Han, Z. J., Feng, Y. H., Gu, B. H., Li, Y. M., & Chen, H. (2018). The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *International journal of oncology*, 52(4), 1081–1094. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4280>
- 66) Geng, H., Liu, Q., Xue, C., David, L. L., Beer, T. M., Thomas, G. V., Dai, M. S., & Qian, D. Z. (2012). HIF1 α protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35496–35505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400697>
- 67) Seo, J. H., Park, J. H., Lee, E. J., Vo, T. T., Choi, H., Jang, J. K., Wee, H. J., Ahn, B. J., Cha, J. H., Shin, M. W., & Kim, K. W. (2015). Autoacetylation regulates differentially the roles of ARD1 variants in tumorigenesis. *International journal of oncology*, 46(1), 99–106. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2708>
- 68) Liu, X., Chen, Z., Xu, C., Leng, X., Cao, H., Ouyang, G., & Xiao, W. (2015). Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic acids research*, 43(10), 5081–5098. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv379>
- 69) Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal*, 428(2), 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>
- 70) Filippopoulou, C., Simos, G., & Chachami, G. (2020). The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview. *Cells*, 9(11), 2359. <https://doi.org/10.3390/cells9112359>
- 71) Shao, R., Zhang, F. P., Tian, F., Anders Friberg, P., Wang, X., Sjöland, H., & Billig, H. (2004). Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1 α in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS letters*, 569(1-3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.079>
- 72) Sharma, V., Fernando, V., Letson, J., Walia, Y., Zheng, X., Fackelman, D., & Furuta, S. (2021). S-Nitrosylation in Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4600. <https://doi.org/10.3390/ijms22094600>
- 73) Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W., & Li, C. Y. (2007). Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Molecular cell*, 26(1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.024>
- 74) Flügel, D., Görlach, A., Michiels, C., & Kietzmann, T. (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology*, 27(9), 3253–3265. <https://doi.org/10.1128/MCB.00015-07>
- 75) Xu, D., Yao, Y., Lu, L., Costa, M., & Dai, W. (2010). Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *The Journal of biological chemistry*, 285(50), 38944–38950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160325>
- 76) Catarzi, D., Varano, F., Vigiani, E., Lambertucci, C., Spinaci, A., Volpini, R., & Colotta, V. (2022). Casein Kinase 1 δ Inhibitors as Promising Therapeutic Agents for Neurodegenerative Disorders. *Current medicinal chemistry*, 29(27), 4698–4737. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220301115124>
- 77) Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E., & Simos, G. (2010). Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of cell science*, 123(Pt 17), 2976–2986. <https://doi.org/10.1242/jcs.068122>

- 78) Kourti, M., Ikonou, G., Giakoumakis, N. N., Rapsomaniki, M. A., Landegren, U., Sinioglou, S., Lygerou, Z., Simos, G., & Mylonis, I. (2015). CK1 δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1 α /ARNT complex formation. *Cellular signalling*, 27(6), 1129–1140. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.017>
- 79) Cam, H., Easton, J. B., High, A., & Houghton, P. J. (2010). mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Molecular cell*, 40(4), 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.030>
- 80) Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- 81) Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., & Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry*, 274(46), 32631–32637. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32631>
- 82) Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., & Michiels, C. (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS letters*, 468(1), 53–58. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01181-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01181-9)
- 83) 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 . *The Journal of biological chemistry*, 281(44), 33095–33106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605058200>
- 84) 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. *The Journal of biological chemistry*, 283(41), 27620–27627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803081200>
- 85) Rashid, M., Zadeh, L. R., Baradaran, B., Molavi, O., Ghesmati, Z., Sabzichi, M., & Ramezani, F. (2021). Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene*, 798, 145796. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145796>
- 86) Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- 87) Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- 88) Chen, Y., Zhao, B., Zhu, Y., Zhao, H., & Ma, C. (2019). HIF-1-VEGF-Notch mediates angiogenesis in temporomandibular joint osteoarthritis. *American journal of translational research*, 11(5), 2969–2982.
- 89) Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*, 9(6), 677–684. <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>
- 90) Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- 91) Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
- 92) Mylonis, I., Simos, G., & Paraskeva, E. (2019). Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*, 8(3), 214. <https://doi.org/10.3390/cells8030214>

- 93) Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6282), 175–180. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4405>
- 94) Liao, D., Corle, C., Seagroves, T. N., & Johnson, R. S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer research*, 67(2), 563–572. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2701>
- 95) Kitajima, Y., & Miyazaki, K. (2013). The Critical Impact of HIF-1a on Gastric Cancer Biology. *Cancers*, 5(1), 15–26. <https://doi.org/10.3390/cancers5010015>
- 96) Unruh, A., Ressel, A., Mohamed, H. G., Johnson, R. S., Nadrowitz, R., Richter, E., Katschinski, D. M., & Wenger, R. H. (2003). The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*, 22(21), 3213–3220. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206385>
- 97) Kheshtchin, N., Arab, S., Ajami, M., Mirzaei, R., Ashourpour, M., Mousavi, N., Khosravianfar, N., Jadidi-Niaragh, F., Namdar, A., Noorbakhsh, F., & Hadjati, J. (2016). Inhibition of HIF-1a enhances anti-tumor effects of dendritic cell-based vaccination in a mouse model of breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 65(10), 1159–1167. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1879-5>
- 98) Gimple, R. C., & Wang, X. (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Frontiers in oncology*, 9, 965. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00965>
- 99) Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., & Stahl, D.A. (2014). *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*. Ηράκλειο: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
- 100) Jenkins, G. J., Williams, G. L., Beynon, J., Ye, Z., Baxter, J. N., & Parry, J. M. (2002). Restriction enzymes in the analysis of genetic alterations responsible for cancer progression. *The British journal of surgery*, 89(1), 8–20. <https://doi.org/10.1046/j.0007-1323.2001.01968.x>
- 101) ATCC. (2023). HeLa. Retrieved May 18, 2023, from <https://www.atcc.org>
- 102) ATCC. (2023). 3T3-L1. Retrieved May 18, 2023, from <https://www.atcc.org>
- 103) Marinus, M. G., & Løbner-Olesen, A. (2014). DNA Methylation. *EcoSal Plus*, 6(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013>
- 104) Agilent Technologies. (2023). QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Retrieved May 17, 2023, from <https://www.agilent.com/product/mutagenesis-cloning/mutagenesis-kits/site-directed-mutagenesis-kits/quickchange-ii-233117>
- 105) New England Biolabs. PCR Using Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) Protocol. Retrieved May 18, 2023, from <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>
- 106) Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- 107) Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- 108) Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(4), 102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- 109) Fang, J. Y., & Richardson, B. C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet. Oncology*, 6(5), 322–327. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70168-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70168-6)